UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Agrícola y Bromatología

Tesis Doctoral

Valorización de semillas de moringa mediante procesos germinativos y su aplicación en alimentos de alto valor nutritivo y funcional

Karín Elizabeth Coello Ojeda

Madrid, junio 2022

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Agrícola y Bromatología

Valorización de semillas de moringa mediante procesos germinativos y su aplicación en alimentos de alto valor nutritivo y funcional

Memoria presentada por:

Karín Elizabeth Coello Ojeda

Para optar al grado de:

Doctora en Ciencias de la Alimentación

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. Juana Frías Arevalillo

Dra. Elena Peñas Pozo

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

CSIC CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ICTAN INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN

GOBIERNO DE ESPAÑA | MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN

CSIC CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ICTAN INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN

JUANA FRÍAS AREVALILLO, INVESTIGADORA CIENTÍFICA, Y ELENA PEÑAS POZO, CIENTÍFICA TITULAR, PERTENECIENTES AL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN (ICTAN) DE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC),

HACEN CONSTAR QUE:

La presente memoria de tesis doctoral titulada **"Valorización de semillas de moringa mediante procesos germinativos y su aplicación en alimentos de alto valor nutritivo y funcional"** ha sido realizada por Dña. Karín Elizabeth Coello Ojeda bajo nuestra dirección para optar al título de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, dando nuestra conformidad para que sea presentada y defendida.

Madrid, 2 de junio de 2022

Dra. Juana Frías Arevalillo

Dra. Elena Peñas Pozo

Visto Bueno: TUTORA

Dra. Yolanda Aguilera Gutierrez
Departamento de Química Agrícola y Bromatología
Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

"...toda gran obra, en arte como en ciencia, es el resultado de una gran pasión puesta al servicio de una gran idea".

Santiago Ramón y Cajal

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento, en ocasiones, no puede expresarse en palabras por lo inmenso que es; así que, aunque me quedaré corta de palabras, expresaré mi gratitud a quienes con su presencia hicieron posible que yo alcance esta nueva meta, que me ha tomado más de lo esperado…

A mis dos excelsas directoras de tesis: a ambas les debo más que la formación técnica que adquirí, de ellas aprendí el tesón y a ser mucho más organizada. Serán siempre mis referentes en el trabajo investigativo que deberé desarrollar en mi país, Ecuador.

A Juana Frías, inteligente, tenaz, con talento científico inigualable, mi más grande admiración y eterno agradecimiento. Se queda grabado por siempre en mi memoria su abrazo, su guía, su atención, preocupación y acompañamiento en cada paso que dí.

A Elena Peñas, por guiarme con su amplio conocimiento y compartir con alegría, días y horas interminables de laboratorio, horarios y esfuerzos extraordinarios, gracias infinitas.

A Cristina Martínez, por su colaboración y apoyo en mi formación científica, por escucharme y ofrecerme su cálida amistad.

A Yolanda Aguilera, mi tutora, que siempre estuvo cuando la necesité, su ayuda siempre fue incondicional y su apoyo oportuno en las vicisitudes que se presentaron, especialmente durante la pandemia.

A Tiziana Fornari, siempre atenta y gentil, con su ayuda pude avanzar con pasos más firmes.

A Natalia Aparicio, por su ayuda incondicional y los mejores consejos, tanto para el desarrollo de los ensayos en el laboratorio como para los lugares emblemáticos de Madrid; gracias por tus ideas y consejos.

A Luz Paucar y a Claudia Abeijón, agradezco su compañía, las risas, los paseos.

A Laura Lagertera, del Instituto de Química Médica (IQM-CSIC), buena vecina de laboratorio y buena onda siempre.

A Sara Bautista por su compañía y ser mi ejemplo a seguir para mi defensa de tesis.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN) por la acogida y facilidades prestadas durante mi formación doctoral. A todo el personal de esta Institución que estuvo presto a orientarme y ofrecerme información y ayuda.

A Esperanza y Esther, por su empatía y el té.

A Sancho, mi tutor de la UM, por ser mi primera inspiración y, a mi familia murciana, a quienes los llevo en mis recuerdos con cariño.

A Ligia y su hijo Andrés, que me acogieron como parte de su familia en mi primera estancia en Madrid.

A Angelova, su pequeña hija y su madre por preocuparse de mí y hacerme sentir en casa.

A Beto y su madre Silvia, por su confianza y amistad.

A Angelita y Shila, por hacer mis estancias más soportables. Por multiplicar su amistad muchas veces. Siempre recordaré su calidez, los paseos, las risas, los cumpleaños… ¡gracias por el recibimiento de siempre!

A los chicos BPC: Juan Luis, Natividad, Beatriz, Cristina, Elena, Gema, por compartir, por las veladas divertidas, el *chat*, la comida y las personas.

A Douglas, por su solidaridad.

A Aaron, por una amistad coincidencialmente impensada.

A Alejandro, por ser muy especial, compañía y contención en buenos y malos momentos.

A Patricio y a Freddy por su impulso, su amistad sincera, a ellos les debo parte de este camino.

A los directivos de ESPOL, por su confianza y respaldo.

A mis colegas y compañeros de trabajo en FIMCP y de la carrera de Ingeniería en Alimentos, por su apoyo y por felicitar cada pequeño logro.

A mis alumnos de ESPOL, especialmente quienes cursaron *Desarrollo e Innovación de Alimentos* y *Desarrollo de Nuevos Productos Alimenticios*, en el II Semestre 2017 y 2019, y en el I y II Semestre 2018, por ser autónomos, comprensivos y perseverantes.

A Fanny, mi ayudante de investigación, muy colaboradora, inteligente, trabajadora, por toda la ayuda desinteresada que me brindó, le deseo lo mejor.

A mis hermanos Miguel y Rosa, que siempre han estado para mí, cuidándome. A mis cuñados Nela y Geovanny y a mis sobrinos, prestándome sus recursos y su ayuda incondicional, alegrando mis días.

A mis padres, Hugo y Elizabeth, que se transformaron en más que abuelos para mis hijos ¡Qué bendición tenerlos!

A mis amados hijos, Camille y Daniel, mi razón de vivir y de ser quien soy, gracias por soportar mis ausencias y todo el sacrificio de estos años, esperando un mejor porvenir. Con todo mi amor, les entrego este esfuerzo.

A mis abuelos, que desde el cielo me han cuidado cada día.

Gracias a Dios, mi Padre Celestial, por estar a mi lado acompañándome en cada paso, en cada decisión, en momentos oscuros y en los más radiantes.

Y el agradecimiento más profundo a mí misma, por convencerme y llegar hasta aquí y continuar…

APORTACIONES CIENTÍFICAS

La presente memoria ha dado lugar a las siguientes aportaciones:

Publicaciones científicas

1. **Coello, K. E.**, Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., Cartea, M. E., Abilleira, R., & Peñas, E. (2020). Potential of germination in selected conditions to improve the nutritional and bioactive properties of moringa (*Moringa oleifera* L.). *Foods*, 9, 1639. DOI: 10.3390/foods9111639.
2. **Coello, K. E.**, Peñas, E., Martinez-Villaluenga, C., Cartea, M. E., Velasco, P., & Frias, J. (2021). Pasta products enriched with moringa sprout powder as nutritive dense foods with bioactive potential. *Food Chemistry*, *360*, 130032. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130032.
3. **Coello, K. E.**, Peñas, E., Martinez-Villaluenga, C., Cartea, M. E., Velasco, P., & Frias, J. (2022). Manufacture of healthy snack bars supplemented with moringa sprout powder. *LWT-Food Science and Technology*, *154*, 112828. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112828

Contribuciones a Congresos

1. **Coello, K. E.,** Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., & Frias, J. Impact of germination conditions on nutritional and functional quality of moringa. VI Congreso Ecuatoriano de Ingeniería en Alimentos, I Congreso Internacional de Cereales, Leguminosas y Afines y XVI Jornadas de Ciencia y Tecnología en Alimentos, 25-28 julio 2018, Cuenca (Ecuador).
2. **Coello-Ojeda, Karín**, Peñas Elena, Martínez-Villaluenga, Cristina, Frías, Juana. Impacto de la germinación sobre el valor funcional de moringa. X Congreso Nacional CyTA-CESIA, 15-17 mayo 2019, León (España).
3. **Coello, K. E.,** J. Frías, C. Martinez-Villaluenga, M. E. Cartea, P. Velasco, E. Peñas. Development of healthy pasta products enriched with sprouted moringa flour. 34th EFFoST International Conference, 10-12 noviembre 2020, evento online.
4. **Coello, K. E.,** J. Frías, C. Martinez-Villaluenga, M. E. Cartea, P. Velasco, E. Peñas. Adición de germinados de moringa y su impacto sobre el perfil nutricional y funcional

de un snack saludable. II Congreso Internacional de Cereales, Leguminosas y Afines, CICLA 2021, 11–15 octubre 2021, Ambato (Ecuador).

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS 19

I. RESUMEN/SUMMARY 23

II. INTRODUCCIÓN 31

2.1. Distribución geográfica, características botánicas y agronómicas de la moringa 33

2.2. Usos potenciales de la moringa 35

2.3 Composición nutricional y fitoquímica de las semillas de moringa 36

2.3.1. Composición nutricional de la semilla de moringa 36

2.3.2. Composición fitoquímica de la semilla de moringa 41

2.3.2.1. Glucosinolatos 42

2.3.2.2. Esteroles y estanoles 43

2.3.2.3. Compuestos fenólicos 44

2.3.2.4. Saponinas 45

2.3.2.5. Péptidos bioactivos 46

2.4. Actividades biológicas de la semilla de moringa 46

2.4.1. Actividad antioxidante 46

2.4.2. Actividad anti-inflamatoria 49

2.4.3. Actividad anticancerígena 53

2.4.4. Actividad antidiabética 57

2.5. Aplicación de la semilla de moringa en el desarrollo de alimentos 58

2.6. La germinación: estrategia tecnológica para mejorar las propiedades nutricionales y bioactivas de la moringa 62

2.6.1. Aspectos generales de la germinación 62

2.6.2. Influencia de la germinación en el contenido y biodisponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos de la moringa 63

III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 67

3.1. Justificación 69

3.2. Hipótesis 70

3.3. Objetivos 71

IV. RESULTADOS 73

4.1. FASE 1. Optimización de las condiciones de germinación para la obtención de harinas de alto valor añadido a partir de la semilla de moringa 75

4.2. FASE 2. Producción y caracterización de alimentos saludables empleando harina de moringa germinada 93

4.2.1. Desarrollo de pasta tipo tallarines enriquecida con harina de moringa germinada 93

4.2.2. Desarrollo de snacks saludables (barritas de cereales) enriquecidos con harina de moringa germinada 103

V. DISCUSIÓN GENERAL 115

5.1. Fase 1. Optimización de las condiciones de germinación para la obtención de harinas de alto valor añadido a partir de la semilla de moringa (Publicación 1) 118

5.2. Fase 2. Producción y caracterización de alimentos saludables empleando harina de moringa germinada 129

5.2.1. Desarrollo de pasta (tallarines) enriquecida con harina de moringa germinada (Publicación 2) 129

5.2.2. Desarrollo de snacks saludables (barritas de cereales) enriquecidos con harina de moringa germinada (Publicación 3) 138

VI. CONCLUSIONES 151

VII. BIBLIOGRAFÍA 155

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAT	Aminoácidos totales
AchE	Acetilcolinesterasa
ALT	Alanina transaminasa
AOP	Gen que codifica enzimas dioxigenasas dependientes de α-ketoglutarato
ASM	Aceite de semilla de moringa
AST	Aspartato aminotransferasa
α-TE	α-tocoferol equivalentes
BchE	Butirilcolinesterasa
BCL2	Proteína de linfoma 2 de células B
BIT	Bencil isotiocianato
°C	Grado Celsius
Ca	Calcio
CAT	Catalasa
CFL	Compuestos fenólicos libres
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CPSM	Concentrado proteico de semilla de moringa
Cu	Cobre
CUPRAC	Poder reductor del cobre
CYP	Gen que codifica las ciclofilinas (citocromo P450)
Cys	Cisteína
€	Euros
EAA	Aminoácidos esenciales
ECA	Enzima convertidora de angiotensina I
EESM	Extracto etanólico de semilla de moringa
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAL	Fosfatasa alcalina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fe	Hierro
FHEM	Fracción obtenida en hexano a partir de extractos etanólicos
FRAP	Poder reductor del hierro
g	Gramos

G'	Módulo de almacenamiento
G"	Módulo de pérdida
GABA	Acido γ-aminobutírico
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GGT	Gamma-glutamil transferasa
GLS	Glucosinolatos totales
GOT	Glutamato oxalacetato transaminasa
Gp91phox	Subunidad de la NADPH oxidasa
GPx	Glutatión peroxidasa
GSH	Glutatión reducido
GPT	Glutamato piruvato transaminasa.
Hb	Hemoglobina
HSM	Harina de semilla de moringa
HSMF	Harina de semilla de moringa fermentada
HSMG	Harina de semilla de moringa germinada
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JCR	Journal Citation Reports
K	Potasio
kDa	Kilo-dalton
L	Litro
Leu	Leucina
LHD	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
Lys	Lisina
M	Molar
MDA	Malondialdehído
Mg	Magnesio
mg	Miligramos
MIC-1	Moringa isotiocianato-1
mL	Mililitros
Mn	Manganeso
MSP	Harina de moringa germinada
MSR	Metodología de superficie de respuesta
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados

Na	Sodio
ND	No determinado
NEAA	Aminoácidos no esenciales
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud/World Health Organization
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
P	Fósforo
PAL	Fenilalanina amoníaco liasa
Phe	Fenilalanina
ps	Peso seco
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
ROS	Especies reactivas de oxígeno
$	Dólar
SM	Semilla de moringa
SOD	Superóxido dismutasa
SZT	Estrepozotocina
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TE	Trolox equivalentes
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TPA	Análisis de perfil de textura
Val	Valina
Zn	Zinc

I. RESUMEN/SUMMARY

La moringa, tradicionalmente conocida como árbol milagroso o árbol de rábano picante, es una planta de crecimiento rápido y resistente a las sequías, nativo de zonas de clima tropical y subtropical con suelos áridos. Originaria del sur asiático y de África, el cultivo de moringa se está generalizando en otras zonas del mundo principalmente debido a su capacidad de adaptación a zonas con bajas precipitaciones ayudando, de este modo, a la reconstitución de suelos desestructurados y a frenar el cambio climático. Todas las partes de la moringa son muy apreciadas por ser una fuente excepcional de nutrientes y de compuestos bioactivos relacionados con la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas, y ha formado parte de la medicina tradicional en las zonas donde se cultiva. En el caso particular de la alimentación humana y usos terapéuticos, se han estudiado fundamentalmente hojas, flores, frutos y raíces, mientras que las semillas han sido escasamente exploradas.

Las semillas de moringa son ricas en proteínas, lípidos, hidratos de carbono, minerales y vitaminas, responsables de su alto valor nutricional. Además, son fuente de compuestos con actividad biológica como los compuestos fenólicos y los glucosinolatos, que confieren propiedades destacables como antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética e, incluso, anticancerígena, asociadas a su potencial para reducir el riesgo de enfermedades de elevada incidencia en la sociedad actual. Recientemente, las semillas de moringa se han utilizado en el desarrollo de alimentos como panes y galletas, principalmente para aportar mejoras en sus propiedades nutricionales, si bien las propiedades tecnofuncionales pueden verse modificadas.

La germinación es una tecnología natural que se ha empleado tradicionalmente para mejorar el aroma, la textura y la palatabilidad de las semillas y que en la actualidad ha adquirido gran interés como una estrategia económica y sostenible para incrementar sus propiedades nutricionales y beneficiosas para la salud. La obtención de harinas germinadas y su empleo como ingredientes en alimentos de alto valor añadido se ha convertido en una de las tendencias innovadoras en la industria agroalimentaria.

Con estos antecedentes, el objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido la valorización de la semilla de moringa mediante germinación para el desarrollo de harinas innovadoras y su aplicación como ingrediente funcional para mejorar el perfil nutricional y el potencial bioactivo de alimentos de alto consumo como pasta y snacks. Para ello, inicialmente se evaluó la influencia del tiempo y la temperatura de germinación sobre el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos de la semilla de moringa y mediante la herramienta estadística de metodología de superficie respuesta, MSR, se identificaron las condiciones óptimas de germinación que maximizaban su contenido (publicación 1). Se estableció que un tiempo de germinación de 24 h y una temperatura de 28 ºC favorecían el contenido de riboflavina,

glucosinolatos y la actividad antioxidante. Las harinas de moringa germinada en estas condiciones se utilizaron para la elaboración de pasta tipo tallarines, alimentos de alto consumo, y se estudió el efecto de su incorporación en distintas proporciones (5-30%) sobre su calidad nutricional, su potencial bioactivo y sus propiedades tecnológicas y sensoriales (publicación 2). La pasta obtenida presentó un mayor contenido de proteína, grasa, fibra dietética, cenizas, tiamina, riboflavina, GABA y glucosinolatos que la pasta control elaborada con harina de trigo. Además, los tallarines enriquecidos con harina de moringa germinada demostraron propiedades reológicas adecuadas, así como propiedades sensoriales aceptables a niveles 5-10%.

Con objeto de conseguir un alimento rico en GABA, se eligieron las condiciones de germinación que maximizaran su contenido, que se consiguieron a 36 ºC durante 96 h. Estas harinas, además, presentaban un elevado contenido en glucosinolatos (publicación 1). Con las harinas de moringa germinada en estas condiciones se formuló un snack tipo barrita de cereales lista para el consumo, alimentos que tienen una gran aceptación por parte de los consumidores. Se estudió la sustitución de harina de trigo por distintas proporciones de las harinas de moringa germinada (6-26%) para formular este tipo de snack. El prototipo de barrita elaborada con un 18% de harina de moringa germinada se seleccionó como la formulación óptima en base a pruebas de fracturabilidad (publicación 3). Estas barritas contenían mayores niveles de proteína, grasa, tiamina, riboflavina, aminoácidos totales y contenido relativo de ácidos grasos insaturados, así como un menor contenido en hidratos de carbono que la barrita control. La barrita suplementada con un 18% de harina de moringa germinada, además, fue una excelente fuente de GABA y glucosinolatos totales, además de presentar una alta actividad antioxidante. Las pruebas sensoriales realizadas pusieron de manifiesto su buena aceptabilidad sensorial por parte de panelistas ecuatorianos entrenados. Se realizó, a continuación, una estimación del precio de venta de las barritas fortificadas con un 18% de harina de moringa germinada teniendo en cuenta los costes de producción y se estableció en $ 0,75/unidad para el mercado ecuatoriano. Tras una encuesta a 104 participantes, el 79% mostró disposición a comprar este tipo de barritas y todos ellos estaban dispuestos a pagar el precio estimado.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la germinación es un proceso natural sostenible que aumenta la calidad nutricional, el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de las semillas de moringa, y las harinas funcionales obtenidas constituyen ingredientes muy atractivos para la elaboración de alimentos de alto consumo como pastas y snacks, mejorando su valor nutricional y sus propiedades saludables.

Moringa, traditionally known as miracle tree or horseradish tree, is a fast-growing, drought-resistant plant native to tropical and subtropical climate zones with arid soils. Native to South Asia and Africa, moringa cultivation is becoming widespread in other parts of the world mainly because of its ability to adapt to areas with low rainfall, thus helping to rebuild unstructured soils and slow climate change. All parts of moringa are highly valued for being an exceptional source of nutrients and bioactive compounds related to the prevention and treatment of chronic degenerative diseases, and it has been part of traditional medicine in the areas where it is cultivated. In the particular case of human nutrition and therapeutic uses, leaves, flowers, fruits and roots have been studied, while seeds have been scarcely explored.

Moringa seeds are rich in proteins, lipids, carbohydrates, minerals and vitamins, which are responsible for their high nutritional value. In addition, they are a good source of biologically active compounds such as phenolic compounds and glucosinolates, which provide remarkable beneficial properties such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, and even anticarcinogenic, associated with their potential to reduce the risk of diseases of high incidence in society. Recently, moringa seeds have been used for the development of foods such as breads and cookies, mainly to improve their nutritional properties, although the techno-functional properties may be modified.

Germination is a natural technology that has traditionally been used to improve the aroma, texture and palatability of seeds and, recently, it acquired great interest as an economical and sustainable strategy to increase their nutritional and health-promoting properties. The production of sprouted flours and their use as ingredients in high value-added foods has become one of the most innovative trends in the agri-food industry.

With this background, the objective of this PhD Thesis has been the valorization of moringa seed by germination for the development of innovative flours and their application as a functional ingredient to improve the nutritional profile and the bioactive potential of highly consumed foods such as pasta and snacks. With this objective, the influence of germination time and temperature on the content of nutrients and bioactive compounds of moringa seed was initially evaluated and, using the statistical tool of response surface methodology, RSM, the optimal germination conditions that maximized their content were identified (publication 1). It was established that a germination time of 24 h and a temperature of 28 °C favored the accumulation of riboflavin, glucosinolates and antioxidant activity. Moringa flours germinated under these conditions were used for the elaboration of fetticcini-type pasta, a highly consumed food, and the effect of their incorporation in different proportions (5-30%) on their nutritional quality, bioactive potential, and technological and sensory properties was studied (publication

2). The pasta obtained presented a higher content of protein, fat, dietary fiber, ash, thiamine, riboflavin, GABA and glucosinolates than the control pasta made with wheat flour. In addition, fettuccini enriched with germinated moringa flour demonstrated adequate rheological properties as well as acceptable sensory properties at 5-10% levels.

In order to achieve a GABA-enriched food, germination conditions were selected to maximize the content of this bioactive compound, which were achieved at 36 ºC for 96 h. These flours also had a high glucosinolate content (publication 1). A ready-to-eat cereal snack bar was formulated with the germinated moringa flours obtained under these germination conditions, since this type of foods are highly appreciated by consumers. The substitution of wheat flour by different proportions of the germinated moringa flour (6-26%) was studied to formulate snack bars. The prototype cereal bar made with 18% of germinated moringa flour was selected as the optimal formulation based on fracturability tests (publication 3). This bar contained higher levels of protein, fat, thiamine, riboflavin, total amino acids and relative unsaturated fatty acid content, as well as lower carbohydrate content than the control bar. The bar supplemented with 18% germinated moringa flour was also an excellent source of GABA and total glucosinolates, as well as having high antioxidant activity. The sensory tests revealed good sensory acceptability by trained Ecuadorian panelists. The selling price of fortified bars with 18% germinated moringa flour was then estimated, taking into account the production costs, and was set at $0.75 per unit for the Ecuadorian market. After a survey of 104 participants, 79% were willing to buy these bars and all of them were willing to pay the estimated price.

In view of the results obtained, it can be concluded that germination is a sustainable natural process that increases the nutritional quality, the content of bioactive compounds and the antioxidant activity of moringa seeds. The functional flours obtained are very attractive ingredients for the production of highly consumed foods such as pastas and snack bars, improving their nutritional value and their health promoting properties.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Distribución geográfica, características botánicas y agronómicas de la moringa

La moringa es un árbol dicotiledóneo de hoja perenne que pertenece al orden *Brassicales* y a la familia *Moringaceae* (Saini y col., 2016), comúnmente conocido como "árbol milagroso", “árbol de Ben”, “árbol de rábano picante” y “palillo de tambor”, entre otros nombres.

La familia *Moringaceae* está constituida por un único género (*Moringa*) que comprende 13 especies, distribuidas por la India (*M. oleifera* y *M. concanensis*), África (*M. arborea*, *M. borziana*, *M. longituba*, *M. ovalifolia*, *M. peregrina*, *M. pygmaea*, *M. rivae*, *M. ruspoliana* y *M. stenopetala*), Arabia y Madagascar (*M. drouhardii* y *M. hildebrandtii*) (Fahey, 2005; Paliwal y col., 2011; Martín y col., 2013; Leone y col., 2015). *Moringa oleífera* es la especie más estudiada y de mayor importancia económica (Vaknin & Mishal, 2017).

La especie *M. oleífera* es un árbol de crecimiento rápido que puede alcanzar hasta 10-12 m de altura y que posee tallos erectos y raíces tuberosas (Paliwal y col., 2011; Leone y col., 2015). Tiene hojas pinnadas y un fruto en forma de vaina larga y leñosa que contiene las semillas trivalvas con alas longitudinales (Olson & Fahey, 2011) (**Figura 1**). Sus hojas están divididas en folíolos dispuestos sobre un raquis, las flores son zigomórficas con cinco pétalos, cinco sépalos, cinco estambres funcionales y varios estaminodios, y tienen pedicelos e inflorescencias axilares (Velázquez-Zavala y col., 2016). Generalmente crece a menos de 2000 m en países tropicales y subtropicales con precipitaciones medias anuales entre 760 y 2500 mm y temperaturas entre 18 y 28 °C. Aunque tolera condiciones de sequía, el estrés hídrico afecta a su crecimiento (Dubey y col., 2013). Puede crecer en cualquier tipo de suelo, a pH entre 4.5 y 5.0, si bien prefiere suelos arcillosos y arenosos bien drenados (Leone y col., 2015; Velázquez-Zavala y col., 2016). Las condiciones climáticas, tipo de suelo y zona de cultivo tienen gran influencia en el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos en las diferentes partes de este árbol (semillas, hojas, frutos) (Dubey y col., 2013; Föster y col., 2015).

Figura 1. Arbol, vainas y semillas de M. *oleífera*.

Debido a sus escasas exigencias agronómicas, en la actualidad el cultivo de moringa se ha extendido desde India y África a Sudamérica, Centro América, Islas del Caribe y Asia (Paliwal y col., 2011; Liu y col., 2018) (**Figura 2**). En Ecuador, se estima que existen 400 hectáreas cultivadas de moringa en las regiones del litoral y oriente ecuatoriano, y existe un gran interés por su utilización y aprovechamiento.

Figura 2. Localización geográfica de cultivos de *M. oleífera* a nivel mundial.

2.2. Usos potenciales de la moringa

Diversas partes del árbol de moringa, fundamentalmente hojas, flores, frutos y raíces, se han empleado tanto para el consumo animal como humano desde tiempos ancestrales en ciertas regiones de Asia y África debido a sus propiedades nutricionales y, se han utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas (Martín y col., 2013).

En la actualidad, existen múltiples aplicaciones de la moringa, ya sea para la elaboración de alimentos o suplementos dietéticos y en alimentación animal (Gopalakrishnan y col., 2016; Omodanisi y col., 2017; Sahay y col., 2017; Natsir y col., 2019; Ma y col., 2020; Oguntibeju y col., 2020), para la producción de fertilizantes, biopesticidas o biocombustible (Rashid y col., 2008; Sabale y col., 2008; Azad y col., 2015; França y col., 2017; Raman y col., 2018; Oladipo y Betiku, 2019), en la industria textil y cosmética e, incluso, para la purificación de agua (Dorea, 2006; Gopalakrishnan y col., 2016; Gupta y col., 2018; Kapse y Samadder, 2021) (**Figura 3**).

Con respecto a su aplicación en nutrición humana, hay que señalar que tanto las hojas, como las vainas, las semillas y las raíces tienen uso alimentario debido a su alto valor nutricional y se emplean para la elaboración de diferentes platos en la India, Indonesia, Filipinas, Malasia, el Caribe y en diversos países de África (Foidl y col., 2001; Ghazali y Mohammed, 2011; Oyeyinka y Oyeyinka, 2018). Las hojas tiernas y las flores, ya sean crudas o cocidas, se emplean en la preparación de ensaladas, sopas y salsas. Las flores también se emplean para la obtención de miel (Singh y col., 2013). Las vainas tiernas, preparadas del mismo modo que las habichuelas, son muy apreciadas en la India, si bien en Malasia se utilizan como ingredientes de diferentes variedades locales de curry. Las semillas maduras, separadas de la vaina, se emplean también de modo similar a las legumbres o bien se consumen fritas o tostadas, en infusiones y en salsas (Ramachandran y col., 1980). A partir de las raíces se preparan salsas que, por su sabor, recuerdan al rábano picante.

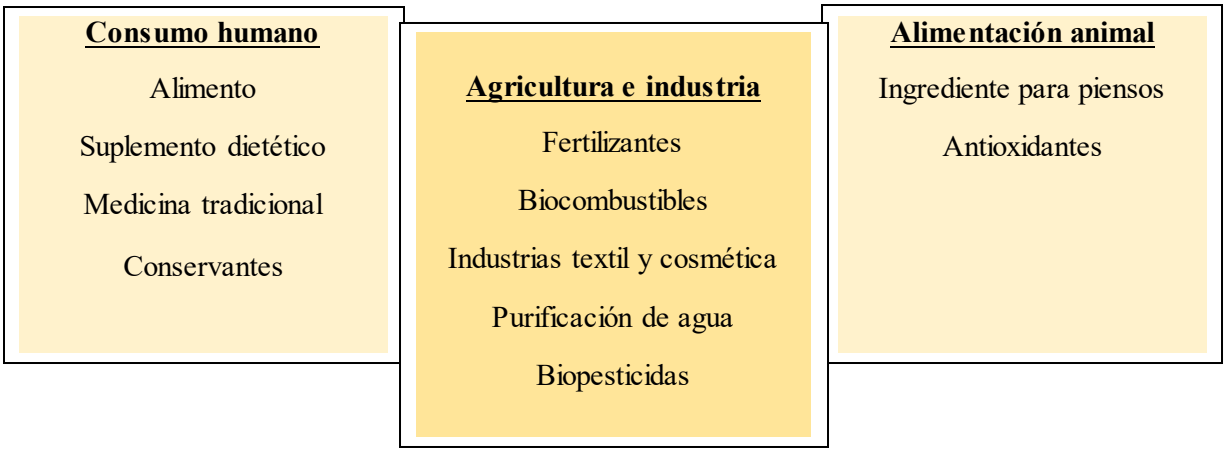


Figura 3. Diversos usos de *M. oleífera.*

2.3. Composición nutricional y fitoquímica de las semillas de moringa

El elevado valor nutricional de las diferentes partes del árbol de moringa se ha demostrado en numerosos estudios realizados durante las dos últimas décadas (Anhwange y col., 2004; Compaoré y col., 2011; Abiodun y col., 2012; Mbah y col., 2012a,b; Ijarotimi y col., 2013; Bridgemohan y col., 2014; Gopalakrishnan y col., 2016; Falowo y col., 2018; Singh y col., 2020). Su gran calidad nutricional ha llevado a la FAO y a diversas asociaciones gubernamentales a recomendar la inclusión de la moringa en la dieta de poblaciones nutricionalmente desfavorecidas, como la población infantil con altos índices de desnutrición, así como en las mujeres embarazadas o en periodo de lactancia (Fuglie, 2001; Fahey, 2005; Brilhante y col., 2017).

A pesar de que en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios dirigidos a evaluar la composición nutricional y el perfil de compuestos bioactivos de las semillas de moringa, éstas han sido mucho menos estudiadas que las hojas, ampliamente empleadas con propósitos nutricionales.

2.3.1. Composición nutricional de la semilla de moringa

La semilla de moringa presenta un alto valor nutricional ya que es una fuente importante de macronutrientes (**Tabla 1**).

Tabla 1. Composición proximal (g/100 g) de la semilla de moringa.

Nutriente	Contenido	Referencias
Humedad	4,7-8,9	1, 2, 4, 6, 8
Lípidos	30,8-43,6	4-10
Proteína	18,9-40,3	3, 4, 8, 11, 15
Hidratos de carbono	10,6-40,1	5, 6, 10, 12, 14
Fibra	1,4-12,2	3, 4, 8, 10
Cenizas	2,6-5,4	3, 4, 6, 7, 10, 12

Referencias: 1. Abdulkarim y col. (2005); 2. Anwar y col. (2005); 3. Compaoré y col. (2011); 4. Abiodun y col. (2012); 5. Mbah y col., (2012a); 6. Aja y col. (2013); 7. Ijarotimi y col. (2013); 8. Bridgemohan y col. (2014); 9. Olagbemide y Philip (2014); 10. Barakat y Ghazal (2016); 11. Gopalakrishnan y col. (2016); 12. Chatepa y Mbewe (2018); 13. Lesten y Emmanuel (2018); 14. Mabusela y col., (2018); 15. Guzmán-Albores y col. (2021).

La semilla de moringa presenta un contenido en humedad muy bajo (< 9%) y es considerada una semilla oleaginosa, ya que la fracción lipídica representa el componente mayoritario, que constituye el 31-44% de la semilla (**Tabla 1**). Esta fracción lipídica de la semilla destaca por su alto contenido de ácidos grasos insaturados, que constituyen aproximadamente el 83% del total de ácidos grasos, mientras que los ácidos grasos saturados son el componente minoritario (Al Juhaimi y col., 2017). El ácido oleico (65-85%) es el principal ácido graso insaturado presente en la semilla de moringa, aunque también contiene cantidades apreciables de otros ácidos grasos insaturados tales como: ácido vaccínico, elaídico, palmitoleico, eicosanoico y linoleico. Entre los ácidos grasos saturados, destacan: ácido palmítico, láurico, araquídico, esteárico y behénico (**Tabla 2**).

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos totales) de la semilla de moringa.

Acido graso	Estructura química	Contenido	Referencias
Ácido laúrico	C8:0	0,02-0,04	1-3
Ácido mirístico	C14:0	0,10-0,30	1-4, 8
Ácido miristoleico	C14:1c9	0,29	4
Ácido pentadecanoico	C15:0	0,02	8
Ácido palmítico	C16:0	5,66- 13,48	2-6, 8, 9
Ácido palmitoleico	C16:1	1,10-2,85	2-4, 6, 7-9
Ácido margárico	C17:0	0,04-0,10	1-3, 6, 8
Ácido heptadecenoico	C17:1	0,06	6
Ácido esteárico	C18:0	2,27-8,46	3-6, 8, 9
Ácido oleico	C18:1(cis)c9	42,43-79,58	1-4, 6-9
Ácido elaídico	C18:1(trans)c9	5,66-6,39	4, 7
Ácido vaccénico	C18:1c11	6,00	7
Ácido linoleico	C18:2c9,12	0,58-1,21	1-4, 6-9
Ácido linolénico	C18:3c9,12,15	0,06-0,45	1-6, 9
Ácido araquídico	C20:0	1,18-6,41	1-4, 6-9
Ácido gadoleico	C20:1	1,18-3,16	1, 2, 6, 9
Ácido heneicosanoico	C21:0	0,15	8
Ácido behénico	C22:0	2,62-10,54	1-4, 6-9
Ácido erúcico	C22:1	0,11-0,14	1,2, 8
Ácido tricosanoico	C23:1	0,23	8
Ácido lignocérico	C:24	0,66-3,08	3, 8, 9
Ácido nervónico	C24:1	0,45-1,47	1, 3
Ácido cerótico	C26:0	0,08-1,23	3, 6, 8, 9

Referencias: 1. Lalas y Tsaknis (2002); 2. Rahman y col. (2009); 3. Compaoré y col. (2011); 4. Goja (2013); 5. Ijarotimi y col. (2013); 6. Barakat y Ghazal (2016); 7. Al Juhaimi y col. (2017); 8. Idris e Ishag, (2020); 9. Gharsallah y col. (2021).

La semilla de moringa es una fuente notable de proteína (**Tabla 1**), que constituye el segundo nutriente mayoritario de la semilla después de los lípidos (Saa y col., 2019) y varía en el rango 19-40 g/100 g y 32-63 g/100 g en la semilla madura y la semilla desgrasada, respectivamente (Anwar y Rashid, 2007; Singh y col., 2011). Las albúminas son las

principales proteínas presentes en la semilla de moringa, que constituyen el 65% del total de proteínas, seguidas de las globulinas (14%) y glutelinas (12%), mientras que las prolaminas constituyen la fracción proteica minoritaria (9%) (Guzmán-Albores y col., 2021). El valor biológico de las proteínas presentes en la semilla de moringa es elevado ya que presentan altos niveles de aminoácidos esenciales como valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, treonina, histidina y tirosina (Ijarotimi y col., 2013; Barakat y Ghazal, 2016; Gu y col., 2020), si bien la metionina y la lisina son los aminoácidos limitantes (Anhwange y col., 2004; Ijarotimi y col., 2013) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Contenido (g/100 g proteína) de aminoácidos proteicos en la semilla de moringa.

Aminoácido	Contenido
Aminoácidos esenciales	
Valina	1,08-4,35
Metionina	0,31-2,04
Lisina	0,31-1,87
Isoleucina	3,16-4,23
Leucina	3,55-5,97
Fenilalanina	3,27-4,83
Treonina	1,97-3,02
Histidina	1,93-3,39
Tirosina	1,97-2,68
Aminoácidos no esenciales	
Ácido aspártico	4,55-15,70
Ácido glutámico	17,87-22,71
Serina	3,06-3,58
Glicina	2,37-5,66
Arginina	8,28-15,78
Alanina	4,00-5,16
Prolina	2,18-6,98
Cisteína	1,50-2,73
Arginina	8,28-15,78

Referencias: Ijarotimi y col. (2013); Barakat y Ghazal (2016); Gu y col. (2020).

El contenido de hidratos de carbono de la semilla de moringa (**Tabla 1**) varía entre 11 y 40% dependiendo del genotipo de la semilla y de las condiciones edafoclimáticas (Mbah y col., 2012a; Aja y col., 2013; Chatepa y Mbewe, 2018; Mabusela y col., 2018). La fibra representa aproximadamente entre 1,4 y 12,2% de la semilla, mientras que el contenido de monosacáridos y disacáridos como glucosa, fructosa y sacarosa es 2,57-3,67 %, 0,03-0,87 % y 1,67-2,9 %, respectivamente (Compaoré y col., 2011; Al Juhaimi y col., 2017). También, se han identificado oligosacáridos como la rafinosa (0,12%), la estaquiosa (0,14%) y la verbascosa (0,07%) en la semilla de moringa (Al Juhaimi y col., 2017).

El elevado contenido de cenizas presente en la semilla de moringa (2,6-5,4 g/100 g) (**Tabla 1**) refleja sus altos niveles de minerales (Compaoré y col., 2011; Abiodun y col., 2012; Mbah y col., 2012a; Aja y col., 2013; Ijarotimi y col., 2013; Barakat y Ghazal, 2016; Chatepa y Mbwe, 2018). Aunque la composición de minerales varía en función de la variedad de semilla, del tipo de suelo y de la localización geográfica de cultivo, se ha demostrado que los principales minerales presentes son P, Fe, Ca, Na y Mg, aunque también contiene Zn, I y Mn en menores cantidades (**Tabla 4**). Considerando la ingesta diaria recomendada de Ca, Fe, Mg, I y Zn tanto para la población adulta como infantil por la FAO/WHO (2001), se puede considerar que la inclusión de semillas de moringa en la dieta de la población de países desfavorecidos con alto índice de desnutrición proporcionaría una parte importante de los niveles de minerales diarios necesarios para el adecuado mantenimiento de las funciones fisiológicas del organismo.

Las vitaminas mayoritarias en la semilla de moringa son la vitamina A y las vitaminas del grupo B (B_1, B_2, B_6 y B_{12}), seguidas de la vitamina E, si bien el contenido de las mismas es muy variable en función de la variedad de semilla, condiciones de cultivo y técnica empleada para su cuantificación (**Tabla 4**). Debido a su alto contenido de vitaminas, la semilla de moringa es un ingrediente nutricionalmente muy valioso que puede contribuir a proporcionar los niveles diarios recomendados de estas vitaminas para la población, de acuerdo a los datos aportados por la FAO/WHO (2001) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Contenido de micronutrientes (mg/100 g) de la semilla de moringa.

Micronutriente	Contenido	Ingesta diaria recomendada (mg)[1]		Referencias
Minerales		**Adultos**	**Niños**	
Ca	20-550	1000-1300	300-1300	2-4, 6, 9, 11
P	103-813			4, 6, 9
Fe	3-10	9-24	5-26	4, 8, 9, 11
Na	16-295			4, 7, 8, 9, 11
K	48-881			4, 7-9, 11
Mg	22-299	190-270	26-250	1, 6-9, 11
Cu	0,3-13			4, 6, 8, 9, 11
Zn	0,8-2,6	3-6	1-6	7-9, 11
I	0,1-0,6	110-200 (µg)	75-140 (µg)	4
Mn	2-32			9
Vitaminas				
A	70-2040	0,6-0,8	0,4-0,6	3, 12
B_1	40-940	1,1-1,5	0,2-1,2	3, 12
B_2	870	1,1-1,6	0,3-1,3	12
B_6	80	1,3-2,0	0,1-1,3	12
B_{12}	120	2,4-2,8 (µg)	0,4-2,4 (µg)	12
E	3,5-36,4	7,5-10 (α-TE)	2,7-10 (α-TE)[2]	5, 9, 10
α-tocoferol	1,5-12,8	7,5-10 (α-TE)	2,7-10 (α-TE)[2]	5, 6
γ-tocoferol	0,4-7,5			5, 6
δ-tocoferol	0,9-7,5			5, 6

Referencias: 1. Lalas y Tsaknis (2002); 2. Abiodun y col. (2012); 3. Mbah y col. (2012a); 4. Ijarotimi y col. (2013); 5. Rahman y col. (2009); 6. Barakat y Ghazal (2016); 7. Al Juhaimi y col. (2017); 8. Liang y col. (2019); 9. Gu y col. (2020); 10. Fu y col. (2021); 11. Lanjwani y col. (2021); 12. Stevens y col. (2021). [1]FAO/WHO (2001). [2]α-TE: α-tocoferol equivalentes.

2.3.2. Composición fitoquímica de la semilla de moringa

La semilla de moringa es una fuente importante de glucosinolatos y esteroles, aunque también se han identificado compuestos fenólicos en bajos niveles.

2.3.2.1. Glucosinolatos

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios nitrogenados y azufrados presentes en las plantas del orden *Brassicales*, que juegan un importante papel en la defensa de este tipo de vegetales (Marino y col., 2021). Estos compuestos se han estudiado ampliamente en la familia de las brásicas y, en menos medida, en la familia de las moringas. Son compuestos estables y biológicamente inactivos presentes en las células vegetales que, al producirse un daño en el tejido vegetal durante el procesado o masticación, son hidrolizados por la enzima mirosinasa. La mirosinasa es una enzima β-tioglucosidasa glucohidrolasa que se localiza en las vacuolas celulares, separada de los glucosinolatos. Cuando se produce el daño del tejido vegetal, la mirosinasa entra en contacto con los glucosinolatos y los hidroliza dando lugar a una amplia gama de compuestos de hidrólisis biológicamente activos, siendo los isotiocianatos los más abundantes (Barba y col., 2016). Los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos de hidrólisis de los glucosinolatos han sido ampliamente estudiados *in vivo* tanto en ensayos preclínicos como clínicos, habiéndose demostrado sus efectos positivos en la prevención de trastornos cardiometabólicos (mejoran el control glicémico, disminuyen la presión sanguínea y el colesterol LDL y aumentan el colesterol HDL), neurológicos (confieren neutroprotección, reducen la neuroinflamación y mejoran la memoria y el aprendizaje) y músculo-esqueléticos (confieren protección frente a la destrucción de osteoclastos y mejoran la densidad ósea), además de mostrar propiedades anticancerígenas (inhiben la proliferación de células cancerígenas de colon e hígado y las rutas celulares implicadas en el cáncer de próstata y reducen el desarrollo de tumores) (Connolly y col., 2021; Marino y col., 2021).

Estudios previos han demostrado que la semilla de moringa contiene glucosinolatos específicos, poco comunes en otros vegetales de la familia de las brásicas, que se caracterizan por la presencia de dos residuos de ramnosa (Bennet, 2003; Maldini y col., 2014). La glucomoringina (4-O-(α-L-ramnopiranosil-oxi)-benzil glucosinolato) es el glucosinolato mayoritario en la semilla de moringa (Bennet y col., 2003; Amaglo y col., 2010; Maldini y col., 2014), aunque también se han identificado otros glucosinolatos como la glucosinalbina (4-hidroxibenzil glucosinolato), glucorafanina (4-metil-sufinil-butil glucosinolato) y glucoiberina (3-metil-sulfinil-propil glucosinolato) en concentraciones menores (Maldini y col., 2014). El contenido de glucosinolatos en la semilla de moringa varía notablemente dependiendo del genotipo de la semilla, de las condiciones de cultivo y de los tratamientos post-cosecha (Giuberti y col., 2021).

Los glucosinolatos presentes en la semilla de moringa son en gran medida responsables de sus propiedades beneficiosas para la salud. En este contexto, se ha puesto de manifiesto que la glucomoringina, sus derivados acetilados y sus productos de hidrólisis como el isotiocianato 1 (4-[(α-L-ramnosi-loxi) benzil]), presentan potentes propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antiproliferativas y neuroprotectoras (Cheenpracha y col., 2010; Park y col., 2011; Galuppo y col., 2013; Giacoppo y col., 2017a,b; Kim y col., 2018). El sulforafano, producto de hidrólisis de la glucorafanina, también ha demostrado un notable potencial anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante y antimicrobiano (Kaiser y col., 2021; Mangla y col., 2021). Los isotiocianatos derivados de la glucoiberina reducen el riesgo de padecer cáncer de colon (Hashem y col., 2012), mientras que el compuesto p-hidroxibenzil isotiocianato presenta actividad antiproliferativa en células tumorales (Boscaro y col., 2018). En su conjunto, estos hallazgos demuestran el gran potencial bioactivo de la semilla de moringa y su interés como ingrediente funcional para el desarrollo de alimentos innovadores con propiedades promotoras para la salud.

2.3.2.2. Esteroles y estanoles

La semilla de moringa también destaca por su contenido de fitosteroles y fitostanoles (formas saturadas de los fitosteroles), compuestos estructuralmente similares al colesterol si bien, a diferencia de éste, no pueden ser sintetizados por el organismo. El contenido total de esteroles en la semilla de moringa es elevado (4-5 g/Kg) y varía dependiendo de las condiciones del cultivo y del genotipo de la semilla (Boukandoul y col., 2017). El fitosterol más abundante identificado en la fracción lipídica de la semilla de moringa es el β-sitosterol (43,7-57,5%), seguido del estigmasterol (15,8-23,1%), campesterol (10,9-18,4%) y el Δ5-avenasterol (5,0-12,7%) (Lalas y Tsaknis, 2002; Anwar y Rashid, 2007; Boukandoul y col., 2017; Özcan y col., 2019; Faisal y col., 2020; Gharsallah y col., 2021). Algunos estudios también han demostrado la existencia de otros esteroles minoritarios en semillas de moringa de origen africano y asiático, como el clerosterol (1,7-2,2%), 5,24-estigmastadienol (1,0%), 28-isoavenasterol (0,5-2,3%), Δ7-avenasterol (0,5-1,0%), Δ7,14-estigmasterol (0,8%), Δ7,14-estigmastanol (0,4-0,9%), Δ7,14-estigmastadienol (0,4-0,5%), Δ7-campestanol (0,6-0,7%), estigmastanol (0,5-0,8%), campestanol (0,3-0,6%), ergostadienol (0,3-0,5%), Δ7-estigmasterol (0,7-1,5%) y ergosterol (< 0,1%) (Lalas y Tsaknis, 2002; Anwar y Rashid, 2007; Boukandoul y col., 2017; Özcan y col., 2019).

El efecto hipocolesterolémico de los fitosteroles es ampliamente conocido, habiéndose demostrado que estos compuestos disminuyen la solubilidad del colesterol y, por su mayor hidrofobicidad, desplazan competitivamente al colesterol y evitan su incorporación a la fracción fosfolipídica de las micelas mixtas (estructuras formadas por fosfolípidos y sales biliares), inhibiendo su absorción dentro del lumen intestinal y favoreciendo su excreción a través de las heces. Debido a su estructura, los fitosteroles y fitostanoles se absorben escasamente a nivel intestinal, por lo que una vez incorporados en las micelas mixtas se produce su desensamblaje y se liberan también a través de las heces (Brufau y col., 2008; Soleimanian y col., 2020). Algunos estudios han revelado que los fitosteroles pueden reducir los niveles de colesterol plasmático incluso cuando no se ingieren simultáneamente con la comida, hecho que sugiere que deben existir otros mecanismos implicados en su actividad hipocolesterolémica, aparte de reemplazar al colesterol en las micelas mixtas (Katan y col., 2003; Brufau y col., 2008).

Se ha demostrado que el consumo de 1,5-2,0 g de esteroles vegetales al día reduce los niveles plasmáticos de colesterol total y de colesterol LDL entre 7,5 y 11,6% (Engel y col., 2005; Izadi y col., 2012), reduciendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. El β-sitosterol inhibe diversas rutas bioquímicas implicadas en la síntesis de colesterol y, además, presenta actividad antiinflamatoria, antioxidante, antidiabética, inmunomoduladora y antimicrobiana (Sayeed y col., 2016). Una revisión muy reciente recopila diversos estudios que demuestran la actividad antiinflamatoria, neuroprotectora y anticancerígena del estigmasterol (Salehi y col., 2021). De modo similar, un meta-análisis publicado recientemente puso de manifiesto la asociación lineal entre el consumo de campesterol y la disminución del riesgo de padecer cáncer (Jiang y col., 2019).

Teniendo en cuenta las propiedades beneficiosas de estos compuestos, el alto contenido de esteroles en la semilla de moringa la convierten en un ingrediente saludable muy atractivo.

2.3.2.3. Compuestos fenólicos

A pesar de que la moringa está reconocida como una buena fuente de compuestos fenólicos, el contenido de estos compuestos bioactivos varía mucho dependiendo de la parte de la planta considerada y de las condiciones de cultivo (Vazquez-León y col., 2017). Dos estudios muy recientes han evidenciado que el contenido de compuestos fenólicos es muy superior en la hoja de moringa que en la semilla (Khan y col., 2021; Owon y col., 2021). El

contenido de compuestos fenólicos libres en extractos obtenidos en diferentes disolventes (agua, metanol, etanol, hexano y etil acetato) a partir de la semilla de moringa varía entre 0,1 y 41,0 mg/g extracto (Gu y col., 2020; Fernandes y col., 2021; Khan y col., 2021) y es inferior a 2 mg GAE/g de semilla (Owon y col., 2021). El contenido de compuestos fenólicos unidos a componentes de la pared celular es notablemente más elevado que el de compuestos fenólicos libres. En este sentido, Singh y col. (2013) observaron un contenido de compuestos fenólicos libres de 0,78 mg GAE/g en semillas de moringa de origen indio, mientras que el contenido de compuestos fenólicos unidos fue cinco veces superior (4,2 mg GAE/g). Los principales compuestos fenólicos identificados en la fracción libre de la semilla de moringa por estos autores fueron el ácido gálico, seguido de la epicatequina y el ácido cafeico, si bien se han identificado otros minoritarios como la vainillina, la catequina, la quercetina y los ácidos p-cumárico, protocatecuico, cinámico y ferúlico. En la fracción no soluble (unida), sin embargo, la quercetina fue el principal compuesto fenólico, seguida del ácido gálico y la catequina, mientras que la epicatequina y el ácido p-cumárico se encontraban en menor cantidad. Khan y col. (2021), en cambio, identificaron flavonoides (7,8,2',3'-tetrametoxiflavona 5-glucósido), ácidos fenólicos (ácidos p-salicílico, 2,4,6-trihidroxibenzoico, 3,4-dihidroxibenzoico, 4-p-cumaroilquínico) y glucósidos de ácidos fenólicos en semillas de moringa pakistaníes. Fernandes y col. (2021) también han observado la presencia de catequina, epicatequina y glucósidos de apigenina en semillas de moringa guineanas. Por otra parte, otros autores han identificado taninos condensados en la semilla de moringa (Compaoré y col., 2011; Gu y col., 2020). Recientemente, se ha demostrado que la nazirina, glucósido fenólico presente en la semilla de moringa, presenta propiedades antiinflamatorias, mejora el metabolismo lipídico y de los hidratos de carbono y la hiperglicemia, siendo efectiva para el control del síndrome metabólico en ratones (Bao y col., 2020). Estos antecedentes indican que la semilla de moringa puede ser considerada como fuente de compuestos fenólicos saludables.

2.3.2.4. Saponinas

Las saponinas son glucósidos de triterpenoides que contienen de 27 a 30 átomos de carbono en la parte no glucídica de la molécula (El Aziz y col., 2019). Estudios recientes han demostrado la presencia de saponinas en la semilla de moringa (Fowoyo y Oladoja, 2015; Sahumena y col., 2021; Saka y col., 2021), en niveles entre 0,12 y 9,8 mg/100 g dependiendo del genotipo de la semilla y de las condiciones de cultivo (Kawo y col., 2009;

Mbah y col., 2012a; Ijarotimi y col., 2013; Matthew y col., 2021). Las saponinas están consideradas compuestos antinutricionales debido a su capacidad de unirse a las proteínas y disminuir su susceptibilidad a las proteasas (Irakli y col., 2020). Sin embargo, las saponinas de la semilla de moringa han demostrado inhibir la absorción de colesterol al unirse a los ácidos biliares, disminuyendo así su circulación enteropática y, además, incrementan la excreción fecal del colesterol, reduciendo sus niveles plasmáticos (Shamlan y col., 2021).

2.3.2.5. Péptidos bioactivos

Debido al alto contenido proteico de la semilla de moringa (**Tabla 1**), en los últimos años diversos grupos de investigación se han centrado en la producción y estudio de la bioctividad de sus péptidos. En este contexto, González-Garza y col. (2017) evaluaron las propiedades bioactivas de las fracciones proteicas obtenidas a partir de la semilla de moringa mediante digestión gastrointestinal simulada. Estos autores demostraron que la fracción peptídica de peso molecular superior a 10 kDa presenta importantes actividades antioxidante, inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA) y antidiabética, sugiriendo su gran potencial nutracéutico. De modo similar, Aderinola y col. (2018) demostraron que la hidrólisis de proteínas de semilla de moringa con distintas enzimas (alcalasa, pepsina y tripsina) permite la obtención de péptidos con actividades antioxidante e inhibidora de la ECA que podrían tener aplicación como ingredientes en la elaboración de nutracéuticos y alimentos funcionales. Recientemente, se ha demostrado que la hidrólisis enzimática de proteínas de semilla de moringa con flavourzyme, dispasa, papaína, pepsina y alcalasa dio lugar a la formación de péptidos de tamaño inferior a 3,5 kDa con elevada actividad antioxidante (Liang y col., 2019). Así mismo, Chandrashekar y col. (2020) han puesto de manifiesto que las proteínas presentes en la semilla de moringa contienen secuencias peptídicas de peso molecular inferior a 7,5 kDa con actividad antimicrobiana que pueden contribuir a aumentar la vida útil de los alimentos que contengan harina de moringa.

2.4. Actividades biológicas de la semilla de moringa

2.4.1. Actividad antioxidante

Existe una sólida evidencia científica acerca de la actividad antioxidante de la semilla de moringa. Diversas investigaciones han demostrado que extractos obtenidos a partir de semillas de moringa de origen chino, indio e indonesio empleando diferentes disolventes

(acetona, agua, butanol, cloroformo, etanol, etil acetato, éter de petróleo, benceno, hexano y metanol) presentaron un elevado potencial antioxidante determinado mediante los ensayos de captación de radicales DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y ABTS (2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), reducción del hierro (FRAP, ferric reducing antioxidant power) y del cobre (CUPRAC, cupric reducing antioxidant power), así como actividad quelante de fosfomolibdeno y metales (Vyas y col., 2015; Jahan y col., 2018; Gu y col., 2020; Khan y col., 2021) (**Tabla 5**). Fuel y col. (2021) han descrito resultados similares donde extractos etanólicos obtenidos de semillas de moringa mostraron una alta capacidad de captación del radical $ABTS^+$ e incrementaron la actividad de enzimas detoxificantes como la glutatión-S-transferasa y la quinona-oxidoreductasa. Otros estudios también muy recientes realizados en extractos de semilla de moringa obtenidos en metanol y etil acetato también han puesto de manifiesto su elevada actividad antioxidante, determinada por los métodos del DPPH y ABTS (Amina y col., 2021; Sahumena y col., 2021). Así mismo, Saka y col. (2021) han demostrado que el aceite de semilla de moringa potencia de modo notable la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa y disminuye la producción de malondialdehído, compuesto resultante de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados, en un modelo animal de enfermedad cardíaca. En esta misma línea de trabajo, Fernandes y col. (2021) evaluaron la capacidad de los extractos hidroetanólicos e infusiones acuosas de semillas de moringa de inhibir la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la hemólisis oxidativa en células de tejido cerebral porcino y eritrocitos ovinos. Estos autores observaron que los extractos de estas semillas presentaban una alta actividad antioxidante determinada por ambos ensayos, que fue superior a la mostrada en los extractos obtenidos a partir de las hojas de moringa.

Tabla 5. Actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de la semilla de moringa determinada en estudios *in vitro*.

Extractos (disolventes)	Resultados relevantes	Ref.
Petróleo-benceno, cloroformo, metanol y agua	Los extractos metanólicos y acuosos presentaron el mayor porcentaje de inhibición del ABTS (~90%) Los extractos metanólicos mostraron el mayor porcentaje de inhibición del DPPH (80%)	1
Metanol, acetona y agua	Los extractos acuosos mostraron los mayores porcentajes de inhibición del DPPH (92%) y ABTS (57%) y poder reductor (Abs700 nm: 1,03)	2
Etanol, etil acetato, éter de petróleo, butanol y agua	Los extractos obtenidos en etil acetato mostraron la mayor capacidad de captación de los radicales ABTS y DPPH y poder reductor del hierro (FRAP) Los extractos acuosos presentaron los menores valores de actividad antioxidante	3
Etanol (E) y agua (A)	Capacidad de inhibir la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (IC_{50}, TBARS): E=0,09 mg/mL; A: 0,42-0,92 mg/mL Hemolisis oxidativa (IC_{50}): E=nd; A= 2,4-5,1 µg/mL	4
Etanol	Capacidad de captación del radical ABTS: 1,7 µg GAE/mg extracto Actividad antioxidante en células HT-29: 21-25 mg UAA/mg extracto (a concentraciones de 2,5 y 3 mM) Actividad glutatión-S-transferasa: 48,4 U/mg (concentración del extracto: 2,5 µg/mL) Actividad quinona reductasa: 1034 U/mg (concentración del extracto: 2,5 µg/mL)	5
Metanol, hexano, etil acetato y agua	Los extractos metanólicos presentaron la mayor actividad neutralizadora del radical DPPH (35,6 mg TE/g extracto) y poder quelante de metales (20 mg EDTAE/g extracto) Los extractos obtenidos en etil acetato mostraron la mayor capacidad neutralizadora del ABTS (74,8 mgTE/g extracto), FRAP (57,3 mg TE/g extracto), poder reductor de iones metálicos (CUPRAC, 102,9 mg TE/g extracto) y actividad quelante de fosfomolibdeno (1,14 mg TE/g extracto, similar al extracto obtenido en hexano)	6

ABTS: 2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico; DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo; UAA: unidades de actividad enzimática.

Referencias. 1. Vyas y col. (2015); 2. Jahan y col. (2018); 3. Gu y col. (2020); 4. Fernandes y col. (2021); 5. Fuel y col. (2021); 6. Khan y col. (2021).

Un amplio número de estudios *in vivo* (**Tabla 6**) han demostrado que la administración oral de semillas de moringa o de su aceite incrementa la actividad de enzimas antioxidantes que revierten la toxicidad de diversos fármacos antitumorales y contaminantes ambientales a nivel testicular, hepatorenal y neuronal en ratas y ratones (Al-Said y col., 2012; Olatosin y col., 2014; Abarikwu y col., 2017a,b; Edeogu y col., 2019; Famurewa y col., 2019a,b). Así

mismo, se ha puesto de manifiesto que la administración oral de extractos etanólicos de semilla de moringa reduce significativamente los niveles séricos de las enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) en un modelo animal de artritis reumatoide (Mahajan y col., 2007a). El consumo de semillas de moringa en ratas ha demostrado ejercer efectos antioxidantes a nivel vascular (Randriamboavonjy y col., 2017). Además, se ha descrito que la administración del glucósido fenólico (1-O-(4-hidroximethilfenil)-α-L-ramnopiranósido), muy abundante en las semillas de moringa, presenta efecto hepatoprotector (Sun y col., 2019). Li y col. (2020) también observaron que la incorporación de semillas de moringa a la dieta de ratones con daño cardiaco inducido ejercía efectos cardioprotectores debido a sus efectos inhibidores del estrés oxidativo. Por otra parte, Ibrahim y col. (2019) observaron que la inclusión de semillas de moringa en la dieta de peces de interés comercial atenuaba los efectos adversos a nivel de estrés oxidativo y daño en el ADN causado por insecticidas presentes en el agua. Todos estos estudios demuestran la actividad antioxidante de las semillas de moringa que puede repercutir positivamente en la salud.

2.4.2. Actividad anti-inflamatoria

En los últimos años, diversos estudios *in vitro* han destacado la actividad anti-inflamatoria de la semilla de moringa y del aceite obtenido a partir de ella (**Tabla 7**). Muangnoi y col. (2012) observaron que el tratamiento de macrófagos murinos RAW264.7 estimulados por lipopolisacárido (LPS) con extractos de vainas con semillas de moringa (31-250 μg/mL) inhibía el incremento de los niveles de RNAm y proteicos relativos a IL-6, TNF-α, iNOS y COX-2 de manera dosis dependiente. Aderonke Otunola y Jude Afolayan, (2018) pusieron de manifiesto que el aceite de semilla de moringa inhibía de manera significativa la desnaturalización de la albúmina de suero bovino (BSA) y la hemolisis de la membrana eritrocitaria, eventos empleados como marcadores de inflamación por los autores del estudio. Por su parte, Fernandes y col. (2021) mostraron que extractos etanólicos y acuosos obtenidos a partir de semillas de moringa cultivadas en dos localizaciones diferentes de Guinea-Bissau inhibían la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados por LPS.

Los efectos anti-inflamatorios de la semilla de moringa observados en cultivos celulares se han confirmado en estudios *in vivo* en animales de experimentación (**Tabla 7**). En este sentido, Mahajan y col. (2007a,b) pusieron de manifiesto la capacidad de extractos

de semilla de moringa para atenuar la respuesta inflamatoria crónica mediada por el sistema inmune característica de enfermedades como el asma y la artritis reumatoide. Posteriormente, el mismo grupo demostró que extractos de semilla de moringa obtenidos con n-butanol reducían los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-4 y TNF-α) en cerdos guineanos con inflamación inducida por ovoalbúmina administrada por vía respiratoria (Mahajan y col., 2009). Así mismo, se ha observado que la ingesta de extractos etanólicos de semilla de moringa reduce la infiltración hepática de células inflamatorias en ratas con fibrosis quística inducida químicamente (Hamza, 2010). Posteriormente, Minaiyan y col. (2014) encontraron que extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de semillas de moringa producían un efecto antiinflamatorio en la mucosa intestinal de ratones, siendo efectivos para el tratamiento de la colitis aguda. Los extractos hidroalcohólicos de semilla de moringa también redujeron la secreción colónica de marcadores proinflamatorios (TNF-α, óxido nítrico, IL-1, IL-6 y quimiocina derivada de queratinocitos) en un modelo de ratón de colitis ulcerosa (Kim y col., 2017). Resultados similares se han descrito en estudios realizados en modelos animales de inflamación crónica de la piel, donde se encontró que la ingesta de un extracto de semilla de moringa enriquecido en isotiocianatos reducía el proceso inflamatorio y edema dérmicos, así como la hipertrofia de manera significativa (Jaja-Chimedza y col., 2017). El aceite de semilla de moringa inhibió también de manera efectiva la actividad de la enzima iNOS y la síntesis de NF-kB, ambos considerados marcadores de inflamación, así como los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6) y óxido nítrico en el riñón causando, consecuentemente, un efecto nefro-protector en modelos animales de daño renal (Edeogu y col., 2019; Famurewa y col., 2019b).

Los efectos anti-inflamatorios de la semilla de moringa observados en los diferentes estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se han atribuido a los compuestos bioactivos presentes como isotiocianatos (Rajan y col., 2016b; Giacoppo y col., 2017a,b; Sailaja y col., 2021), compuestos fenólicos (Bao y col., 2020), esteroles (Liao y col., 2018), lectinas (Araújo y col., 2013) y proteínas de unión a quitina (Pereira y col., 2011), de ahí que el consumo de moringa pueda relacionarse con un efecto beneficioso para la salud.

Tabla 6. Actividad antioxidante de la semilla de moringa (SM) y del aceite de semilla de moringa (ASM) determinada en estudios en modelos animales.

Modelo animal	Tratamiento y duración	Resultados relevantes (grupo tratado vs control)	Ref.
Rata: artritis reumatoide inducida por *M. tuberculosis* atenuado	Administración oral de EESM (100 y 200 mg/kg), 1 dosis	↓ niveles de CAT y SOD con la dosis superior	1
Rata: daño hepático y peroxidación lipídica inducidos por CCl_4	Administración oral de ASM (0,2 y 0,4 mL/día), 21 días	↓ niveles hepáticos de GOT, GPT, FAL, GGT y MAD ↑ niveles heptáticos de sulfhidrilos no proteicos y proteína total	2
Rata: daño hepático y estrés oxidativo inducidos por acetaminofeno	Administración oral de ASM (2 mL/kg peso/día), 10 días	↓ niveles hepáticos de MAD y de la actividad de ALT y FAL	3
Rata: diabetes inducida por estreptozotocina	Administración oral de SM en polvo (50 y 100 mg/kg peso), 4 semanas	↓ peróxidos lipídicos y ↑CAT y SOD en plasma y riñón	4
Rata: estrés oxidativo renal y hepático inducido por $HgCl_2$	Administración intraperitoneal de ASM (1,798 mg/kg peso), 3 veces/semana durante 21 días	↓ actividad de CAT y SOD y de los niveles de MAD en hígado y riñón	5
Rata: estrés oxidativo testicular inducido por $HgCl_2$	Administración oral de ASM (2 mL/kg peso/día), 15 días	↓ actividad de CAT y SOD	6
Ratas espontáneamente hipertensas	Administración oral de SM en polvo (750 mg/rata/día), 20 semanas	↓ niveles plasmáticos de 8-isoprostano y de la expresión de la NADPH oxidasa, iNOS y nitrotirosina en la aorta.	7
Rata: toxicidad cerebral inducida por metotrexato	Administración oral de ASM de moringa (5 mL/kg peso/día), 17 días	↓ niveles cerebrales de MAD.↑ actividad de SOD, CAT, GPx y de los niveles cerebrales de GSH	8
Rata: nefrotoxicidad inducida por 5-fluorouracilo	Administración oral de ASM (5 mL/kg peso/día), 10 días	↓ niveles renales de MAD ↑actividad de SOD, CAT, GPx y de los niveles de GSH	9
Pez: estrés oxidativo inducido por clorpirifós	Administración oral de SM (7% en la dieta basal), 30 días	↓ niveles de ALT, AST, LHD y MAD ↑ niveles de SOD y CAT	10
Rata: daño hepático inducido por CCL_4	Administración de 1-O-(4-hidroximetilfenil)-α-L-ramnopiranósido (50, 10 y 150 mg/kg/día), 7 días	↓ niveles séricos de FAL, AST y AKP y del daño en el ADN ↑ de SOD, CAT y GPx	11
Rata: nefrotoxicidad inducida por gentamicida	Administración intraperitoneal de ASM (5 mL/kg peso/día), 16 días	↓ niveles renales de MAD ↑ niveles de SOD, CAT, GPx y GSH.	12
Ratón: infarto de miocardio	Administración oral de SM en polvo (600 mg/día, 900 mg/día), 6 semanas	↓ niveles cardiacos de $gp91^{phox}$ y de iNOS.	13

ALT: Alanina transaminasa. ASM: aceite de semilla de moringa. AST: aspartato aminotransferasa. CAT: catalasa. EESM: extracto etanólico de semilla de moringa. FAL: fosfatasa alcalina. GGT: gamma-glutamil transferasa. GOT: glutamato oxalacetato transaminasa. $Gp91^{phox}$: subunidad de la NADPH oxidasa. GPT: glutamato piruvato transaminasa. GPX: glutatión peroxidasa. GSH: glutatión reducido. iNOS: óxido nítrico sintasa inducible. LHD: lactato deshidrogenasa. MAD: malondialdehído. SM: semilla de moringa. SOD: superóxido dismutasa

Referencias: 1. Mahajan y col. (2007a); 2. Al-Said y col. (2012); 3. Olatosin y col. (2014); 4. Al-Malki y Rabey (2015); 5. Abarikwu y col. (2017a); 6. Abarikwu y col. (2017b); 7. Randriamboavonjy y col. (2017); 8. Famurewa y col. (2019a); 9. Famurewa y col. (2019b); 10. Ibrahim y col. (2019); 11. Sun y col. (2019); 12. Edeogu y col. (2019); 13. Li y col. (2020).

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de la semilla de moringa (SM) y del aceite de semilla de moringa (ASM) determinada en estudios *in vitro* e *in vivo*.

Tipo de estudio	Tipo de extracto/muestra	Modelo (*in vitro* o animal)/tratamiento y duración	Resultados relevantes (grupo tratado vs control)	Ref.
In vivo	Extracto etanólico	Rata con artritis inducida por *M. tuberculosis* atenuado. Administración oral (100 y 200 mg/kg peso), 1 dosis	↓ niveles séricos de IL-1β, IL-6 y TNF-α con ambas dosis de extracto con respecto a los animales control	1
In vivo	Extracto etanólico	Rata con asma inducido por 2,4-toluoneo diisocianato. Administración oral (100 y 200 mg/kg peso), 1 dosis	↓ niveles de IL-4, IL-6 séricos con ambas dosis de extracto y de IL-4, IL-6 y TNF-α en fluido broncoalveolar con la dosis superior	2
In vivo	Extracto obtenido en n-butanol	Cerdo de guinea con inflamación respiratoria inducida por ovoalbúmina. Administración oral (100 mg/kg peso), 1 dosis	↓ niveles de IL-4, IL-6 y TNF-α en plasma y en fluido broncoalveolar con respecto a los animales control	3
In vivo	Extracto etanólico	Rata con fibrosis hepática inducida por CCL4/aceite de maíz. Administración oral (1 g/kg peso/día), 8 semanas	↓ infiltración de células inflamatorias en el hígado y de la actividad de MPO con respecto al grupo control	4
In vitro	Extracto etanólico	Macrófagos murinos RAW264.7 estimulados por LPS.	↓ IL-6, TNF-α, iNOS, COX	5
In vivo	Extracto etanólico	Rata con colitis aguda inducida por ácido acético. Administración oral (50, 10 y 200 mg/kg peso) 2h previas a la inducción de colitis y 5 días después de la misma	↓ extensión y severidad de la inflamación intestinal y de la actividad de MPO	6
In vivo	SM	Rata con diabetes inducida por estreptozotocina. Administración oral (50 y 100 mg/kg peso), 4 semanas	↓ IL-6	7
In vivo	Extracto etanólico	Ratón con colitis ulcerosa aguda y crónica inducida por dextrano sulfato sódico. Administración oral (150 mg/kg peso/día), 14 días.	↓ niveles de MPO (36-67%) en colon en modelos agudo y crónico ↓ Lcn-2 (8%) en el modelo agudo ↓TNF-α (26%), NO (42%), IL-1, IL-6 y KC (2%) en el modelo crónico	8
In vitro e *in vivo*	Extracto acuoso	Rata con edema dérmico inducido por carragenano. Administración oral (10 mL/kg peso, conteniendo 250 y 500 mg/kg MIC-1)	↓ *in vivo* del edema dérmico (40% a las 2 h) con ambas dosis ↓ NO en macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS	9
In vitro	ASM	Eritrocitos	↓ desnaturalización de albúmina (IC_{50}<0,1 mg/mL) y de hemolisis de la membrana eritrocitaria (% inhibición >80% con concentraciones de 0,3-0,5 mg/mL)	10
In vivo	ASM	Rata con nefrotoxicidad inducida por gentamicina. Administración intraperitoneal (5 mL/kg peso/dia), 16 días	↓niveles renales de MAD y aumento de las actividades de CAT, SOD, GPx y de los niveles de GSH	11
In vivo	ASM	Rata con nefrotoxicidad inducida por 5-fluorouracilo. Administración oral (5 mL/kg peso/día), 10 días	↓niveles renales de TNF-α, IL-1β, IL-6 y NF-κβ	12
In vitro	Extractos acuosos y etanólicos	Macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados por LPS	↓NO en macrófagos (IC_{50}: 180-237 μg/mL)	13

ASM: aceite de semilla de moringa. CAT: catalasa. COX: ciclooxigenasa -2. GPx: glutatión peroxidasa. GSH: glutatión reducido. IL-1β: interleuquina1β. IL-6: Interleuquina 6. iNOS: óxido nítrico sintasa inducible. KC: quimiocina derivada de queratinocitos. Lcn-2: Lipocalina-2 fecal. LPS: lipopolisacárido bacteriano. MDA: malondialdehído. MIC-1: moringa isotiocianato-1. MPO: mieloperoxidasa. NF-κβ: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. SM: semilla de moringa. SOD: superóxido dismutasa. NO: óxido nítrico. TNF-α: factor de necrosis tumoral α.

Referencias. 1. Mahajan y col. (2007a); 2. Mahajan y col. (2007b); 3. Mahajan y col. (2009); 4. Hamza (2010); 5. Muangnoi y col. (2012); 6. Minaiyan y col. (2014); 7. Al-Malkiy col. (2015); 8. Kim y col. (2017); 9. Jaja-Chimedza y col. (2017); 10. Aderonke Otunola y Jude Afolayan (2018); 11. Edeogu y col. (2019); 12. Famurewa y col. (2019b); 13. Fernandes y col. (2021).

2.4.3. Actividad anticancerígena

Numerosos estudios recientes han evaluado la actividad anticancerígena de la semilla de moringa en cultivos celulares y modelos animales (**Tabla 8**), obteniéndose resultados prometedores que abren una nueva vía para el futuro desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos a partir de moringa. Un estudio realizado en dos líneas celulares de colangiocarcinoma, un tipo de cáncer que se origina en los conductos biliares, concluyó que extractos de semilla de moringa obtenidos en etanol al 70% inhibían la proliferación celular y promovían la apoptosis celular mediante la inducción de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la disfunción mitocondrial (Leelawat y Leelawat, 2014). Shu y col. (2018) revelaron que la semilla de moringa presentó propiedades anti-metastásicas en células de cáncer gástrico. De manera similar, Potestà y col. (2019) observaron efectos pro-apoptosis y antiproliferativos de extractos acusos de semilla de moringa en células linfocitarias y monocitarias tumorales. Adebayo y col. (2020), por su parte, encontraron que extractos de semillas de moringa obtenidos en hexano inducían la apoptosis y la detención del ciclo celular y modulaban la expresión de diversas proteínas (HSP60, NPM, PGK1, RCN1, and PDIA1) implicadas en fenómenos de metástasis, invasividad celular y glucolisis en una línea celular de cáncer de mama. Extractos etanólicos y acuosos de semilla de moringa también han demostrado efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer de lengua y nasofaríngeo (Wang y col., 2020). Así mismo, extractos etanólicos obtenidos a partir de semilla de moringa potenciaron notablemente la actividad de enzimas detoxificantes (glutatión-S-transferasa y quinona oxidoreductasa) en una línea celular de cáncer colorrectal e inhibieron la proliferación celular (Fuel y col., 2021). El aceite de semilla de moringa, además, presenta potencial anticancerígeno, de acuerdo con los resultados de dos estudios recientes. El primero de ellos demostró que el aceite de esta semilla causaba citotoxicidad en diferentes líneas de células cancerígenas humanas (cáncer cervical, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, y adenocarcinoma de colon) y fibroblastos de ratón, cuando se aplicó en concentraciones en el rango 0,015-1,0 mg/mL durante 24 h (Elsayed y col., 2015). En el segundo estudio, se observó que el aceite de esta semilla en su forma libre y en forma de nanomicelas promovía la apoptosis de las células cancerígenas mediante la inducción de disfunciones mitocondriales (Abd-Rabou y col., 2016).

Con respecto a las investigaciones llevadas a cabo en animales de experimentación (**Tabla 8**), Budda y col. (2011) administraron vainas con semillas de moringa hervidas y

liofilizadas en diferentes concentraciones (1,5%, 3% y 6%) a un modelo de ratón de carcinogénesis de colon inducida por sulfato sódico dextrano y azoximetano (DSS/AOM). Este estudio reveló que la proliferación de células tumorales y le incidencia tumoral disminuyó muy significativamente en los ratones en los que se administró las semillas de moringa conjuntamente con dicho agente químico, o bien previamente o posteriormente al mismo, en comparación con los ratones expuestos únicamente al DSS/AOM. Los efectos anticancerígenos de las semillas de moringa, además, fueron mayores con la dosis más elevada (6%). Recientemente, Zunica y col. (2021) han puesto de manifiesto que extractos de semilla de moringa inhiben la angiogénesis en tumores de mama triple negativo en un modelo preclínico de ratón obeso, uno de los cánceres más agresivos, si bien este efecto fue revertido cuando los extractos de moringa se emplearon en combinación con agentes quimioterápicos. Los isotiocianatos parecen ser los principales responsables de la actividad anticancerígena de la semilla de moringa, ya que estudios *in vitro* han demostrado que estos compuestos derivados de los glucosinolatos inhiben la proliferación de células cancerígenas y su migración y promueven su apoptosis (Rajan y col., 2016a; Jaafaru y col., 2018; Cirmi y col., 2019; Wang y col., 2019a). Sin embargo, otros compuestos bioactivos de la semilla de moringa como las lectinas también han mostrado actividad anticancerígena al promover fenómenos de apoptosis en células cancerígenas (de Andrade Luz y col., 2017; Asaduzzaman y col, 2018). El β-sitosterol, otro de los compuestos bioactivos presentes en la semilla de moringa, también presenta potencial quimiopreventivo frente al cáncer de próstata y mama, a juzgar por los resultados obtenidos en un estudio de acoplamiento molecular a biomarkadores de cáncer (Apeh y col., 2022). A pesar de los resultados prometedores sobre la potencial actividad anticancerígena de la semilla de moringa y sus compuestos bioactivos, aún no se han realizado ensayos clínicos de envergadura para confirmar estos efectos.

Tabla 8. Actividad anticancerígena de la semilla de moringa (SM) y del aceite de semilla de moringa (ASM) determinada en estudios *in vitro* e *in vivo*

Tipo de estudio	Tipo de extracto/muestra	Modelo (in vitro o animal)/tratamiento y duración	Resultados relevantes (grupo tratado vs control)	Ref.
In vivo	Vainas con semillas hervidas en polvo (VHP)	Rata con colitis asociada a cáncer colorrectal inducido por dextrano sulfato sódico y azoximetano. Dieta basal suplementada (1,5%, 3% o 6% de VHP) durante 5 semanas (Grupos 3-5) o durante 2 semanas previas a la inducción de cáncer y una semana después (grupos 6-8)	↓ incidencia y multiplicación de tumores e índice PCNA en grupo 8 ↓ expresión de iNOS y COX-2 en grupos 7 y 8.	1
In vitro	Extracto etanólico	Líneas celulares de colangiocarcinoma (RMCCAI y KKU100). Concentraciones de extracto: 10 y 100 µg/mL	↓ proliferación celular y ↑apoptosis.	2
In vitro	ASM	Líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7), carcinoma hepatocelular (HepG2), cáncer cervical (HeLa), fibroblastos de ratón (L929) y adenocarcinoma de colon (Caco-2) Concentraciones ASM: 0,015-1mg/mL	↓ viabilidad celular (% toxicidad: 60%, 65%, 76%, , 57% y 49% para MCF-7, HepG2, HeLa, L929 y Caco-2, respectivamente).	3
In vitro	ASM o ASM en nanomicelas (ASMn)	Líneas celulares de cáncer de mama (MCFS), colorrectal (HCT 116 y Caco-2), hepático (HpeG2) y células renales no cancerígenas (BHK-21). Concentraciones de ASM 20-100 µg/mL	↑ apoptosis (608% y 568% para ASM y ASMn, respectivamente) en células cancerígenas a través de la inducción de disfunciones mitocondriales. Sin efecto en células no cancerígenas.	4
In vitro	Extracto metanólico	Líneas celulares de cáncer gástrico (AGS, SGC7901, MKN45). Concentraciones de extracto: 25-200 µg/mL	↓ metástasis celular con la dosis menor y ↑expresión de la proteína supresora de metástasis NDRG1	5
In vitro	Extracto acuoso	Linfocitos humanos (Jurkat E6-1) y monocitos (THP1). Concentraciones de extracto equivalentes a 0,01-10 mg de extracto de SM fresco/mL	↓ Proliferación celular de manera dosis dependiente. ↑ Apoptosis y de niveles de BCL2 y SIRT1.	6
In vitro	FHEM	Lineas celulares de cáncer de mama (MCF7, MCF, 10A, MDA-MB-231). Concentraciones de extracto 0,25-4 mg/mL	↓proliferación celular (MCF7 y MDA-MB-231) ↑apoptosis y detención del ciclo celular en MCF7. Alteración de expresión de HSP60, NPM, PGK1, RCN1 y PDIA1.	7
In vitro	Extracto etanólico	Línea de células escamosas de cáncer de lengua (CAL27) y carcinoma nasofaríngeo (CNE-1). Concentración de extracto: 0,8 mg/mL	↓ Proliferación (IC_{50}: 1,10 y 1,22 mg/mL, para CNE-1 y CAL27, respectivamente) y ↑ apoptosis.	8
In vitro	Extracto etanólico	Líneas celulares de cáncer colo-rectal (HT29, T84, HCT-15, SW480, HTR-29 and CCD-18	↓ Proliferación(IC_{50}:19,8-98,9 µg/mL) y marcadores cancerígenos (CD133, CD24, SOX2 y NANOG), ↑ fases G1 y S del ciclo celular y de la expresión de caspasas (3, 8 y 9; 1,8, 1,1 y 2,2-veces, respectivamente).	9

In vivo	Extracto etanólico	Ratón obeso con cáncer de mama triple negativo. Dieta rica en grasa suplementada con el extracto etanólico (0,6% p/p) sólo o en combinación con un agentes quimioterápicos (doxorrubicina y ciclofosfamida)	↓ glucosa posprandial y angiogénesis en los tumores con tratamiento de extracto etanólico sólo, pero el efecto se revierte al aplicarlo en combinación con quimioterapia. ↑ sensibilidad a la glucosa. ↑ progresión del cáncer de mama en combinación con quimioterapia.	10

ASM: aceite de semilla de moringa. BCL2: proteína de linfoma 2 de células B. CAT: catalasa. COX-2: ciclooxigenasa-2. FHEM: Fracción obtenida en hexano a partir de extractos etanólicos. GPx: glutatión peroxidasa. GSH: glutatión reducido. HSP60: proteína de choque térmico 60. IL-1β: interleuquina1β. IL-6: Interleuquina 6. iNOS: óxido nítrico sintasa inducible. KC: quimiocina derivada de queratinocitos. Lcn-2: Lipocalina-2 fecal. LPS: lipopolisacárido bacteriano. MDA: malondialdehído. MIC-1: moringa isotiocianato-1. MPO: mieloperoxidasa. NF-κβ: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. NPM: nucleofosmina. PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular. PDIA1: proteína disulfuro isomerasa. PGK1: fosfoglicerato quinasa. RCN1: retículocalbina. SIRT1: sirtuina-1. SM: semilla de moringa. SOD: superóxido dismutasa. NO: óxido nítrico. TNF-α: factor de necrosis tumoral α.

Referencias. 1. Budda y col. (2011); 2. Leelawat y Leelawat (2014): 3. Elsayed y col. (2015); 4. Abd-Rabou y col. (2016); 5. Shu y col. (2018); 6. Potestà y col. (2019); 7. Adebayo y col. (2020); 8. Wang y col. (2020); 9. Fuel y col. (2021); 10. Zunica y col. (2021).

2.4.4. Actividad antidiabética

Diversas evidencias científicas han demostrado que las semillas de moringa también presentan efectos hipoglicémicos (**Tabla 9**). Al-Malki y Rabey (2015) estudiaron la influencia de las semillas de moringa en polvo cuando se incorporaron en dos dosis diferentes (50 y 100 mg/kg de peso) a la dieta de ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (SZT). Los resultados mostraron reducciones de 35% y 45% en los niveles de glucosa en ayunas y 13% y 22% en los niveles de hemoglobina glicada tras el tratamiento durante 4 semanas con las dosis de 50 mg/kg y 100 mg/kg, respectivamente, en comparación con el control positivo del estudio. Posteriormente, Oboh y col. (2018) evaluaron el efecto de la administración de semillas de moringa (2% y 4%) durante 14 días, con o sin acarbosa (compuesto inhibidor de las enzimas α-glucosidasa y α-amilasa), en los niveles de glucosa en ayunas de un modelo de ratón con diabetes inducida por SZT. Estos autores observaron una reducción significativa dosis-dependiente de los mismos, tanto cuando se administraron las semillas solas como con acarbosa. Así mismo, extractos hidroetanólicos de semillas de moringa ricos en isotiocianatos (161 mg de MIC-1/kg) redujeron notablemente los niveles de glucosa plasmática cuando se realizaron test de tolerancia a la glucosa durante 12 semanas en ratones obesos con diabetes inducida por una dieta rica en grasas, con respecto a los ratones diabéticos no tratados (Jaja-Chimedza y col., 2018). Owolabi y col. (2020), por su parte, evaluaron el efecto de la administración oral de extractos acuosos (100, 200 and 400 mg/kg) de vainas de semillas de moringa en ratas normales y con diabetes inducida por aloxano. Los resultados de este estudio indicaron que los extractos de vaina de moringa reducían significativamente los niveles de glucosa en ayunas y postprandial en las ratas diabéticas, y esta disminución fue comparable a la producida por un fármaco antidiabético (glibenclamida). Estos autores también observaron reducciones en los niveles de glucosa en las ratas diabéticas en el test de tolerancia a la glucosa realizado durante 21 días, siendo la reducción mayor con la dosis de 200 mg/kg ya que disminuía los niveles de glucosa plasmática junto con los de las enzimas alanina transferasa y aspartato transaminasa.

Tabla 9. Actividad antidiabética de la semilla de moringa (SM) determinada en estudios *in vivo*.

AchE: acetilcolinesterasa. ALT: alanina transferasa. AST: aspartato transaminasa. BchE: butirilcolinesterasa. ECA: Enzima convertidora de angiotensina I. Hb: hemoglobina. MIC-1: moringa isotiocianato-1. SM: semilla de moringa.

Tipo de extracto/muestra	Modelo animal/tratamiento y duración	Resultados relevantes (grupo tratado vs control)	Ref.
SM	Rata con diabetes y nefropatía diabética inducida por SZT/(50 y 100 mg/kg peso), 4 semanas.	↓ glucosa en ayunas y Hb glicada y restauración de la histología y función renales	1
SM	Rata con diabetes inducida por SZM/dieta basal suplementada con SM (2% y 4%) con/sin acarbosa, 14 días.	↓ glucosa en ayunas, AchE, BchE y ECA	2
Extracto hidroalcohólico	Ratón con dieta rica en grasa suplementada con el extracto (0,54%), 12 semanas.	↓ glucosa plasmática	3
Extracto acuoso de vaina	Rata con diabetes inducida por aloxano/administración oral (100, 200 y 400 mg/kg), 21 días.	↓ glucosa en ayunas y postprandial, ALT y AST ↑ tolerancia a la glucosa	4

STZ: estreptozotocina.

Referencias: 1. Al-Malki y El Rabey (2015). 2. Oboh y col. (2018). 3. Jaja-Chimedza y col. (2018). 4. Owolabi y col. (2020).

2.5. Aplicación de la semilla de moringa en el desarrollo de alimentos

En los últimos años, se ha observado un enorme interés en el desarrollo de alimentos saludables de alto valor nutricional incorporando *M. oleífera* como ingrediente. La mayor parte de las investigaciones en este campo se han centrado en la hoja de moringa, si bien los estudios realizados empleando semilla de moringa son comparativamente menos numerosos.

Varios grupos de investigación han evaluado el empleo de semilla de moringa en polvo para la elaboración de alimentos horneados (**Tabla 10**). En este contexto, Ogunsina y col. (2011) elaboraron panes y galletas reemplazando la harina de trigo por harina de semillas de moringa (5-15% y 10-30%, respectivamente), hervidas en agua para eliminar el amargor. La adición de harina de moringa mejoró las propiedades nutricionales del pan y las galletas al incrementar los contenidos de proteína, cenizas, lípidos, hierro, calcio y disminuir el de hidratos de carbono. Sin embargo, la inclusión de harina de moringa afectó negativamente a las características tecnológicas y sensoriales de ambos alimentos, disminuyendo la absorción de agua, estabilidad de la masa y la calidad sensorial del pan y de las galletas en comparación con las elaboradas con harina de trigo (control). La incorporación de harina de moringa (5-15%) en combinación con harina de chufa germinada (5-15%) durante la elaboración de pan incrementó el contenido proteico, de fibra, cenizas, Fe, Ca y Mg y disminuyó el de carbohidratos y de Na con respecto al pan de trigo convencional mejorando, además, su volumen sin afectar negativamente a sus propiedades sensoriales (Chinma y col., 2014a). Bolarinwa y col. (2019) observaron que la sustitución de harina de trigo por harina de semilla

de moringa (5-20%) incrementó notablemente el contenido de proteína, cenizas, lípidos y fibra y disminuyó los niveles de carbohidratos en los panes obtenidos en comparación con el pan control. El contenido de minerales (P, K, Ca y Fe) y vitamina A también aumentó significativamente y de manera lineal al incrementar la cantidad de harina de semilla de moringa empleada. Los panes elaborados con 5% de harina de semilla no mostraron diferencias sensoriales significativas con respecto al pan control, si bien el empleo de cantidades superiores afectó negativamente a la calidad sensorial del pan. Por otra parte, la sustitución parcial de harina de trigo por harina de semilla de moringa (2,5-7,5%) durante la elaboración de galletas incrementó de manera dosis-dependiente el contenido de proteína, lípidos, fibra (total, soluble e insoluble), aminoácidos y el de minerales, y disminuyó los niveles de carbohidratos. Además, se observó un aumento del peso y del grosor de las galletas y una disminución de su volumen (Rabie y col., 2020).

Chinma y col. (2014b) investigaron el efecto de la sustitución parcial (10-40%) de harina de trigo por harina de semilla de moringa germinada sobre la calidad nutricional, sensorial y tecnológica de bizcochos y observaron un incremento significativo del contenido de proteína, fibra y minerales (Zn, Fe y Ca) en comparación con el bizcocho control elaborado con harina de trigo. No se observaron diferencias en el color de la corteza y la miga, aroma y textura entre los bizcochos que contenían harina de moringa germinada y los controles, si bien la incorporación de harina de moringa germinada en niveles superiores al 30% disminuyó la aceptabilidad sensorial.

Dhawi y col. (2020) investigaron la adición de harina de semilla de moringa (0,1%-0,2%) sobre las propiedades nutricionales y bioactivas del yogurt (**Tabla 10**) y mostraron un incremento del contenido de minerales (Ca, P, K y Fe) y de compuestos fenólicos, así como de las actividades antioxidante y antimicrobiana frente a diversos patógenos (*E. coli, S. aureus, L. monocytogenes* y *Salmonella* spp). Posteriormente, Quintanihla y col. (2021) evaluaron el empleo de extractos de semilla de moringa (1-3 mL/L) obtenidos en solución salina (1 M) como ingrediente para mejorar las propiedades tecnológicas del yogurt. Estos autores observaron que los yogures elaborados con extracto de semilla moringa presentaron menor susceptibilidad a la sinéresis, mayor firmeza y microestructura más homogénea y compacta que los yogures control, siendo la concentración de extracto de 2 mL/L la que causó los mejores resultados.

Aluko y col. (2013) estudiaron la influencia de la adición de harina de semilla de moringa (2,5-7,5%) en la calidad nutricional y sensorial de snacks de harina de maíz (**Tabla 10**). Los autores observaron un aumento en el contenido de proteína, cenizas, lípidos y fibra, así como

en la capacidad de absorción de agua a medida que se incrementaba la cantidad de harina de moringa incorporada. Los snacks producidos mostraron buenas propiedades sensoriales, si bien la aceptabilidad general fue inferior a la de los snacks control elaborados únicamente con harina de maíz. Jude-Ojei y col. (2017) evaluaron el efecto de la incorporación de harina procedente de semilla de moringa fermentada espontáneamente durante dos días en las propiedades tecno-funcionales del ogi, gachas fermentadas de maíz muy populares en ciertas regiones de África. La inclusión de harina de moringa fermentada afectó negativamente a la capacidad de absorción de agua, la densidad aparente y la capacidad de hinchamiento de estas gachas.

Los estudios realizados demuestran que la harina de semilla de moringa es un ingrediente de gran interés para mejorar la calidad nutricional de diversos alimentos, si bien esta mejora, en ocasiones, se realiza en detrimento de las propiedades organolépticas de los alimentos desarrollados. Por ello, es necesario desarrollar nuevos alimentos que, además de ser nutritivos y saludables, sean sensorialmente atractivos para el consumidor.

Tabla 10. Aplicación de harina de semilla de moringa (SM) en el desarrollo de alimentos.

Alimento	Ingrediente base	Harina de semilla de moringa	Resultados relevantes (alimento ingerido vs control)	Ref.
Pan	Harina de trigo	5-15%	↑Proteína (20-57%), cenizas (84-128%) lípidos (192-614%), Fe (30-100%), Ca (18-56%) ↓ Carbohidratos (3-15%), absorción de agua (5-10%), estabilidad masa (38-55 min)	1
Pan	Harina de trigo (70-90%)/ chufa germinada (5-15%)	5-15%	↑ Proteína (17-50%), cenizas (63-117%), lípidos (20-51%), fibra (88-382%), Fe (37-81%), Ca (17-23%), Mg (13-58%), peso rebanada (2-3%) ↓ Carbohidratos (11-29%), energía (1-3%), sodio (14-28%), volumen rebanada (2-4%)	2
Pan	Harina de trigo	5-20%	↑ Proteína (20-67%), cenizas (129-179%), lípidos (33-115%), fibra (125-675%), P (163-200%), K (21-46%), Ca (69-147%), Fe (40-90%), vitamina A (100-300%) ↓ Carbohidratos (8-20%), calidad sensorial (HSM >5%)	3
Galletas	Harina de trigo	10-30%	↑ Proteína (45-141%), cenizas (26-44%), lípidos (14-33%), Fe (72-223%), Ca (40-116%) ↓ Carbohidratos (8-22%), resistencia a la rotura (1-14%), aceptabilidad (6-37%), grosor (4-9%)	1
Galletas	Harina de trigo	2,5-7,5%	↑ Proteína (9-28%), lípidos (3-8%), fibra soluble (18-55%), fibra insoluble (19-57%), fibra total (19-56%), AAE (2-6%), AANE (2-7%), AAT (2-7%), K (4-9 veces), Ca (32-85%), Mg (121-263&), Na (47-139%, P (12-37%), Fe (33-142%), Zn (35-106%), peso (2-24%), grosor (11-21%) ↓ Carbohidratos (2-7%), volumen (2-5%)	4
Galletas	Harina de trigo	CPSM (2-6%)	↑ Proteína (4-23%), cenizas (72-120%), peso (30-60%) ↓ Carbohidratos (2-6%), grosor (4-20%)	5
Snacks	Harina de maíz	2,5-7,5%	↑Proteína (72-276%), fibra (25-142%), grasa (433-1000%), cenizas (233-900%), capacidad de absorción de agua (1-20%)	6
Bizcocho	Harina de trigo	20-40% HSMG	↑ Proteína (20-76%), cenizas (21-86%), Lípidos (23-39%), fibra (76-255%), Zn (9-67%), Fe (22-167%), Ca (4-12%) ↓ Aceptabilidad sensorial (>30% HSMG)	7
Ogi	Maíz	10-100% HSMF	↓ Absorción de agua (11-28%), densidad aparente (14-45%), capacidad de hinchamiento (harina) (5-21%)	8
Yogurt	Leche de búfala	0,1% y 0,2% p/v	↑ Ca (22-32%), P (4-8%), K (21-33%), Fe (21-33%), compuestos fenólicos totales, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana vs *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp.	9
Yogurt	Leche de vaca	Extractos de HSM (1, 2 y 3 mL/L)	↓ susceptibilidad a la sinéresis ↑ firmeza y microestructura del yogurt; Concentración de extracto óptima: 2 mL/L	10

AAE; aminoácidos esenciales. AANE: aminoácidos no esenciales. AAT: aminoácidos totales. CPSM: concentrado proteico de semilla de moringa. HSMF: harina de semilla de moringa fermentada. HSMG: harina de semilla de moringa germinada. SM: semilla de moringa. p: peso; v: volumen.

Referencias. 1. Ogunsina y col. (2011); 2. Chinma y col. (2014a); 3. Bolariwa y col. (2019); 4. Rabie y col. (2020); 5. Aderinola y col. (2020); 6. Aluko y col. (2013); 7. Chinma y col. (2014b); 8. Jude-Ojei y col. (2017); 9. Dhawi y col. (2020); 10. Quintanilha y col. (2021).

2.6. La germinación: estrategia tecnológica para mejorar las propiedades nutricionales y bioactivas de la moringa

2.6.1. Aspectos generales de la germinación

La germinación es un proceso natural que se inicia con la absorción de agua por parte de una semilla y finaliza con la aparición de la radícula de la planta a través de las cubiertas de la semilla (Carrera-Castaño y col., 2020). La captación de agua durante el remojo que precede a la germinación produce diferentes eventos bioquímicos que debilitan las cubiertas de las semillas, activan el metabolismo y la transcripción genética, degradan las paredes celulares, se sintetizan nuevos orgánulos, se activan enzimas endógenas y se movilizan las sustancias de reserva (Benincasa y col., 2019). Los eventos producidos durante la germinación causan la degradación, movilización y acumulación de nutrientes y antinutrientes y la formación de compuestos con actividad biológica de distinta naturaleza, produciéndose notables cambios en la composición y propiedades sensoriales de las semillas (Benincasa y col., 2019). La germinación se ha empleado tradicionalmente para ablandar la semilla y mejorar el aroma, la textura y la palatabilidad, pero en las últimas décadas ha adquirido gran interés como una estrategia económica, sostenible y respetuosa con el medio ambiente para incrementar las propiedades nutricionales y beneficiosas para la salud de las semillas y los granos (Benincasa y col., 2019).

Los germinados o brotes se definen como el "producto obtenido de la germinación de semillas y su desarrollo en agua u otro medio, que se cosechan antes del desarrollo de las hojas y que se consumen enteros, incluyendo la semilla" (Reglamento (EC) No 208/2013). Los germinados de semillas han despertado un interés creciente en los últimos años ya que son alimentos que están en consonancia con las preferencias de los consumidores actuales, que demandan cada vez más alimentos de origen vegetal, nutritivos y saludables, que no contengan aditivos y que se produzcan con tecnologías sin impacto medioambiental (Graça col., 2019; Li y Kallas, 2021; Maruyama y col., 2021). En la actualidad, existe una amplia variedad de germinados en el mercado, si bien los germinados de legumbres (alfalfa, soja, judía mungo), pseudocereales (trigo sarraceno) y brásicas (brócoli, berro, col roja) son los más populares. Los germinados se consumen generalmente crudos, debido a que sus colores, aromas y sabores particulares confieren propiedades organolépticas atractivas a ensaladas y otros alimentos. No obstante, sus excelentes propiedades nutricionales, junto con su elevado contenido de compuestos biológicamente activos y su característico aroma y sabor convierten a los germinados en un potencial ingrediente innovador para el mercado actual

de alimentos saludables que demanda el consumidor. En este contexto, la producción de harinas a partir de semillas y granos germinados constituye una tendencia innovadora tanto en el campo de la investigación como para la industria alimentaria (Aparicio-García y col., 2020; Rico y col., 2020; Aparicio-García y col., 2021a). Estudios recientes han empleado harinas obtenidas a partir de granos germinados tanto en procesos de panificación (Horstmann y col., 2019; Cardone y col., 2020; Peñaranda y col., 2021; Perri y col., 2021), como ingrediente para el desarrollo de yogures y bebidas con características nutricionales mejoradas y efectos beneficiosos para la salud (Cáceres y col., 2017; Aparicio-García y col., 2021b; Peñaranda y col., 2021).

El lanzamiento al mercado de alimentos derivados de los germinados se ha incrementado exponencialmente en la pasada década en todas las categorías de alimentos a nivel mundial, observándose un incremento del 26% entre 2012 y 2016, de acuerdo a un estudio realizado por la agencia de tendencias de consumo Mintel (Pagand y col., 2017). Según este estudio, la principal categoría de alimentos en cuanto al lanzamiento de productos entre 2015 y 2017 fueron los snacks, seguido de las harinas y los productos horneados.

A pesar de la gran oportunidad de innovación que proporcionan los germinados a la industria alimentaria y del gran potencial de la moringa como ingrediente para el desarrollo de alimentos funcionales, la semilla de moringa apenas se ha empleado para la producción de germinados, no existiendo en la actualidad alimentos comerciales derivados de la semilla de moringa germinada. La producción de germinados de moringa, por tanto, abre una nueva línea de innovación en la industria alimentaria encaminada a satisfacer las demandas de los consumidores actuales y a valorizar el cultivo y utilización de la semilla de moringa.

2.6.2. Influencia de la germinación en el contenido y biodisponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos de la moringa

En la última década se han llevado a cabo un gran número de estudios encaminados a evaluar los cambios en la composición de nutrientes y fitoquímicos causados por el proceso de germinación en una amplia variedad de semillas. Sin embargo, los estudios de germinación en la semilla de moringa son aún muy limitados y se dirigen, principalmente, a evaluar la composición nutricional y propiedades tecno-funcionales de las harinas de los germinados de moringa obtenidos en condiciones de germinación determinadas.

Estos estudios han demostrado que la germinación a 22-30 °C durante 3-8 días causó un aumento del contenido proteico de la semilla de moringa debido a la síntesis de novo de

proteínas estructurales (Ijarotimi y col., 2013; Matthew y col., 2021; Saa y col., 2022). Así mismo, la germinación incrementó el contenido de aminoácidos libres, esenciales y no esenciales, por activación de las rutas de biosíntesis de aminoácidos necesarios para la formación de nuevas proteínas en la semilla de moringa en desarrollo (Ijarotimi y col., 2013; Matthew y col., 2021).

El contenido de hidratos de carbono, por el contrario, disminuyó notablemente en la semilla de moringa tras el proceso de germinación, fenómeno atribuido fundamentalmente a la hidrólisis de almidón, por activación de enzimas amilasas endógenas, dando lugar a azúcares libres que sirven como fuente de energía para el desarrollo del embrión (Matthew y col., 2021; Saa y col., 2022). Así, Tesfay y col. (2016) observaron un aumento del contenido de glucosa y fructosa en la semilla de moringa durante las primeras 72 h de germinación. Respecto al contenido de fibra, los resultados son variables: algunos estudios han evidenciado un incremento tanto de la fibra total como de las fracciones soluble e insoluble en los germinados de moringa obtenidos durante 4-8 días (Ijarotimi y col., 2013; Saa y col., 2022), mientras que Matthew y col. (2021) no observaron cambios significativos en el contenido de fibra total tras la germinación durante 3 días de semillas de moringa.

El contenido de lípidos también se vio afectado por la germinación, si bien de diferente manera dependiendo del cultivar de semilla de moringa considerado y de las condiciones de germinación. Ijarotimi y col. (2013) observaron un aumento del contenido lipídico tras la germinación de semillas de moringa africanas a 30 °C durante 4 días, resultados también observados en un estudio más reciente realizado en semillas de origen africano germinadas durante 3 días a temperatura ambiente (Matthew y col., 2021). Sin embargo, Saa y col., (2022) no apreciaron cambios estadísticamente significativos en el contenido de lípidos tras la germinación de semillas de moringa durante 8 días. La germinación también causó cambios significativos de la composición de ácidos grasos en la semilla de moringa, observándose un aumento del contenido de ácidos grasos saturados, fundamentalmente ácido palmítico y esteárico, así como de poliinsaturados, en particular de ácido linoleico (Ijarotimi y col., 2013). A su vez, Salama y col. (2020) pusieron de manifiesto un incremento de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados en la semilla de moringa tras la germinación durante 3 días, aunque observaron que el contenido de ácidos grasos saturados, particularmente palmítico y esteárico, disminuía tras este proceso.

El valor energético también disminuyó en semillas de moringa germinadas debido, fundamentalmente, a la hidrólisis de lípidos e hidratos de carbono complejos y a la

utilización de los productos de hidrólisis resultantes para la obtención de la energía necesaria para el desarrollo de la nueva planta (Ijarotimi y col., 2013).

El contenido de cenizas no se vio modificado (Saa y col., 2022) o bien se redujo ligeramente (Ijarotimi y col., 2013; Matthew y col., 2021) en los germinados de semilla de moringa. En esta línea, Ijarotimi y col. (2013) revelaron que el perfil de minerales de la semilla de moringa apenas se modificó cuando se germinó durante 4 días, observándose ligeras reducciones del contenido de Ca, P, Fe, Na, K y Mg. De modo similar, el contenido de tocoferoles (α-, β-γ- y δ-tocoferol) de la semilla de moringa disminuyó tras 72 h de germinación (Salama y col., 2020).

La germinación durante 4 días no causó, por otra parte, cambios importantes de las propiedades tecno-funcionales (capacidad espumante, capacidad de hinchamiento, capacidad de absorción de agua, densidad) de la harina de moringa obtenida a partir de semilla de moringa germinada (Ijarotimi y col., 2013). Sin embargo, el color de las harinas se modificó tras periodos de germinación prolongados (8 días), observándose una disminución de la luminosidad (parámetro L*) y blancura y un aumento de los parámetros a* y b* (Saa y col., 2022).

Tesfay y col. (2016) investigaron el efecto de diferentes rangos de temperatura (30/20 °C, 25/15 °C y 20/10 °C) y tiempos de germinación (48 y 72 h) sobre la capacidad germinativa y el contenido de azúcares, compuestos fenólicos y actividades enzimáticas de la semilla de moringa. Los autores demostraron que el aumento de la temperatura tenía un efecto positivo sobre la capacidad germinativa de las semillas de moringa, acumulación de compuestos fenólicos y actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa), α-amilasa y fenilalanina amonio liasa, así como en la actividad antioxidante de los germinados obtenidos.

Estos estudios de germinación descritos revelan que la temperatura y el tiempo de germinación tienen una enorme influencia en el potencial nutricional y bioactivo de la semilla de moringa. Sin embargo, no existen estudios dirigidos a optimizar las condiciones del proceso para maximizar la acumulación de nutrientes y compuestos bioactivos en los germinados de moringa, aspecto de indudable interés para obtener harinas e ingredientes derivados con características mejoradas que se puedan emplear en el desarrollo de alimentos saludables, nutritivos y atractivos.

III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Justificación

En las últimas décadas se ha producido una modificación en las tendencias de consumo de los países desarrollados hacia alimentos precocinados y listos para consumir que se adapten al ritmo de vida frenético actual. Estos alimentos presentan, generalmente, una calidad nutricional muy pobre que, junto con la falta de actividad física de la población, ha conducido a un aumento de la incidencia de sobrepeso, así como de enfermedades crónicas degenerativas como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 e, incluso, cáncer (AESAN, 2020; Monge y col., 2021; Zhang y col., 2022). Paralelamente, se estima que 820 millones de personas en todo el mundo (1 de cada 9 personas) padecen hambre y que 149 millones de niños con edad inferior a 5 años presentan problemas de desnutrición (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO, 2019). Se prevé que ambas situaciones de malnutrición empeoren en los próximos años debido a las alteraciones del sistema alimentario causadas por la pandemia de COVID-19 (Headey y col., 2020). Esta situación dificultará, sin ninguna duda, que se alcancen las metas de los Objetivos 2 (acabar con el hambre, lograr la seguridad alimentaria, mejorar la nutrición y promover la agricultura sostenible) y 3 (garantizar una vida sana y promover el bienestar en todas las edades) de la Agenda de Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) impulsada por la ONU para el año 2030. Por otra parte, el rápido crecimiento demográfico mundial, el cambio climático y la mayor concienciación de los consumidores sobre la necesidad de una adecuada alimentación para la prevención de enfermedades crónicas (Chapman y col., 2021) indica la necesidad de modificar el sistema actual de producción de alimentos para preservar el medio ambiente y poder garantizar el acceso a alimentos seguros, nutritivos y saludables a toda la población. En este contexto, la industria agroalimentaria se enfrenta a nuevos desafíos con el fin de proporcionar alimentos de mayor calidad nutricional y propiedades beneficiosas para la salud que se produzcan de manera sostenible y que permitan alimentar a una población mundial en continuo crecimiento. La innovación en las tecnologías de procesado de alimentos y la búsqueda de nuevas materias primas más sostenibles es crucial para conseguir estos objetivos.

La moringa (*Moringa oleífera*) se conoce desde tiempos ancestrales por sus propiedades nutricionales y beneficios para la salud. El rápido crecimiento del árbol de moringa unido a su alta capacidad de adaptación a un amplio rango de condiciones agro-climáticas y su contribución a aumentar la fertilidad y la conservación de la humedad del suelo (Palada, 2021) convierten el cultivo de moringa en un aspecto de enorme interés para

ayudar a mitigar el cambio climático. A pesar de que las vainas, raíces, corteza, flores y hojas de la moringa se han utilizado en la industria textil y cosmética, como parte de la medicina tradicional y para la alimentación de ganado, su uso alimentario se reduce a la preparación de platos tradicionales en ciertas regiones de Asia y África. El uso de la semilla de moringa con propósitos nutricionales, sin embargo, es un aspecto aún por explorar. Considerando el alto valor nutricional y el contenido de compuestos con actividad biológica de esta semilla (revisados a lo largo de la introducción de esta Tesis Doctoral), su incorporación en los alimentos como ingrediente para mejorar la calidad nutricional y las propiedades beneficiosas para la salud representa una estrategia dietética altamente innovadora. El desarrollo de alimentos derivados de la semilla de moringa, además, está en línea con las preferencias de los consumidores actuales que demandan cada vez más alimentos de origen vegetal nutritivos y saludables, así como con las políticas de salud actuales que aconsejan consumir más alimentos vegetales como componente clave de la transición hacia un sistema alimentario más saludable y sostenible (Bauer y col., 2022).

La germinación es una estrategia natural, económica y respetuosa con el medio ambiente que se emplea cada vez más para incrementar la calidad nutricional, potenciar la síntesis de compuestos con actividad biológica y mejorar las propiedades organolépticas de una gran variedad de semillas. Sin embargo, el empleo de este proceso tecnológico para el desarrollo de nuevos ingredientes alimentarios es muy incipiente todavía. La germinación de semillas de moringa y la incorporación de las harinas obtenidas para la elaboración de alimentos más nutritivos y saludables representa, por tanto, un enfoque prometedor, tanto en su vertiente tecnológica como dietética, que abre la puerta a nuevas vías de innovación en la industria agroalimentaria, así como a potenciar su cultivo y uso alimentario que puedan ayudar a contrarrestar los efectos adversos del cambio climático, contribuyendo, paralelamente, a la mejora del estado nutricional, bienestar y salud de los consumidores.

3.2. Hipótesis

Considerando los antecedentes descritos, la hipótesis de partida de la presente Tesis Doctoral se basa en que la germinación en condiciones óptimas de tiempo y temperatura mejorará la calidad nutricional y la acumulación de compuestos bioactivos de la semilla de moringa. Además, la incorporación de la harina obtenida a partir de la moringa germinada en alimentos de consumo frecuente a nivel mundial como la pasta y las barritas de cereales permitirá mejorar sus propiedades nutricionales y su potencial saludable.

3.3. Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es la valorización de la semilla de moringa mediante el desarrollo de harinas innovadoras empleando el proceso de germinación y su aplicación como ingrediente funcional para mejorar el valor nutricional y el potencial bioactivo de alimentos de alto consumo mundial como la pasta y los snacks.

Para la consecución de este objetivo global se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la influencia de las condiciones de germinación (tiempo y temperatura) sobre las propiedades nutricionales y el contenido de compuestos bioactivos de la semilla de moringa.
2. Establecer las condiciones óptimas de germinación para maximizar la calidad nutricional y la acumulación de compuestos bioactivos en la semilla de moringa.
3. Caracterizar la composición nutricional y el perfil de compuestos bioactivos en las harinas obtenidas a partir de la semilla de moringa germinada en condiciones óptimas.
4. Estudiar el efecto de la incorporación de harina de moringa germinada en condiciones seleccionadas sobre la calidad nutricional, el potencial bioactivo y las propiedades tecnológicas y sensoriales de pasta tipo tallarines.
5. Evaluar la influencia de la incorporación de harina de moringa germinada en condiciones seleccionadas para desarrollar snacks tipo barritas de alta calidad nutricional, bioactiva y sensorial y estudiar sus costes de producción y su posible aceptación e intención de compra por parte de los consumidores ecuatorianos.

IV. RESULTADOS

La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado en tres fases diferentes y cada una de ellas ha dado lugar a la publicación de un artículo científico en revista de alto impacto recogidas en el JCR. A continuación, se exponen los resultados más relevantes obtenidos en cada una de las fases de esta Tesis Doctoral.

4.1. FASE 1. Optimización de las condiciones de germinación para la obtención de harinas de alto valor añadido a partir de la semilla de moringa

Publicación 1. Potencial de la germinación en condiciones seleccionadas para mejorar las propiedades nutricionales y bioactivas de la moringa (*Moringa oleifera* L.).

Karín E. Coello, Juana Frías, Cristina Martínez-Villaluenga, María Elena Cartea, Rosaura Abilleira, Elena Peñas (2020). Potential of germination in selected conditions to improve the nutritional and bioactive properties of moringa (*Moringa oleifera* L.). *Foods*, 9, 1639. DOI: 10.3390/foods9111639.

RESUMEN

La moringa es muy apreciada por su alto contenido en compuestos fitoquímicos. A pesar de que la mayoría de las partes de la moringa se han estudiado ampliamente, las semillas han sido poco investigadas. El primer objetivo de este estudio ha sido explorar la germinación como estrategia para mejorar la composición nutricional (composición proximal y contenido de vitaminas B_1 y B_2), contenido de compuestos bioactivos (glucosinolatos, compuestos fenólicos y ácido γ-aminobutírico, GABA) y actividad antioxidante de la semilla de moringa. La germinación mejoró el contenido en proteína, grasa, fibra, riboflavina, compuestos fenólicos, algunos glucosinolatos y GABA, así como el potencial antioxidante de los germinados, pero el grado de mejora dependió de las condiciones de germinación. El segundo objetivo de este estudio fue identificar las condiciones óptimas de germinación para maximizar la calidad nutricional y el contenido de compuestos bioactivos a través de la utilización de una herramienta de optimización multirespuesta: Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Los modelos matemáticos obtenidos mediante MSR indicaron que las condiciones óptimas de germinación para maximizar la acumulación de riboflavina, compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la semilla de moringa fueron una temperatura de 28 °C y tiempo de 24 h, mientras que los mayores niveles de tiamina, GABA y glucosinolatos se obtenían a 36 °C

durante 24-96 h. Los resultados obtenidos indican que los germinados de moringa son ingredientes funcionales prometedores para el desarrollo de alimentos innovadores.

foods

MDPI

Article

Potential of Germination in Selected Conditions to Improve the Nutritional and Bioactive Properties of Moringa (*Moringa oleifera* L.)

Karín E. Coello [1,2], Juana Frias [2], Cristina Martínez-Villaluenga [2], María Elena Cartea [3], Rosaura Abilleira [3] and Elena Peñas [2,*]

[1] Escuela Superior Politécnica del Litoral, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, ESPOL Polytechnic University, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, Guayaquil P.O. Box 09-01-5863, Ecuador; kcoello@espol.edu.ec

[2] Department of Food Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), 28006 Madrid, Spain; frias@ictan.csic.es (J.F.); c.m.villaluenga@csic.es (C.M.-V.)

[3] Group of Genetics, Breeding and Biochemistry of Brassicas, Biological Mission of Galicia (CSIC), PO Box 28, E-36080 Pontevedra, Spain; ecartea@mbg.csic.es (M.E.C.); rabilleira@mbg.csic.es (R.A.)

* Correspondence: elenape@ictan.csic.es; Tel.: +34-91-258-7601

Received: 2 October 2020; Accepted: 5 November 2020; Published: 10 November 2020

Abstract: *Moringa oleifera* L. is greatly appreciated for its high content of phytochemicals. Although most parts of moringa tree have been widely studied, seeds remained scarcely explored. The first goal of this study was to investigate the effectiveness of germination to improve the nutritional composition (proximate composition and levels of vitamins B1 and B2), content of bioactive compounds (glucosinolates, phenolics and γ-aminobutyric acid, GABA) and antioxidant activity of moringa seed. Germination improved protein, fat, fiber, riboflavin, phenolics, some individual glucosinolates (GLS) and GABA contents, as well as the antioxidant potential in moringa sprouts, but the extent of the improvement depended on germination conditions. The second objective of this work was to identify the optimal germination conditions to maximize nutritional and bioactive quality of moringa by applying multi-response optimization (response surface methodology, RSM). RSM models indicated that 28 °C and 24 h were the optimal conditions to enhance the accumulation of riboflavin, phenolics and antioxidant activity of sprouts, while the highest GABA and total GLS contents were observed at 36 °C for 96 h and thiamine achieved the maximum content at 36 °C for 24 h. These results show that moringa sprouts are promising functional foods that might be also used as ingredients for the elaboration of novel foodstuffs.

Keywords: moringa; germination; thiamine; riboflavin; phenolic compounds; gamma-aminobutyric acid; glucosinolates; antioxidant activity

1. Introduction

Moringa (*Moringa oleifera* L.) is considered a multipurpose crop native of the Himalayan region (India) that was introduced in various parts of the world, such as the Ecuadorian coast, due to its low demand in terms of soil conditions and agronomic practices. Leaves, flowers, stems and roots have been widely studied in moringa and traditionally they have been consumed or used in traditional medicine [1].

Recently, more attention has been paid to its health-promoting properties including antioxidant, hypolipidemic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties [2,3]. The high prevalence of non-communicable diseases (NCDs) and the fact that an effective strategy to reduce the scaling of these

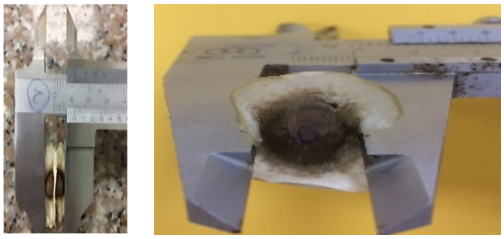
pathologies in to control the activity of inflammatory mediators via modifiable risk factors such as diet [4], make the consumption of moringa an attractive approach for preventing the development of NCDs. The health-promoting properties of moringa have been attributed to their high content of bioactive compounds, such as phenolic compounds, alkaloids and terpenes, which have been reported to be the most abundant metabolites in moringa leaves [5]. Although moringa leaves have been deeply studied, information on moringa seeds is less abundant. Most of the studies performed in seed have been focused on the evaluation of the proximate composition in defatted moringa seed and oil [6], as well as on the utilization of seeds and isolated seed proteins for animal feeding [7]. Several studies have demonstrated the high nutritional value of moringa seeds due to their content in proteins, polyunsaturated fatty acids, vitamins and minerals [8] and the presence of phytochemicals such as alkaloids (moringine), phenolic compounds, sterols, and glucosinolate derivatives [9,10] suggesting their great potential for development of novel and healthy food products.

Germination is a natural physiological plant process that starts with water uptake and concludes with the appearance of the radicle [11]. This process enhances the nutritional value and phytochemical content in diverse edible seeds [12]. It has been evidenced that germination causes a remarkable increase of the content of group B and C vitamins [13], proteins and the levels of several bioactive compounds such as phenolic compounds and γ-aminobutyric acid (GABA) in grains [14,15]. Biochemical and physiological changes in seeds strongly depends on soaking time and germination conditions (presence/absence of light, temperature and time) [14,16]. Therefore, the careful selection of the most suitable germination conditions for each seed is crucial to improve its nutritional value and health-promoting properties [17]. It has been reported that moringa sprouts obtained at 30 °C for four days exhibited higher lipid (26%) and protein (9.5%) contents than ungerminated seeds [18]. However, to our knowledge, there is no information in the literature regarding the influence of germination conditions on nutritional and phytochemical composition of moringa seeds. The aim of the present study was to investigate the impact of germination temperature and time on the proximate composition and content of thiamine, riboflavin, free phenolic compounds and GABA as well as on the antioxidant activity of moringa sprouts. A multi-response optimization approach was applied to identify the optimal germination conditions that improve nutritional and health-promoting features in sprouted moringa seed. Since naturalness and minimal processing are two of the most desired attributes by consumers nowadays [19], the identification of optimal germination conditions in moringa seeds will help to develop, through an economical technology, novel ingredients from moringa in line with current consumer preferences.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Moringa (*Moringa oleifera* L.) seeds were obtained from trees grown in the Eastern part of Ecuador (Shushufindi) and were kindly provided by a local grower. Seeds were harvested during July 2018 and had an average mass of 0.27 g, average size of 9.17 × 10.44 mm, true density of 0.73 g/ml, bulk density of 0.098 g/ml and porosity of 86.67 (Figure 1). They were stored in vacuum-sealed plastic bags at room temperature and darkness until their use.



(**a**) (**b**)

Figure 1. Dimensions of moringa seeds (**a**) width; (**b**) length.

2.2. Chemicals and Reagents

Unless otherwise specified, all reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain).

2.3. Germination Experiments

Moringa seeds were soaked in 0.1% sodium hypochlorite solution (1:6, *w*/*v*) for 30 min at room temperature and then they were washed with distilled water until they reached neutral pH. Seeds were then soaked with distilled water for 18 h at room temperature (~22 °C). Distilled water was drained, and hydrated seeds were placed in trays on a wet filter paper. Germination was performed in a cabinet (G-120 model, ASL Snijders International S. L., Tilburg, The Netherlands) with an automatic control of temperature and 95% atmospheric humidity. Since germination temperature and time are the most important factors influencing the nutritional quality and the content of bioactive compounds in sprouted seeds [13–16], different temperatures (28 °C, 32 °C, and 36 °C) and time periods (24, 60, and 96 h) were selected for germination process. Germination temperatures were selected based on the common temperatures used for moringa cultivation in Ecuador, and germination time based on previous studies performed by our group [14]. Moringa sprouts were freeze-dried, milled, packed in plastic bags under vacuum and stored at −20 °C until their use.

2.4. Proximate Composition

Nitrogen content was analyzed by the Dumas method, as described in the Association of Official Analytical Chemists AOAC (2000) method 992.23, using a nitrogen analyzer (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). A factor of 5.83 was used for protein content conversion. Fat (AOAC 922.06), ash (AOAC 923.03), and total dietary fiber (AOAC 991.43) were also determined. Total carbohydrates were estimated by difference: 100 − (% proteins + % fat +% ash + % water) [20]. The results were expressed in percentage of dry matter (d.m.).

2.5. Thiamine and Riboflavin

A single extraction procedure for vitamins B1 and B2 was carried out. Briefly, 1 g of samples was extracted by acid hydrolysis with 0.3 M HCl (7 mL) in an autoclave for 15 min at 120 °C. After cooling, the pH of samples was adjusted to 5 with 4 M ammonium acetate and then they were incubated with 1.7 mL of a Taka-Diastase solution (20%) for 3 h at 45 °C in agitation. After incubation, sample volume was adjusted to 10 mL with bidistilled water. Extractions were performed in duplicate for each germination condition. Thiamine was quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), using a post-column derivatization chromatographic method, while riboflavin was directly determined by HPLC [21]. Results were expressed in μg/100 g d.m.

2.6. Total and Individual GLS

Total GLS (glucosinolates) were extracted from 100 mg of moringa flour samples following a two-step extraction and desulfatation procedure (Kliebenstein et al., 2001) [22]. Extracts were analyzed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) using an UPLC Nexera LC-

30AD chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Nexera SIL-30AC injector and SPD-M20A photodiode array detector. The UPLC column was a C18 Atlantis T3 column (3 μm particle size, 2.1 × 100 mm i.d.) from Waters (Waters Corporation, Milford, MA, USA) protected with a C18 guard cartridge. The oven temperature was set at 35 °C. Compounds were eluted at flow rate of 0.8 mL/min by using bidistilled water (mobile phase A) and aqueous acetonitrile (mobile phase B) and the following gradient program: 3 min at 100% H_2O, 23 min from 0% to 25% acetonitrile, 1 min at 25% (*v*/*v*) acetonitrile, 9 min from 25% to 0% (*v*/*v*) acetonitrile, and 4 min at 100% H_2O. LabSolutions software Shimadzu (version 5.30 SPI) was used to record the data. Neoglucobrassicin (Phytoplan Diehm and Neuberger GmbH, Heidelberg, Germany) was used as external standard. Results were expressed as μmol/g d.m.

2.7. GABA

The extraction and quantification of GABA in moringa seeds and sprouts was performed by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Briefly, 0.5 g of freeze-dried sample was extracted in 10 mL of bidistilled water at 4 °C for 16 h in agitation. After centrifugation (10.000 rpm, 10 °C, 10 min), the supernatant was dried under vacuum conditions and dissolved in 0.5 mL of bidistilled water. Ten μL of the internal standard solution (containing 1.2 mg/mL allyl-L-glycine and 20 μL of 20% *v*/*v* triethylamine in 50% methanol) was added to 50 μL of the extract obtained and the mixture was derivatized by mixing with 30 μL of phenyl isothiocyanate. Then, samples were dried under vacuum conditions, they were dissolved in 0.5 mL of 0.1 M ammonium acetate pH 6.5 and filtered through a 0.22 μm nylon filter for HPLC analysis. HPLC quantification was carried out in an Alliance Separation Module 2695 equipped with a 2996 photodiode array detector (Waters, Milford, KS, USA) using a C18 Alltima column (250 × 4.6 mm, 5 μm, Grace & Co., Albany, NY, USA) at 40 °C. Mobile phases A (0.1 ammonium acetate pH 6.5) and B (0.1 M ammonium acetate, acetonitrile, methanol, 44/46/10, *v*/*v*/*v*, pH 6.5) were used at a flow rate of 0.7 mL/min. The elution gradient was initiated at 100% A for 15 min, then gradient flow from 100% A to 100% B for 27 min, 100% B for 8 min, and finally, 100% A for 5 min. Results were expressed in mg GABA/100 g of dry matter (d.m.).

2.8. Free Phenolic Compounds

The content of free phenolic compounds (FPC) was determined in methanolic extracts by the Folin–Ciocalteu's phenol method, according to Cáceres et al. [14]. Results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 g d.m.

2.9. Antioxidant Activity

The antioxidant activity was determined in methanolic extracts following the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method previously described by Cáceres et al. [14]. The reaction mixture contained 180 μL of 70 nm fluorescein, 90 μL of 12 mM 2,2′-azo-bis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) and 30 μL of diluted sample of the standard (Trolox) at a concentration in the range 1–8 μM. The reaction was performed at 37 °C. The fluorescence was read in a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Winnoski, VT, USA) every minute at λex 485 and λem 520 nm. Results were expressed as mg of Trolox equivalents (TE)/100 g d.m.

2.10. Data Modelling and Optimization of Germination Conditions

Response Surface Methodology (RSM) was used to investigate the effect of germination conditions (time and temperature; independent variables) on the content of nutritional and bioactive compounds (response variables) in germinated moringa.

Regression models obtained by response surface methodology (RSM) were used to find out the optimal germination time and temperature for enhancing moringa nutritional and bioactive potential. The response value y was estimated by the following equation:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 \quad (1)$$

where x_1 and x_2 are the independent variables representing germination time and temperature, respectively; b0 is a constant coefficient; b_1 and b_2 are the linear coefficients; and b_{12}, b_{11} and b_{22} are the factor interaction coefficients.

The adequacy of the models developed to the experimental data was evaluated by the coefficient of determination (R^2).

2.11. Statistical Analysis

Data shown are the mean values of three experimental replicates of each germination condition ± standard deviation. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between germination conditions were compared using a Duncan´s multiple-range test with $p \leq 0.05$ level of significance. The regression models obtained by RSM were validated by multivariate ANOVA. Statgraphics Centurion XVI software, version 16.1.17 (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA) was used for RSM data modelling and ANOVA analyses.

3. Results and Discussion

3.1. Effect of Germination Conditions on Proximate Composition of Moringa Sprouts

The proximate composition of moringa sprouts is presented in Table 1. Ash content (3.3 g/100 g) in moringa seed is in agreement with literature data [23,24] and it was decreased during germination, suggesting a slight decrease of mineral content in moringa sprouts.

The protein content in moringa seed (~28 g/100 g d.m) was within the range of values earlier reported [25,26]. In general, protein content increased significantly during germination, and the extent of such increment depended on the germination conditions. Moringa sprouts obtained at 32 °C for 60–96 h and at 36 °C for 60 h exhibited the highest protein levels. Ijarotomi et al. [18] reported an enhancement of protein content in moringa germinated at 30 °C for 4 days. The rise in protein levels might be explained by the loss of carbohydrates through respiration, causing perceptual increase in other nutrients, such as proteins. The increase in protein levels observed in moringa sprouted at different germination conditions is less than 15%, results that match with those previously reported in cereal sprouts [27].

Fat content in moringa seed (~29 g/100 g d.m.) (Table 1) was similar to values reported earlier [8,26,28]. In contrast, Olagbemide and Alikwe [24] and Liang et al. [23] reported lower fat levels in moringa seeds than the ones of the present study. Fat content in moringa seed varied depending on germination conditions. Germination at 28 and 36 °C did not result in pronounced modifications of fat content, but temperatures of 32 °C caused a significant ($p \leq 0.05$) increase in seed fat levels.

Moringa seeds exhibited a total dietary fiber content of 24.4 g/100 g d.m. (Table 1). Dietary fiber increased during germination process and the largest content was found at 32 °C (32–33 g/100 g d.m.). The European Food Safety Authority (EFSA) provide recommendations for consumption of more than 25 g of fiber/day to maintain bowel function, and reduced risk of weight gain, cardiovascular diseases and type 2 diabetes [29]. Taking into account EFSA guidelines, the consumption of 100 g of moringa sprouts per day will satisfy the fiber consumption needs.

Total carbohydrate content in moringa seed was 35.3 g/100 g d.m. (Table 1). During germination, carbohydrate content was reduced. The decrease in carbohydrates levels can be explained by the hydrolysis of starch and the release of reducing sugars that provide energy to the growing seedling [14].

Table 1. Proximate composition (g/100 g d.m.) of moringa seed and their sprouts obtained at different germination conditions.

Sample	T (°C)	t (h)	Ash	Protein	Lipids	Fiber	Total Carbohydrates
Seed	-	-	3.34 ± 0.00[a]	28.01 ± 0.63[e]	28.73 ± 0.04[cd]	24.41 ± 1.24[d]	35.32 ± 0.83[a]

		24	2.98 ± 0.03^{c}	29.59 ± 0.66^{bc}	30.13 ± 0.04^{bc}	28.32 ± 1.59^{ab}	34.45 ± 0.73^{a}
	28	60	3.14 ± 0.03^{b}	30.64 ± 0.50^{b}	31.89 ± 0.30^{ab}	29.72 ± 2.09^{a}	29.25 ± 0.24^{bc}
		96	2.99 ± 0.02^{c}	28.43 ± 0.97^{e}	29.26 ± 1.05^{cd}	26.92 ± 0.05^{c}	34.79 ± 2.05^{a}
		24	3.19 ± 0.06^{b}	30.04 ± 0.70^{bc}	32.08 ± 1.14^{ab}	26.12 ± 1.56^{bcd}	29.54 ± 1.84^{bcd}
Sprouts	32	60	3.20 ± 0.40^{b}	31.86 ± 0.73^{a}	33.39 ± 1.29^{a}	26.20 ± 2.37^{bcd}	28.00 ± 1.14^{cd}
		96	3.17 ± 0.11^{b}	32.21 ± 0.46^{a}	33.18 ± 0.50^{a}	27.11 ± 1.61^{abcd}	26.84 ± 1.02^{d}
		24	2.83 ± 0.05^{d}	28.80 ± 0.06^{de}	30.40 ± 1.33^{bc}	28.01 ± 0.74^{ab}	34.04 ± 1.28^{a}
	36	60	3.13 ± 0.02^{b}	31.79 ± 0.43^{a}	30.27 ± 0.38^{bc}	23.97 ± 0.27^{d}	30.11 ± 0.42^{b}
		96	3.14 ± 0.00^{b}	28.99 ± 0.20^{cde}	27.87 ± 1.53^{d}	27.77 ± 1.75^{abc}	35.01 ± 1.31^{a}

Data are the mean ± standard deviation of three independent experiments. Different superscript letters within a column indicate significant differences (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test, $p \leq 0.05$). T: germination temperature; t: germination time; d.m.: dry matter.

3.2. Effect of Germination Conditions on Vitamin B_1 and B_2 Contents in Moringa Sprouts

The content of thiamine (vitamin B_1) and riboflavin (vitamin B_2) in moringa seeds and sprouts is collected in Table 2. Moringa seeds exhibited levels of thiamine of 1113.5 μg/100 g d.m., which fell within the range of values previously found [25]. Sprouting did not substantially affect the thiamine content in moringa, with exception of germination at 32 °C for 24–96 h and 36 °C for 96 h that showed 10–12% reduction. It has been reported that sprouting stimulates de accumulation of B vitamins in cereal seeds to support seedling development and growth [30]. However, there is no scientific data concerning the effect of germination conditions on thiamine content in moringa seeds. Our results suggest that de novo synthesis of thiamine in moringa is only initiated at lower temperatures in later germination stages, as it has been concluded by Moongngarm and Saetung [31] in sprouted rice, or at high temperatures for short germination times. The leaching of thiamine in water during moringa soaking might explain the slight reduction found in some moringa sprouts.

Riboflavin content in moringa seeds was higher than values previously reported in other moringa varieties [28]. The content of riboflavin in moringa did not change or even increased during germination, and the highest values were observed at 28 °C and 24 h. It has been found that the content of riboflavin increased gradually throughout the germination period up to the fifth day in rapeseeds [32] and wheat seeds [33]. However, our results indicate that riboflavin levels in moringa sprouts decreased with increasing germination time.

Table 2. Content of thiamine and riboflavin (μg/100 g d.m.) in moringa seed and their sprouts obtained at different germination conditions.

Sample	T (°C)	t (h)	Thiamine	Riboflavin
Seed	-	-	1113.5 ± 18.8^{a}	179.11 ± 6.4^{de}
		24	1090.8 ± 35.3^{a}	625.20 ± 52.1^{a}
	28	60	1099.4 ± 5.0^{a}	221.27 ± 10.8^{b}
		96	1112.0 ± 7.3^{a}	215.54 ± 8.4^{bc}
Sprouts		24	995.4 ± 8.6^{b}	152.80 ± 13.0^{d}
	32	60	1005.7 ± 50.3^{b}	153.95 ± 12.5^{d}
		96	979.7 ± 8.0^{b}	81.50 ± 10.9^{f}
	36	24	1113.7 ± 51.9^{a}	193.33 ± 17.1^{cd}

	60	1090.2 ± 30.3[a]	115.10 ± 13.6[e]
	96	1001.9 ± 27.4[b]	65.40 ± 3.8[g]

Data are the mean ± standard deviation of three independent experiments. Different superscript letters within a column indicate significant differences (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test $p \leq 0.05$). T: germination temperature; t: germination time.

3.3. Effect of Germination Conditions on Total and Individual GLS Content in Moringa Sprouts

The content of total and individual GLS identified in moringa seeds and sprouts is presented in Table 3. Glucomoringin (4-α-rhamnopyranosyloxy-benzyl GLS) (Figure 2) was the main GLS found in moringa seeds, as reported earlier [9,34,35]. Small amounts of sinalbin (*p*-hydroxybenzyl glucosinolate) (Figure 2, Table 3) were also present in the seed in agreement with a previous study [36].

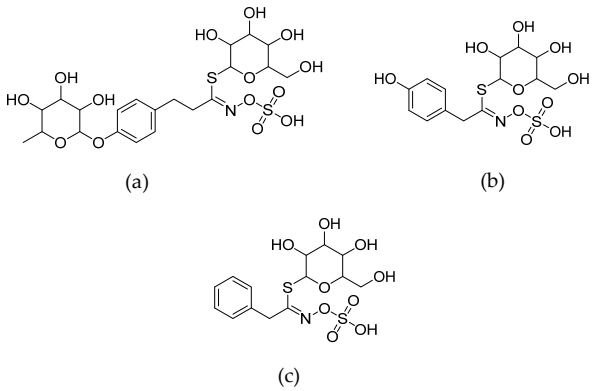


Figure 2. Structure of glucosinolate molecules in moringa sprouts. (**a**) glucomoringin; (**b**) sinalbin; (**c**) glucotropaeolin.

Table 3. Content of glucomoringin, sinalbin, glucotropaeolin and total glucosinolates (GLS) (μmol/g d.m.) in moringa seed and their sprouts obtained at different germination conditions.

Sample	T (°C)	t (h)	Glucomoringin	Sinalbin	Glucotropaeolin	Total GLS
Seed	-	-	197.4 ± 0.2[d]	7.10 ± 0.29[a]	ND[f]	204.5 ± 0.1[c]
		24	90.0 ± 1.2[g]	4.11 ± 0.05[b]	ND[f]	94.1 ± 1.2[e]
	28	60	176.7 ± 1.9[e]	3.23 ± 0.46[c]	0.90 ± 0.02[d]	180.8 ± 2.4[d]
		96	205.1 ± 0.9[c]	2.62 ± 0.03[d]	1.28 ± 0.16[c]	209.02 ± 0.8[c]
		24	234.9 ± 0.6[a]	2.64 ± 0.02[d]	ND[f]	237.5 ± 0.6[a]
Sprouts	32	60	214.5 ± 3.3[b]	2.56 ± 0.08[de]	0.38 ± 0.11[e]	217.5 ± 3.2[b]
		96	170.2 ± 3.5[f]	2.51 ± 0.20[de]	3.69 ± 0.70[b]	176.4 ± 3.0[d]
		24	202.4 ± 6.9[cd]	2.47 ± 0.08[de]	ND[f]	204.9 ± 6.9[c]
	36	60	232.9 ± 6.5[a]	2.58 ± 0.10[de]	0.39 ± 0.01[e]	235.8 ± 6.6[a]
		96	171.4 ± 1.1[ef]	2.23 ± 0.13[e]	4.88 ± 0.31[a]	181.3 ± 5.5[d]

Data are the mean ± standard deviation of four replicates. Different superscript letters within a column indicate significant differences (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test $p \leq 0.05$). T: germination temperature; t: germination time; ND: not detected.

Significant differences ($p \leq 0.05$) in the levels of individual GLS between moringa seed and their sprouts were observed. Sprouts exhibited a significant ($p \leq 0.05$) lower content of sinalbin than seed, whilst changes in glucomoringin depended on germination conditions. Moringa sprouts obtained at 28 °C for 24–60 and 32–36 °C for 96 h presented smaller levels of glucomoringin than seed, while germinated moringa obtained in the rest of germination conditions showed an increase in the content of this compound. Moreover, moringa sprouts obtained in all temperatures at germination periods of 60–96 h also exhibited low amounts of glucotropaeolin (Figure 2), compound that was not found

in moringa seeds. These results are consistent with those reported by Maldini et al. [36], who also found small levels of glucotropaeolin in 12-day-old seedlings of moringa but not in seed pulp and coat. Total GLS significantly decreased ($p \leq 0.05$) in moringa sprouts, with the exception of those produced at 32 °C for 24–60 h and 36°C for 60 h. These results indicate that longer germination periods cause higher diminution of GLS content. As previously reported, postharvest processing strongly affects GLS content in brassica vegetables [37]. Upon cellular injury of plant tissues during processing, GLS are enzymatically degraded by a thioglucosidase enzyme (myrosinase) to a wide variety of breakdown products such as glucose, sulfate, isothiocyanates, epithionitriles, nitriles, indolic alcohols, oxazolidinethions, amines, and thiocyanate [38]. The reduction of total GLS amount observed in most of the moringa sprouts can be attributed to the selective metabolism of some individuals GLS such as sinalbin by myrosinase enzyme [39] during germination. In agreement with our results, recent studies have reported a diminution of total GLS content during sprouting of brassica vegetables such a broccoli and rocket [40,41]. Our results also evidenced that germination in selected conditions activates the biosynthesis of glucomoringin and glucotropaeolin, findings in accordance with those observed by other authors, who reported the increase of levels of some individual GLS in different germinating brassica seeds [42,43]. The branched chain amino transferase, methylthioalkylmalate synthase, and sulfotransferases are key enzymes involved in GLS synthesis, while *BCA*, *CYP* and *AOP* are the most important genes in GLS biosynthetic pathway [44]. Our results suggest that certain germination conditions may influence the expression of these genes, thus affecting the activity of enzymes involved in GLS synthesis pathway.

GLS are sulfur-containing secondary metabolites that alongside with their breakdown products exert chemopreventive, anti-tumor and antimicrobial activity [45]. Current literature has shown that glucomoringin derivatives are able to counteract the inflammatory cascade involved in multiple sclerosis [46] and exert antibacterial activity [47]. Sinalbin has been shown to exhibit in vitro antiproliferative, proapoptotic and antimicrobial effects [48], while glucotropaeolin derivatives showed preventive activity against breast and prostatic cancers in animal models [49,50]. Thus, moringa sprouts can be considered a good source of health-promoting GLS.

3.4. Effect of Germination Conditions on GABA Content in Moringa Sprouts

Table 4 summarizes the GABA content in moringa seeds and sprouts obtained at different germination temperatures and times. Non-germinated moringa seeds showed a GABA content of 50.07 mg/100 g d.m., value notably higher than levels reported in other seeds such as pseudocereals [16] and legumes [51]. Germination improved notably the levels of GABA in moringa, showing sprouts increments between 1.8–8.8 fold in the levels of this compound, depending on germination conditions. The only exception was observed when moringa seeds were germinated at 32 °C for 24 h, conditions in which sprouts showed lower GABA concentration than seeds. In general, an increase in GABA was observed with longer germination times, which indicated the strong influence of germination period on its biosynthesis in moringa. The highest GABA accumulation was observed after germination at 36 °C for 96 h (219.19 mg/100 g d.m.).

Table 4. Content of GABA (mg/100 g d.m.), FPC (mg GAE/100 g d.m) and antioxidant activity (mg TE/100 g d.m) in moringa seed and their sprouts obtained at different germination conditions.

Sample	T (°C)	t (h)	GABA	FPC	Antioxidant Activity
Seed	-	-	50.1 ± 2.2^{f}	418.0 ± 32.0^{e}	1531.4 ± 129.1^{g}
		24	97.6 ± 9.6^{d}	753.5 ± 61.0^{a}	5172.9 ± 522.3^{a}
	28	60	101.8 ± 4.8^{d}	646.9 ± 40.2^{b}	2199.9 ± 170.9^{de}
		96	197.6 ± 19.9^{b}	335.7 ± 22.6^{f}	1904.7 ± 171.4^{f}
Sprouts		24	33.9 ± 3.6^{g}	593.5 ± 50.7^{c}	2541.9 ± 245.4^{b}
	32	60	129.2 ± 7.8^{c}	562.0 ± 46.8^{d}	2467.0 ± 237.3^{bc}
		96	136.2 ± 20.5^{c}	576.1 ± 52.8^{cd}	2333.4 ± 196.0^{cd}
	36	24	75.0 ± 7.3^{e}	340.8 ± 33.3^{f}	2124.1 ± 203.1^{ef}

60	107.0 ± 9.3[d]	324.2 ± 21.4[f]	2097.3 ± 133.1[ef]
96	291.2 ± 19.9[a]	645.7 ± 35.9[f]	1108.1 ± 111.1[h]

Data are the mean ± standard deviation of three independent experiments. Different superscript letters within a column indicate significant differences (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test $p \leq 0.05$). T: germination temperature; t: germination time; GABA: γ-aminobutyric acid; FPC: free phenolic compounds; GAE: gallic acid equivalents; TE: Trolox equivalents.

GABA is a non-protein amino acid that acts as an important depressive neurotransmitter in the nervous system and also as a potent blood pressure and heart rate regulator. Other GABA-related health functions include diabetes prevention, diuresis, and sedation [12]. During germination, endogenous enzyme systems are activated, and proteins are hydrolyzed into free amino acids such as glutamic acid, a GABA precursor. Additionally, glutamate decarboxylase and diamine oxidase, enzymes involved in GABA biosynthesis through decarboxylation of glutamic acid and polyamines, respectively, are activated during germination [50]. The highest GABA content found in moringa sprouts obtained at 36 °C observed in this work is consistent with a previous study showing that the optimal activity of glutamate decarboxylase occurs at temperatures close to 40 °C [52].

3.5. Effect of Germination Conditions on the Content of Free Phenolic Compounds (FPC) in Moringa Sprouts

Table 4 collects the FPC in moringa seeds and sprouts produced at different germination conditions. FPC observed in moringa seeds (418.02 mg GAE/100 g d.m.) was higher than that reported for a moringa variety grown in Mexico [53]. Moringa seed is an excellent source of phenolic compounds, exhibiting levels of these phytochemicals much higher than those found in other grains such as cereals, pseudocereals, and other less known sources of sprouts such as teff, evening primrose, phacelia and fenugreek [14,16,54,55].

During germination, changes in phenolic content of moringa strongly depended on experimental conditions. Temperatures ranging 28–32 °C for periods of 24–60 h enhanced the levels of FPC significantly ($p \leq 0.05$) in moringa. However, 28 °C applied for 96 h and 36 °C for 24–60 h led to lower phenolic contents in the soluble fraction compared to the ungerminated seed. The enhancement of activity and gene expression of key enzymes involved in phenolics biosynthesis during germination have been well documented [56]. The activity of enzymes participating in phenylpropanoid pathway, one of the routes responsible for phenolic accumulation in plants, such as phenylalanine ammonia lyase (PAL), is drastically influenced by germination time and temperature. In this sense, Tesfay et al. [57] observed that the activity of PAL enzyme is maximal at temperatures of 20–30 °C. These findings support the results of the present work, were the highest phenolic content was found at germination temperature of 28 °C for short periods of time. Moreover, activation of cell wall-degrading enzymes (cellulases, endoxylanases and esterases) that hydrolyze phenolic compounds bound to cell wall during germination at temperatures in the range 28–32 °C might also contribute to the increase of phenolic levels in moringa sprouts obtained at these temperatures, as it has been previously reported in other plant sprouts [30].

3.6. Effect of Germination Conditions on Antioxidant Activity in Moringa Sprouts

Raw moringa seeds exhibited a high antioxidant potential (1531.36 mg TE/100 g d.m.) (Table 4), which was remarkably enhanced during all germination conditions assayed, with the exception of 36 °C for 96 h. Our results indicate that the accumulation of phenolic compounds in moringa sprouts was positively influenced by mild temperatures and shorter germination times (Table 4), thus contributing to the antioxidant activity of sprouted moringa. It has been shown that germination promotes the antioxidant potential in other plant seeds [16,58]. During germination, there is an uncontrolled production of reactive oxygen species (ROS) that can cause oxidative stress and severe cellular deterioration and, therefore, plant antioxidant enzymes are activated at the early stage of germination [59]. In fact, it has been reported that superoxide dismutase (SOD), an enzyme that plays a crucial role in the major antioxidant defense system against the superoxide radical, is activated during the first day of germination of peanut seed and its activity decrease dramatically afterwards

[60]. These findings are in accordance with the highest antioxidant activity of moringa sprouts obtained after 24 h in this work.

Antioxidant activity exhibited a positive correlation with FPC levels, but the low value obtained for the coefficient of correlation ($R^2 = 0.442$) suggests that there might be other antioxidant compounds such as vitamins E and C that are also contributing to the antioxidant activity of moringa sprouts.

3.7. Multi-Response Modelling of the Influence Germination Conditions on Nutritional and Bioactive Properties of Moringa Sprouts

RSM has been used to better understand the impact of germination time and temperature on nutritional and bioactive profile of germinated moringa. The contribution of each factor to the properties of moringa sprouts is important in order to optimize the conditions of germination process to maximize their quality. Response variables (contents of thiamine, riboflavin, GLS, GABA, FPC and antioxidant activity) were modelled as a function of germination temperature and time. The regression models obtained are presented in Table 5. All models exhibited a non-significant ($p > 0.05$) lack-of-fit and were significant ($p \leq 0.05$), as evidenced by ANOVA analysis (results not shown). The values of the coefficient of determination higher than 0.75 for all models indicate their suitability to explain the variability of experimental data (Table 5). Both germination time and temperature exerted a strong linear and quadratic influence on the response variables analyzed, being the interactive effect between both factors also significant.

Table 5. Predictive polynomial equations obtained by RSM and the predicted and experimental values for thiamine, riboflavin, GLS, GABA, FPC contents and antioxidant activity in the optimal germination conditions.

Response	Predicted Model	R^2	Optimal Conditions			
			T (°C)	t (h)	Predicted Values	Experimental Values
Thiamine	$Y(T,t) = 5978.36 - 325.97T + 8.72\,t + 5.37T^2 - 0.29T \times t$	0.83	36	24	1156.6	1113.7 ± 51.9
Riboflavin	$Y(T,t) = 10{,}034.0 - 536.61T - 26.47\,t + 7.41T^2 + 0.54\,T \times t + 0.05t^2$	0.83	28	24	577.7	625.2 ± 52.1
GLS	$Y(T,t) = 3057.2 - 187.21T + 1.72\,t + 2.83T^2 + 0.07\,T \times t - 0.03t^2$	0.87	36	96	246.9	178.55 ± 0.6
GABA	$Y(T,t) = 3494.6 - 204.17T - 6.84t + 3.01T^2 + 0.20T \times t + 0.02t^2$	0.83	36	96	255.7	291.2 ± 19.9
FPC	$Y(T,t) = 846.17 + 91.88T - 48.63t - 2.98T^2 + 1.35T \times t + 0.04t^2$	0.86	28	24	840.4	753.5 ± 61.0
AO	$Y(T,t) = 23{,}028.9 - 755.53T - 178.11t + 5.26T^2 + 4.25T \times t + 0.17t^2$	0.76	28	24	4671	5172 ± 522

GLS: glucosinolates; GABA: γ-aminobutyric acid; FPC: free phenolic compounds; AO: antioxidant activity; T: temperature; t: time; RSM: response surface methodology. All results are expressed in d.m.

Optimal germination conditions determined by RSM were a temperature of 28 °C for 24 h to enhance the contents of riboflavin, FPC and antioxidant activity in moringa sprouts, while 36 °C in combination with times of 24 and 96 h maximized the levels of thiamine and GABA, respectively (Table 5).

Response surface tridimensional plots illustrate the variation of nutritional and bioactive compounds in sprouted moringa as a function of germination temperature and time (Figure 3). Time and temperature exhibited important interactive effects on thiamin content during germination of moringa, and temperature of 36 °C combined with shorter germination times were the conditions

that caused the highest accumulation of this vitamin (Figure 3a). Riboflavin content was mainly influenced by germination temperature, while the impact of time was less relevant (Figure 3b). Combinations of low temperatures and short germination times produced moringa sprouts with the largest levels of riboflavin. Germination time was the most important factor influencing the GLS content in moringa sprouts, as previously reported [61], being the effect of temperature less notable (Figure 3c). Short germination times favored the retention of GLS, while longer times caused the reduction of total GLS levels possibly due to the activation of myrosinase enzyme. GABA increased steadily in moringa with germination time, regardless of the temperature used (Figure 3d). Longer germination times and higher temperatures resulted in the most pronounced accumulation of GABA. A decreasing trend was observed for FPC at germination temperatures up to 32 °C with increasing germination time (Figure 3e). However, the opposite behavior occurred at temperatures from 32 to 36 °C, in which FPC content was enhanced as germination time augmented. Germination temperature was the most important factor affecting the antioxidant potential in moringa, being its influence more important at shorter germination times (Figure 3f).

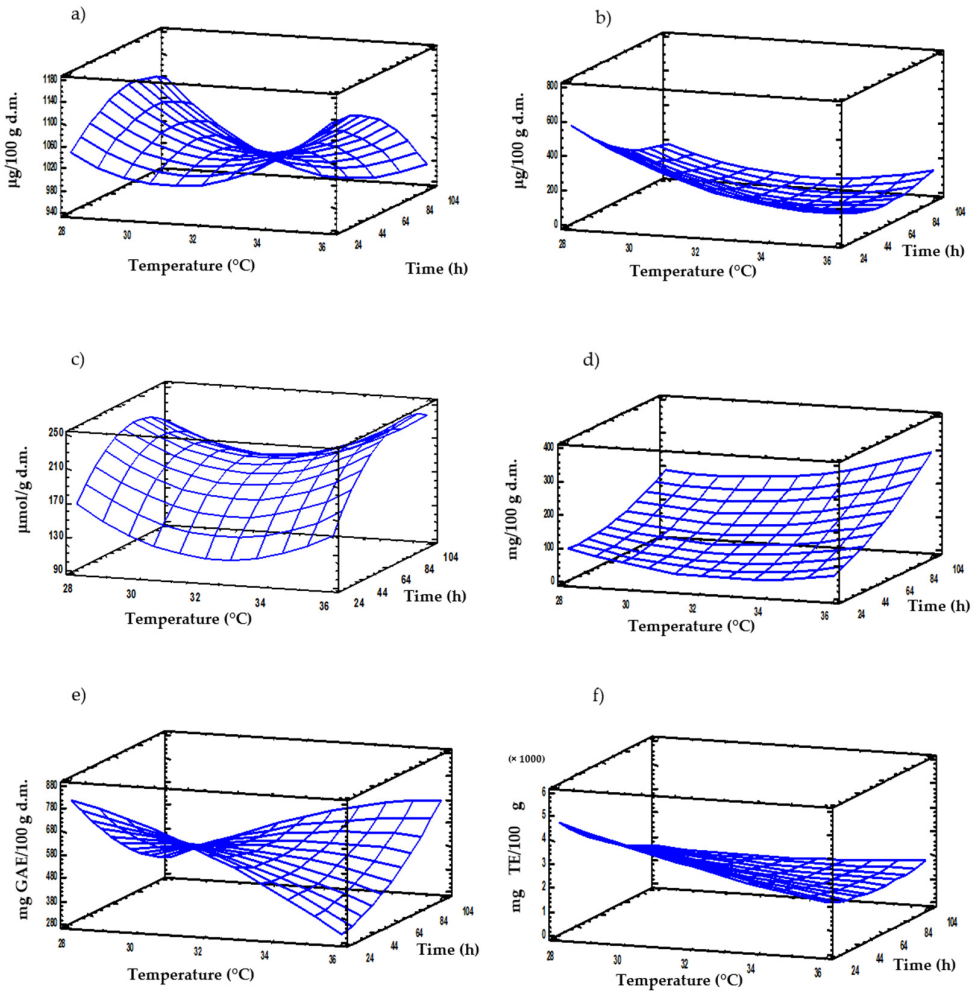


Figure 3. Response surface plots for contents of thiamine (**a**), riboflavin (**b**), glucosinolates (**c**), GABA (**d**), free phenolic compounds (**e**) and antioxidant activity (**f**) in sprouted moringa as a function of germination time and temperature.

Optimal germination conditions determined by RSM were a temperature of 28 °C and 24 to enhance the contents of riboflavin, FPC and antioxidant activity in moringa sprouts, while 36 °C in combination with times of 24 and 96 h, maximized the levels of thiamine and GABA, respectively (Table 5).

The regression models obtained were further validated by comparing the experimental results with those predicted by the models under the optimal conditions (Table 5). Predicted values closely matched with the experimental ones, confirming the adequacy of the regression models describing the relationship between germination conditions and the studied response variables in germinated moringa.

4. Conclusions

This investigation shows that germination is a feasible approach to improve the nutritional and bioactive quality of moringa seeds, but the extent of nutritional and functional improvement depended on the germination temperature and time. Germination enhanced the content of fiber, fat, riboflavin, GABA and FPC, as well as the antioxidant potential of moringa sprouts. Total GLS decreased during germination at 96 h while some individual GLS (glucomoringin and glucotropaeolin) increased during moringa sprouting at selected conditions. Multi-response optimization carried out by RSM allowed to identify the optimal germination conditions that maximize the quality of moringa sprouts, which were 28 °C for 24 h for enhancing the accumulation of riboflavin, free phenolics and antioxidant activity, while the highest thiamine levels were observed at 36 °C for 24 h. The accumulation of GLS and GABA was favored by higher germination temperatures and longer germination times (36 °C for 24 h). These results provide interesting insights for the production of moringa sprouts with high content of nutrients and bioactive compounds and large antioxidant potential that can be consumed as such or used as functional ingredients in novel foodstuffs such as pasta, instant powdered foods, snacks, bakery products and drinks.

Author Contributions: Conceptualization, K.E.C., J.F., C.M.-V. and E.P.; methodology, K.E.C., E.P.; J.F; C.M.-V.; M.E.C. and R.A.; validation, K.E.C., J.F. and E.P.; formal analysis, K.E.C., E.P.; J.F.; C.M.-V.; M.E.C. and R.A.; investigation, K.E.C., E.P.; J.F; C.M.-V.; M.E.C. and R.A.; resources, K.E.C., J.F. and E.P.; data curation, K.E.C., J.F. and E.P.; writing—original draft preparation, K.E.C., J.F. and E.P; writing—review and editing, K.E.C., E.P.; J.F; C.M.-V.; M.E.C. and R.A.; visualization, K.E.C., E.P.; J.F.; C.M.-V.; M.E.C. and R.A.; supervision E.P., C.M.-V., J.F.; project administration, J.F. and E.P.; funding acquisition, K.E.C.; J.F. and E.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the following grants: AGL2015-67598-R (MINECO/FEDER, UE), AGL2017-83718-R (AEI/FEDER, UE), and intramural project grant number 201870I097 (CSIC).

Acknowledgments: The authors acknowledge PROTAL-ESPOL laboratory for technical support and the Analysis Service Unit facilities of ICTAN for the analysis of total nitrogen.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gupta, S.; Jain, R.; Kachhwaha, S.; Kothari, S. Nutritional and Medicinal Applications of *Moringa oleifera* Lam.—Review of Current Status and Future Possibilities. *J. Herb. Med.* **2018**, *11*, 1–11, doi:10.1016/j.hermed.2017.07.003.
2. Jaja-Chimedza, A.; Graf, B.L.; Simmler, C.; Kim, Y.; Kuhn, P.; Pauli, G.F.; Raskin, I. Biochemical Characterization and Anti-Inflammatory Properties of an Isothiocyanate-Enriched Moringa (*Moringa oleifera*) Seed Extract. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182658, doi:10.1371/journal.pone.0182658.
3. Mehta, K.; Balaraman, R.; Amin, A.; Bafna, P.; Gulati, O. Effect of Fruits of *Moringa oleifera* on the Lipid Profile of Normal and Hypercholesterolaemic Rabbits. *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *86*, 191–195, doi:10.1016/s0378-8741(03)00075-8.
4. Zabetakis, I.; Lordan, R.; Norton, C.; Tsoupras, A. COVID-19: The Inflammation Link and the Role of Nutrition in Potential Mitigation. *Nutrients* **2020**, *12*, 1466, doi:10.3390/nu12051466.

5. Guzmán-Albores, J.M.; Ramírez-Merchant, M.L.; Interiano, E.C.; Ruiz-Valdiviezo, V.M. Mebabolomic and Proteomic Analysis of *Moringa oleifera* Cultivated with Vermicompost and Phosphate Rock Under Water Stress Conditions. *Int. J. Agric. Biol.* **2019**, *21*, 786–794.
6. Raman, J.K.; Alves, C.M.; Gnansounou, E. A Review on Moringa Tree and Vetiver Grass–Potential Biorefinery Feedstocks. *Biores. Technol*. **2018**, *249*, 1044–1051.
7. Falowo, A.B.; Mukumbo, F.E.; Idamokoro, E.M.; Lorenzo, J.M.; Afolayan, A.J.; Muchenje, V. Multi-Functional Application of *Moringa oleifera* Lam. in Nutrition and Animal Food Products: A Review. *Food Res. Int.* **2018**, *106*, 317–334, doi:10.1016/j.foodres.2017.12.079.
8. Saa, R.W.; Fombang, E.N.; Ndjantou, E.B.; Njintang, N.Y. Treatments and Uses of *Moringa oleifera* Seeds in Human Nutrition: A Review. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 1911–1919, doi:10.1002/fsn3.1057.
9. Chen, R.; Wang, X.-J.; Zhang, Y.-Y.; Xing, Y.; Yang, L.; Ni, H.; Li, H.-H. Simultaneous Extraction and Separation of Oil, Proteins, and Glucosinolates from *Moringa oleifera* Seeds. *Food Chem.* **2019**, *300*, 125162, doi:10.1016/j.foodchem.2019.125162.
10. Zhu, Y.; Yin, Q.; Yang, Y. Comprehensive Investigation of *Moringa oleifera* from Different Regions by Simultaneous Determination of 11 Polyphenols Using UPLC-ESI-MS/MS. *Molecules* **2020**, *25*, 676, doi:10.3390/molecules25030676.
11. Nonogaki, H.; Bassel, G.W.; Bewley, J.D. Germination—Still a Mystery. *Plant Sci.* **2010**, *179*, 574–581, doi:10.1016/j.plantsci.2010.02.010.
12. Gan, R.-Y.; Lui, W.-Y.; Wu, K.; Chan, C.-L.; Dai, S.-H.; Sui, Z.-Q.; Corke, H. Bioactive Compounds and Bioactivities of Germinated Edible Seeds and Sprouts: An Updated Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *59*, 1–14, doi:10.1016/j.tifs.2016.11.010.
13. Rico, D.; Peñas, E.; García, M.C.; Martínez-Villaluenga, C.; Rai, D.K.; Birsan, R.I.; Frias, J.; Martin-Diana, A.B. Sprouted Barley Flour as a Nuttitious and Functional Ingredient. *Foods* **2020**, *9*, 296.
14. Cáceres, P.J.; Martínez-Villaluenga, C.; Amigo, L.; Frias, J. Maximising Thephytochemical Content and Antioxidant Activity of Ecuadorian Brown Rice Sprouts Through Optimal Germination Conditions. *Food Chem.* **2014**, *152*, 407–414.
15. Aparicio-García, N.; Martínez-Villaluenga, C.; Frias, J.; Peñas, E. Changes in Protein Profile, Bioactive Potential and Enzymatic Activities of Gluten-Free Flours Obtained from Hulled and Dehulled Oat Varieties as Affected by Germination Conditions. *LWT* **2020**, *134*, 109955, doi:10.1016/j.lwt.2020.109955.
16. Paucar-Menacho, L.M.; Martínez-Villaluenga, C.; Dueñas, M.; Frias, J.; Peñas, E. Response Surface Optimisation of Germination Conditions to Improve the Accumulation of Bioactive Compounds and the Antioxidant Activity in Quinoa. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *53*, 516–524, doi:10.1111/ijfs.13623.
17. Tomé-Sánchez, I.; Martín-Diana, A.B.; Peñas, E.; Bautista-Expósito, S.; Efrias, J.; Rico, D.; González-Maillo, L.; Martinez-Villaluenga, C. Soluble Phenolic Composition Tailored by Germination Conditions Accompany Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Wheat. *Antioxidants* **2020**, *9*, 426, doi:10.3390/antiox9050426.
18. Ijarotimi, O.S.; Adeoti, O.A.; Ariyo, O. Comparative Study on Nutrient Composition, Phytochemical, and Functional Characteristics of Raw, Germinated, and Fermented *Moringa oleifera* Seed Flour. *Food Sci. Nutr.* **2013**, *1*, 452–463, doi:10.1002/fsn3.70.
19. Román, S.; Sánchez-Siles, L.M.; Siegrist, M. The Importance of Food Naturalness for Consumers: Results of a Systematic Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *67*, 44–57, doi:10.1016/j.tifs.2017.06.010.
20. Cáceres, P.J.; Martínez-Villaluenga, C.; Amigo, L.; Frias, J. Assessment on Proximate Composition, Dietary Fiber, Phytic Acid and Protein Hydrolysis of Germinated Ecuatorian Brown Rice. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2014**, *69*, 261–267, doi:10.1007/s11130-014-0433-x.
21. Frias, J.; Prodanov, M.; Sierra, I.; Vidal-Valverde, C. Effect of Light on Carbohydrates and Hydrosoluble Vitamins of Lentils during Soaking. *J. Food Prot.* **1995**, *58*, 692–695, doi:10.4315/0362-028x-58.6.692.
22. Kliebenstein, D.J.; Kroymann, J.; Brown, P.; Figuth, A.; Pedersen, D. Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. *Plant physiol.* **2001**, *126*, pp. 811–825, doi:10.1104/pp.126.2.811.
23. Liang, L.; Wang, C.; Li, S.; Chu, X.; Sun, K. Nutritional Compositions of Indian *Moringa oleifera* Seed and Antioxidant Activity of Its Polypeptides. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7*, 1754–1760, doi:10.1002/fsn3.1015.
24. Olagbemide, P.T.; Alikwe, P.C.N. Proximate Analysis and Chemical Composition of Raw and Defatted *Moringa oleifera* Kernel. *Adv. Life Sci. Technol.* **2014**, *24*, 92–99.
25. Eme, P.; Mbah, B.; Ogbusu, O. Effect of Cooking Methods (Boiling and Roasting) on Nutrients and Anti-nutrients Content of *Moringa oleifera* Seeds. *Pak. J. Nutr.* **2012**, *11*, 211–215, doi:10.3923/pjn.2012.211.215.

26. Leone, A.; Spada, A.; Battezzati, A.; Schiraldi, A.; Aristil, J.; Bertoli, S. *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 2141, doi:10.3390/ijms17122141.
27. Mbithi-Mwikya, S.; Van Camp, J.; Yiru, Y.; Huyghebaert, A. Nutrient and Antinutrient Changes in Finger Millet (*Eleusine coracan*) During Sprouting. *LWT* **2000**, *33*, 9–14, doi:10.1006/fstl.1999.0605.
28. Gopalakrishnan, L.; Doriya, K.; Kumar, D.S. Moringa oleifera: A Review on Nutritive Importance and Its Medicinal Application. *Food Sci. Hum. Wellness* **2016**, *5*, 49–56, doi:10.1016/j.fshw.2016.04.001.
29. EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for Carbohydartes and Dietary Fibre. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1462.
30. Lemmens, E.; Moroni, A.V.; Pagand, J.; Heirbaut, P.; Ritala, A.; Karlen, Y.; Lê, K.; Broeck, H.C.V.D.; Brouns, F.J.; De Brier, N.; et al. Impact of Cereal Seed Sprouting on Its Nutritional and Technological Properties: A Critical Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *18*, 305–328, doi:10.1111/1541-4337.12414.
31. Moongngarm, A.; Saetung, N. Comparison of Chemical Compositions and Bioactive Compounds of Germinated Rough Rice and Brown Rice. *Food Chem.* **2010**, *122*, 782–788, doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.053.
32. Zieliński, H.; Frias, J.; Piskuła, M.K.; Kozłowska, H.; Vidal-Valverde, C. The Effect of Germination Process on the Superoxide Dismutase-Like Activity and Thiamine, Riboflavin and Mineral Contents of Rapeseeds. *Food Chem.* **2006**, *99*, 516–520, doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.014.
33. Rahmatullina, Y.R.; Doronin, A.F.; Vrzhesinskaya, O.; Kodentsova, V. Content of Vitamins B1 and B2 in Germinating Grain. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2013**, *154*, 628–630, doi:10.1007/s10517-013-2016-5.
34. Bennett, R.N.; Mellon, F.A.; Foidl, N.; Pratt, J.H.; Dupont, M.S.; Perkins, L.; Kroon, P.A. Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of the Multi-Purpose Trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L. *J. Agric. Food Chem*. **2003**, *51*, 3546–3553.
35. Förster, N.; Ulrichs, C.; Schreiner, M.; Müller, C.T.; Mewis, I. Development of a Reliable Extraction and Quantification Method for Glucosinolates in *Moringa oleifera*. *Food Chem.* **2015**, *166*, 456–464, doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.043.
36. Maldini, M.; Maksoud, S.A.; Natella, F.; Montoro, P.; Petretto, G.L.; Foddai, M.; De Nicola, G.R.; Chessa, M.; Pintore, G. *Moringa oleifera*: Study of Phenoics and Glucosinaltes by Mass Spectrometry. *J. Mass. Spectr*. **2014**, *49*, 900–910.
37. Sikorska-Zimny, K.; Beneduce, L. The Glucosinolates and Their Bioactive Derivatives in *Brassica*: A Review on Classification, Biosynthesis and Content in Plant Tissues, Fate During and After Processing, Effect on the Human Organism and Interaction with the Gut Microbiota. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, 1–28, doi:10.1080/10408398.2020.1780193.
38. Miękus, N.; Marszałek, K.; Podlacha, M.; Iqbal, A.; Puchalski, C.; Swiergiel, A.H. Health Benefits of Plant-Derived Sulfur Compounds, Glucosinolates, and Organosulfur Compounds. *Molecules* **2020**, *25*, 3804, doi:10.3390/molecules25173804.
39. Bellostas, N.; Sørensen, A.D.; Sørensen, J.C.; Sørensen, H. Genetic Variation and Metabolism of Glucosinolates. *Adv. Bot. Res.* **2007**, *45*, 369–415, doi:10.1016/s0065-2296(07)45013-3.
40. Olszewska, M.A.; Granica, S.; Kolodziejczyk-Czepas, J.; Magiera, A.; Czerwińska, M.E.; Nowak, P.; Rutkowska, M.; Wasiński, P.; Owczarek, A. Variability of Sinapic Acid Derivatives During Germination and Their Contribution to Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Broccoli Sprouts on Human Plasma and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Food Funct.* **2020**, *11*, 7231, doi:10.1039/d0fo01387k.
41. Ragusa, L.; Picchi, V.; Tribulato, A.; Cavallaro, C.; Scalzo, R.L.; Branca, F. The Effect of the Germination Temperature on the Phytochemical Content of Broccoli and Rocket Sprouts. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2016**, *68*, 411–420, doi:10.1080/09637486.2016.1248907.
42. Andini, S.; Dekker, P.; Gruppen, H.; Araya-Cloutier, C.; Vincken, J.P. Modulation of Glucosinolate Composition in Brassicaceae Seeds by Germinatin and Fungal Elicitaion. *J. Agric. Food Chem*. **2019**, *67*, 12770–12779.
43. Wang, M.; Zhang, Y.; Leng, C.; Li, X.; Wang, P.; Gu, Z.; Yang, R. Glucosinolates Metabolism and Redox State of Rocket (*Eruca sativa* Mill.) During Germination. *J. Food Process. Preserv.* **2019**, *43*, e14019, doi:10.1111/jfpp.14019.
44. Li, L.; Song, S.; Nirasawa, S.; Hung, Y.C.; Jiang, Z.; Liu, H. Slightly Acidic Electrolyzed Water Treatment Enhances the Main Bioctive Phytochemicals Content in Broccoli Sprouts via Changing Metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 606–614.

45. Maina, S.; Misinzo, G.; Bakari, G.; Kim, H.-Y. Human, Animal and Plant Health Benefits of Glucosinolates and Strategies for Enhanced Bioactivity: A Systematic Review. *Molecules* **2020**, *25*, 3682, doi:10.3390/molecules25163682.
46. Galuppo, M.; Giacoppo, S.; De Nicola, G.R.; Iori, R.; Navarra, M.; Lombardo, G.E.; Bramanti, P.; Mazzon, E. Antiinflammatory Activity of Glucomoringin Isothocyanate in a Mouse Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Fitoterapia* **2014**, *95*, 160–174.
47. Galuppo, M.; De Nicola, G.; Iori, R.; Dell'Utri, P.; Bramanti, P.; Mazzon, E. Antibacterial Activity of Glucomoringin Bioactivated with Myrosinase against Two Important Pathogens Affecting the Health of Long-Term Patients in Hospitals. *Molecules* **2013**, *18*, 14340–14348, doi:10.3390/molecules181114340.
48. Boscaro, V.; Boffa, L.; Binello, A.; Amisano, G.; Fornasero, S.; Cravotto, G.; Gallicchio, M. Antiproliferative, Proapoptotic, Antioxidant and Antimicrobial Effects of *Sinapis nigra* L. and *Sinapis alga* L. Extracts. *Molecules* **2018**, *23*, 3004, doi:10.3390/molecules23113004.
49. Cho, H.J.; Lim, D.Y.; Kwon, G.T.; Kim, J.H.; Huang, Z.; Song, H.; Oh, Y.S.; Kang, Y.H.; Lee, K.W.; Dong, Z.; et al. Benzyl Isothiocyanate Inhibits Prostate Cancer Dvelopment in the Transgenic Adenocarcinoma Mouse Prostate (TRAMP) Model, Which Is Associated with the Induction of Cell Cycle G1 Arrest. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 264.
50. Kim, E.J.; Hong, J.E.; Eom, S.J.; Lee, J.Y.; Park, J.H.Y. Oral Administration of Benzyl-Isothiocyanate Inhibits Solid Tumor Grow and Lung Metastasis of 4t1 Murine Mammary Carcinoama Cells in BALB/c Mice. *Breast Cancer Res. Treat.* **2011**, *130*, 61–71.
51. Luo, X.; Wang, Y.; Li, Q.; Wang, D.; Xing, C.; Zhang, L.; Xu, T.; Fang, F.; Wang, F. Accumulating Mechanism of γ-Aminobutyric Acid in Soybean (Glycine Max L.) During Germination. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2017**, *53*, 106–111, doi:10.1111/ijfs.13563.
52. Kim, H.S.; Lee, E.J.; Lim, S.-T.; Han, J.-A. Self-enhancement of GABA in Rice Bran Using Various Stress Treatments. *Food Chem.* **2015**, *172*, 657–662, doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.107.
53. León-López, L.; Bañuelos-Piña, A.M.; Reyes-Moreno, C.; Milán-Carrillo, J.; Contreras-Andrade, I.; Sánchez-Magaña, L.M.; Cuevas-Rodríguez, E.O. Optimisation of Temperature and Time for the Dark Germination Bioprocess of *Moringa oleifera* Seeds to Boost Nutritional Value, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity. *Int. Food Res. J.* **2019**, *26*, 831–839.
54. Pająk, P.; Socha, R.; Broniek, J.; Królikowska, K.; Fortuna, T. Antioxidant Properties, Phenolic and Mineral Composition of Germinated Chia, Golden Flax, Evening Primrose, Phacelia and Fenugreek. *Food Chem.* **2019**, *275*, 69–76, doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.081.
55. Zhu, F. Chemical Composition and Food Uses of Teff (*Eragrostis tef*). *Food Chem.* **2018**, *239*, 402–415, doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.101.
56. Cho, D.-H.; Lim, S.-T. Changes in Phenolic Acid Composition and Associated Enzyme Activity in Shoot and Kernel Fractions of Brown Rice During Germination. *Food Chem.* **2018**, *256*, 163–170, doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.040.
57. Tesfay, S.Z.; Modi, A.; Mohammed, F. The Effect of Temperature in Moringa Seed Phytochemical Compounds and Carbohydrate Mobilization. *South Afr. J. Bot.* **2016**, *102*, 190–196, doi:10.1016/j.sajb.2015.07.003.
58. Sharma, S.; Saxena, D.C.; Riar, C.S. Changes in the GABA And Polyphenols Contents of Foxtail Millet on Germination and Their Relationship with In Vitro Antioxidant Activity. *Food Chem.* **2018**, *245*, 863–870, doi:10.1016/j.foodchem.2017.11.093.
59. Chen, K.; Arora, R. Dynamics of the Antioxidant System During Seed Osmopriming, Post-Priming Germination, and Seedling Establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Sci.* **2011**, *180*, 212–220, doi:10.1016/j.plantsci.2010.08.007.

60. Limmongkon, A.; Nopprang, P.; Chaikeandee, P.; Somboon, T.; Wongshaya, P.; Pilaisangsuree, V. LC-MS/MS Profiles and Interrelationships Between the Anti-Inflammatory Activity, Total Phenolic Content and Antioxidant Potential of Kalasin 2 Cultivar Peanut Sprout Crude Extract. *Food Chem.* **2018**, *239*, 569–578, doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.162.
61. Meier, K.; Ehbrecht, M.D.; Wittstock, U. Glucosinolate Content in Dormant and Germinating *Arabidopsis thaliana* Seeds Is Affected by Non-Functional Alleles of Classical Myrosinase and Nitrile-Specifier Protein Genes. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 10, doi:10.3389/fpls.2019.01549.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

4.2. FASE 2. Producción y caracterización de alimentos saludables empleando harina de moringa germinada

4.2.1. Desarrollo de pasta tipo tallarines enriquecida con harina de moringa germinada

Publicación 2. Pasta enriquecida en harina de moringa germinada como alimento de alto valor nutricional y potencial bioactivo.

Karín E. Coello, Elena Peñas, Cristina Martínez-Villaluenga, María Elena Cartea, Pablo Velasco, Juana Frias (2021). Pasta products enriched with moringa sprout powder as nutritive dense foods with bioactive potential. *Food Chemistry*, 360, 130032. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130032.

RESUMEN

Se propusieron 5 formulaciones de pasta tipo tallarines incorporando 5% (5MSP), 10% (10MSP), 15% (15MSP), 20% (20MSP) y 30% (30 MSP) de harina de moringa germinada (moringa sprout powder, MSP; condiciones de germinación: 28 °C, 24 h) con el objetivo de mejorar el valor nutricional y contenido de compuestos bioactivos en comparación con la pasta de semolina convencional control (0% de MSP). Los resultados mostraron un aumento gradual del contenido de proteína, grasa, fibra y minerales a medida que se incrementó la cantidad de MSP incorporada, mientras que se observó el efecto opuesto en el contenido de hidratos de carbono. La incorporación de MSP también aumentó los niveles de tiamina, riboflavina, GABA, glucosinolatos y la actividad antioxidante de la pasta. Las masas obtenidas a partir de todas las formulaciones estudiadas mostraron parámetros reológicos similares. La adición de MSP en cantidades de hasta el 10% no causó cambios notables de los atributos sensoriales de los tallarines, pero cantidades superiores tuvieron un impacto negativo. De estos resultados se concluyó que la adición de cantidades de harina de moringa germinada inferiores a 10% es una estrategia tecnológica prometedora para mejorar la calidad nutricional y funcional de la pasta sin comprometer su aceptación por parte del consumidor.

Food Chemistry 360 (2021) 130032

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Pasta products enriched with moringa sprout powder as nutritive dense foods with bioactive potential

Karín E. Coello [a,b], Elena Peñas [b,*], Cristina Martinez-Villaluenga [b], María Elena Cartea [c], Pablo Velasco [c], Juana Frias [b]

[a] Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, FIMCP, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador
[b] Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, Madrid 28006, Spain
[c] Group of Genetics, Breeding and Biochemistry of Brassicas, Misión Biológica de Galicia (CSIC), Pontevedra, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Moringa
Pasta
Germination
Nutritional properties
Bioactive compounds
Antioxidant activity
Sensory properties
Texture

ABSTRACT

Five fettuccini formulations containing 5% (5MSP), 10% (10MSP), 15% (15MSP), 20% (20MSP), and 30% (30MSP) of moringa sprout powder (MSP) were produced aimed at improving the nutritional and bioactive profile of conventional pasta. A gradual increase of protein, lipids, fiber and mineral content was observed in fettuccine as the MSP amount increased, while carbohydrates were reduced. MSP-addition also increased the levels of thiamine, riboflavin, γ- aminobutyric acid, glucosinolates and the antioxidant activity in pasta. All pasta doughs showed similar rheological parameters. Textural properties decreased after MSP inclusion, but the values obtained were close to those of control. Incorporation of MSP up to 10% did not modify substantially the sensory attributes of fettuccine, but higher amounts had a negative impact. Thus, addition of MSP up to 10% is a promising technological approach to improve the nutritional and functional properties of pasta without compromising consumer acceptance.

1. Introduction

Moringa oleifera L. is considered a multipurpose tree with great economical value and bioactive potential that is able to tolerate a wide range of climatic conditions and to adapt to different soils. Moringa cultivation is being greatly encouraged since it is regarded as the global most nutritious plant for humans (Falowo et al., 2018). Seeds are one of the most promising and less studied product of moringa tree. Moringa seeds exhibit a valuable nutritional composition that includes 21–40% proteins, 21–42% lipids, 10–25% dietary fiber and low starch content (Al Juhaimi, Ghafoor, Babiker, Matthäus, & Özcan, 2017). Furthermore, they are considered as an important source of minerals, vitamins and relevant phytochemicals such as glucosinolates (GLS), saponins, and phytates (in minor amounts) (Amaglo et al., 2010). Many of these phytochemicals have been linked to the prevention and management of several chronic and degenerative diseases including type-2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, anemia and cancer, among other disorders (Omodanisi, Aboua, & Oguntibeju, 2017). Despite the great nutritional value and health promoting properties of moringa seeds, their potential as functional food has been not fully explored.

One of the main constrains to the use of moringa seeds as food constituents is their bitterness and astringency jointly with their hardness and fibrous consistency (Chinma, Gbadamosi, Ogunsina, Oloyede, & Salami, 2014). Germination makes seeds tasty and softer, and it has been suggested that sprouts provide better nutritional value and functionality than seeds (Lemmens et al., 2019). This natural process activates metabolic enzymatic pathways rendering seeds more digestible and their compounds more bioavailable. During germination, the bioavailability of proteins increases, starch is hydrolyzed, the content of several vitamins is enhanced and secondary metabolites can suffer increase/reduction depending on the germination conditions (Lemmens et al., 2019). Recent studies carried out in our laboratory showed that protein underwent a slight increase during moringa germination; however carbohydrates, ash and fiber suffered a decrease. Thiamine underwent a sharp increase in moringa sprouts while riboflavin was not significantly modified. Significant rise in aminobutyric acid (GABA) and antioxidant activity was also observed, but the extent of the increase depended on the germination conditions (Coello et al., 2020). Our findings suggest that flours derived from moringa sprouts might have enhanced nutritional value containing, at the same time, minor

* Corresponding author.
E-mail address: elenape@ictan.csic.es (E. Peñas).

https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130032
Received 6 February 2020; Received in revised form 12 April 2021; Accepted 4 May 2021
Available online 9 May 2021
0308-8146/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

compounds with important health benefits. Taking into account its nutritional and bioactive properties, moringa sprout powder (MSP) could be used as ingredient to fortify highly consumed foodstuff such as pasta, which main ingredient is wheat flour.

Pasta is a popular food that is consumed worldwide by children and adults regardless of their socio-economic status, even in underdeveloped countries. High quality pasta is characterized by strength and elasticity, minimal cooking loss and stickiness, easy to prepare and good firmness after cooking. However, from a nutritional point of view, pasta products are energy dense foods with low amounts of micronutrients and bioactive compounds. The fortification of pasta with nutritive dense matrices that contain bioactive compounds might be an interesting and innovative way to improve the nutritional properties and health benefits of these products. In fact, different Health International Organizations consider the fortification of wheat flour a key aspect to prevent diseases related with a poor nutrition (OMS, Fao, UNICEF, GAIN, MI, & FFI, 2009), especially in the Latin-American and the Caribbean regions. Based on these considerations, the inclusion of MSP in pasta products may be a valuable mean of improving the nutritional and bioactive quality of pasta. In this scenario, only one study has investigated the supplementation of wheat flour with moringa sprout powder to produce cakes (Chinma et al., 2014). Furthermore, other moringa seed products such as debittered moringa flour and fermented moringa seed flour have been used in the formulation of bread and cookies (Bolarinwa, Aruna, & Raji, 2018; Ogunsina, Radha, & Indrani, 2011). However, supplementation of pasta products with moringa sprouts has not been documented. The amount of a functional ingredient to be added to semolina flour is a crucial factor since the obtained dough shall maintain the rheological properties and the resulting pasta products must be sensory attractive. In this context, it is important to highlight that the nutritional value of pasta cannot be improved at the expense of the sensory perception, which is one of the most important factor influencing the consumer choices. Thus, the texture and palatability of pasta products are key factors that determine the level of pasta supplementation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the fortification of wheat flour with moringa sprout powder (MSP) at different concentrations (5%, 10%, 15%, 20% and 30%) on nutritional, bioactive and sensory quality of fettuccini type pasta. Proximate composition (contents of protein, lipids, ash, fiber and carbohydrates) and the contents of vitamins B_1 and B_2 were determined in MSP-enriched pasta, as well as the levels of GABA, individual and total GLS and antioxidant activity. Furthermore, rheological, textural and sensory properties were studied in all MSP-enriched pasta formulations. Fettuccini pasta fortified with moringa sprouts could be marketed as an innovative functional product.

2. Materials and methods

2.1. Production of moringa sprout powder (MSP)

Moringa seeds (Moringa *oleifera* L.) were harvested from moringa trees grown in the Eastern part of Ecuador and provided by an Ecuadorian private company. The seeds were germinated at 28 °C for 24 h as previously reported (Coello et al., 2020), freeze-dried and kept in vacuum conditions until fettuccini preparation. The production of MSP from seeds is summarized in Fig. S1 (supplementary material).

2.2. Fettuccini production

Commercial wheat flour (WF) (Harinera del Mar Siglo XXI, S.L., Spain), semolina wheat flour (SWF) (OROMÁS S.A., Spain) and MSP were used as solid ingredients and water as liquid ingredient. Fettuccini pasta was prepared substituting SWF and WF by MSP at different levels of 0, 5%, 10%, 15%, 20% and 30% with a water/flour ratio equivalent to 0.4, according with the following equation:

$$\mathrm{MSP(g)} = (\%\mathrm{MSP}/100)\mathrm{x}(\mathrm{WF}+\mathrm{SWF})$$

In a first step all dry ingredients were premixed and the dough was sheeted on a chrome-plated steel pasta machine (Imperia Titania pasta maker, Italy). Fettuccini without MSP addition were considered as control pasta. The fresh pasta was dried in an oven at 40 °C for 16 h, milled, and kept refrigerated for subsequent physicochemical, sensory and texture analysis. Fettuccini formulations were coded as control, 5MSP, 10MSP, 15MSP, 20MSP and 30MSP, according to the concentration of MSP incorporated: 0 g/100 g, 5 g/100 g, 10 g/100 g, 15 g/100 g, 20 g/100 g and 30 g/100 g, respectively (Table S1, Supplementary material).

2.3. Proximate composition

Protein was analysed by the Dumas method, as described in the AOAC (1992) method 992.23, using a nitrogen analyser (LECO Corp., St. Joseph, MI). A factor of 5.83 was used for protein content conversion. Fiber, ash and lipids were analysed following methods of AOAC (978.10 for fiber, 923.03 for ash and 922.06 for lipids) and moisture content was determined following the ISO 712:1998 method. Starch content was quantified by the total starch kit (K-TSTA-50A, Megazyme, Wicklow, Ireland), a method accepted by AOAC (method 996.11) and AACC (method 76–13.01). All measurements were performed in duplicate and mean values were expressed in g/100 g of sample on dry matter basis (dm).

2.4. Determination of thiamine and riboflavin

The content of thiamine (vitamin B_1) and riboflavin (vitamin B_2) was determined after acid hydrolysis of pasta samples followed by enzymatic dephosphorylation at 45 °C. Afterwards both vitamins were independently quantified by HPLC equipped with a fluorescence detector. In this sense, thiamine was quantified at λ_{exc} 360 nm and λ_{emi} 435 nm after a postcolumn derivatization while riboflavin was directly determined at λ_{exc} 445 nm and λ_{emi} 520 nm (Frias, Peñas, & Vidal-Valverde, 2009). Thiamine and riboflavin standard curves with a linear range of 0.1–10 μg/mL and 0.03–10.0 μg/mL, respectively, were prepared for vitamins B_1 and B_2 quantification. Two independent extractions for every fettuccini sample were performed and three injections of each one were quantified. Mean values were expressed as μg/100 g dm.

2.5. Characterization of free phenolic profile

The extraction of phenolic compounds was carried out by adding 0.5 g of powdered pasta samples in 10 mL of 80% (v/v) methanol aqueous solution containing 0.1% of HCl by continuous magnetic stirring at room temperature for 24 h. Determination of free phenolic composition was performed by HPLC-DAD/QTOF-MS. An Agilent 1200-LC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with autosampler, vacuum degasser, quaternary pump and diode array detector (DAD) was used for chromatographic analysis. Sample (10 μL) elution was carry out on a ZORBAX Eclipse XDB-C18 column (5 μm, 150 × 4.6 mm) at a flow rate of 1 mL/min. Elution gradient of 0.1% formic acid in water (mobile phase A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (mobile phase B) was carried out as follows: from 5% B to 30% B in 30 min, from 30% B to 50% B in 5 min, from 50% B to 5% B in 2 min. HPLC system was coupled to a 6530A Accurate-Mass QTOF-MS, equipped with an Agilent Dual Jet Stream electrospray ionization interface in negative ionization mode under the following conditions: nebulizer pressure, 50 psi; flow rate of nitrogen, 12 L/min; gas drying temperature, 370 °C; capillary voltage, 3500 V; scan range: 50–1500 *m/z*. Phenolic compounds were identified according to their maximum absorbance at wavelengths 280 nm and 360 nm, molecular mass and fragmentation pattern. Data acquisition was performed using Agilent MassHunter Workstation.

2.6. Determination of antioxidant activity

Antioxidant activity was evaluated in methanolic extracts obtained as in Section 2.5 by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method described previously (Paucar-Menacho, Martínez-Villaluenga, Dueñas, Frias, & Peñas, 2018), with some modifications. Briefly, 30 μL of diluted sample were mixed with 180 μL of 70 nM fluorescein and 90 μL of 12 mM 2,2′-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) oxidant agent. At the same time, a set of 1 to 8 μM solutions of Trolox was also performed to make the standard curve. The reaction was carried out at 37 °C in 75 mM phosphate buffer (pH 7.4) for 150 min. Reaction mixtures were placed in a black 96-well plate (Fisher Scientific) in triplicate, the plate was automatically shaken and the fluorescence (λ_{exc} 485 nm and λ_{emi} 520 nm) readings were performed in a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments) every minute using Gene5™ software, version 1.1. (BioTek Instruments). The areas under the fluorescence decay curve (AUC) were calculated from the plots showing the relative fluorescence units as function of time. The AUC of blanks were subtracted. Every sample was analysed in duplicate and results were expressed as mg of Trolox equivalents (TE)/100 g dm.

2.7. Determination of GABA

The content of GABA in fettuccini samples was examined using reversed-phase high performance liquid chromatography as in Paucar-Menacho et al. (2018). Briefly, 0.5 g of sample was suspended in 12 mL distilled water and stirred at 4 °C for 16 h. Then, they were centrifuged at 15,000 rpm (10 °C, 20 min) and supernatants were vacuum-dried and dissolved in 500 μL of distilled water. An aliquot of 50 μL of extract was added to 10 μL of an internal standard solution containing 1.2 mg/mL of allyl-L-glycine and 20 μL of 20% (v/v) trimethylamine in 50% methanol (v/v) and derivatized with 30 μL of phenyl isothiocyanate. Afterward, samples were vacuum-dried, reconstituted in 500 μL of 0.1 M ammonium acetate pH 6.5 (mobile phase A) and centrifuged at 15,000 rpm at 10 °C for 5 min. Supernatants were filtered through a 0.22 μm nylon filter and analysed by HPLC. Two independent extractions were performed for each sample and mean values were expressed in mg GABA/100 g dm. GABA content was quantified by using an external GABA standard calibration curve with a linear range over 0–240 μg/ml.

2.8. Determination of individual and total GLS

Total GLS were extracted from 100 mg of powdered pasta samples following a two-step extraction and desulfatation procedure according to the method previously described by Kliebenstein et al. (2001) with minor modifications. Three microliters of the extract were analyzed by UPLC in order to identify and quantify GSL. Chromatographic analyses were performed on an ultrahigh-performance liquid chromatograph (UPLC Nexera LC-30AD; Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Nexera SIL-30AC injector and SPD-M20A photodiode array detector. The UPLC column was a C18 Atlantis T3 Waters column (3 μm particle size, 2.1 × 100 mm i.d.) protected with a C18 guard cartridge. The oven temperature was set at 35 °C. Compounds were eluted at flow rate of 0.8 mL/min by using bidistilled water (mobile phase A) and aqueous acetonitrile (mobile phase B) and the following gradient program: 3 min at 100% H_2O, 23 min from 0% to 25% acetonitrile, 1 min at 25% (v/v) acetonitrile, 9 min from 25% to 0% (v/v) acetonitrile, and 4 min at 100% H_2O. Data were recorded on a computer with LabSolutions software (Shimadzu). GSL were quantified at 229 nm by using sinalbin and glucotropaeolin (Phytoplan Diehm and Neuberger GmbH, Heidelberg, Germany) as external standards (linear range of standard curves: 0.079–1.264 nm and 0.083–1.333 nm for sinalbin and glucotropaeolin, respectively). Results were expressed in μmol/g dm.

2.9. Rheological analysis

The rheological properties of dough samples were analyzed by a dynamic oscillation rheological test using a Kinexus Pro Malvern Panalytical Rheometer (Malvern Instruments Limited Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, UK, WR14 1XZ), with a peltier plate cartridge temperature-controlled system set at 25 °C, 40 mm diameter rough parallel plate and user interface 21 CFR part 11 software, 1.6 version. Approximately, 5 g of dough was loaded onto the bottom plate and the top plate lowered to a gap of 1.6 mm. Excess dough was trimmed off and removed from the outer edge of the top plate geometry, and then the dough residue at the bottom plate of the rheometer was cleaned up. Paraffin oil was then added to the outer edge of the dough to prevent drying during measurement, and the dough was allowed to rest for a 5 min equilibration period. For each dough sample, a dynamic oscillatory frequency sweep was conducted at a constant strain amplitude (γ = 0.1%) within the linear viscoelastic regime. Frequency sweep oscillation procedure were carried out to measure the dynamic storage modulus (G', Pa) and loss modulus (G″, Pa) as a function of angular frequency (ω) from 0.02 to 215 rad/s to shape the linear viscoelastic region for pasta doughs with varying amount of MSP. Triplicated measurements for every experimental fettuccini sample were carried out.

2.10. Texture profile analysis

For texture analysis, 10 g of experimental MSP fettuccini were cooked in boiling water (1:10, w/v) for 10 min. Texture measurements were performed in form of texture profile analysis (TPA) using a Texture Analyzer CT3 (Brookfield, Middleboro, USA) with TexturePro CT Software, in a termostatised room at 19 °C ± 2.5 °C and 53% ± 15 RH. For statistical purposes, three strands of cooked MSP fettuccini were analyzed and results are the mean values and standard deviation of twelve replicates. Briefly, a pasta strand of 1 mm thickness was compressed up to 30% of its original height at a crosshead speed of 0.5 mm/s with a cylindrical probe (2 mm of diameter, 20 mm long, Stainless Steel). From the TPA curves, hardness (N), springiness (mm), stickiness (N), chewiness (mJ), adhesiveness (mJ) and cohesiveness were measured. Hardness was defined by peak force during first compression cycle. Springiness was defined as a ratio of the distance to peak force during second compression cycle and the distance to peak first compression cycle. Stickiness was defined by negative peak. Adhesiveness is a measure of stickiness and it is calculated as the area under the negative peak as probe withdraws after the first compression. Cohesiveness was calculated as the ratio of the area under the compression stokes of the second cycle and the area under the compression stokes of the first cycle. Finally, chewiness was obtained by multiplying hardness, cohesiveness and springiness.

2.11. Sensory evaluation

A total of 25 non-trained panelists belonging to ICTAN-CSIC who consume pasta every week were selected for sensory analysis of experimental MSP fettuccini. The six cooked MSP pasta were presented to panelists in randomized coded form, and tap water and unflavored plain cookies were provided to rinse the mouth between evaluations. The panelists were asked to evaluate the control and MSP-enriched fettuccini for appearance, aroma, taste, texture and overall acceptability. Each sensory attribute was rated on a non-structured scale (0 = disliked extremely; 5 = indifference; 10 = liked extremely).

2.12. Statistical analysis

Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) by Statgraphics Centurion XVI.I software, version 17.2.07 (Statpoint Technologies, Inc.) and differences for each attribute were compared by using least square difference (LSD) Fisher's multiple range test with $p \leq$

0.05 level of significance. Statistical analyses of texture samples were accomplished using MINITAB 17 statistical software, version 17.1.0 (Minitab, Inc.).

3. Results and discussion

3.1. Effect of MSP inclusion on the proximate composition of fettuccini

Table 1 shows the proximate composition of control and MSP-enriched fettuccini pastas. As it can be observed, a gradual increase in protein, lipids, ash and fiber levels was observed as consequence of MSP addition. The levels of protein underwent a 1.3-fold rise (from 13.5% in 5MSP to 16.0% in 30MSP), indicating that fettuccini containing larger MSP concentration provides higher protein content, a nutrient that is usually present in low amounts in pasta products. The enhanced protein levels in MSP-enriched pasta can be attributed to the high protein content in MSP (29.6 g/100 g dm). These results are consistent with those observed in cakes enriched with 30% moringa sprouts where 1.6-fold increase in protein levels was reported (Chinma et al., 2014). Similar behavior was observed for lipids content that reached levels of 7.8% in 30MSP fettuccini in comparison to 0.25% found in control pasta, results consistent with the high lipid content of MSP (Table 1). Taking into account the high content of unsaturated fatty acids such as oleic acid, omega-3, omega-6 in moringa (Al Juhaimi et al., 2017), our findings suggest that pasta enriched with MSP could have a more favorable lipid composition.

The content of minerals (ash) in experimental fettuccini also increased up to 1.8-fold (Table 1), evidencing the contribution of MSP mineral content (2.98 g/100 g dm) to ash levels observed in pasta. These results are in agreement with results reported by Chinma et al. (2014), who found a 1.5-fold rise in cake produced with 30% of germinated moringa. Similarly, the content of dietary fiber increased sharply in MSP-supplemented pasta (3.0 and 3.8% in 20MSP and 30MSP formulations, respectively) compared to control fettuccini (not detected). These results clearly show the important contribution of MSP fiber content (28.3 g/100 g dm) to the final levels observed in MSP-enriched pasta. Our results are in line with those obtained in cakes produced with 30% of moringa sprouts, where dietary fiber underwent a 2.9-fold increment (Chinma et al., 2014). The content of starch, however, underwent a decrease in MSP-fettuccine formulations and changed from 67.6% in control to 45.7% in 30MSP (reduction of 32%) (Table 1), results that can be attributed to the reduction of wheat flour content as MSP levels increased. All these results indicate that the inclusion of MSP improves the nutritional value of fettuccini, in agreement with results previously published for cake, bread, biscuits and cookies enriched with germinated moringa flour (Bolarinwa et al., 2018; Chinma et al., 2014; Ogunsina et al., 2011).

3.2. Effect of MSP inclusion on the content of thiamine and riboflavin of fettuccini

The content of thiamine in control fettuccine was 200.5 μg/100 g dm that increased gradually as the proportion of MSP included in the formulation augmented, reaching the highest levels in 30MSP fettuccini (282.5 μg/100 g dm) (Table 1). The content of thiamin in MSP-enriched pasta is consistent with the levels of this vitamin in MSP (1091 μg/100 g dm). In addition, it has been reported that commercial wheat flour provides around 250 μg vitamin B_1/100 g dm (Turgut, Karacabey, & Kucukoner, 2014), results that match with those reported here. MSP fettuccini contained higher thiamine amounts than pasta prepared with 10% of germinated pigeon pea (120 μg/100 g dm) (Torres, Frias, Granito, & Vidal-Valverde, 2007) but lower than those found in pasta made with blends of whole wheat flour (319 μg/100 g dm) (Turgut et al., 2014). Thiamine lack in food is associated with neurodegenerative diseases since it acts in the body as the coenzyme thiamin pyrophosphate (TPP) for tissue respiration.

The same trend was observed for riboflavin content that also rose in experimental fettuccini as MSP amount increased, from 72.6 μg/100 g dm in control sample to 115.4 μg/100 g dm in the 30MSP formulation (Table 1). MSP contains 625.2 μg riboflavin/100 g dm, levels that are in agreement with those observed in fettuccini formulations. Pasta enriched with MSP up to 20% provided lower amounts of this vitamin than pasta containing 10% of germinated pigeon pea (110 μg /100 g dm) (Torres et al., 2007) but higher riboflavin content to those of blends made with whole wheat flour (81 μg/100 g dm) (Turgut et al., 2014). The body uses vitamin B_2 to metabolize fats, proteins and carbohydrates into glucose, maintaining the body health, among other properties, and MSP-enriched pasta can contribute to increase vitamin B_2 intake.

3.3. Effect of MSP inclusion on the composition of free phenolic compounds

In order to elucidate the phenolic composition in MSP and MSP-enriched pasta, the free phenolic profile was studied by HPLC-DAD/QTOF-MS. Free phenolic compounds were not detected neither in MSP nor in MSP-enriched fettuccini (Fig. S2, Supplementary material). Our results agree with those recently reported by other authors, who observed very low soluble phenolic contents (0.1–0.7 mg/g) in hydro-ethanolic extracts obtained from moringa seeds (Fernandes et al., 2021). The low content of free phenolic compounds found may suggest that most phenolic compounds present in moringa seeds are bound to cell wall components and would be not soluble in alcoholic-aqueous solutions.

3.4. Effect of MSP inclusion on the content of GABA in fettuccini

Table 2 summarizes the content of GABA in control and MSP-supplemented pasta formulations. GABA was not detected in control pasta, but the content of this bioactive compound rose dramatically after MSP incorporation up to 20% and no further increases were observed in 30MSP pasta. GABA content in moringa seed flour was 80 mg/100 g dm (data not shown). As can be observed from Table 2, a notable higher GABA content was observed in MSP (97.6 mg/100 g dm), increase that can be explained by the activation during germination of glutamate

Table 1
Proximate composition (g/100 g dm), content of thiamine (μg/100 g dm) and riboflavin (μg/100 g dm) of MSP, control pasta and pasta formulations enriched with 5% (5MSP), 10% (10MSP), 15% (15MSP), 20% (20MSP) and 30% (30MSP) of moringa sprout powder (MSP).

Samples	Moisture	Protein	Lipids	Ash	Fiber	Starch	Thiamine	Riboflavin
MSP	3.21 ± 0.11^{a}	29.59 ± 0.66^{f}	30.13 ± 0.04^{f}	2.98 ± 0.03^{c}	28.32 ± 1.59^{e}	2.73 ± 0.21^{a}	1090.81 ± 35.31^{e}	625.20 ± 52.10^{f}
Control	10.73 ± 0.00^{d}	12.00 ± 0.02^{a}	0.25 ± 0.05^{a}	0.62 ± 0.03^{a}	ND ^{a}	67.56 ± 1.89^{f}	200.52 ± 11.67^{a}	72.59 ± 1.98^{a}
5MSP	8.32 ± 0.00^{c}	13.56 ± 0.10^{b}	1.02 ± 0.01^{ab}	0.92 ± 0.01^{b}	0.68 ± 0.02^{ab}	66.33 ± 1.04^{f}	223.06 ± 8.70^{b}	92.31 ± 3.28^{b}
10MSP	6.51 ± 0.04^{b}	14.17 ± 0.04^{c}	3.28 ± 0.23^{cd}	0.93 ± 0.02^{b}	1.11 ± 0.19^{b}	61.67 ± 0.69^{e}	225.63 ± 15.03^{b}	99.35 ± 4.30^{c}
15MSP	10.94 ± 0.00^{d}	14.15 ± 0.06^{c}	2.78 ± 1.68^{bc}	0.92 ± 0.02^{b}	2.09 ± 0.14^{c}	50.12 ± 1.81^{c}	247.70 ± 17.17^{c}	96.20 ± 4.16^{bc}
20MSP	8.16 ± 0.08^{c}	14.83 ± 0.02^{d}	5.15 ± 0.02^{d}	1.03 ± 0.02^{b}	3.05 ± 0.62^{cd}	54.40 ± 0.75^{d}	250.87 ± 12.04^{c}	104.90 ± 3.67^{d}
30MSP	10.53 ± 0.00^{d}	16.04 ± 0.02^{e}	7.81 ± 1.45^{e}	1.14 ± 0.01^{b}	3.81 ± 0.71^{d}	45.65 ± 0.32^{b}	282.53 ± 22.42^{d}	115.37 ± 5.13^{e}

Data are expressed as mean values ± standard deviation of three independent experiments (n = 3). Different superscript letters within a column indicate significant differences among samples ($p \leq 0.05$).

Table 2
Content of GABA (mg/100 g dm), glucomoringin (μmol/g dm), sinalbin (μmol/g dm) and total GLS (μmol/g dm) in control pasta and pasta formulations enriched with 5% (5MSP), 10% (10MSP), 15% (15MSP), 20% (20MSP) and 30% (30MSP) of moringa sprout powder (MSP).

Fettuccine	GABA	Glucomoringin	Sinalbin	Total GLS
MSP	97.59 ± 9.64^{f}	43.07 ± 2.03^{e}	3.62 ± 0.52^{e}	46.20 ± 2.11^{e}
Control	ND^{a}	ND^{a}	ND^{a}	ND^{a}
5MSP	2.80 ± 0.32^{b}	ND^{a}	ND^{a}	ND^{a}
10MSP	5.01 ± 0.31^{c}	ND^{a}	ND^{a}	ND^{a}
15MSP	10.72 ± 0.16^{d}	0.81 ± 0.05^{c}	0.20 ± 0.01^{c}	1.01 ± 0.05^{c}
20MSP	11.28 ± 0.21^{e}	0.49 ± 0.04^{b}	0.12 ± 0.01^{b}	0.6 ± 0.03^{b}
30MSP	12.04 ± 0.70^{e}	2.06 ± 0.06^{d}	0.40 ± 0.03^{d}	2.46 ± 0.04^{d}

Data are expressed as mean values ± standard deviation of three independent experiments (n = 3). Different superscript letters within a column indicate significant differences among samples ($p \leq 0.05$).

decarboxylase (GAD), one of the main enzymes involved in the GABA-shunt pathway (Ding, Johnson, Chu, & Feng, 2019). These findings suggest that sprouts are valuable ingredients to enhance GABA levels in foods. GABA is a non-protein amino acid that exhibits multiple positive effects on human health including lowering blood pressure (Chen et al., 2018) and inhibition of tumor cell proliferation (Song et al., 2016), among others. Our results demonstrated that the incorporation of MSP in fettuccini blend represents a feasible way to obtain healthy pasta products enriched in GABA.

3.5. Effect of MSP inclusion on the content of GLS in fettuccini

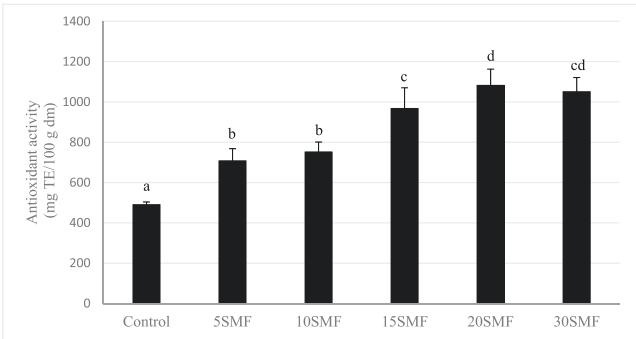
Individual and total GLS content found in MSP-enriched pastas are presented in Table 2. GLS were not detected in control, 5MSP and 10MSP supplemented pastas. However, concentrations of MSP above 15% exhibited total GLS levels ranging from 0.6 to 2.5 μmol/g dm. Glucomoringin was the most abundant GLS in MSP-supplemented pasta, which content varied from 0.8 to 2.1 μmol/g dm, followed by sinalbin (0.1–0.4 μmol/g dm.). Increased amount of MSP in pasta caused higher total and individual GLS concentration. The only exception was 20MSP pasta, which exhibited lower total and individual GLS content than 15MSP. Taking into account that the contents of total GLS, glucomoringin and sinalbin in MSP were 46.2 μmol/g dm, 43.1 μmol/g dm and 3.6 μmol/g dm (data not shown), respectively, higher amounts of total and individual GLS would be expected in MSP enriched pastas than those really observed. It has been reported that post-harvest treatments and culinary processes have a great influence in GLS content in vegetables. In this sense, mechanical impacts and technological processes such as breadmaking strongly reduces the content of GLS, mainly due to the activity of myrosinase upon the plant tissue damage, yielding a wide range of bioactive hydrolysis compounds (Klopsch et al., 2019). These findings could explain that levels of GLS found in MSP-enriched pasta were lower than those expected. Our results are in agreement with those found in previous studies (Amaglo et al., 2010; Förster, Ulrichs, Schreiner, Müller, & Mewis, 2015) reporting that glucomoringin (4-α-rhamnopyranosyloxy-benzyl GLS) was the main GLS in *M. oleifera* seeds. Sinalbin (*p*-hydroxybenzyl glucosinolate) have been also detected in flowers and leaves of *M. oleifera* (Amaglo et al., 2010). However, the present study reports for the first time the presence of both GLS in pasta formulations enriched in MSP. GLS are secondary metabolites that have been associated with the prevention of several types of cancer, activity that can be attributed to their breakdown derivatives produced by myrosinase enzyme. In this context, GLS hydrolysis products are able to disrupt several steps of carcinogenesis including the prevention of DNA damage in normal cells, stimulate detoxifying enzymes, cell cycle arrest and apoptosis of cancer cells (Soundararajan & Kim, 2018). Hence, the presence of GLS provides to MSP-enriched pasta additional health benefits.

3.6. Effect of MSP inclusion on antioxidant activity in fettuccini

The antioxidant activity in control pasta was 490.24 mg TE/100 g dm (Fig. 1), and the gradual addition of MSP caused an increment in this biological activity. The addition of 5%-10% MSP increased 1.7–1.8-fold the ORAC values and further enrichment led to higher rise that was doubled when 15, 20 and 30% of MSP was added (967–1050.8 mg TE/100 g dm). The high antioxidant activity of MSP (5172.87 mg GAE/100 g dm, Fig. 1) explains this increment in pasta ORAC values. Since no phenolic compounds were detected in MSP-enriched pasta, the increased ORAC values strongly suggest the enhancement of other antioxidant compounds during moringa seed germination. It has been reported that the content of vitamins C and E, that are recognized antioxidants, increased during seed germination (Fernandez-Orozco et al., 2006; Rico et al., 2020). Moreover, saponins are present in significant amounts in moringa seeds (Gu, Yang, & Wang, 2020) and isothiocyanates produced from GLS hydrolysis during germination to exhibit high ORAC values (Borĉul, Mekinić, Radan, Rollin, & Blažebic, 2018; Han et al., 2019). It can be hypothesized that all these antioxidant compounds, which have not been quantified in the present work, may act synergistically increasing ORAC values in MSP-enriched pasta as the amount of MSP augmented. The increased GABA content in MSP as compared with moringa seeds could also contribute to enhanced ORAC values of MSP-enriched pasta, as previously reported in germinated wheat (Kim, Kwak, & Kim, 2001). Since our results suggest that there are several antioxidant compounds responsible for the increased antioxidant activity of MSP-enriched pasta, further studies aimed at identifying these antioxidant compounds are needed, in order to confirm their contribution to the high ORAC values observed in MSP-derived pasta developed in the present work.

3.7. Effect of MSP inclusion on rheological properties of fettuccini dough

Rheological analysis of pasta dough is frequently used as an indicator to predict the quality of pasta products. Results of the dynamic oscillatory tests performed in control and MSP-supplemented fettuccini are represented in Fig. 2. All pasta samples showed a solid-like viscoelastic behaviour, where the storage modulus G′ (elastic part) was higher than the loss modulus G″ (viscous properties), over the frequency range tasted, and both moduli increased with increasing angular frequency. As shown in Fig. 2, within G′> G″, the phase angle (ϕ) was lower than 45° in a range of 22° to 30°. An initial deformation at low frequency was observed, but as the frequency was gradually increased, with the same shear stress, pasta samples exhibited more resistance to deformation, confirming their solid-like behaviour (Fig. 2a–f). The addition of MSP at different concentrations did not affect to the elasticity of pasta dough, since no significant variations of rheological parameters were observed



MSP antioxidant activity: 5172.87 mg TE/100 g dm.

Fig. 1. Antioxidant activity (mg TE/100 g dm) in control pasta and pasta enriched with 5% (5MSP), 10% (10MSP), 15% (15MSP), 20% (20MSP) and 30% (30MSP) of moringa sprout powder (MSP).

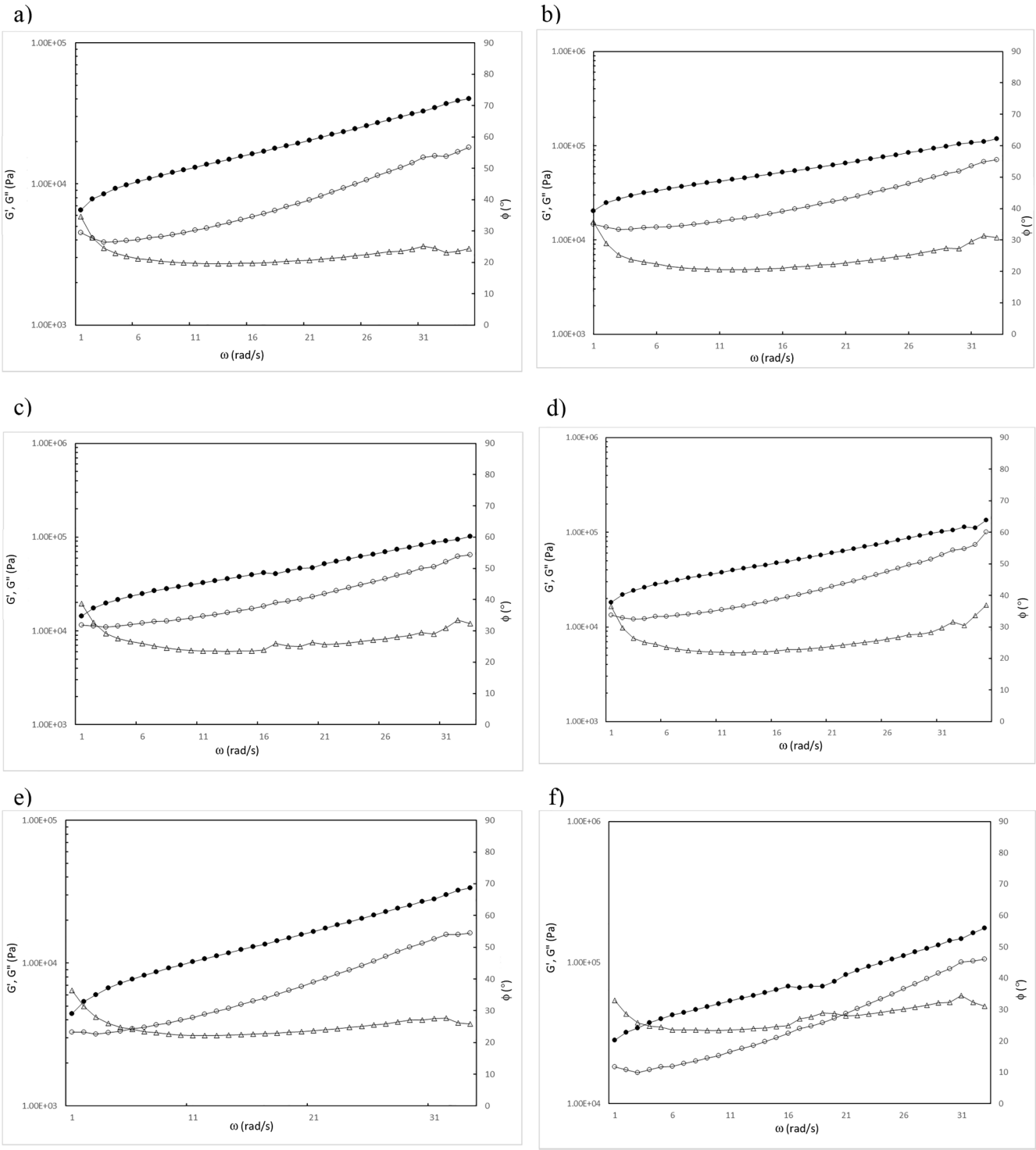


Fig. 2. Dynamic oscillatory data for control (a) and fettuccini pasta formulations enriched with 5% (5MSP) (b), 10% (10MSP) (c), 15% (15MSP) (d), 20% (20MSP) (e) and 30% (30MSP) (f). G′ (Pa, closed circles); G″ (Pa, open circles); ϕ(°, open triangles).

when compared to the control one.

The rheological properties of pasta doughs will depend on the structure and on the arrangement of different ingredients and forces between them. Gluten protein network, starch gelatinization phenomena and the content of proteins, fat and water plays a key role for pasta structure building (). It should be noted that MSP-enriched pastas present a lower gluten-content than the control one. Gluten network provides to pasta dough its unique viscoelastic properties. However, it has been reported that protein content in dough up to 14% cause a decrease in G′ and G″ moduli, but with higher protein levels, the dynamic moduli are not affected (Khatkar, 2005). MSP moringa-derived pastas exhibit higher protein content (14–16%) than control pasta, and this fact could counteract the effect of gluten reduction, explaining the maintenance of dynamic oscillatory parameters of pasta dough after MSP incorporation. Moreover, low molecular weight proteins derived from moringa seeds form an active network that favours colloid aggregation (Brilhante et al., 2017) that could contribute to maintain rheological properties of dough similar to those of control sample.

3.8. Effect of MSP inclusion on textural properties of cooked fettuccini

Textural characteristics are key attributes for pasta cooking quality that are the cornerstone of final consumer acceptance. Table 3 collects the textural properties of cooked experimental fettuccini. Control pasta showed higher hardness values than MSP-enriched formulations. In general terms, as the content of MSP increased, the hardness of pasta decreased (Table 3), reaching a 33% reduction in 30MSP sample. Similar reduction of springiness, stickiness and chewiness was observed by addition of increased amounts of MSP, showing 30MSP formulation a reduction of these parameters of 21%, 26% and 50%, respectively (Table 3). However, no significant differences ($p > 0.05$) in adhesiveness were found between control and MSP supplemented pasta, with the exception of 15MSP and 20 MSP that exhibited lower values for this attribute (Table 3). Similarly, addition of MSP to pasta did not change the cohesiveness parameter, showing all fettuccini samples values close to 1.00, a reference value for high quality pasta.

Textural properties of pasta are mainly affected by the matrix structural network of starch, gluten, additional proteins, and other ingredients (Chang & Wu, 2008). Pasta hardness represents the force needed for pasta structure deformation (Pasqualone et al., 2016). The reduction of this textural parameter in MSP fettuccini samples can be explained by their lower starch and gluten levels compared with wheat flour-based pasta (D'Egidio, Nardi, & Cubadda, 1990). Springiness, that measures the extent of recovery that occurs when a compressive force is removed (Pasqualone et al., 2016), also decreased in fettuccine after MSP inclusion, indicating the lower elasticity of moringa enriched pasta. Chewiness indicates the energy necessary to bring the fettuccini to a swallowing state (Motta-Romero, Santra, Rose, & Zhang, 2017). As expected, control fettuccini exhibited the highest chewiness, suggesting that control sample had stronger structure network than MSP containing formulations. Adhesiveness reflects the stickiness to teeth while cohesiveness is the ability of pasta to stick to itself (Weng, Wang, & Weng, 2020). The values for both parameters found in MSP enriched fettuccini indicate similar sticky behaviour of pasta after inclusion of MSP.

In general terms, consumers prefer pasta that is firm, chewy and not gummy or adhesive. Although some textural parameters were reduced in MSP pasta formulations, their textural profiles were close to that of control (Fig. S3, Supplementary material), especially when a low MSP concentration was used. These findings suggest that the incorporation of MSP at low-medium doses did not caused important textural changes in fettuccini pasta.

3.9. Sensory evaluation of MSP enriched fettuccini.

The sensory evaluation of fettuccini formulations fortified with MSP is presented in Table 4. Higher scores of sensory attributes are related to better acceptance. No significant ($p > 0.05$) differences were detected for all sensory attributes between control fettuccini and 5MSP pasta. Moreover, 10MSP pasta exhibited similar odor, texture and overall acceptability than control and 5MSP fettuccini. There findings suggest that the inclusion of low levels of MSP to pasta did not adversely affect its sensory quality and confirm the feasibility of enriching pasta with MSF. However, addition of higher percentage of moringa (15%-30%) to fettuccini caused significant ($p \leq 0.05$) lower scores for all sensory attributes.

Table 4
Sensory attributes of control pasta and pasta formulations enriched with 5% (5MSP), 10% (10 MSP), 15% (15 MSP), 20% (20MSP) and 30% (30MSP) of moringa sprout powder (MSP) after cooking.

Fettuccine	% MSP	Appearance	Odor	Taste	Texture	Overall acceptability
Control	0	7.72^{d}	7.18^{b}	6.92^{d}	5.86^{cd}	6.48^{c}
5MSP	5	7.20^{cd}	6.34^{b}	5.94^{cd}	6.70^{d}	6.26^{c}
10MSP	10	6.46^{c}	6.52^{b}	5.13^{c}	6.34^{d}	5.67^{c}
15MSP	15	5.19^{b}	4.74^{a}	3.14^{b}	4.66^{bc}	3.31^{b}
20MSP	20	4.47^{ab}	4.61^{a}	2.43^{ab}	3.77^{ab}	2.38^{ab}
30MSP	30	3.71^{a}	3.88^{a}	1.47^{a}	3.20^{a}	1.36^{a}

Data are the mean values ± SD of the independent trials (n = 25). Different superscript letter within column indicates significant differences ($p \leq 0.05$).

Taste and texture were the sensory descriptors more affected by MSP addition. Lower scores for taste can be explained by the bitter aftertaste caused by some minor compounds as GLS (Förster et al., 2015) present in moringa sprouts. Moreover, the worst texture perceived in fettuccine containing high amounts of MSP and the grainy feeling in 30MSP fettuccini identified by some panellists can be attributed to the reduction of hardness, stickiness and chewiness observed in textural profile analysis (Table 3). Consequently, inclusion of MSP amounts higher than 15% affected negatively the overall acceptability of fettuccini.

Although 5MSP and 10MSP fettuccini showed an overall acceptability similar to control, it should be point out that higher MSP proportions could be accepted by younger generations who tend to be more open-minded and prone to novel food experiences (Torri, Tuccillo, Bonelli, Piraino, & Leone, 2020). In addition, testing sensory assays carried out in the laboratory showed that the use of tasty pasta sauces added to MSP fettuccini improved their acceptability by consumers regardless of their age.

4. Conclusions

This study provides valuable information to support the incorporation of moringa sprout powder (MSP) to obtain fettuccini pasta with good nutritional, bioactive, rheological and sensory properties. The results indicated that the content of protein, lipids, minerals, fiber, thiamine and riboflavin improved in pasta as the MSP amount incorporated increased. Increasing amounts of MSP added to pasta also enhanced the levels of bioactive compounds (GABA and GLS) and the antioxidant activity of fettuccini. Several texture attributes studied in cooked fettuccini such as hardness, springiness, stickiness, and chewiness decreased as levels of MSP rose. However, no differences in cohesiveness and adhesiveness between control and MPS-containing fettuccini were observed. Sensory evaluation of MSP-enriched pasta indicates that incorporation of MSP up to 10% allows the production of fettuccine with good sensory properties. Fettuccini containing 20%-30% of MSP

Table 3
Textural properties of control pasta and pasta formulations enriched with 5% (5MSP), 10% (10 MSP), 15% (15 MSP), 20% (20MSP) and 30% (30MSP) of moringa sprout powder after cooking.

	Hardness (N)	Springiness (mm)	Stickiness (N)	Chewiness (mJ)	Adhesiveness (mJ)	Cohesiveness
Control	0.26 ± 0.04^{d}	0.24 ± 0.02^{d}	0.24 ± 0.06^{d}	0.06 ± 0.02^{d}	0.0055 ± 0.01^{b}	0.93 ± 0.20^{ab}
5MSP	0.20 ± 0.03^{bc}	0.22 ± 0.04^{bc}	0.18 ± 0.04^{bc}	0.042 ± 0.01^{bc}	0.0033 ± 0.00^{ab}	$0.91 \pm 0.12a^{b}$
10MSP	0.19 ± 0.02^{ab}	0.21 ± 0.02^{ab}	0.17 ± 0.04^{bc}	0.03 ± 0.01^{ab}	0.0030 ± 0.00^{ab}	0.91 ± 0.16^{ab}
15MSP	0.22 ± 0.02^{c}	0.23 ± 0.02^{cd}	0.20 ± 0.03^{c}	0.05 ± 0.01^{c}	0.0020 ± 0.00^{a}	0.90 ± 0.11^{ab}
20MSP	0.19 ± 0.03^{ab}	0.21 ± 0.03^{ab}	0.16 ± 0.03^{ab}	0.03 ± 0.01^{ab}	0.00172 ± 0.00^{a}	0.85 ± 0.11^{ab}
30MSP	0.18 ± 0.02^{a}	0.19 ± 0.03^{a}	0.14 ± 0.03^{a}	0.029 ± 0.01^{a}	0.0028 ± 0.00^{ab}	0.82 ± 0.17^{a}

Data are expressed as mean values ± standard deviation of three independent experiments (n = 3).
Different superscript letters within column indicate significant differences among samples ($p \leq 0.05$).

exhibited the highest levels of nutrients, bioactive compounds and antioxidant activity, but exhibited the lowest sensory scores, mainly due to taste and texture attributes. The nutritional, functional, rheological and textural results obtained in the present work demonstrate the potential of using MSP as a nutritious and bioactive ingredient for producing pasta with good quality. Further studies focused on the identification of the bioactive compounds responsible for the antioxidant activity of MSP-enriched pasta are necessary. Moreover, studies aimed at improving sensory and textural properties of fettuccini containing high MSP percentage (20–30%) by incorporating hydrocolloids and proteins will be performed. The results obtained in this study open great opportunities to use MSP as ingredient for the development of a wide range of functional food products such as bakery or extruded foods.

CRediT authorship contribution statement

Karín E. Coello: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing. **Elena Peñas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Cristina Martinez-Villaluenga:** Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing - review & editing. **María Elena Cartea:** Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing - review & editing. **Pablo Velasco:** Methodology, Validation, Investigation, Writing - review & editing. **Juana Frias:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing - review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was funded by grants AGL2017-83718-R (AEI/FEDER, UE), AGL2015-67598-R (MINECO/FEDER, UE) and intramural project grant number 201870I097 (CSIC).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130032.

References

Al Juhaimi, F., Ghafoor, K., Babiker, E. E., Matthäus, B., & Özcan, M. M. (2017). The biochemical composition of the leaves and seeds meals of moringa species as non-conventional sources of nutrients. *Journal of Food Biochemistry, 41*(1), e12322. https://doi.org/10.1111/jfbc.2017.41.issue-110.1111/jfbc.12322.

Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Lo Curto, R. B., Rosa, E. A. S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., … Timpo, G. M. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry, 122*(4), 1047–1054. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.073.

Bolarinwa, I. F., Aruna, T. E., & Raji, A. O. (2018). Nutritive value and acceptability of bread fortified with moringa seed powder. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 18*, 195–200. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.05.002.

Borĉul, F., Mekinić, I. G., Radan, M., Rollin, P., & Blažebic, I. (2018). Isothiocyanates: Cholinesterase inhibiting, antioxidant, and anti-inflammatory actvity. *Journal of the Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 33*, 577–582. https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1442832.

Brilhante, R. S. N., Sales, J. A., Pereira, V. S., Castelo-Branco, D. D. S. C. M., Cordeiro, R. D. A., de Souza Sampaio, C. M., … Rocha, M. F. G. (2017). Research advances on the multiple uses of Moringa oleifera: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 10*(7), 621–630. https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.07.002.

Chang, H. C., & Wu, L. C. (2008). Texture and quality properties of chinese fresh egg noodles formulated with green seaweed (*Monostroma nitidum*) powder. *Journal of Food Science, 79*, S398–S404. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00912.x.

Chen, B.-C., Hung, M.-Y., Wang, H.-F., Yeh, L.-J., Pandey, S., Chen, R.-J., … Huang, C.-Y. (2018). GABA tea attenuates cardiac apoptosis in spontaneously hypertensive rats (SHR) by enhancing PI3K/Akt-mediated survival pathway and suppressing Bax/Bakdependent apoptotic pathway. *Environmental Toxicology, 33*(7), 789–797. https://doi.org/10.1002/tox.v33.710.1002/tox.22565.

Chinma, C. E., Gbadamosi, K. B., Ogunsina, B. S., Oloyede, O. O., & Salami, S. O. (2014). Effect of addition of germinated moringa seed flour on the quality attributes of wheat-based cake. *Journal of Food Processing and Preservation, 38*(4), 1737–1742. https://doi.org/10.1111/jfpp.12136.

Coello, K. E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., Cartea, M. E., Abilleira, R., & Peñas, E. (2020). Potential of germination in selected conditions to improve the nutritional and bioactive properties of moringa (*Moringa oleifera* L.). *Foods, 9*(11), 1639. https://doi.org/10.3390/foods9111639.

Frias, J., Peñas, E., & Vidal-Valverde, C. (2009). Changes of vitamin content of powder enteral formulas as a consequence of storage. *Food Chemistry, 115*, 1411–1416. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.070.

D'Egidio, Mariani, Nardi, Novaro, & Cubadda, R. (1990). Chemical and technological variables and their relationships : a predictive equation for pasta cooking quality. Cereal Chemistry, 67, 275–281. 10.12691/wjar-2-1-3.

Ding, J., Johnson, J., Chu, Y. F., & Feng, H. (2019). Enhancement of γ-aminobutyric acid, avenanthramides, and other health promoting metabolites in germinating oats (*Avena sativa* L.) treated with and without power ultrasound. *Food Chemistry, 283*, 239–247. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.136.

Falowo, A. B., Mukumbo, F. E., Idamokoro, E. M., Lorenzo, J. M., Afolayan, A. J., & Muchenje, V. (2018). Multi-functional application of Moringa oleifera Lam. in nutrition and animal food products: A review. *Food Research International, 106*, 317–334. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.079.

Fernandes, A., Bancessi, A., Pinela, J., Dias, M. I., Liberal, A., Calhelha, R. C., … Barros, L. (2021). Nutritional and phytochemical profiles and biological activities of *Moringa oleifera* Lam. edible parts from Guinea-Bissau (West Africa). *Food Chemistry, 341*, Article 128229. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128229.

Fernandez-Orozco, R., Piskula, M. K., Zielinski, H., Kozlowska, H., Frias, J., & Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology, 223*(4), 495–502. https://doi.org/10.1007/s00217-005-0229-1.

Förster, N., Ulrichs, C., Schreiner, M., Müller, C. T., & Mewis, I. (2015). Development of a reliable extraction and quantification method for glucosinolates in *Moringa oleifera*. *Food Chemistry, 166*, 456–464. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.043.

Gu, X., Yang, Y., & Wang, Z. (2020). Nutritional, phytochemical, antioxidant, -glucosidase and -amylase inhibitory properties of Moringa oleifera seeds. *South African Journal of Botany, 133*, 151–160. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.021.

Han, Y., Chi, J., Zhang, M., Zhang, R., Fan, S., Dong, L., … Liu, L. (2019). Changes in saponins, phenolics and antioxidant activity of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd) during millling process. *LWT-Food Science and Technology, 114*, Article 108381. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108381.

Khatkar, B. S. (2005). Effect of protein contents and water absorption values on dynamic rheological properties of wheat flour dough. *Journal of Food Science and Technology, 42*, 321–325.

Kim, M. J., Kwak, H. S., Kim, S. S. (20018). Effects of germination on protein, γ-aminobutyric acid, phenolic acids, and antioxidant capacity in wheat. Molecules, 23, 2244. 10.3390/molecules23092244.

Kliebenstein, D. J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., & Mitchell-Olds, T. (2001). Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. *Plant Physiology, 126*(2), 811–825. https://doi.org/10.1104/pp.126.2.811.

Klopsch, R., Baldermann, S., Hanschen, F. S., Voss, A., Rohn, S., Schreiner, M., & Neugart, S. (2019). *Brassica*-enriched wheat bread: Unraveling the impact of ontogeny and breadmaking on bioactive secondary plant metabolites of pak. *Food Chemistry, 295*, 412–422. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.113.

Lemmens, E., Moroni, A. V., Pagand, J., Heirbaut, P., Ritala, A., Karlen, Y., … Delcour, J. A. (2019). Impact of cereal seed sprouting on its nutritional and technological properties: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18*, 305–328. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12414.

Motta-Romero, H., Santra, D., Rose, D., & Zhang, Y. (2017). The dough rheological properties and texture of gluten-free pasta based on proso millet flour. *Journal of Cereal Science, 74*, 238–243. https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.02.014.

Ogunsina, B. S., Radha, C., & Indrani, D. (2011). Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered Moringa oleifera seed flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62*(2), 185–194. https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526928.

OMS, FAO, UNICEF, GAIN, MI, & FFI. (2009). Recomendaciones sobre el enriquecimiento de la harina de trigo y de maíz. Informe de reunión: Declaración de consenso provisional. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. Retrieved at: https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/wheat_maize_fort_es.pdf?ua=1, last accessed: 22-01-2020.

Omodanisi, E. I., Aboua, G. Y., & Oguntibeju, O. O. (2017). Therapeutic potentials and pharmacological properties of moringa oleifera lam in the treatment of diabetes mellitus and related complications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 16*, 1737–1746. https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i7.35.

Pasqualone, A., Gambacorta, G., Summo, C., Caponio, F., Di Miceli, G., Flagella, Z., … Lenucci, M. S. (2016). Functional, textural and sensory properties of dry pasta supplemented with lyophylized tomato matrix or with durum wheat bran extracts produced by supercritical carbon dioxide or ultrasound. *Food Chemistry, 213*, 545–553. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.006.

Paucar-Menacho, Luz María, Martínez-Villaluenga, Cristina, Dueñas, Montserrat, Frias, Juana, & Peñas, Elena (2018). Response surface optimisation of germination conditions to improve the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity in quinoa. *International Journal of Food Science and Technology, 53*(2), 516–524. https://doi.org/10.1111/ijfs.13623.

Rico, Daniel, Peñas, Elena, García, María del Carmen, Martínez-Villaluenga, Cristina, Rai, Dilip K., Birsan, Rares I., … Martín-Diana, Ana B. (2020). Sprouted barley flour as a nutritious and functional ingredient. *Foods, 9*(3), 296. https://doi.org/10.3390/foods9030296.

Song, L., Du, A., Xiong, Y., Jiang, J., Zhang, Y., Tian, Z., & Yan, H. (2016). Gamma-Aminobutyric acid inhibits the proliferation and increases oxaliplatin sensitivity in human colon cancer cells. *Tumor Biology, 37*, 14885–14894. https://doi.org/10.1007/s13277-016-5367-5.

Soundararajan, P., & Kim, J. S. (2018). Anti-carcinogenic glucosinoaltes in cruciferous vegetables and their antagonistic efffects on prevention of cancers. *Molecules, 23*, 2983. https://doi.org/10.3390/molecules23112983.

Torres, Alexia, Frias, Juana, Granito, Marisela, & Vidal-Valverde, Concepción (2007). Germinated Cajanus cajan seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chemistry, 101*(1), 202–211. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.018.

Torri, Luisa, Tuccillo, Fabio, Bonelli, Simona, Piraino, Stefano, & Leone, Antonella (2020). The attitudes of Italian consumers towards jellyfish as novel food. *Food Quality and Preference, 79*, 103782. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103782.

Turgut, S. S., Karacabey, E., & Kucukoner, E. (2014). Potential of Image Analysis Based System in Food Quality Assessments and Classifications. 9th Baltic Conference on Food Science and Technology "Food for Consumer Well-Being," (MAY), 8–12. 10.13140/2.1.5172.1605.

Weng, Zi-Jun, Wang, Be-Jen, & Weng, Yih-Ming (2020). Preparation of white salted noodles using rice flour as the principal ingredient and the effects of transglutaminase on noodle qualities. *Food Bioscience, 33*, 100501. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100501.

4.2.2. Desarrollo de snacks saludables tipo barritas de cereales enriquecidos con harina de moringa germinada

Publicación 3. Producción de snacks saludables suplementados con harina de moringa germinada.

Karín E. Coello, Juana Frías, Cristina Martínez-Villaluenga, María Elena Cartea, Pablo Velasco, Elena Peñas. (2022). Manufacture of healthy snack bars supplemented with moringa sprout powder. *LWT-Food Science and Technology*, 154, 112828. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112828.

RESUMEN

El presente estudio se centró en la utilización de moringa germinada en polvo (moringa sprout powder, MSP; condiciones de germinación: 36 °C, 96 h) para el desarrollo de barritas saludables listas para el consumo. Se evaluó la adición de diferentes proporciones de MSP (9-26%) para la formulación de las barritas y se compararon con las barritas control (0% de MSP). El prototipo de barrita elaborada con MSP al 18% (18MSP) se seleccionó como la formulación óptima en base a pruebas de fracturabilidad. La barrita 18MSP presentó mayores niveles de proteínas, cenizas, grasa y menor contenido de hidratos de carbono que la barrita control y, además, mostró elevadas cantidades de vitamina B_1 y B_2 (983,0 y 94,1 µg/100 g peso seco, ps, respectivamente) y minerales. La incorporación de harina de moringa germinada al 18% también incrementó el contenido de aminoácidos totales (80,8 mg/g ps), el contenido relativo de ácidos grasos insaturados (64,0 g/100 g ácidos grasos totales), de GABA (43,3 mg/100 g ps), los niveles totales e individuales de glucosinolatos (29,6, 1,1, 0,21 y 30,9 µmol/g ps para la glucomoringina, glucosinalbina, glucotropaeolina y glucosinolatos totales, respectivamente) y actividad antioxidante (647,2 mg TE/100 g ps). La barrita presentó, además, una buena aceptabilidad sensorial, principalmente debido a su apariencia, textura y aroma. Se realizaron cuestionarios de aceptabilidad a consumidores ecuatorianos potenciales y mostraron una intención favorable hacia la compra de las nuevas barritas suplementadas con harina de moringa germinada.

LWT - Food Science and Technology 154 (2022) 112828

Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Manufacture of healthy snack bars supplemented with moringa sprout powder

Karín E. Coello [a], Juana Frias [b], Cristina Martínez-Villaluenga [b], María Elena Cartea [c], Pablo Velasco [c], Elena Peñas [b,*]

[a] Polytechnic University, Escuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Faculty of Mechanical Engineering and Production Sciences, Food Engineering Program, Campus Gustavo Galindo Km 30.5 Vía Perimetral, P.O. Box 09-01-5863, Guayaquil, Ecuador

[b] Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Juan de la Cierva 3, Madrid, 28006, Spain

[c] Group of Genetics, Breeding and Biochemistry of Brassicas, Mision Biologica de Galicia (MBG-CSIC), 36080, Pontevedra, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Moringa
Sprouting
Snack bar
Health benefits
Nutritional value

ABSTRACT

The present study focuses on the utilization of moringa sprout powder (MSP) for development of healthy and ready-to-eat snack bars. Different MSP proportions (9–26%) were evaluated for snack bar formulation and compared with control formulation (0% MSP). 18% MSP-containing prototype (18MSP) was selected as the optimal formulation based on the results of the fracturability assay. 18MSP bar exhibited higher protein, ash and fat and lower total carbohydrate contents than control, and was a good source of B_1 and B_2 vitamins (983.0 and 94.1 μg/100 g dry matter, dm, respectively) and minerals. 18% MSP inclusion significantly ($p \leq 0.05$) enhanced the contents of total amino acid (80.8 mg/g dm), the relative content of unsaturated fatty acids (FA) (64.0 g/100 g of total FA), γ-aminobutyric acid (GABA, 43.3 mg/100 g dm), and total and individual glucosinolates (GLS) (29.6, 1.1, 0.21 and 30.9 μmol/g dm for glucomoringin, glucosinalbin, glucotropaeolin and total GLS, respectively), as well as the antioxidant activity (647.2 mg TE/100 g dm). 18MSP had good sensorial acceptability, mainly due to its appearance, texture and odour. Questionnaires performed to potential Ecuadorian consumers indicated the favourable intention of purchasing the novel MSP-supplemented snack bar.

1. Introduction

In recent years, changes undergone in people lifestyles, the lack of time to prepare a proper meal and the constant information regarding the influence of diet on health status have drastically altered consumer eating patterns. Snacks are ready-to-eat palatable and affordable foods that meet the current consumer demands regarding foods capable of being portable and consumed quickly (Mattes, 2018). Snacks are one of the fastest growing food market sectors and their consumption has substantially increased in last years in all age groups worldwide (Vatanparast et al., 2020). However, consumption of unhealthy energy-dense snacks constitutes an important risk factor for obesity and cardiovascular disease development (Amrein, Scholz, & Inauen, 2021). Manufacturing healthy snacks with good sensory properties represents a food industry priority in order to improve the well-being, nutritional and health status of consumers while preventing the development of non-communicable diseases (NCD). Cereal-based bars are attractive foods to achieve these purposes since they can be easily consumed between meals to satisfy momentarily hunger and they can be produced from different plant-based sources providing nutritional and health benefits.

Moringa oleifera Lam. is a foliaged tree native of northern India that is widely cultivated in tropical/subtropical regions of Africa, Central/South America and Asia (Leone et al., 2015). All parts of moringa tree are edible and have been used as food as well as in ayurvedic medicine and cosmetic industry since ancient times. Although leaves are the part most frequently used for nutritional purposes, moringa seeds are also valuable raw materials for food applications since they are a good source of proteins, unsaturated FA and minerals (García Milla, Peñalver, & Nieto, 2021; Singh et al., 2020). Recent studies have shown that moringa seed powder improves the nutritional value of several foodstuffs such as bread, cookies, cakes, snacks and cereal gruels (Aluko, Brai, & Adelore, 2013; Chinma, Gbadamosi, Ogunsina, Oloyede, & Salami, 2014; Jude-Ojei, Lola, Ajayi, & Seun, 2017; Ogunsina, Radha, & Indrani., 2011; Rabie, Ibrahim, Youssif, & El-Ragal, 2020).

In the past few years, different technological approaches including

* Corresponding author.
E-mail address: elenape@ictan.csic.es (E. Peñas).

https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112828
Received 23 September 2021; Received in revised form 11 November 2021; Accepted 15 November 2021
Available online 18 November 2021
0023-6438/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

germination have been applied to improve the nutritional quality and health benefits of seeds. During germination, hydrolytic enzymes are activated or *de novo* synthesized to breakdown stored nutrients in order to fuel seedling growth, leading to numerous physiological/biomolecular changes in seeds (Lemmens et al., 2019). These modifications include degradation of complex carbohydrates, lipids and storage proteins, as well as the synthesis of micronutrients, proteins and fiber. Germination also increases the content of secondary metabolites such as phenolic compounds with recognized antioxidant and anti-inflammatory activity. Similarly, GABA is synthesized during grain germination (Aparicio-García, Martínez-Villaluenga, Frias, & Peñas, 2021), compound that exhibits various health benefits including reduction of blood pressure, inhibition of carcinogenic cell proliferation, antioxidant and immunomodulatory activities (Sahab, Subroto, Balia, & Utama., 2020). GLS, sulfur-containing secondary metabolites present in *Brasicaceae* vegetables, are broke down during germination (Coello et al., 2020) to yield a variety of bioactive compounds with recognized antioxidant and anti-carcinogenic activities (Maina, Misinzo, Bakari, & Kim, 2020). Despite germination benefits, its impact on moringa seed quality has been scarcely investigated. A recent study of our group optimized germination parameters to produce a novel moringa sprout powdered (MSP) ingredient enriched in nutrients, GABA and GLS (Coello et al., 2020). Taking into account the recent trends towards the development of functional foods as a mean of preventing the development of NCD, the aim of the present study was to explore the application of MSP to develop innovative and healthy cereal-based snack bars enriched in nutrients and bioactive compounds.

2. Materials and methods

2.1. Chemical, reagents and standards

All chemicals used were provided by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise specified.

2.2. Production of moringa sprout powder (MSP)

Seeds obtained from moringa trees grown in the Eastern part of Ecuador were germinated at 36 °C for 96 h in darkness in a thermostatically-controlled germination cabinet (G-120 model, ASL Snijders International S. L., Tilburg, The Netherlands), according to Aparicio-García et al., (2021). An humidity higher than 90% was maintained during the whole germination process due to the water circulating system present in the germination chamber. These conditions were selected because they maximized the GABA content in moringa (Coello et al., 2020). Sprouts were dried (50 °C, 24 h) in a drying cabinet (model KBF 240, Binder, Tuttlingen, Germany), milled using a coffee grinder (Moulinex, France) and passed through a sieve (0.2 mm of diameter) to obtain MSP, that was stored in plastic bags under vacuum at −20 °C for further use.

2.3. Manufacturing of snack bars

2.3.1. Ingredients

Oat grains and flaked oatmeal were provided by Basesur and Avenas del Pacífico (Guayaquil, Ecuador), respectively, crispy rice was supplied by DULCENAC (Guayaquil, Ecuador), dehydrated coconut was provided by Confites Magus's (Quito, Ecuador), dehydrated banana slices were supplied by P.E.B.S.A-Productos Elaborados Bolívar (Guayaquil, Ecuador), quinoa seeds were provided by Coprobich (Chimborazo, Ecuador) and panela was supplied by Sugarmill Industry San Carlos (Guayaquil-Ecuador).

2.3.2. Preparation of snack bars

Snack bar formulations with different ratio of solid/liquid phases (65/35, w/v and 75/25, w/v) were produced. Liquid phase consisted of a saturated solution of heated panela (75 °Brix) acting as a binder syrup. Three snack bars corresponding to each formulation containing different MSP proportions (9–26%) were prepared. Snack bars produced without MSP addition were considered as control samples. Snack bar formulations were coded as control, 6MSP, 9MSP, 12MSP, 18MSP, 19MSP and 26MSP, according to the amount of MSP included: 0%, 6%, 9%, 12%, 18% and 19%, respectively (Table 1). The solid ingredients including MSP were weighted and thoroughly manually mixed with the heated panela solution to obtain a uniform dough structure. Doughs were placed into stainless-steel containers (3.0 x 4.5 × 7.5 cm) and baked (105 °C, 15 min) in order to obtain bars with a water activity lower than 0.78, as previously reported (Serna-Cock, Angulo-López, & Ayala-Aponye, 2015). Bars were prepared in the Laboratory of Development and Food Processing of ESPOL (Guayaquil, Ecuador). Each bar of approximately 35 g was packed in tri-laminated polyethylene-polyethylene-aluminum foil and stored at ambient temperature until further analysis. Fig. S1 (supplementary material) illustrates the different snack bar formulations produced.

2.3.3. Descriptive fracturability analysis

The fracturability of snack bars was evaluated in order to select the formulation with the best texture. This analysis was carried out by 10 trained panelists recruited from the staff of Wipala Healthy Snacks (Guayaquil, Ecuador), one of the main snack producers in Ecuador. Control and MSP-supplemented bars were placed in the mouth, compressed between molar teeth, and bit down evenly until bars shattered (Sato et al., 2018). A 5-point non-structured scale was used, where 1 and 5 represent the lowest and the highest cutting force, respectively.

2.4. Proximate composition of snack bars

AOAC methods were used to determine protein, fat, ash and total dietary fiber contents. Total carbohydrates (including fiber content) were estimated by difference: 100-(% proteins + % fat +% ash + % water) (Caceres, Martinez-Villaluenga, Amigo, & Frias, 2014). A factor of 5.83 was used for protein content conversion (Coello et al., 2021). The results were expressed in g/100 g on dry matter basis (dm).

2.5. Contents of thiamine and riboflavin

Thiamine and riboflavin were extracted after acid hydrolysis of snack bars in an autoclave (15 min, 120 °C) followed by enzymatic dephosphorylation with Taka-Diastase (3 h, 45 °C), and quantified separately by reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) (Coello et al., 2020). Results were expressed in μg/100 g dm.

2.6. Mineral composition

Mineral profile was determined by atomic absorption using a Analytikjena ContrAA 700 high-resolution atomic absorption spectrometer (Analytik Jena AG, Jena, Germany) equipped with a Xenon shortarc lamp (GLE, Berlin, Germany) operating in a "hot spot" mode as the radiation source (Alvarez, Fuentes, Guerrero, & Canet, 2017). Results were expressed as mg/kg dm.

2.7. Fatty acid composition

FA profile of snack bars was determined by measuring the content of fatty acid methyl esters (FAMEs) by gas chromatography (GS) on an Agilent gas chromatograph (7820A model) with a flame ionization detector (FID) (Aparicio-García et al., 2021). A FAME standard mixture (FAME 37 + PUFA N° 2 Animal Source + PUFA N° 3 Menhaden oil) was used for identification of individual FAMEs in snack bars. Results were expressed as mg/g dm.

Table 1
Formulations for control and MSP snack bars.

SI/LI ratio	Snack bar formulation	% SI						
		MSP	Oat grain	Flaked oatmeal	Quinoa	Crispy rice	Dry banana	Dry coconut
65/35	Control	0	13	10	13	20	9	0.1
	9MSP	9	12	9	8	12	9	6
	18MSP	18	10	7	6	11	8	5
	26MSP	26	9	6	5	9	7	3
75/25	Control	0	15	13	16	20	11	0.1
	6MSP	6	14	9	14	12	10	10
	12MSP	12	13	8	13	11	10	9
	19MSP	19	12	7	11	10	8	8

SI: Solid ingredients, LI: Liquid ingredients.

2.8. Amino acid profile

The content of protein amino acids was determined by acid hydrolysis, derivatization and HPLC quantification (Peñas, Gomez, Frias, Baeza, & Vidal-Valverde, 2011). The results were expressed as mg/g dm.

2.9. γ-aminobutyric acid content

GABA was extracted in distilled water and quantified by HPLC, as previously reported (Caceres et al., 2014). The results were expressed as mg GABA/100 g dm.

2.10. Individual and total GLS

Total GLS were extracted from 100 g of snack bars-derived flour following a two-step extraction and desulfatation procedure (Kliebenstein et al., 2001). After freezing (−80 °C) and freeze-drying these samples (−0.1 mbar, 24 h, Gamma 2–16 Christ freeze dryer), GLS content in the resultant extracts was quantified by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC) using an UPLC Nexera LC-30AD chromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a Nexera SIL-30AC injector and SPD-M20A photodiode array detector (Coello et al., 2021). Results were expressed as μmol/g dm.

2.11. Content of soluble phenolic compounds (SPC)

SPC were extracted from snack bar flours (100 mg) in 80% methanol/0.1% formic (1 mL) acid under continuous agitation (2000 rpm, 20 °C, 15 min). Samples were then centrifuged (10,000 rpm, 20 °C, 5 min) (Sorval RC 6 Plus centrifuge ThermoFisher, Madrid, Spain). Supernatants were collected, and 1 mL of 70% acetone/0.1% formic acid was added to the pellet for a second extraction in the same conditions. Supernatants from the first and second extractions were combined and the volume was made up to 2 mL with bidistilled water. SPC were quantified in the extract by Fast Blue BB assay (Pico, Pismag, Laudouze, & Martinez, 2020). Results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 g dm.

2.12. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

Antioxidant activity was determined in the extracts obtained for SPC quantification by ORAC assay (Caceres et al., 2014). The fluorescence was quantified in a microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, Winnoski, VT, USA) every minute at λexc 485 nm and λem 520 nm. The results were expressed as mg of Trolox equivalents (TE)/100 g dm.

2.13. Sensory analysis

A total of 30 panelists who declared to consume snack bars at least once a week were recruited among the students and employees of ESPOL. Sensory evaluation was carried out in individual boxes under white light. Two snack bars (control and MSP-supplemented bars) were presented to panelists in white plastic plates. After tasting each sample, panelists rinse their mouth with bottled water. A hedonic scale was used to evaluate 5 sensory attributes, including appearance, aroma, taste, texture and overall acceptability, where +3 means "like extremely", +2 "like moderately", +1 "like slightly", 0 "indifference", −1 "dislike slightly", −2 "dislike moderately" and −3 "dislike extremely". It is important to highlight that this was a preliminary sensory test to elucidate whether the novel snack formulated will be accepted by Ecuadorian consumers.

2.14. Estimation of manufacturing process capacity

The capacity of producing snack bars at industrial scale was calculated according to the following equation:

$$P_{\eta} = \left(m_f / m_i\right) \quad \text{(Eq. 1)}$$

where P_{η} is the total capacity of production, m_i is the initial mass and m_f is the final mass resulting.

2.15. Estimation of production costs and selling price

The potential costs derived from industrial production of MSP-supplemented snack bars were performed for the production of 25,000 units as described by Guerrero Macías (2013), according to the following equation:

$$TC = M + DH + IC + T \quad \text{(Eq. 2)}$$

where TC represents the total cost, M is the cost of the materials, DH is the total direct cost derived from work hand, IC is the indirect manufacturing costs and T corresponds to product taxes. The production cost per unit (PUC) was calculated as follows:

$$PUC = TC/U \quad \text{(Eq. 3)}$$

where U represents total product units manufactured per month.

The selling price (SP) was calculated as follows:

$$SP = PUC + CM \quad \text{(Eq. 4)}$$

where CM is the contribution margin, calculated as follows:

$$CM = 0.4 * SPa \quad \text{(Eq.5)}$$

where SPa is the average of the prices for commercial snack bars in Ecuador, ranging from 0.36 to 1.14 $.

2.16. Estimation of consumer's willingness to purchase MSP-supplemented snack bars

A questionnaire comprising 10 questions was administered to young adults (20–34 years) of middle social class (income from the basic salary

onwards) who attended to supermarkets and shopping centers of Guayaquil (Ecuador) from June 11th, 2018 to June 18th, 2018. A guarantee of anonymity was used to counteract inclinations to offer "socially correct" answers. The questionnaire comprised questions devoted to snack bar consumption frequency, motives influencing snack bar consumption, knowledge of moringa and its nutritional and health benefits, willingness to buy a snack bar supplemented with moringa, and maximum price willing to pay for this novel and healthy product. The eligibility criteria to complete the questionnaire was represented by the answer to the question "Do you consume snack bars?". In the case of negative response, the questionnaire was not conducted. A total of 104 useable questionnaires were obtained, that were considered a representative sample of the reference population (adult population ranging 20–34 years of Guayaquil, estimated in 592,736 persons, being the total population of 2.291.158 persons) (INEC, 2011).

2.17. Statistical analysis

Each snack bar formulation was produced in triplicate and all analyses were performed in duplicate. Results were expressed as the mean ± standard deviation. Experimental data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* Duncan multiple range test ($p \leq 0.05$) using Statgraphics Centurion XII software, version 17.2.07 (Statistical graphics Co., Rockville, MD, USA).

3. Results and discussion

3.1. Selection of the optimal snack bar formulation

Since fracturability, defined as the force applied by the molar teeth to crumble or cracked food, is one of the most important attributes of snack bars (Kumar, Mohanty, & Yashaswini., 2018), a preliminary descriptive analysis of fracturability was performed in the different snack bar prototypes in order to select the optimal formulation. No significant differences ($p \leq 0.05$) in fracturability were found between the different snack bar formulations (Table 2). However, it was observed that formulations containing 75/25 solid to liquid ratio exhibited worse consistency than those containing a proportion of 65/35. Taking into account this result, together with the fact that low fracturability value is a desirable property for snack bars and that higher MSP content would improve nutritional and functional quality of bars, we selected 18MSP as the optimal formulation that meet all these features.

3.2. Proximate composition

Table 3 details the proximate composition of the selected MSP-enriched snack bar formulation (18MSP) compared to control bar (0MSP). It was evident that the addition of MSP significantly ($p \leq 0.05$) increased the content of protein and ash (48%) and fat (more than 4-fold) as compared to control bar, while the moisture (8%) and total carbohydrates (15%) contents were reduced. 18MSP moisture content is lower than that reported in other fruit- and grain-based snack bars (Momanyi, Owino, & Makokha, 2020; Da Silva, Siqueira, Carvalho do Lago, Rosell, & Barros Vilas Boas, 2014). Low moisture content is a desirable attribute to increase the microbial stability and shelf-life of the product and to obtain snacks with crunchy texture (Momanyi et al., 2020). Germinated moringa flour is a good source of proteins and minerals (Coello et al., 2020; León-López et al., 2019), thus explaining the increased protein and ash contents found in 18MSP formulation compared to control. Moringa seed contains high lipids levels (13–46%) (Saa, Formbarng, Ndjantou, & Njintang, 2019), mainly unsaturated FA (Al Juhaimi, Ghafoor, Babiker, Matthaäus, & Özcan, 2017), responsible for the higher fat content in 18 MSP compared to control.

Table 2
Fracturability scores for snack bar formulations with different solid/liquid ratios (65/35, w/v and 75/25, w/v) and different amount of MSP (0%, 6%, 9%, 12%, 18%, 19% and 26%).

Snack bars	% MSP	Fracturability
Control 65/35	0	3.17 ± 0.30[a]
9MSP	9	3.83 ± 0.69[a]
18MSP	18	3.00 ± 0.58[a]
26MSP	26	4.00 ± 1.41[a]
Control 75/25	0	2.83 ± 0.36[a]
6MSP	6	3.17 ± 0.58[a]
12MSP	12	3.00 ± 1.53[a]
19MSP	19	3.20 ± 0.98[a]

Data are the mean ± standard deviation of three replicates. Different lower-case letters indicate statistical differences among samples ($p \leq 0.05$, Duncan test).

Table 3
Proximate composition and contents of thiamine, riboflavin and minerals in control and 18MSP snack bars.

	Control	18MSP
Proximate composition (g/100 g dm)		
Moisture	8.13 ± 0.02[b]	7.48 ± 0.01[a]
Protein	7.87 ± 0.07[a]	11.62 ± 0.01[b]
Fat	2.61 ± 0.12[a]	11.17 ± 0.01[b]
Ash	1.31 ± 0.04[a]	1.94 ± 0.06[b]
Total carbohydrates	80.06 ± 0.01[b]	67.72 ± 0.01[a]
Vitamins (μg/100 g dm)		
Thiamine	961.23 ± 16.19[a]	983.04 ± 14.00[b]
Riboflavin	6.06 ± 1.49[a]	94.10 ± 5.22[b]
Minerals (mg/kg dm)		
Calcium (Ca)	480.79 ± 12.92[a]	883.78 ± 3.45[b]
Magnesium (Mg)	1147.11 ± 58.56[a]	1536.06 ± 17.25[b]
Potassium (K)	5044.21 ± 13.39[a]	7298.47 ± 117.49[b]
Sodium (Na)	806.51 ± 32.00[a]	637.28 ± 15.20[b]
Phosphorus (P)	1818.32 ± 60.08[a]	2716.31 ± 39.49[b]
Iron (Fe)	25.16 ± 1.10[a]	32.85 ± 1.02[b]
Zinc (Zn)	19.36 ± 0.74[a]	22.12 ± 1.10[b]
Manganese (Mn)	14.02 ± 1.40[a]	13.92 ± 1.02[a]
Copper (Cu)	5.54 ± 0 .05[a]	6.30 ± 0 .13[a]

Data are the mean ± standard deviation of three replicates. Different lower-case letters indicate statistical differences among samples ($p \leq 0.05$, Duncan test).

The replacement of oat, an excellent source of starch, by MSP where the starch is partially hydrolysed to reducing sugars by activation of endogenous α-amylases during germination (Coello et al., 2020), could be responsible for the reduction of total carbohydrates content in 18MSP bar as compared to the control one. The protein and fat contents observed in the developed 18MSP are higher to those reported in other healthy snack bars enriched in quinoa and corn (Kaur, Ahluwalia, Sachdev, & Kaur, 2018; Figuereido de Sousa et al., 2019), and also in biscuits supplemented with moringa dry leaf (Hedhili et al., 2021). Our findings regarding the enhancement of protein, fat and ash contents in MSP-supplemented snack bars are in agreement with those reported in cakes, pasta and breads where wheat flour was replaced by germinated moringa or moringa seed powder (Bolarinwa, Aruna, & Raji, 2019; Chinma et al., 2014; Coello et al., 2021).

3.3. Content of thiamine and riboflavin

As shown in Table 3, 18MSP exhibited a slightly higher thiamine content (983.0 μg/100 g dm) than the control bar (961.2 μg/100 g dm), while riboflavin levels increased more than 15-fold after inclusion of MSP in the bar formulation. MSP obtained after germination at 36 °C for 96 h exhibits high levels of thiamine and riboflavin (Coello et al., 2020) and their incorporation in snack bars and other processed foods would be an interesting approach to fortify them in B-group vitamins. To our knowledge, there is no information regarding vitamin B_1 and B_2 contents in cereal-based snack bars. However, vitamin content observed in 18MSP bar is higher than that reported in other cereal-based products such as wheat-based bread and pastries made from multigrain flours

(Škrovánková & Sikorová, 2010).

3.4. Mineral content

18MSP snack bar contained significantly ($p \leq 0.05$) higher amounts of Ca, Mg, K, P, Fe and Zn and lower levels of Na than control, while no statistical differences ($p > 0.05$) were observed in Mn and Cu contents between both formulations (Table 3). Notable levels of Ca, Mg, K, P and Fe have been found in moringa seeds (Gopalakrishnan, Doriya, & Kumar., 2016; Ijarotimi, Adeoti, & Ariyo, 2013; Olagbemide & Alikwe, 2014), findings that are in agreement with the mineral content observed in 18MSP. The levels of Ca, Mg, K and Zn in 18MSP were notably higher than those reported in other snack bar formulations based in cereal, legume and nuts (Zainal Abidin, Mohd Zin, Abdullah, Rusli, & Zaino, 2020; Momanyi et al., 2020; Silva Lima et al., 2021). It is important to highlight the reduced content of Na in 18MSP, a desirable attribute taking into consideration the current recommendations of World Health Organization regarding the reduction of dietary Na intake to prevent cardiovascular diseases (WHO, 2012). According to the results (Table 3), two servings of 18MSP snack bar (70 g) provide 49% and 35% of the recommended daily intake for Mg and P, respectively (EFSA, 2015).

3.5. Fatty acid composition

Table 4 shows the FA profile of control and 18MSP bars. A total of 9 FA were identified in control bar, while 18MSP formulation contained 17 FA, being oleic acid (C18:1n9c) the most abundant, followed by lauric (C12:0) and palmitic (C16:0) acids. These results agree with the FA composition of moringa seed and germinated moringa recently reported (El-Baset Salama, Owon, Osman, Ibrahim, & Matthäus, 2020; Gharsallah, Rezig, Msaada, Chalh, & Soltani, 2021; Gu, Yang, & Wang, 2020). MSP incorporation resulted in the simultaneous increase in the levels of both unsaturated and saturated FA in snack bars. The enhancement of unsaturated FA content in 18MSP bar was due to the increase of monounsaturated FA (MUFA), while a 34% reduction was observed in polyunsaturated FA (PUFA) compared to control. The replacement of oat and quinoa, that are good sources of PUFA (Aparicio-García et al., 2021; Rodríguez Gómez, Matías Prieto, Cruz Sobrado, & Calvo Magro, 2021), by a moringa seed-derived ingredient containing low PUFA levels (Gu et al., 2020) explains the PUFA reduction in MSP-enriched bar. Unsaturated FA were predominant in 18MSP lipid fraction, representing ~57% of total FA content (49% MUFA and 7% PUFA), while saturated FA accounted for 43% (Table 4). Recent studies have revealed that MUFA intake reduces the levels of serum triglycerides, total cholesterol, low density lipoprotein (LDL)-cholesterol and atherogenic lipoproteins/apolipoproteins, while increase high density lipoprotein (HDL)-cholesterol (DiNicolantonio & O'Keefe, 2018; Ulug & Nergiz-Unal, 2021) and improves microbiota composition (López-Salazar et al., 2021). Recently, Wiercioch et al. (2018) evidenced that most of commercially available snack bars show an unhealthy fatty acid profile, where saturated FA are more abundant, representing more than 68% of the total FA content. On the other hand, oleic acid exhibits high stability to oxidation (Fuentes de Mendoza et al., 2015), and its presence in snack bars might enhance their shelf-life. Thus, the incorporation of MSP in bar formulation represents a promising strategy to improve the nutritional and healthy properties as well as the shelf-life of snacks currently consumed.

Table 4
Fatty acid composition (mg/g dm) in control and 18MSP snack bars.

Fatty acids	Control	18MSP
C6:0	ND	0.16 ± 0.01^a
C8:0	ND	2.34 ± 0.04^a
C10:0	ND	2.03 ± 0.04^a
C12:0	0.24 ± 0.01^a	16.98 ± 0.28^b
C14:0	0.15 ± 0.01^a	6.24 ± 0.10^b
C16:0	4.33 ± 0.02^a	9.00 ± 0.12^b
C16:1n7	ND	0.78 ± 0.01^a
C18:0	0.55 ± 0.02^a	4.43 ± 0.07^b
C18:1n7c	0.27 ± 0.01^a	3.26 ± 0.06^b
C18:1n9c	10.02 ± 0.03^a	49.67 ± 0.61^b
C18:2n6c	12.48 ± 0.01^b	8.22 ± 0.05^a
C18:3n3	0.72 ± 0.03^b	0.53 ± 0.01^a
C20:0	ND	1.96 ± 0.05^a
C20:1n9	0.26 ± 0.02^a	1.59 ± 0.04^b
C22:0	ND	3.81 ± 0.06^a
C22:1n9	ND	0.16 ± 0.01^a
C24:0	ND	0.72 ± 0.02^a
Total saturated	5.26 ± 0.03^a	47.66 ± 0.72^b
Total unsaturated	23.76 ± 0.02^a	64.06 ± 0.73^b
MUFA	10.56 ± 0.02^a	55.30 ± 0.70^b
PUFA	13.20 ± 0.03^a	8.76 ± 0.05^b
Total	29.02 ± 0.02^a	111.72 ± 1.44^a

Data are the mean ± standard deviation of three replicates. Different lower-case letters indicate statistical differences among samples ($p \leq 0.05$, Duncan test). ND: not detected; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

3.6. Amino acid composition

The influence of MSP addition on the amino acid profile of snack bars is shown in Table 5. Glu was the main non-essential amino acid (NEAA) in 18MSP bar, followed by Arg, while Leu, Phe and Val were the predominant essential amino acids (EAA). The incorporation of MSP improved about 26% the total amino acid content as compared to control bar. All NEAA, with the exception of Asp and Pro, were significantly ($p \leq 0.05$) enhanced after MSP addition, increasing the total NEAA content by 36% in comparison with the control formulation. Among EAA, a significant increase ($p \leq 0.05$) in His, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Tyr and Thr contents was observed in 18MSP prototype, results in line with the amino acid composition reported for moringa seeds (Gu et al., 2020) and with the increase in the total amino acid content (both NEAA and EAA) in moringa seeds after germination (Ijarotimi et al., 2013). However, Cys and Lys levels decreased significantly ($p \leq 0.05$) in 18MSP bars compared to control. The replacement of oat, a good source of both amino acids, by moringa that contains low levels of Cys and in which Lys is the limiting amino acid, can explain the results obtained. Most of EAA often lack in vegetable matrices used for snack elaboration, but MSP contains all of them in a good proportion, pointing out that sprouted

Table 5
Amino acid composition (mg/g dm) in control and 18MSP snack bars.

Amino acids	Control	18MSP	FAO/WHO/UNU 2011[1]
Non-essential amino acids			
Asp + Asn	6.00 ± 0.17^a	6.00 ± 0.05^a	
Glu + Gln	13.07 ± 0.11^a	18.23 ± 0.07^b	
Ser	3.48 ± 0.02^a	3.96 ± 0.05^b	
Gly	3.72 ± 0.04^a	4.92 ± 0.01^b	
Arg	5.03 ± 0.12^a	10.35 ± 0.16^b	
Ala	3.55 ± 0.01^a	4.51 ± 0.04^b	
Pro	1.93 ± 0.30^a	2.00 ± 0.35^a	
Total NEAA	36.77 ± 0.77^a	49.97 ± 0.62^b	
Essential amino acids			
His	2.43 ± 0.03^a	3.06 ± 0.02^b	10
Val	3.58 ± 0.002^a	4.11 ± 0.03^b	26
Met	1.02 ± 0.01^a	1.51 ± 0.03^b	10
Cys	1.19 ± 0.07^b	0.66 ± 0.06^a	4
Ile	2.36 ± 0.04^a	2.84 ± 0.02^b	20
Leu	5.15 ± 0.06^a	5.99 ± 0.04^b	39
Phe	3.74 ± 0.05^a	4.38 ± 0.04^b	25[2]
Tyr	2.01 ± 0.13^a	2.31 ± 0.06^b	
Lys	3.43 ± 0.08^b	3.14 ± 0.05^a	30
Thr	2.42 ± 0.09^a	2.86 ± 0.09^b	15
Total EAA	27.33 ± 0.52^a	28.01 ± 0.06^a	
Total amino acids	64.10 ± 1.29^a	80.83 ± 0.70^b	

Data are the mean ± standard deviation of three replicates. Different lower-case letters indicate statistical differences among samples ($p \leq 0.05$, Duncan test). NEAA: non-essential amino acids; EAA: essential amino acids.

moringa is a good alternative to current plant ingredients used for snack bar manufacturing.

3.7. GABA content

GABA content in 18MSP formulation (36.4 mg/100 g dm) was 20% higher than that observed in the control bar (Table 6). During sprouting, endogenous glutamate decarboxylase enzyme is activated, producing GABA from glutamic acid, being moringa sprouted at 36 °C for 96 h a good source of this non-protein amino-acid (Coello et al., 2020). In recent years, GABA has aroused increasing interest for both food researchers and technologists that have conducted extensive studies for developing GABA-enriched foods (Cataldo, Elean, Savoy de Giori, Saavedra, & Hebert, 2020; Hong Le, Parmentier, Trung Le, & Raes, 2021) since it shows numerous physiological functions, such as reduction of blood pressure, protection against cancer, enhancement of immunity, induction of relaxation and improvement of brain function (Boonstra et al., 2015; Sahab, Subroto, Balia, & Utama, 2020). The production of snack bars enriched in GABA is an innovative approach to improve well-being and health of consumers.

3.8. Content of total and individual GLS

The supplementation of snack bars with MSP significantly ($p \leq 0.05$) increased the content of both individual and total GLS (Table 6). Glucomoringin (4-α-rhamnopyranosyloxy-benzyl GLS) was the only GLS present in the control sample and the content of this compound increased more than 148-fold in snack bars after the addition of MSP, representing 96% of total GLS in 18MSP. 18MSP prototype also showed small amounts of glucosinalbin (4-hydroxybenzyl GLS) and glucotropaeolin (benzyl GLS), compounds that were not detected in control bar. As consequence, total GLS increased more than 150-fold in 18MPS bar in comparison with control. In agreement with our results, previous studies have identified glucomoringin as the main GLS in *M. oleifera* seeds (Amaglo et al., 2010; Chen et al., 2019; Maldini et al., 2014). Small amounts of glucotropaeolin and glucosinalbin have been also detected in moringa seeds by Maldini et al. (2014). The presence of GLS in 18MSP snack bar is of great interest since they are secondary metabolites that are catabolized by the endogenous plant myrosinase enzyme to yield isothiocyanates, with recognized health-promoting properties (Lopez-Rodriguez, Gaytán-Martínez, Reyes-Vega, & Loarca-Piña, 2020). In fact, GLS contained in moringa have shown chemoprotective potential through cytoprotective, anticarcinogenic and antioxidant effects (Fahey et al., 2018). Therefore, snack bars rich in moringa GLS might provide a wide range of health benefits to consumers.

3.9. Content of soluble phenolic compounds (SPC)

Control snack bars showed SPC levels of 267.4 mg GAE/100 g dm, which increased 70.5% in 18MSP bar (Table 6). Germination has shown to play a remarkable role in improving total phenolic content in a wide range of seeds. In moringa, high germination temperatures (32–40 °C) efficiently favored the accumulation of phenolic compounds (Coello et al., 2020; León-López et al., 2019). Plants activate adaptive strategies in response to abiotic stress such as high temperatures that involve activation of phenylalanine ammonia lyase (PAL), enzyme responsible for the synthesis of phenolics. The activation of endogenous seed cellulases, endoxylanases and esterases during sprouting leads to disruption of cell wall components and the release of bound phenolic acids (Sharma, Singh, & Sing, 2019), that might also contribute to the high SPC levels in MSP and, consequently, in 18MSP snack bars. Since several phenolic compounds exhibit powerful antioxidant activity, the development of snack bars enriched in phenolics is of undoubtedly interest.

Table 6
Content of GABA, SPC and antioxidant activity in control and 18MSP snack bars.

	Control	18MSP
GABA	36.40 ± 0.84^{a}	43.33 ± 1.09^{b}
Glucomoringin	0.20 ± 0.06^{a}	29.62 ± 1.29^{b}
Glucosinalbin	ND	1.06 ± 0.06^{a}
Glucotropaeolin	ND	0.21 ± 0.06^{a}
Total GLS	0.20 ± 0.06^{a}	30.88 ± 1.36^{b}
SPC	267.39 ± 11.84^{a}	455.97 ± 32.29^{b}
Antioxidant activity	531.13 ± 51.73^{a}	647.17 ± 48.85^{b}

Data are the mean ± standard deviation of three replicates. Different lower-case letters indicate statistical differences among samples ($p \leq 0.05$, Duncan test). GABA: γ-amino butyric acid; GLS: glucosinolates; ND: not detected; SPC: soluble phenolic compounds.

3.10. Antioxidant activity

As shown in Table 6, 18MSP snack bars displayed a notable antioxidant activity (647.2 mg TE/100 g dm), which was 22% higher than that observed in control bars. These results support recently findings regarding the enhancement of oxygen radical absorbance capacity in sprouted moringa (Coello et al., 2020; León-López et al., 2019). The improvement of antioxidant activity in 18MSP bar compared to control can be attributed to the accumulation of compounds with peroxyl-scavenging activity in MSP after germination. Phenolic acids and flavonoids, compounds with recognized antioxidant activity (Gu, Howel, Dunshea, & Suleria, 2019) that have been identified in moringa seed oil (Gharsallah et al., 2021) might contribute to the enhanced ORAC values observed in 18MSP bar compared to control. GABA also shows free-radical scavenging ability (Zhao, Xie, Wang, Gu, & Yang, 2021), and it may act, together with phenolics and vitamins present in MSP, as antioxidant responsible for the enhanced radical scavenging activity observed in 18MSP.

3.11. Sensory analysis

Fig. 1 shows the scores given by panelists to sensory attributes of control and 18MSP snack bars. The sensory scores revealed that MSP supplementation affected the consumer perception of the different sensory attributes studied. Texture and odour were the attributes better appreciated in 18MSP bars by the panelists, since they liked extremely to 60–70% of them and received better scores than control bar. Regarding appearance, not significant differences between control and 18MSP bars were observed, results of notable importance since appearance is one of the most important parameters determining the choice of a food product (Ciurzyńska et al., 2019). The most pronounced differences between both formulations were observed in taste, attribute which received lower scores in 18MSP formulation than control. Bitterness and astringency are attributes associated with moringa taste, due to the presence of GLS and phenolic compounds, which together with unsaturated FA provide nutty and green sensory notes (Chinma et al., 2014; Methakullawat & Lorjaroenphon, 2019). These attributes could be responsible for the reduction of taste scores in 18MSP bar. Despite the sensory results for taste, it must be taking into account that 18MSP formulation liked moderately or slightly to 60% of the panelists. The addition of higher levels of dry banana and coconut or novel tasty ingredients that mask the unpleasant bitter and astringent taste of germinated moringa or the debittering of sprouted moringa flour (Ogunsina, Radha, & Indrani, 2011) might improve the sensory perception of 18MSP bar. Regarding overall acceptability, 18MSP bar liked to 70% of panelists, while control bar liked to 60%. The improved texture and odour might be responsible for the highest acceptability of 18MSP bar. A previous study performed by our group showed that supplementation of fettuccini with 15–30% of MSP reduced taste scores and overall acceptability (Coello et al., 2021), while Chinma et al. (2014) observed that replacement of wheat by 10%–40% of germinated moringa flour did not change the taste and overall acceptability of the cakes obtained.

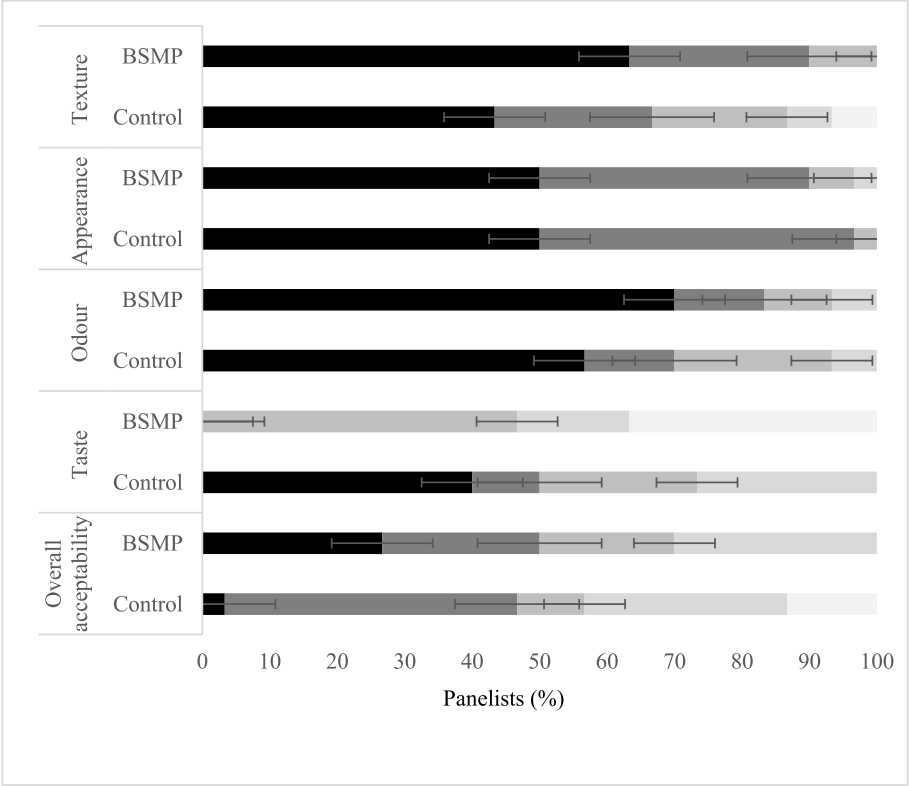


Fig. 1. Scores of sensory attributes of control and 18MSP snack bars.
Liked extremely. Liked moderately. Liked slightly. Indifference. Disliked slightly.

3.12. Estimation of capacity of manufacturing snack bars and selling cost

Taking into account the mass balance calculation of each stage involved in snack bar manufacturing, the efficiency of the process was 90.3%. Consequently, it was estimated that with 45,000 g per batch/h of raw material mixture it is possible to obtain 1161 bars of 35 g with an estimated production unit (calculated according to Eq. (3)) and selling cost (calculated according Eq. (4)) of 0.45$ and 0.75$, respectively. The analysis of the price of commercial snack bars in Ecuador allowed to conclude that it ranges from 0.36$/unit to 1.14$/unit, with an average price of 0.62$/unit. Taking into account that 18MSP snack bar has a high added-valued due to its notable content of nutrients and health-promoting compounds and that "healthiness" is one of the main reasons for determining food choices and consumer's willingness to pay (Timpanaro, Bellia, Foti, & Scuderi, 2020), it can be speculated that 0.75 $ would be an acceptable price for 18MSP snack bar for Ecuadorian consumers.

3.13. Estimation of consumer's willingness to purchase snack bars supplemented with MSP

Before turning to consumers' willingness to pay estimation, a closer look at snack bar purchasing behavior (Fig. S2; supplementary material) and also, the knowledge about moringa health benefits and willingness to purchase moringa-enriched snack bars (Fig. S3, supplementary material) by Ecuadorian consumers was taken.

In total, 33% of responders consume snack bars once a week, 29% consume them twice or more times a week, 20% once a month and 18% twice or three times a month (Fig. S2a). The shelf-reported frequency of consumption of snack bars by Ecuadorian consumers is lower than that observed by Leite Munhoz et al. (2014), who reported a frequency of cereal bar consumption of three times a week in 60% of Brasilian responders. However, lower cereal bar intake was reported by Costa et al. (2021), who found that 17% of Brasilian responders consumed cereal bars 1–4 times a week. The main reason for the consumption of snack bars pointed by Ecuadorian responders was the taste (34%), followed by their nutritional value and energy-providing (25%), prevention of diseases (18%), practicality (12%) and other reasons (11%) (Fig. S2b).

Regarding moringa, 52% of responders declared to know its nutritional and health benefits, while 48% were unaware of their favourable effects on health (Fig. S3a). As regards of purchase intention, 79% of the participants indicated that they probably would buy snack bars containing moringa (Fig. S3b), suggesting that they represent an opportunity of innovation in snack bars market niche in Ecuador. Moringa is a widely known tree in Ecuador, where leaves are consumed due to their nutritional and health-related properties (Guaycha-Pérez, Jaramillo-Jaramillo, Cuenca-Buele, Tocto-León, & Márquez-Hernández, 2017), thus explaining the results obtained in the questionnaire.

Referring to the willingness to pay, 69% of responders declared that they were willing to pay between 0.5 and 1$ for the purchase of moringa-enriched snack bars, while 22% were willing to pay this product at higher price of 1.5–2$ (Fig. S3c). Only 8% of consumers were willing to pay 2.5–3$ for this snack bar prototype, while prices of 3.5–4$ were only accepted by 1% of participants. Taking into account that the production costs per unit was estimated in 0.45$ and the selling cost in 0.75$ (section 3.11), a price of 1$ per a MSP-supplemented snack bar

can be considered acceptable for both consumers and industry. These results are in agreement with previous studies reporting prices of 1€ (1.18$) for a cereal bar made with brewery spent grains (Stelick, Sogari, Rodolfi, Dando, & Paciulli, 2021).

4. Conclusions

The relevance and innovation of the present study lie in the incorporation of moringa sprout powder (MSP) as an ingredient for manufacturing nutritive-dense and healthy snack bars that offer new opportunities for the Ecuadorian snack market. Snack bar formulation containing 18% of MSP (18MSP) was a good source of protein, unsaturated FA, and micronutrients, while its content of carbohydrates was lower than in control bar. MSP incorporation also enhanced the content of bioactive compounds with recognized health promoting properties such as SPC, GABA, total and individual GLS compared to the control formulation. MSP-enriched bar was well accepted by panelists, primarily due to its texture and odour, while its taste received lower scores than the control formulation. Questionnaires performed to potential consumers indicated that most of them would purchase the product at a price of 1$, an acceptable price for both consumers and industry. The findings of this study demonstrated that MSP might represent a valuable ingredient to improve nutritional and health-promoting properties of snack bars. Further studies will be performed in order to obtain more information on the composition of these snacks with the aim to commercialize them.

CRediT authorship contribution statement

Karín E. Coello: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft. **Juana Frias:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Cristina Martínez-Villaluenga:** Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **María Elena Cartea:** Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Pablo Velasco:** Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing. **Elena Peñas:** Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

This study was funded by grants AGL2015-67598-R (MINECO/FEDER), AGL2017-83718-R (AEI/FEDER, UE), and intramural project grant number PI201870I097 (CSIC).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112828.

References

Al Juhaimi, F., Ghafoor, K., Babiker, E., Matthaäus, B., & Özcan, M. M. (2017). The biochemical composition of the leaves and sedes meals of moringa species as non-conventional sources of nutrients. *Journal of Food Biochemistry, 41*, Article e12322. https://doi.org/10.1111/jfbc.12322

Aluko, O., Brai, M. R., & Adelore, A. O. (2013). Evaluation of sensory attributes of snack from maize-moringa seed flour blends. *International Journal of Nutrition and Food Engineering, 7*, 944–946. https://doi.org/10.5281/zenodo.1088095

Alvarez, M. D., Fuentes, R., Guerrero, G., & Canet, W. (2017). Characterization of commercial Spanish hummus formulation: Nutritional composition, rheology, and structure. *International Journal of Food Properties, 20*, 845–863. https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1186692

Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Lo Curto, R. B., Rosa, E. A. S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., et al. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry, 122*, 1047–1054. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.073

Amrein, M. A., Scholz, U., & Inauen, J. (2021). Compensatory health beliefs and unhealthy snack consumption in daily life. *Appetite, 157*, 104996. https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104996

Aparicio-García, N., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., & Peñas, E. Sprouted oat as a potential gluten-free ingredient with enhanced nutritional and bioactive properties. Food Chemistry, 338, 127972. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127972.

Bolarinwa, I. F., Aruna, T. E., & Raji, A. O. (2019). Nutritive value and acceptability of bread fortified with moringa seed powder. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 18*. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.05.002, 0–5.

Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L. S., Alkemade, A., Forstmann, B. U., & Nieuwenhuis, S. (2015). Neurotransmitters as food supplements: The effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in Psychology, 6*, 1520. https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.01520

Caceres, P. J., Martinez-Villaluenga, C., Amigo, L., & Frias, J. (2014). Maximising the phytochemical content and antioxidant activity of Ecuadorian brown rice sprouts through optimal germination conditions. *Food Chemistry, 152*, 407–414. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.156

Cataldo, P. G., Elean, M., Savoy de Giori, G., Saavedra, L., & Hebert, E. M. (2020). Immunomodulatory properties of a γ-Aminobutyric acid-enriched strawberry juice produced by *Levilactobacillus brevis* CRL 2013. *Frontiers in Microbiology, 11*, 610016. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.610016

Chen, R., Wang, X.-J., Zhang, Y.-Y., Xing, Y., Yang, L., Ni, H., et al. (2019). Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds. *Food Chemistry, 300*, 125162. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125162

Chinma, C. E., Gbadamosi, K. B., Ogunsina, B. S., Oloyede, O. O., & Salami, S. O. (2014). Effect of addition of germinated moringa seed flour on the quality attributes of wheat-based cake. *Journal of Food Processing and Preservation, 38*, 1737–1742. https://doi.org/10.1111/jfpp.12136

Ciurzyńska, A., Cieśluk, P., Barwińska, M., Marczak, W., Ordyniak, A., Lenart, A., et al. (2019). Eating habits and sustainable food production in the development of innovative "healthy" snacks. *Sustainability, 11*, 2800. https://doi.org/10.3390/su11102800

Coello, K. E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C., Cartea, M. E., Abilleira, R., & Peñas, E. (2020). Potential of germination in selected conditions to improve the nutritional and bioactive properties of moringa (*Moringa oleifera* L.). *Foods, 9*(11), 1639. https://doi.org/10.3390/foods9111639

Coello, K. E., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Cartea, M. E., Velasco, P., & Frias, J. (2021). Pasta products enriched with moringa sprout powder as nutritive dense foods with bioactive potential. *Food Chemistry, 360*, 130032. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130032

Costa, I. M., Vasconcelos da Silva, S. S., Abreu Silva, A. N., Arruda Conçalves, A. C., Machado Trombete, F., & Kobori, C. N. (2021). Physicochemical and sensory analysis of salted cerals bars developed with vegetables rich in carotenoids. *Research, Society and Development, 10*. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12824. e44210212824.

Da Silva, E. P., Siqueira, H. H., Carvalho do Lago, R., Rosell, C. M., & Barros Vilas Boas, E. V. (2014). Developing fruit-based nutritious snack bars. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 94*, 52–56. https://doi.org/10.1002/jsfa.6282

DiNicolantonio, J. J., & O'Keefe, J. H. (2018). Effects of dietary fats on blood lipids: A review of direct comparison trials. *Open Heart, 5*, Article e000871. https://doi.org/10.1136/openhrt-2018-000871

EFSA. (2015). *Dietary reference values: Magnesium and phosphorus*. https://www.efsa.europa.eu/es/press/news/150728. last accessed 21th July 2021.

El-Baset Salama, M. A., Owon, M., Osman, M., Ibrahim, A., & Matthäus, B. (2020). Effect of germination and roasting on oil profile of *Moringa oleífera* and *Moringa peregrina* seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization, 14*, 2220–2229. https://doi.org/10.1007/s11694-020-00469-2

Fahey, J. W., Olson, M. E., Stephenson, K. K., Wade, K. L., Chodur, G. M., Odee, D., et al. (2018). The diversity of chemotprotective glucosinolates in *Moringaceae* (*Moringa* spp.). *Scientific Reports, 8*, 7994. https://doi.org/10.1038/s41598-018-26058-4

Figuereido de Sousa, M., Gumaraes, R. M., de Oliveira Araújo, Rezende Barcelos, K., Silva Carneiro, N., Silva Lima, D., et al. (2019). Characterization of corn (*Zea mays* L.) bran as a new food ingredient for snack bars. *LWT-Food Science and Technology, 101*, 812–818. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.088

Fuentes de Mendoza, M., Miguel Gordillo, C. D., Ranalli, A., Franco Baltasar, M. N., Martínez Cano, M., & Martín Vertedor, D. (2015). Chemical composition and sensory evaluation of virgin olive oils from "Morisca" and "Carrasqueña" olive varieties. *Grasas Y Aceites, 66*. https://doi.org/10.3989/gya.0702142

García Milla, P., Peñalver, R., & Nieto, G. (2021). Health benefits of uses and applications of *Moringa oleifera* in bakery products. *Plants, 10*, 318. https://doi.org/10.3390/plants10020318

Gharsallah, K., Rezig, L., Msaada, K., Chalh, A., & Soltani, T. (2021). Chemical composition and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil. *South African Journal of Botany, 137*, 475–482. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.11.014

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., & Kumar, D. S. (2016). *Moringa oleífera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness, 5*, 49–56. https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001

Guaycha-Pérez, N., Jaramillo-Jaramillo, C., Cuenca-Buele, S., Tocto-León, J., & Márquez-Hernández, I. (2017). *Revista Ciencia UNEMI, 10*, 60–68.

Guerrero Macías, G. (2013). *Proyectos de inversión* (2nd ed.). ESPOL, Unidad de Publicaciones.

Gu, C., Howel, K., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2019). LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic acids and flavonoids in polyphenol-rich fruits and vegetables and their potential antioxidant activities. *Antioxidants, 8*, 405. https://doi.org/10.3390/antiox8090405

Gu, X., Yang, Y., & Wang, Z. (2020). Nutritional, phytochemical, antioxidant, α-glucosidase and α-amylase inhibitory properties of *Moringa oleifera* seeds. *South African Journal of Botany, 133*, 151–160. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.021

Hedhili, A., Lubbers, S., Bou-Maroun, E., Griffon, F., Akinyemi, B. E., Husson, F., et al. (2021). Moringa oleifera supplemented biscuits: Nutritional values and consumer segmentation. *South African Journal of Botany, 138*, 406–414. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.017

Hong Le, P., Parmentier, N., Trung Le, T., & Raes, K. (2021). Evaluation of using a combination of enzymatic hydrolysis and lactic acid fermentation for γ-aminobutyric acid production from soymilk. *LWT-Food Science and Technology, 142*, 111044. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111044

Ijarotimi, O. S., Adeoti, O. A., & Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition, phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented Moringa oleífera seed flour. *Food Sciences and Nutrition, 1*, 452–463. https://doi.org/10.1002/fsn3.70

INEC, Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2011). https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/. last accessed 29th July 2021.

Jude-Ojei, B. S., Lola, A., Ajayi, I. O., & Seun, I. (2017). Functional and pasting properties of maize 'Ogi' supplemented with fermented moringa seeds. *Journal of Food Processing & Technology, 8*, 1000674. https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000674

Kaur, R., Ahluwalia, P., Sachdev, P., & Kaur, A. (2018). Development of gluten-free cereal bar for gluten intolerant population by using quinoa as major ingredient. *Journal of Food Science & Technology, 55*, 3584–3591.

Kliebenstein, D. J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., et al. (2001). Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. *Plant Physiology, 126*, 811–825. https://doi.org/10.1104/pp.126.2.811

Kumar, A., Mohanty, V., & Yashaswini, P. (2018). Development of high protein nutrition bar enriched with Spirulina platensis for undernourished children. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal, 6*, 835–844.

Leite Munhoz, C., Avellaneda Guimaraes, R. C., Nozaki, V. T., Argandoña, E. J. S., Hiane, P. A., & Rodrigues Macedo, M. L. (2014). Preparation of a cereal bar containing bocaiuva: Physical, nutritional, microbiological and sensory evaluation. *Acta Scientiarum. Technology, 36*, 553–560. https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v36i3.18561

Lemmens, E., Moroni, A. V., Pagand, J., Heirbaut, P., Ritala, A., Karlen, Y., et al. (2019). Impact of cereal seed sprouting on its nutritional and technological properties: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18*, 305–328. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12414

León-López, L., Bañuelos-Piña, A. M., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., Contreras-Andrade, I., Sánchez-Magaña, L. M., et al. (2019). Optimisation of temperature and time for the dark germination bioprocess of *Moringa oleifera* sedes to boost nutritional value, total phenolic content and antioxidant activity. *International Food Research Journal, 26*, 831–839.

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, etnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences, 16*, 12791–12835. https://doi.org/10.3390/ijms160612791

Lopez-Rodriguez, N. A., Gaytán-Martínez, M., Reyes-Vega, M. L., & Loarca-Piña, G. (2020). Glucosinolates and isothiocyanates from *Moringa oleifera*: Chemical and biological approaches. *Plant Foods for Human Nutrition, 75*, 447–457. https://doi.org/10.1007/s11130-020-00851-x

López-Salazar, V., Sánchez Tapia, M., Tobón-Cornejo, S., Díaz, D., Alemán-Escondrillas, G., Granados-Portillo, O., et al. (2021). Consumption of soybean or olive oil at recommended concentration increased the intestinal microbiota diversity and insulin sensitivity and prevented fatty liver compared to the effects of coconut oil. *Journal of Nutritional Biochemistry, 94*, 108751. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108751

Maina, S., Misinzo, G., Bakari, G., & Kim, H.-Y. (2020). Human, animal and plant health benefits of glucosinolates and strategies for enhanced bioactivity: A systematic review. *Molecules, 25*, 3682. https://doi.org/10.3390/molecules25163682

Maldini, M., Maksoud, S. A., Natella, F., Montoro, P., Petretto, G. L., Foddai, M., et al. (2014). *Moringa oleífera*: Study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry, 49*, 900–910. https://doi.org/10.1002/jms.3437

Mattes, R. D. (2018). Snacking: A cause of concern. *Physiology & Behavior, 193*, 279–283. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.010

Methakullawat, C., & Lorjaroenphon, Y. (2019). Application of moringa seed as sweetness-induced substance. *Italian Journal of Food Science, 31*, 1–7.

Momanyi, D., Owino, W., & Makokha, A. (2020). Formulation, nutritional and sensory evaluation of baobab based ready-to-eat sorghum and cowpea blend snack bars. *Scientific African, 7*, Article e00215. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00215

Ogunsina, B. S., Radha, C., & Indrani, D. (2011). Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered *Moringa oleifera* seed flour. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62*, 185–194. https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526928

Olagbemide, P. T., & Alikwe, P. C. N. (2014). Proximate analysis and chemical composition of raw and defatted Moringa oleifera kernel. *Advances in Life Science and Technology, 24*, 92–99.

Peñas, E., Gomez, R., Frias, J., Baeza, M. L., & Vidal-Valverde, C. (2011). High hydrostatic pressure effects on inmmunoreactivity and nutritional quality of soybean products. *Food Chemistry, 125*, 423–429. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.023

Pico, J., Pismag, R. Y., Laudouze, M., & Martinez, M. M. (2020). Systematic evaluation of the Folin-Ciocalteu and Fast Blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant sedes. *Food & Function, 11*, 9868–9880. https://doi.org/10.1039/D0FO01857K

Rabie, M. M., Ibrahim, F. Y., Youssif, M. R. G., & Ezz El-Ragal, N. M. (2020). Effect of *Moringa oleifera* leaves and sedes poder supplementation on quality characteristics of cookies. *Journal of Food and Dairy Science, 11*, 65–73.

Rodríguez Gómez, M. J., Matías Prieto, J., Cruz Sobrado, V., & Calvo Magro, P. (2021). Nutritional characterization of six quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) varieties cultivated in Southern Europe. *Journal of Food Composition and Analysis, 99*, 103876. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.103876

Saa, R. W., Formbarng, E. N., Ndjantou, E. B., & Njintang, N. Y. (2019). Treatments and uses of *Moringa oleifera* seeds in human nutrition: A review. *Food Sciences and Nutrition, 7*, 1911–1919. https://doi.org/10.1002/fsn3.1057

Sahab, N. R. M., Subroto, E., Balia, R. L., & Utama, G. L. (2020). γ-Aminobutyric acid found in fermented foods and beverages: Current trends. *Heliyon, 6*, Article e05526. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05526

Sato, A., Truong, V. D., Johanningsmeier, S. D., Reynolds, R., Pecota, K. V., & Yencho, G. C. (2018). Chemical constituents of sweetpotato genotypes in relation to textural characteristics of processed French fries. *Journal of Food Science, 83*, 60–73.

Serna-Cock, L., Angulo-López, J. E., & Ayala-Aponte, Y. A. A. (2015). Barras de cereal como matriz sólida para la incorporación de microorganismos probióticos. *Informacion Tecnologica, 26*, 29–40. https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200005

Sharma, S., Singh, A., & Singh, B. (2019). Characterization of in vitro antioxidant activity, bioactive components, and nutrient digestibility in pigeon pea (*Cajanus cajan*) as influenced by germination time and temperature. *Journal of Food Biochemistry, 43*, Article e12706. https://doi.org/10.1111/jfbc.12706

Silva Lima, D., Buranelo Egea, M., de Campos Carvalho Cabassa, I., Borges de Almeida, A., Leal de Sousa, T., Mayara de Lima, T., et al. (2021). Technological quality and sensory acceptability of nutritive bars produced with Brazil nut and baru almond coproducts. *LWT-Food Science and Technology, 137*, 110467. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110467

Singh, A. K., Rana, H. K., Tshabalala, T., Kumar, R., Gupta, A., Ndhlala, A. R., et al. (2020). Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop *Moringa oleifera* Lam: An overview. *South African Journal of Botany, 129*, 209–220. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.017

Škrovánková, S., & Sikorová, P. (2010). Vitamin B2 (riboflavin) content in cereal products. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, LWIII*, 377–382.

Stelick, A., Sogari, G., Rodolfi, M., Dando, R., & Paciulli, M. (2021). Impact of sustainability and nutritional messaging on Italian consumers' purchase intent of cereal bars made with brewery spent grains. *Journal of Food Science, 86*, 531–539.

Timpanaro, G., Bellia, C., Foti, V. T., & Scuderi, A. (2020). Consumer behaviour of purchasing biofortified food products. *Sustainability, 12*, 6297. https://doi.org/10.3390/su12166297

Ulug, E., & Nergiz-Unal, R. (2021). Dietary fatty acids and CD36-mediated cholesterol homeostasis: Potential mechanisms. *Nutrition Research Reviews, 34*, 64–67. https://doi.org/10.1017/S0954422420000128

Vatanparast, H., Islam, N., Masoodi, H., Shafiee, M., Prakash Patil, R., Smith, J., et al. (2020). Time, location and frequency of snack consumption in different age groups of Canadians. *Nutrition Journal, 19*, 85. https://doi.org/10.1186/s12937-020-00600-5

Wiercioch, M., Szelag-Pieniek, S., Peszko, K., Baranowska-Bosiacka, I., Maciejewska, K., Łukomska, A., et al. (2018). The fatty acids content in popular bars. *Polish Journal of Natural Sciences, 33*, 591–605.

World Health Organization (WHO). Guideline. (2012). *Sodium intake for adults and children. Geneva*.

Zainal Abidin, N. A., Mohd Zin, Z., Abdullah, M. A. A., Rusli, N. D., & Zaino, M. K. (2020). Physicochemical properties and sensory acceptance of *Canavalia ensiformis* tempeh energy bar. *Food Research, 4*, 1637–1645. https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(5).150

Zhao, Y., Xie, C., Wang, P., Gu, Z., & Yang, R. (2021). GABA regulates phenolics accumulatin in soybean sprouts under NaCl stress. *Antioxidants, 10*, 990. https://doi.org/10.3390/antiox10060990

V. DISCUSIÓN GENERAL

Los cambios en el estilo de vida que ha experimentado la población en los países desarrollados, que incluyen hábitos nutricionales inadecuados y escasa actividad física, han conducido a un incremento de las enfermedades crónicas de elevada incidencia. De hecho, se estima que 15 millones de personas mueren anualmente a causa de estas enfermedades constituyendo, aproximadamente, el 71% del total de muertes globales (Plasek y col., 2020). Este hecho, unido a la reciente pandemia de COVID-19, ha llevado a que los consumidores sean más conscientes de la importancia de la alimentación en la salud y ha incrementado el consumo de alimentos de origen vegetal (Lombardo y col., 2021; Baker y col., 2022). Así mismo, el cambio climático y el aumento demográfico están aumentando de manera extraordinaria las demandas de los consumidores hace alimentos naturales, libres de aditivos y producidos de manera sostenible (Li y Kallas, 2021; Maruyama y col., 2021). Las nuevas tendencias de consumo representan una oportunidad de innovación para la industria alimentaria, ya sea mediante la utilización de nuevas materias primas como de tecnologías de procesado novedosas.

La semilla de moringa representa una materia prima prometedora para desarrollar alimentos innovadores y saludables debido a que, a pesar de presentar un excelente perfil nutricional y de compuestos fitoquímicos, su empleo en la industria alimentaria ha sido prácticamente inexistente hasta el momento. En este sentido, el desarrollo de nuevos ingredientes y alimentos a partir de semillas de moringa permitirá no sólo ampliar su consumo, restringido prácticamente a zonas tropicales y subtropicales de Asia y África, sino también potenciar su cultivo a nivel mundial, iniciado ya en Latinoamérica y en Europa.

El estudio de la germinación de las semillas como estrategia tecnológica para mejorar los efectos beneficiosos para la salud de las personas constituye un área de investigación emergente de enorme interés. Entre las ventajas de la germinación cabe mencionar que es un proceso natural, económicamente viable y sostenible que conduce a una mejora del contenido y biodisponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos de las semillas (Benincasa y col., 2019; Aparicio-García y col., 2021a,b; Bautista-Expósito y col., 2021). Además, debido a su composición, los germinados vegetales presentan propiedades beneficiosas para la salud como actividad antioxidante, antidiabética, hipocolesterolémica, anticancerígena y antimicrobiana (Aloo y col., 2021b). La germinación de la moringa, sin embargo, es un campo de investigación por explorar que ofrece grandes oportunidades de innovación a la industria agroalimentaria.

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral cuyo objetivo principal es la valorización de la semilla de moringa mediante la utilización de

procesos germinativos y la aplicación de los germinados obtenidos para el desarrollo de alimentos de alto valor nutritivo y elevado contenido de compuestos bioactivos. La tesis se ha desarrollado en dos fases diferentes. En la primera fase (Fase 1), se han optimizado las condiciones del proceso de germinación (tiempo y temperatura) de las semillas de moringa, con el fin de maximizar el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos (Publicación 1). A continuación, en la segunda fase (Fase 2), se ha empleado la harina obtenida a partir de los germinados de moringa obtenidos en las condiciones óptimas de germinación seleccionadas en la Fase I para el desarrollo de pasta (tipo tallarines) más saludable y de mayor valor nutricional que la pasta convencional (Publicación 2). Por último, se ha desarrollado un snack tipo barrita de cereales listo para tomar con buen perfil nutricional y enriquecida en compuestos bioactivos al incorporar harina de moringa germinada con mayor contenido en GABA (Publicación 3).

5.1. FASE 1. Optimización de las condiciones de germinación para la obtención de harinas de alto valor añadido a partir de la semilla de moringa (Publicación 1)

La germinación de las semillas produce profundos cambios metabólicos que modifican su composición nutricional y perfil de compuestos fitoquímicos. Estos cambios composicionales van a depender tanto del tipo de semilla empleado como de las condiciones de germinación (Paucar-Menacho y col., 2017a,b; Aparicio-García y col., 2020). Por este motivo, la primera fase del trabajo contemplado en esta memoria de Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio sistemático de la temperatura y el tiempo de germinación en semillas de moringa originarias de Ecuador para producir una harina con características diferenciadoras (Publicación 1). Los escasos estudios previos llevados a cabo sobre germinación de semillas de moringa se han centrado en el empleo de temperaturas y tiempos de germinación establecidos muy concretos y han evaluado parámetros muy específicos (Ijarotimi y col., 2013; Tesfay y col., 2016; Salama y col., 2020; Saa y col., 2022), por lo que el presente trabajo constituye un avance del conocimiento sobre los cambios en la composición de nutrientes y compuestos bioactivos producidos en la semilla de moringa durante la germinación en un amplio rango de condiciones experimentales.

Las semillas empleadas en este trabajo se obtuvieron a partir de árboles de moringa crecidos en el este de Ecuador (Cantón Shushufindi, provincia de Sucumbíos) cultivados durante julio de 2018. Teniendo en cuenta que las semillas de moringa no se emplean todavía en Ecuador con propósitos nutricionales, el desarrollo de ingredientes y alimentos de alto valor

añadido a partir de ellas sin duda contribuirá a aumentar su producción y mejorar las condiciones de trabajo y calidad de vida de los agricultores locales y a impulsar la economía ecuatoriana, así como a contribuir en la nutrición y salud de su población.

En esta publicación, se ensayaron temperaturas de germinación en el rango 28-36 °C, que están dentro del intervalo de la temperatura ambiente en las latitudes en que se cultiva la moringa en Ecuador, así como en el sur de España donde se está iniciando el cultivo de este árbol. Así mismo, se seleccionaron tiempos de germinación entre 24 y 96 h que, de acuerdo con la experiencia previa de nuestro grupo de investigación, son los más adecuados para maximizar la calidad nutricional y funcional de las harinas obtenidas a partir de legumbres, cereales y pseudocereales (Cáceres y col., 2014; Paucar-Menacho y col., 2018; Aparicio-García y col., 2020; Bautista-Expósito y col., 2021). Así mismo, el remojo de las semillas de moringa previo a la germinación ha demostrado ejercer un efecto positivo sobre la calidad de los germinados en comparación con los germinados obtenidos en ausencia de remojo previo (Saa y col., 2022). Para establecer el tiempo de remojo óptimo de la semilla de moringa, se realizó un ensayo previo en el que se evaluó la capacidad de captación de agua de la semilla en función del tiempo y se observó que la semilla alcanzaba peso constante a partir de las 18 h, indicando que a este tiempo de remojo la semilla presentaba la máxima capacidad de hidratación. Por tanto, se estableció 18 h como tiempo de remojo óptimo previo a la germinación.

En las harinas obtenidas a partir de la semilla de moringa no germinada (control) y germinada en las condiciones ensayadas se determinó la composición proximal y el contenido de tiamina (vitamina B_1) y riboflavina (vitamina B_2), con el fin de tener información sobre el efecto de las condiciones de germinación en su calidad nutricional. Los resultados derivados de esta investigación pusieron de manifiesto que la semilla de moringa es una excelente fuente de proteína (28 g/100 g ps), superior a otras semillas como haba, lenteja, garbanzo, arroz, avena, cebada o trigo (Cáceres y col., 2014; Aparicio-García y col., 2020; Rico y col., 2020; Bautista-Expósito y col., 2021; Bayomy y Alamri, 2022). La harina de semilla de moringa también presentó contenidos elevados de lípidos (29 g/100 g ps), hidratos de carbono (35 g/100 g ps), fibra (24 g/100 g ps) y cenizas (3 g/100 g ps). La composición nutricional de la semilla de moringa ecuatoriana estudiada está dentro del rango de los valores descritos previamente en semillas de moringa de origen africano (Abiodun y col., 2012; Barakat y Ghazal, 2016; Matthew y col., 2021; Stevens y col., 2021) y mejicano (Guzmán-Albores y col., 2021).

La germinación causó cambios significativos en la composición proximal de la semilla de moringa, si bien la magnitud de las modificaciones dependió de las condiciones empleadas

en el proceso. En este sentido, la germinación incrementó el contenido proteico de la semilla de moringa, alcanzando valores entre 28,4 y 32,2 g/100 g ps y los germinados obtenidos a 32°C durante tiempos prolongados (60-96 h) fueron los que mostraron mayores niveles de proteína. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por otros autores, quienes observaron aumentos del contenido proteico tras la germinación de semilla de moringa a 30 °C durante 4-8 días (Ijarotimi y col., 2013; Saa y col., 2022). No obstante, el incremento del contenido proteico tras la germinación de la semilla de moringa fue inferior al 15%, resultados coincidentes con los publicados en germinados de cereales (Aparicio-García y col., 2020; Mbithi-Mwikya y col., 2000) y legumbres (Atudorei y col., 2021). El aumento proteico podría deberse a la pérdida de peso en forma de hidratos de carbono por la respiración durante la germinación (Tian y col. 2010; Grasi y col., 2018; Yousaf y col., 2021), aunque la síntesis proteica *de novo* durante este proceso, así como el incremento de los niveles de enzimas implicadas en la germinación (Rosental y col., 2014; Xu y col., 2019; Bautista-Expósito y col., 2021) también podrían contribuir a los valores observados.

El contenido lipídico apenas se vio afectado durante el proceso germinativo, con independencia de las condiciones empleadas, con la excepción del proceso realizado a 32 °C durante 60-96 h que causó un incremento significativo de los niveles de grasa en las harinas de moringa ($p \leq 0,05$). Nuestros resultados están de acuerdo con los publicados por Saa y col. (2022), quienes pusieron de manifiesto la ausencia de cambios en los niveles lipídicos de la semilla de moringa tras su germinación durante 192 h. En cambio, Ijarotimi y col. (2013) evidenciaron un incremento cuando la semilla de moringa se germinó a 30 °C durante 96 h. Estos cambios se deben a que durante la germinación se activan lipasas endógenas que hidrolizan los triacilgliceroles presentes en la semilla a ácidos grasos libres que, posteriormente, sufren β-oxidación que proporciona la energía necesaria para la protrusión de la nueva plántula (Xu y col., 2019). Así mismo, se sintetizan nuevos ácidos grasos (Megat Rusydi, 2011), por lo que el balance neto del contenido lipídico dependerá de las tasas de síntesis y degradación lipídica tras el proceso de germinación.

En general, la germinación ocasionó una disminución del contenido de hidratos de carbono en las harinas de moringa, efecto atribuible a la activación de un amplio rango de enzimas hidrolíticas, (α-amilasas, β-amilasas y dextranasas) responsables de la hidrólisis del almidón a azúcares reductores que son empleados como fuente de energía para el desarrollo de la nueva plántula (Olaerts y col., 2016; Najdi Hejazi y Orsat, 2017).

Por su parte, la fibra dietética apenas experimentó cambios o bien aumentó ligeramente durante el proceso de germinación, dependiendo de la temperatura y el tiempo utilizados. La temperatura de 32 °C apenas ejerció influencia, independientemente del tiempo de germinación, si bien 28 y 36 °C, en general, afectaron positivamente al contenido de fibra dietética. La germinación parece tener un efecto muy variable sobre el contenido de fibra, dependiendo del tipo y variedad de semilla y de las condiciones de germinación consideradas. Así, se ha descrito un aumento de fibra total debido al incremento de la fracción soluble por la síntesis de nuevas paredes celulares, celulosa y hemicelulosa durante la germinación de mijo (Yousaf y col., 2021), y a la hidrólisis de estructuras proteicas, ruptura de enlaces intermoleculares y solubilización de macromoléculas durante la germinación de trigo (Ding y col., 2018; Jan y col., 2018). Por su parte, Ijarotimi y col. (2013) y Saa y col. (2022) también encontraron un aumento del contenido de fibra en los germinados de moringa obtenidos a 30 °C durante 96-192 h. Contrariamente, otros autores han observado que la germinación a 15-30 °C durante 2-3 días no afectó al contenido de fibra total de la cebada y el trigo (Koehler y col., 2007; Teixeira y col., 2016) o bien disminuyó durante la germinación del trigo a 15-20 °C durante 2 días (Koehler y col., 2007). Teniendo en cuenta los valores de fibra descritos en esta Tesis Doctoral, el consumo de 100 g al día de harina de moringa germinada está en línea con las directrices marcadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, que recomienda un consumo diario de fibra dietética superior a 25 g para mantener una adecuada función intestinal y reducir el riesgo de sobrepeso, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (EFSA, 2010).

A continuación, se evaluó el contenido de tiamina y riboflavina en las harinas germinadas de la semilla de moringa. Los niveles de tiamina (1113,5 µg/100 g ps) fueron similares a los descritos previamente (Mbah y col., 2012a), si bien los de riboflavina (179,1 µg/100 g ps) fueron superiores a los observados por otros autores (Gopalakrishnan y col., 2016; Rajendaran y col., 2020). Las condiciones de germinación ejercieron un efecto diferente sobre los niveles de ambas vitaminas. El contenido de tiamina no se modificó de manera relevante cuando la germinación se realizó a 28 o 36 °C, mientras que la germinación a 32 °C durante los tres periodos de tiempo estudiados causó una ligera, aunque significativa ($p \leq 0,05$), reducción de los niveles de esta vitamina. Se ha descrito que la germinación potencia la acumulación de vitaminas del grupo B en los cereales para facilitar el desarrollo y crecimiento de la nueva planta (Lemmens y col., 2019). Sin embargo, no existen datos en la bibliografía sobre el efecto

de la germinación en el contenido de tiamina de la moringa. Moongngarm y Saetung (2010) pusieron de manifiesto que la síntesis *de novo* de tiamina en el grano de arroz tiene lugar en estados tardíos de la germinación, resultados que coinciden con los encontrados en este trabajo, que sugieren que la síntesis de la vitamina B_1 en la semilla de moringa se iniciaría a tiempos superiores a 96 h. Por lo que se refiere a la riboflavina, su contenido no se vio afectado a 32 y 36 °C en combinación con tiempos cortos de germinación (< 60 h), si bien tiempos superiores causaron un descenso del contenido de esta vitamina. Por el contrario, temperaturas más bajas de germinación (28 °C) favorecieron su acumulación en las harinas, especialmente a tiempos más cortos. Estudios realizados en trigo y colza han revelado que el contenido de vitamina B_2 aumenta paulatinamente a lo largo de la germinación hasta el quinto día (Zieliński y col., 2006; Rahmatullina y col., 2013). Sin embargo, nuestros resultados indican que tiempos de germinación prolongados disminuyen el contenido de riboflavina en la moringa.

Con el objetivo de conocer la influencia de las condiciones de germinación en las potenciales propiedades beneficiosas para la salud, se evaluó el contenido de diferentes compuestos bioactivos relevantes en la semilla de moringa. Los glucosinolatos son metabolitos secundarios presentes en los vegetales de la familia de las brásicas que forman parte del mecanismo defensivo de estos vegetales frente a insectos y se han relacionado con numerosos efectos beneficiosos para la salud (Lopez-Rodriguez y col., 2020). La semilla de moringa presentó un contenido de glucosinolatos totales de 204,5 µmol/g ps, superior al observado en otras brásicas como la col blanca y roja (17-38 µmol/g ps) (Feng y col., 2021; Wu y col., 2021), el brócoli (7-23µmol/g ps) (Jo y col., 2022) y las coles de bruselas (4 µmol/g ps) (Sun y Chen, 2019). La glucomoringina (4-α-ramnopiranosiloxi-benzil glucosinolato) fue el glucosinolato más abundante en la semilla de moringa (197,4 µmol/g ps), seguido de la sinalbina (p-hidroxibencil glucosinolato), presente en una cantidad muy inferior (7,1 µmol/g ps). Nuestros resultados se encuentran en concordancia con estudios previos que han identificado la glucomoringina como el principal glucosinolato en la semilla de moringa (Bennet y col., 2003; Föster y col., 2015; Chen y col., 2019a), y Maldini y col. (2014) también han observado la presencia de sinalbina. La germinación causó importantes cambios del contenido de glucosinolatos en la semilla de moringa. Con respecto a los glucosinolatos individuales, la sinalbina disminuyó en las harinas germinadas con respecto a la harina control, independientemente de las condiciones de germinación empleadas. Los niveles de glucomoringina, sin embargo, dependieron de las condiciones de germinación. Así, las harinas

obtenidas tras la germinación a 28 °C durante 96 h y a 32-36 °C durante 24-60 h mostraron un ligero, aunque significativo ($p \leq 0,05$), aumento del contenido de glucomoringina, mientras que este glucosinolato disminuyó en el resto de condiciones de germinación ensayadas. Además, hay que señalar que los germinados obtenidos durante los tiempos más largos de germinación (60-96 h) a todas las temperaturas estudiadas presentaron pequeñas cantidades de glucotropaeolina (bencil glucosinolato), compuesto no detectado en la semilla de moringa sin germinar. Resultados similares han sido descritos por Maldini y col. (2014), quienes observaron la presencia de pequeñas cantidades de glucotropaeolina en la semilla de moringa germinada durante 12 días, pero no en la pulpa o cubierta de la semilla no germinada. Por otra parte, no se observó una tendencia clara en el efecto de las condiciones de germinación sobre el contenido de glucosinolatos totales, ya que temperaturas de 32-36 °C en combinación con tiempos cortos (24-60 h) no causaron cambios o incrementaron ligeramente el contenido total de estos compuestos, mientras que 28 °C ocasionó una disminución significativa ($p \leq 0,05$) cuando se aplicó durante tiempos cortos (≤60 h). Estos hallazgos indican que, en general, tiempos prolongados de germinación (96 h) ocasionan una reducción de los niveles de glucosinolatos totales. Numerosos estudios científicos demuestran que el procesado afecta considerablemente al contenido de glucosinolatos de la familia de las brásicas (Hanschen y col., 2018; Paulsen y col., 2021; Luo y col., 2022). El daño en los tejidos vegetales que tiene lugar durante el procesado conduce a la hidrólisis de los glucosinolatos por parte de la enzima mirosinasa (tioglucosidasa) dando lugar a una amplia variedad de compuestos como glucosa, sulfato, isotiocianatos, epitionitrilos, nitrilos, alcoholes indólicos, oxazolidinotiones y tiocianatos (Miękus y col., 2020). Durante la germinación, se produce la rotura de la cubierta de la semilla de moringa ocasionando la modificación de los tejidos celulares, que conduce a que la mirosinasa entre en contacto con los glucosinolatos causando su hidrólisis, como refleja la disminución del contenido de glucosinolatos totales en las harinas de moringa germinada. Otros autores también han observado una disminución notable del contenido total de glucosinolatos durante la germinación de vegetales de la familia de las brásicas como el brócoli y la rúcula (Ragusa y col., 2017; Olszewska y col., 2020). Sin embargo, la hidrólisis selectiva de algunos glucosinolatos individuales por la mirosinasa explicaría que el contenido de algunos glucosinolatos, como la sinalbina, se vea reducido en mayor extensión que la glucomoringina (Bellostas y col., 2007). Así mismo, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral evidencian que la germinación en ciertas condiciones activa la biosíntesis de glucomoringina y glucotropaeolina, confirmando resultados previos obtenidos por otros autores, quienes

pusieron de manifiesto el aumento de los niveles de algunos glucosinolatos tras la germinación de semillas de brásicas (Andini y col., 2019; Wang y col., 2019b). Diversas enzimas, entre las que destacan las aminotransferasas de cadena ramificada, la metiltioalquilmalato sintasa y las sulfotransferasas, están implicadas en la síntesis de glucosinolatos, mientras que los genes BCA, CYP y AOP son los principales genes implicados en las rutas de biosíntesis de estos compuestos (Li y col., 2020). Recientemente, se ha demostrado que durante el proceso germinativo también se sintetizan glucosinolatos *de novo* y que la tasa de síntesis excede a la de degradación en *Arabidopsis thaliana* cuando la germinación se produce a 21-22ºC con ciclos de luz/oscuridad (16h/8h) durante tiempos inferiores a 9 días (Jeschke y col., 2019). Nuestros resultados sugieren que tiempos cortos en combinación con temperaturas altas de germinación tendrían un efecto positivo en la expresión de los genes BCA, CYP y AOP y en la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de glucosinolatos. Los efectos beneficiosos para la salud de los glucosinolatos y sus productos de hidrólisis son ampliamente conocidos, habiéndose descrito que pueden ejercer actividades anticancerígena y antimicrobiana (Maina y col., 2020). Las evidencias existentes muestran que los derivados de glucomoringina contrarrestan la cascada inflamatoria implicada en enfermedades como la esclerosis múltiple (Galuppo y col., 2014) y tienen actividad antibacteriana (Galuppo y col., 2013). Estudios *in vitro* han revelado que la sinalbina presenta actividades antiproliferativa y pro-apoptosis en células cancerígenas, así como efecto antimicrobiano (Boscaro y col., 2018), mientras que los compuestos derivados de la glucotrapaeolina tienen actividad preventiva frente al cáncer de mama y próstata en modelos animales (Kim y col., 2011; Cho y col., 2016). Las harinas obtenidas a partir de moringa germinada son una fuente notable de glucosinolatos, cuyos niveles son superiores a los reportados en otras brásicas germinadas como las coles blanca y crespa (kale) (10-100 µg/g ps) (Zeng y col., 2021; Liu y col., 2022a), por lo que su consumo podría contribuir a prevenir el desarrollo de enfermedades degenerativas.

Debido a sus innumerables propiedades beneficiosas del GABA para la salud, se investigó la influencia de la germinación en su contenido en la semilla de moringa. La semilla no germinada mostró un contenido de GABA (50,1 mg/100 g ps) muy superior a los niveles encontrados en otras semillas como la quinoa (Paucar-Menacho y col., 2017a), la avena (Aparicio-García y col., 2021a) y la soja (Luo y col., 2017). La germinación favoreció la acumulación de GABA en la moringa y se observaron niveles entre 1,8 y 5,8 veces superiores comparado con la harina control, si bien la magnitud del aumento dependió de las condiciones de germinación. La única excepción fueron los germinados obtenidos a 32 °C durante 24 h,

que mostraron niveles de GABA inferiores a la semilla no germinada. Se observó que la acumulación de GABA era dependiente del tiempo de germinación, de modo que tiempos más largos conducían a mayores niveles de este compuesto en los germinados de moringa, mientras que la temperatura no tuvo una influencia muy marcada. Las harinas de moringa obtenidas a 36 °C durante 96 h fueron las que mostraron los niveles superiores de GABA (291,2 mg/100 g ps). Hay que destacar que estas harinas son una excelente fuente de GABA en comparación con otras harinas obtenidas a partir de avena, arroz, maíz y amaranto germinados (Cáceres y col., 2017; Paucar-Menacho y col., 2017a,b; Aparicio-García y col., 2021b). El GABA es un aminoácido no proteico que actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central y, además, es un potente regulador de la presión sanguínea y de la frecuencia cardiaca. El GABA desempeña otras funciones beneficiosas para la salud que incluyen la diuresis, modulación de las funciones cognitivas, regulación del estrés y la ansiedad, mejora del sueño, prevención de la diabetes tipo I e inhibición de la proliferación y migración de células cancerígenas (Ortega, 2003; Tian y col., 2004; Li y col., 2015; Song y col., 2016; Rashmi y col., 2018). El aumento de GABA durante la germinación se debe, principalente, a la activación de enzimas proteolíticas endógenas de las semillas que hidrolizan las proteínas en aminoácidos liberándose, entre otros, ácido glutámico, precursor del GABA. A la vez, la activación de otros sistemas enzimáticos, como la glutamato descarboxilasa y la diamina oxidasa, a través de la descarboxilación del ácido glutámico y las poliaminas, respectivamente, ocasionan la síntesis de GABA (Kim y col., 2011). Los mayores niveles de GABA observados en las harinas de moringa germinada a 36 °C durante 96 h son coherentes con los resultados expuestos por Kim y col. (2015) que han puesto de manifiesto que la actividad óptima de la enzima glutamato descarboxilasa se desarrolla a temperaturas próximas a 40 °C.

Posteriormente, en las harinas de moringa germinadas se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos libres mediante el método de Folin-Ciocalteu, considerando las innumerables propiedades beneficiosas para la salud de estos compuestos, como se ha descrito en la introducción de esta Tesis Doctoral. La harina control mostró niveles elevados de compuestos fenólicos (418,0 mg de equivalentes de ácido gálico, GAE/100 g ps). El efecto de las condiciones de germinación sobre el contenido de estos compuestos no mostró una tendencia clara. Así, los procesos llevados a cabo a 28 °C durante 24-60 h, 32 °C durante todos los tiempos ensayados y 36 °C durante 96 h incrementaron los valores de compuestos fenólicos libres, mientras que el resto de condiciones de germinación ocasionaron una disminución con respecto a la harina de moringa sin germinar. Se ha documentado ampliamente en la

bibliografía el incremento en la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de los compuestos fenólicos durante la germinación (Cho y col., 2018). Así mismo, se ha descrito que la actividad de las enzimas claves que participan en la ruta de los fenilpropanoides, responsables parcialmente de la acumulación de compuestos fenólicos en los vegetales, como la fenilalanina amonio liasa, se ve enormemente afectada por el tiempo y temperatura de la germinación y es máxima entre 20 y 30 °C (Tesfay y col., 2016). Estos hallazgos nos llevaron a pensar que altas temperaturas y tiempos de germinación prolongados favorecerían la síntesis *de novo* de compuestos fenólicos en la semilla de moringa. Con el fin de conocer cómo afectan las condiciones de germinación al perfil de compuestos fenólicos de estas semillas, se realizó una cuantificación de los compuestos fenólicos individuales mediante HPLC-DAD/QTOF-MS. Sin embargo, no se detectaron compuestos fenólicos en los extractos metanólicos obtenidos a partir de las diferentes harinas de moringa, ya fuesen crudas o germinadas. Estos resultados fueron inesperados, teniendo en cuenta los obtenidos mediante el ensayo bioquímico empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Diferentes estudios han descrito que compuestos como la vitamina C, ciertos aminoácidos como el triptófano o la tirosina e, incluso, los azúcares reductores reaccionan con el reactivo de Folin (Sánchez-Rangel y col., 2013; Pico y col., 2020), fenómeno que podría estar distorsionando los datos obtenidos al cuantificar los compuestos fenólicos libres con este reactivo. De hecho, se ha puesto de manifiesto que el triptófano y la tirosina están en cantidades elevadas en las semillas de moringa (Al Juhaimi y col., 2017), y que la germinación causa un aumento importante de la vitamina C y de los azúcares reductores durante el proceso germinativo (Rico y col., 2020). El conjunto de estos hallazgos podría explicar los valores sobredimensionados relativos al contenido de compuestos fenólicos libres observados en las harinas de moringa en las que, en cambio, no se detectaron compuestos fenólicos mediante el análisis llevado a cabo por HPLC. Estos resultados son coherentes con los obtenidos recientemente por Fernandes y col. (2021), quienes encontraron niveles muy bajos (0.1-0.7 mg/g) de compuestos fenólicos libres en extractos hidroetanólicos obtenidos a partir de semillas de moringa. Nuestros resultados, junto con los obtenidos por estos autores, sugieren que la mayoría de compuestos fenólicos presentes en las semillas de moringa estarían unidos a componentes de la pared celular y, por tanto, no serían solubles en soluciones hidroalcohólicas.

Por último, se estudió la actividad antioxidante de las harinas de moringa mediante el ensayo *in vitro* ORAC. La harina de semilla no germinada presentó un alto potencial antioxidante (1531,4 mg TE/100 g ps), muy superior al descrito en otras semillas de brásicas

como el brócoli o la col roja (Aloo y col., 2021a). La germinación en todas las condiciones ensayadas, con la excepción de 36 °C durante 96 h, incrementó considerablemente la actividad antioxidante de las harinas de moringa, obteniéndose valores entre 1905 y 5173 mg TE/100 g ps. Estudios recientes también han puesto de manifiesto el incremento de actividad antioxidante tras la germinación de cereales (Aparicio-García y col., 2021a,b; Navyashree y col., 2022), legumbres (Bautista-Expósito y col., 2021), pseudocereales (Bhinder y col., 2022) y semillas de la familia de las brásicas (Aloo y col., 2021b). Se ha demostrado que durante la germinación hay una enorme producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden causar estrés oxidativo y daños severos a nivel celular, lo que da lugar a la síntesis y activación de enzimas antioxidantes en estados tempranos de la germinación (Chen y Arora, 2011). En este contexto, se ha descrito que la enzima SOD, que desempeña un papel fundamental en el mecanismo de defensa frente al radical superóxido en vegetales, se activa durante el primer día de germinación en semillas de cacahuete y su actividad disminuye posteriormente de manera drástica (Limmongkon y col., 2018). Los resultados de este estudio están en consonancia con los obtenidos en la presente Tesis Doctoral, donde los valores máximos de actividad antioxidante se observaron a las 24 h de germinación en todas las temperaturas ensayadas. Considerando que no se encontraron cantidades detectables de compuestos fenólicos extraíbles en las harinas de moringa germinada, el aumento de la actividad antioxidante con respecto a la harina control sugiere el incremento de otros compuestos antioxidantes durante la germinación de la moringa. Diversos estudios han evidenciado que la semilla de moringa es una fuente importante de vitamina E (3,5-36,4 mg/100 g ps) (Rahman y col., 2009; Gu y col., 2020; Fu y col., 2021), reconocido antioxidante, y que los niveles de esta vitamina aumentan notablemente durante el proceso de germinación (Fernández-Orozco y col., 2006; Ng y col., 2013). Así mismo, las saponinas, presentes en cantidades significativas en la semilla de moringa (Gu y col., 2020) y los isotiocianatos producidos por hidrólisis de los glucosinolatos, incluidos los derivados de la glucomoringina, también han mostrado elevada actividad antioxidante (Giacoppo y col., 2015; Burĉul et al., 2018). Además, se ha puesto de manifiesto que el MOP-1, arabinoxilano aislado de las semillas de moringa, presenta una potente actividad antioxidante (He y col., 2018), actividad también descrita para el GABA en trigo germinado (Kim y col., 2011). Todos estos estudios sugieren que son diversos los compuestos bioactivos presentes asociados a las propiedades antioxidantes que podrían actuar de manera sinérgica o aditiva y ser corresponsables del incremento de la actividad antioxidante observada en las harinas germinadas de moringa obtenidas. Su gran potencial antioxidante convierte a estas harinas en

ingredientes muy interesantes para el desarrollo de nuevos alimentos con propiedades saludables.

Una vez conocido el efecto de las condiciones de germinación estudiadas sobre las propiedades nutricionales y bioactivas de la semilla de moringa, se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con el fin de obtener más información sobre la contribución individual del tiempo y de la temperatura de germinación en los efectos observados y establecer las condiciones óptimas de germinación que maximizan el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos estudiados, así como la actividad antioxidante de dichas harinas. Para ello, los resultados experimentales obtenidos se ajustaron a una ecuación polinómica de segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{2} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{2} \beta_{1i} X_i^2 + \beta_1 X_1 X_2 + \varepsilon$$

Donde Y representa los valores previstos para cada variable respuesta, X_i representan las variables independientes en este estudio, tiempo (i=1) y temperatura (i=2) de germinación, β_0 es una constante, β_i, β_{1i} y β_1 son los coeficientes de los términos lineal, cuadrático e interacción respectivamente, mientras que ε representa la precisión de la estimación. Se evaluó la idoneidad de los modelos matemáticos obtenidos para explicar los resultados experimentales mediante el cálculo del coeficiente de determinación (R^2) y los modelos se validaron estadísticamente mediante la realización de un ensayo ANOVA multivariante y la prueba de falta de ajuste. Los resultados obtenidos del ANOVA pusieron de manifiesto que todos los modelos presentaron una falta de ajuste no significativa ($p>0,05$) y todos los términos de la ecuación fueron estadísticamente significativos. Además, los valores de R^2 fueron superiores a 0,75, indicando su adecuación para explicar la variabilidad de los datos experimentales. Las ecuaciones obtenidas indicaron que tanto la temperatura como el tiempo de germinación ejercieron efectos cuadráticos y lineares sobre todas las variables de respuesta estudiadas, mostrando que las interacciones entre ambos también ejercen una influencia notable. Las ecuaciones resultantes junto con los gráficos tridimensionales de superficie de respuesta permitieron inferir que la interacción entre el tiempo y la temperatura de germinación fue el factor que presentó mayor influencia en el contenido de tiamina, mientras que la temperatura fue el factor con mayor impacto en los niveles de riboflavina y en la capacidad antioxidante. Por el contrario, el tiempo fue el factor con mayor influencia en el contenido de glucosinolatos y GABA en las harinas de

moringa germinada. Tras analizar la influencia de las condiciones de germinación en la calidad nutricional y funcional de las harinas de moringa germinada, se utilizó la MSR para determinar las condiciones óptimas de germinación y maximizar el contenido de vitaminas B_1 y B_2, glucosinolatos y GABA, así como la actividad antioxidante en estas harinas. Los resultados indicaron que las condiciones de germinación idóneas para maximizar los niveles de riboflavina y la actividad antioxidante fue 28 °C y 24 h, mientras que la temperatura de 36 °C en combinación con tiempos de 24 y 96 h ocasionaron los máximos niveles de tiamina y GABA, respectivamente, en las harinas de moringa. En las condiciones de germinación óptimas indicadas por los modelos de MSR, los valores experimentales obtenidos para las variables respuesta fueron muy similares a los predictivos calculados por los modelos matemáticos, confirmando así la idoneidad de las ecuaciones polinómicas obtenidas para modelizar la influencia de las condiciones de germinación en el perfil nutricional y bioactivo de las harinas de moringa germinadas.

5.2. FASE 2. Producción y caracterización de alimentos saludables empleando harina de moringa germinada

Una vez identificadas las condiciones óptimas de germinación en la semilla de moringa, la segunda fase de esta Tesis Doctoral consistió en la utilización de las harinas obtenidas en las condiciones de germinación seleccionadas como óptimas como ingrediente para mejorar las propiedades nutricionales y saludables de dos alimentos altamente consumidos a nivel mundial, como son una pasta tipo tallarines y un snack listo para el consumo tipo barrita de cereales. Durante la discusión se utilizará el término MSP por sus siglas en inglés (moringa sprout powder) para denominar las harinas obtenidas a partir de moringa germinada, de acuerdo a las publicaciones mostradas en el apartado de resultados.

5.2.1. Desarrollo de pasta tipo tallarines enriquecida con harina de moringa germinada (Publicación 2)

La pasta es un alimento popular altamente consumido a nivel mundial por la población de todos los rangos de edad, independientemente del estado socio-económico del consumidor, incluso en países en desarrollo. A pesar de su popularidad, desde el punto de vista nutricional, la pasta es un alimento de alto valor energético, por su alto contenido en hidratos de carbono, y con bajo contenido en proteínas, micronutrientes y compuestos bioactivos saludables. La

suplementación de la pasta con matrices vegetales de alta calidad nutricional y elevado potencial bioactivo representa una estrategia innovadora para mejorar las características nutricionales y promotoras de salud de estos alimentos. En este escenario, diferentes organizaciones internacionales de la salud consideran que la fortificación de la harina refinada de trigo es un aspecto crucial para prevenir enfermedades relacionadas con un bajo estado nutricional, especialmente en Latinoamérica y regiones del Caribe (OMS, FAO, UNICEF, GAIN, MI y FFI, 2009).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en la segunda fase de la Tesis Doctoral se planteó la formulación de una pasta tipo tallarines con características nutricionales y saludables mejoradas respecto a la pasta convencional, mediante la sustitución parcial de la harina de trigo por harina de moringa germinada (MSP) en las condiciones determinadas como óptimas en la Fase 1 para maximizar el contenido de riboflavina y la actividad antioxidante, manteniendo niveles elevados de tiamina, glucosinolatos y GABA (28 °C durante 24 h). Para ello, se propusieron 6 formulaciones que contenían distintas cantidades de MSP: 0% (formulación control), 5% (formulación denominada 5MSP), 10% (10MSP), 15% (15MSP), 20% (20MSP) y 30% (30MSP) (**Figura 4**). Las formulaciones frescas se secaron en un horno a 40 °C durante 16 h para obtener los tallarines.

a) b) c)

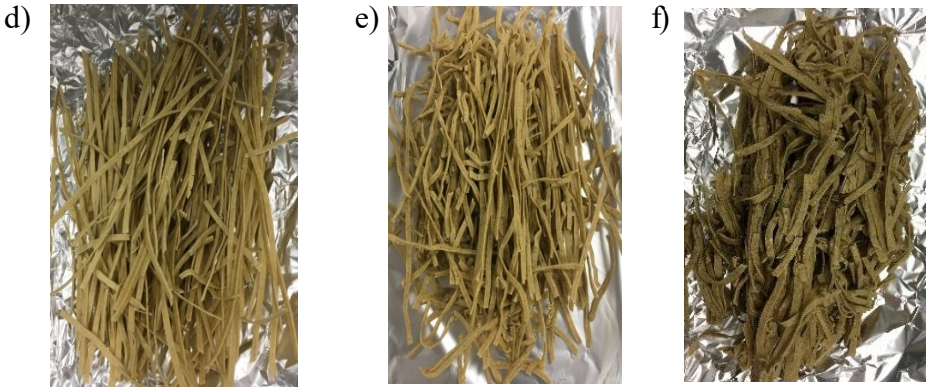


Figura 4. Tallarines obtenidos con la harina de moringa germinada. a) Control, b) 5MSP, c) 10MSP, d) 15MSP, e) 20MSP y f) 30MSP.

En las formulaciones de pasta obtenidas se evaluó, en primer lugar, la composición proximal, con el fin de estudiar la influencia de la adición de harina de moringa germinada en la calidad nutricional de los tallarines desarrollados. Se observó un aumento gradual del contenido de proteína, grasa, cenizas y fibra dietética al aumentar la cantidad de harina de moringa germinada. En particular, los niveles de proteína se incrementaron entre un 13% en la formulación 5MSP y un 34% en 30MSP, resultados de gran interés teniendo en cuenta que la pasta es un producto pobre en proteína. En consonancia con nuestros resultados, estudios previos han demostraron incrementos en el rango 28-59% en los niveles de proteínas en galletas, bizcochos y panes suplementados con harina de moringa germinada con niveles entre 7,5 y 30%, en comparación con los controles (Chinma y col., 2014b; Bolarinwa y col., 2019; Rabie y col., 2020). El contenido de lípidos de las pastas se incrementó de manera drástica y dosis-dependiente, observándose valores entre 4 y 31 veces superiores en las pastas suplementadas en comparación con la pasta control, resultados compatibles con el alto contenido lipídico de la harina moringa germinada (30 g/100 g ps). Teniendo en cuenta que la semilla de moringa es rica en ácidos grasos insaturados (Al Juhaimi y col., 2017), su incorporación a la pasta proporciona una composición lipídica más saludable. Además, el contenido en cenizas experimentó un incremento en el rango 48-84% tras la incorporación de la harina de moringa germinada en las pastas, reflejando la importante contribución de este ingrediente al contenido de minerales de las formulaciones obtenidas. Aumentos significativos (26-179%) del contenido de cenizas también se han descrito previamente en diferentes alimentos como pan y galletas tras la sustitución parcial de harina de trigo por harina de semilla de moringa o de moringa germinada en diferentes proporciones (5-40%) (Ogunsina y col.,

2011; Chinma y col., 2014b; Bolarinwa y col., 2019). Las pastas elaboradas empleando harina de moringa germinada como ingrediente funcional también mostraron niveles de fibra dietética notablemente superiores a los tallarines control (niveles de fibra no detectados), atribuibles al alto contenido de fibra de la harina de moringa germinada (28 g/100 g ps). Resultados semejantes han sido recientemente descritos en panes y galletas enriquecidos con harina de semilla de moringa en proporciones del 2,5-20%, donde los niveles de fibra total se incrementaron entre un 19 y un 675% (Bolariwa y col., 2019; Rabie y col., 2020). En contraste, el contenido de almidón disminuyó significativamente ($p \leq 0,05$), desde niveles próximos al 68% en la pasta control hasta niveles de 46% en la formulación 30MSP, donde se observó una disminución del 32%. Estos resultados podrían deberse a la sustitución de la harina de trigo, rica en almidón, por harina de moringa germinada, en la que el almidón fue hidrolizado durante el proceso. Los resultados de composición proximal de las pastas obtenidas sugieren que la inclusión de harina de moringa germinada mejora el valor nutricional de los tallarines, resultados en concordancia con los publicados en otros alimentos suplementados con este tipo de harina como bizcochos, pan, y galletas (Ogunsina y col., 2011; Chinma y col., 2014; Bolarinwa y col., 2018).

A continuación, se estudió el contenido de tiamina y riboflavina en las diferentes formulaciones de pasta. La pasta control (0MSP) mostró una cantidad notable de tiamina (200,5 µg/100 g ps). Los niveles de esta vitamina se incrementaron en la pasta a medida que se aumentó la cantidad de harina de moringa germinada incorporada, alcanzándose los mayores niveles en la formulación 30MSP (282,5 µg/100 g ps), resultados en consonancia con los niveles de tiamina en la harina germinada (1091 µg/100 g ps). Se ha descrito que la harina de trigo comercial proporciona una cantidad de tiamina en torno a 250 µg/100 g (Turgut y col., 2014), niveles que coinciden con los obtenidos en la pasta control y muy inferiores a los de la harina de moringa germinada. Los tallarines suplementados con esta harina desarrollados en la presente Tesis Doctoral son superiores a resultados previos encontrados en la bibliografía para pasta suplementada con un 10% de harina de quinchoncho (*Cajanus cajan* L.) (120 µg/100 g ps) (Torres y col., 2007). Existen evidencias científicas que indican que el incremento en el consumo de tiamina previene o revierte enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, dislipidemisas, infarto de miocardio y problemas neurodegenerativos (Eshack y Arafa, 2018; Nguyen y col., 2022), por lo que aumentar el contenido de esta vitamina en alimentos es un reto de gran importancia nutricional. Por lo que se refiere al contenido de riboflavina en las pastas enriquecidas con harina de moringa germinada, los resultados obtenidos mostraron una

tendencia similar a los observados para tiamina, incrementándose gradualmente desde un 27% a un 59% según aumentaba los niveles de harina de moringa germinada en las distintas formulaciones (5MSP-30MSP). La pasta suplementada con la mayor concentración de harina de moringa germinada (al 30%) presentó un contenido de riboflavina (115,37 µg/100 g ps) similar a la pasta enriquecida con harina del quinchoncho al 10% (110 µg/100 g ps) (Torres y col., 2007). La ingesta de cantidades adecuadas de riboflavina en la dieta es crucial para el estado de salud, ya que esta vitamina desempeña funciones muy importantes en el organismo a nivel mitocondrial y del sistema nervioso central, y dietas pobres en riboflavina se han relacionado con diversos problemas metabólicos y migrañas (Fila y col., 2021; Hrubša y col., 2022).

Posteriormente, evaluamos el contenido de GABA en las pastas elaboradas, teniendo en cuenta que la harina de moringa germinada presentaba altos niveles de GABA (97 mg/100 g ps, publicación 1). En la pasta control no se encontraron niveles detectables de GABA, si bien su contenido se incrementó drásticamente al aumentar la cantidad de harina de moringa germinada incorporada hasta un 20%. Sin embargo, no se observaron cambios significativos ($p>0,05$) entre las formulaciones MSP20 y MSP30. Así, la pasta MSP5 mostró un contenido de GABA de ~3 mg/100 g ps, mientras que la pasta 30MSP presentó niveles de 12 mg/100 g ps. Como se ha comentado, las harinas de moringa germinada son una fuente notable de este compuesto bioactivo, superior a la harina de moringa no germinada (80 mg/100 g), debido a la síntesis de GABA durante la germinación por activación de la enzima glutamato descarboxilasa, como se ha explicado previamente en la discusión de la publicación 1. Los resultados obtenidos demuestran que la incorporación de harina de moringa germinada es una estrategia dietética interesante para obtener pasta enriquecida en GABA que aporta propiedades saludables, teniendo en cuenta los múltiples efectos beneficiosos para la salud de este compuesto (Song y col., 2016; Rashmi y col., 2018; Chen y col., 2019b).

Teniendo en cuenta el notable contenido de glucosinolatos observados en la harina de moringa germinada (Publicación 1), consideramos interesante estudiar los niveles de estos compuestos bioactivos en las pastas obtenidas. No se detectó la presencia de glucosinolatos en la pasta control ni en las formulaciones 5MSP y 10MSP. Sin embargo, la incorporación de niveles de harina de moringa germinada en el rango 15-30% incrementó el contenido de glucosinolatos totales a niveles entre 0,6 y 2,5 µmol/g ps. En estas formulaciones, se observó la presencia de glucomoringina (0,8-2,1 µmol/g ps) y sinalbina (0,1-0,4 µmol/g ps). Estos niveles son inferiores a los esperables, teniendo en cuenta la alta cantidad de glucosinolatos

totales encontrados en la harina de moringa germinada (94,1 μmol/g ps, publicación 1). Se ha descrito que los tratamientos postcosecha y los procesos culinarios tienen gran influencia en el contenido de glucosinolatos de las brásicas. En este sentido, los impactos mecánicos y los procesos tecnológicos, como se ha descrito en la Introducción, reducen drásticamente el contenido de estos compuestos, debido a su hidrólisis por la enzima mirosinasa tras el daño de los tejidos vegetales, generando derivados con actividades beneficiosas para la salud (Klopsch y col., 2019). La disminución de los niveles de glucosinolatos totales e individuales en la pasta con respecto a los niveles esperados considerando el contenido presente en la harina de moringa germinada, por tanto, estaría relacionada con su conversión en compuestos con mayor actividad biológica y con efectos beneficiosos para la salud. La presencia de glucomoringina en semillas de moringa ha sido previamente descrita por otros autores (Amaglo y col., 2010, Föster y col., 2015), mientras que Amaglo y col. (2010) también identificaron sinalbina en flores y hojas de moringa. Sin embargo, la presencia de ambos glucosinolatos en pasta suplementada con harina de moringa germinada se ha descrito por primera vez en esta Tesis Doctoral. Los efectos promotores de la salud de ambos glucosinolatos han sido ampliamente descritos, como se ha comentado previamente. Apenas existen ensayos clínicos que hayan evaluado las dosis necesarias de glucosinolatos o sus productos de hidrólisis para reducir el riesgo de cáncer, y estos estudios se han centrado principalmente en el brócoli, alimento rico en sulforafano (Atwell y col., 2015; Zhang y col., 2020). Sin embargo, no existen estudios de este tipo realizados en moringa. Aun así, los estudios *in vitro*, preclínicos y clínicos muestran la asociación inversa del consumo de brásicas ricas en glucosinolatos con la incidencia de diversos tipos de cáncer (Connolly y col., 2021). Con los resultados expuestos, se puede inferir que la producción de pastas suplementadas con harina derivada de semilla de moringa es una estrategia novedosa rica en glucosinolatos que puede contribuir a mejorar la salud y jugar un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas de las personas.

Con el fin de conocer la contribución de la harina de moringa germinada a la actividad antioxidante de las pastas elaboradas, se evaluó la capacidad de absorción de radicales libres mediante el método ORAC. La pasta control mostró una actividad antioxidante de 490,2 mg TE/100 g ps, y se observó un incremento gradual a medida que aumentó la cantidad de harina de moringa adicionada. Así, la actividad antioxidante en la muestra 5MSP fue un 44% superior que en la pasta control, mientras que en la muestra 30MSP se incrementó un 110%, resultados atribuibles a la alta actividad antioxidante de la harina de moringa germinada (5172,9 mg TE/100 g ps). Teniendo en cuenta que no se encontraron cantidades detectables de compuestos

fenólicos libres en la harina de moringa germinada, la alta actividad antioxidante de las formulaciones de pasta suplementadas podría explicarse por el alto contenido de compuestos antioxidantes diferentes de los compuestos fenólicos presentes, como el GABA, a los productos de hidrólisis de los glucosinolatos, que han mostrado elevada actividad antioxidante en estudios previos (Burĉul y col., 2018; Tu y col., 2022), así como de otros compuestos no determinados en esta Tesis Doctoral pero cuya presencia en altas cantidades ha sido previamente descrita en las semillas de moringa, como la vitamina E, vitamina C y las saponinas, potentes antioxidantes (Bag y col., 2022; Bukowska y Duchnowicz, 2022). Estos compuestos antioxidantes podrían actuar de modo sinérgico contribuyendo a los altos valores de ORAC observados en las pastas suplementadas con harina de moringa germinada.

Una vez estudiado el contenido de nutrientes y compuestos bioactivos de las pastas elaboradas, se procedió a la evaluación de algunas de sus propiedades tecno-funcionales como indicadores para predecir la calidad reológica de la pasta. En este sentido, se estudiaron estas propiedades en las pastas frescas mediante el ensayo reológico dinámico de oscilación mecánica y los resultados indicaron que todas las formulaciones se comportaban como sólidos viscoelásticos, presentando un módulo de almacenamiento (G´), que representa el carácter elástico, superior al módulo de pérdida (G´´), que representa el comportamiento viscoso, en el rango de frecuencia estudiada, y ambos módulos se incrementaron al aumentar la frecuencia angular. Se observó una deformación inicial en las pastas a baja frecuencia, pero a medida que se incrementó la frecuencia, con el mismo esfuerzo cortante, las pastas mostraron mayor resistencia a la deformación, confirmando su carácter semi-sólido. La adición de harina de moringa germinada a diferentes concentraciones no modificó la elasticidad de las masas, ya que no se observaron cambios en los parámetros reológicos en comparación con la pasta control. Las propiedades reológicas de la pasta dependen de su estructura y de la proporción de los diferentes ingredientes e interacciones entre ellos. La formación de una red entre las proteínas de gluten, la presencia de grasa y de agua juegan un papel fundamental en la estructura de la masa (Fradinho y col., 2020). Hay que señalar que la incorporación de harina de moringa germinada en sustitución de la harina de trigo reduce el contenido de gluten de las pastas. Así mismo, se ha descrito que contenidos proteicos bajos, hasta 14%, reducen los módulos G´ y G´´, pero niveles de proteína superiores no modifican ambos módulos (Khatkar, 2005). Las pastas suplementadas con harina de moringa germinada presentan un contenido proteico (14-16%) superior que la pasta control (12%), y este mayor contenido proteico podría contrarrestar el efecto derivado de la reducción del gluten y el mantenimiento de los parámetros

reológicos de las pastas. Además, las proteínas de bajo peso molecular presentes en las semillas de moringa forman una red activa que favorece la agregación coloidal (Brilhante y col., 2017), fenómeno que podría contribuir a mantener unas propiedades reológicas en las pastas enriquecidas con harina de moringa germinada similares a las de la pasta control.

Posteriormente a los estudios reológicos, se investigó la influencia de la adición de la harina de moringa germinada en la textura de los tallarines por ser un aspecto clave en la aceptación por parte del consumidor. Se estudiaron 5 parámetros de textura: 1) dureza, que representa la fuerza necesaria para deformar al estructura de la pasta (Pasqualone y col., 2016); b) elasticidad, parámetro que indica la magnitud de la recuperación que ocurre cuando desaparece la fuerza de compresión ejercida (Pasqualone y col., 2016); c) pegajosidad, que indica la adherencia de la pasta a los materiales (Motta-Romero y col., 2017); d) masticabilidad, que refleja la energía necesaria para deglutir la pasta (Motta-Romero y col., 2017); e) adhesividad, que indica la adherencia de la pasta a los dientes (Weng y col., 2020) y f) cohesividad, que representa la capacidad de la pasta de pegarse a sí misma (Weng y col., 2020). Las formulaciones suplementadas con harina de moringa germinada mostraron valores de dureza (0,18-0,20 N) significativamente ($p \leq 0,05$) inferiores a la pasta control (0,26 N), que fueron menores a medida que se incrementaba la cantidad de harina de moringa adicionada. Así, la formulación 30MSP mostró una dureza 33% inferior a la pasta control. Se observó una tendencia similar en los parámetros texturales elasticidad, pegajosidad y masticabilidad, que disminuyeron al aumentar los niveles de harina de moringa germinada, y la pasta 30MSP mostró una reducción del 21%, 26% y 50% en elasticidad, pagajosidad y masticabilidad, respectivamente. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la adhesividad entre la pasta control y las que incorporaban harina de moringa, con la excepción de 15MSP y 20MSP, que mostraron menores valores que la fórmula control. De manera similar, no se observaron diferencias significativas en la cohesividad de las pastas elaboradas, mostrando todas ellas valores cercanos a 1,0, valor de referencia para las pastas de buena calidad. Las propiedades texturales de la pasta se deben principalmente a la red de almidón, gluten, proteínas diferentes del gluten, junto con otros ingredientes (Chang y Wu, 2008). La reducción de la dureza y masticabilidad en los tallarines enriquecidos con harina de moringa germinada podría deberse a su menor contenido en gluten y almidón en comparación con la pasta control elaborada con harina de trigo (D'Egidio y col., 1990), que aporta una estructura menos rígida y dura. No obstante, esta composición no se reflejó en los parámetros de adhesividad y cohesividad. En términos generales, los consumidores prefieren las pastas

firmes, masticables y con baja adhesividad. A pesar de que algunos parámetros mostraron una reducción en las pastas con harina de moringa, los perfiles texturales de estas pastas fueron muy similares al control, especialmente cuando se incorporaron cantidades bajas-medias de MSP (5-15%).

Por último, se llevaron a cabo pruebas sensoriales para conocer las apreciaciones del consumidor hacia las pastas enriquecidas con harina de moringa germinada con respecto a la pasta control. Se empleó un panel de 25 catadores no entrenados que consumían habitualmente pasta y se evaluaron 5 parámetros sensoriales (apariencia, aroma, sabor, textura y aceptabilidad general) en base a una escala no estructurada de 10 puntos. Las puntuaciones más altas indicaban mayor aceptabilidad al parámetro estudiado. No se observaron diferencias significativas en los parámetros sensoriales evaluados entre los tallarines control, las formulaciones 5MSP y 10MSP que presentaron atributos de aroma, textura y aceptabilidad general similar a la pasta control. Estos resultados indican que la incorporación de harina de moringa germinada hasta el 10% no afecta a la calidad sensorial de la pasta. Sin embargo, la adición de cantidades superiores (15-30%) causó una reducción de los valores de todos los parámetros sensoriales, siendo el sabor y la textura los atributos más afectados. Las menores puntuaciones otorgadas por los panelistas para el sabor en las pastas suplementadas con harina de moringa germinada en comparación con la control podrían explicarse por el regusto amargo aociado a la presencia de compuestos como los glucosinolatos (Förster y col., 2015) en los germinados de moringa. Además, la valoración más baja recibida por los tallarines que contenían las mayores cantidades de harina de moringa germinada (30MSP) podría atribuirse a la disminución de la dureza, pegajosidad y masticabilidad observada en el análisis del perfil textural. Por lo que se refiere a la aceptabilidad general, no se observaron diferencias significativas entre la pasta control y las que contenían hasta un 10% de harina de moringa germinada, si bien la adición de cantidades superiores causó una disminución de la valoración de todos los parámetros sensoriales y, en consecuencia, de la aceptabilidad general de las pastas. A pesar de que el análisis sensorial se realizó en población adulta, hay que señalar que las pastas con alta proporción de harina de moringa germinada podrían ser mejor valoradas por la población infantil o adolescente, ya que las generaciones más jóvenes están más abiertas a nuevas experiencias alimentarias (Torri y col., 2020). Por otra parte, se realizaron análisis sensoriales en el laboratorio con los tallarines suplementados con las mayores proporciones de harina de moringa germinada (30MSP) a los que se incorporaron salsas comerciales para pasta y se demostró que mejoraba su aceptabilidad sensorial. Teniendo en cuenta el alto contenido

en nutrientes y compuestos bioactivos de las pastas con altas cantidades de harina de moringa germinada (20MSP y 30MSP) y sus buenas propiedades reológicas, la realización de nuevos estudios destinados a mejorar la calidad sensorial y la textura de estas pastas incorporando hidrocoloides y proteínas podrían proporcionar oportunidades innovadoras para utilizar la harina de moringa germinada como ingrediente en la elaboración de pasta y otros alimentos como extrusionados o productos de panificación, y su consumo contribuiría a la mejora del estado nutricional y de salud de los consumidores.

5.2.2. Desarrollo de snacks saludables (barritas de cereales) enriquecidos con harina de moringa germinada (Publicación 3)

Es evidente que los hábitos de consumo han sufrido grandes cambios principalmente causado por un estilo de vida frenético que lleva consigo la falta de tiempo para cocinar y a un aumento en el consumo de alimentos preparados o listos para el consumir. Por otra parte, los consumidores son cada vez más conscientes de la relación entre la alimentación y el estado de salud, fenómeno que está alterando gradualmente los patrones de consumo en la sociedad, y las tendencias indican que cada vez más se buscan alimentos nutritivos y saludables.

Los snacks son alimentos listos para consumir (*ready-to eat*), sabrosos, asequibles y de conveniencia que responden a las demandas de los consumidores actuales en cuanto a alimentos fáciles de llevar y económicos, que se pueden consumir rápidamente y, lo más importante, que permiten saciar el hambre temporalmente (Mattes, 2018). Los snacks constituyen uno de los sectores del mercado de la alimentación que ha experimentado un crecimiento más rápido en los últimos años y su consumo ha aumentado sustancialmente en todos los grupos de edad a nivel mundial (Vatanparast y col., 2020). Sin embargo, el consumo de snacks poco saludables y de alto valor energético constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, la diabetes y obesidad (Amrein y col., 2021). La producción de snacks saludables con buenas propiedades sensoriales representa un nicho prioritario de la industria alimentaria que pueden ayudar a mejorar el estado nutricional y, a la vez, pueden contribuir a la prevención de estas enfermedades crónicas y, en consecuencia, la salud de los consumidores. Las barritas de cereales son alimentos idóneos para alcanzar este propósito ya que pueden consumirse fácilmente entre comidas para saciar el hambre momentánea y pueden elaborarse a partir de diferentes fuentes vegetales de alto valor nutricional. En este contexto, la última parte de esta Tesis Doctoral se ha centrado en investigar

la viabilidad de utilizar harina de moringa germinada para desarrollar barritas de cereales innovadoras y saludables de alto valor nutricional y con potencial bioactivo. Para elaborar estas barritas, consideramos interesante utilizar la harina de moringa germinada (MSP) obtenida en condiciones de temperatura y tiempo que maximizan el contenido de GABA (36 °C y 96 h) (publicación 1) ya que, debido a sus numerosas propiedades positivas para la salud, podría proporcionar beneficios para el consumidor adicionales a las propiedades nutricionales de la semilla de moringa.

Se elaboraron dos tipos de formulaciones de barritas con diferente proporción entre los ingredientes sólidos (avena en grano, copos de avena, arroz crujiente, plátano y coco deshidratados y MSP) y los líquidos (solución saturada de panela, 75 °Brix, que actúa como un sirope aglutinante): 65/35 y 75/25 (peso/volumen). Se prepararon 6 barritas, cada una de ellas de 35 g, 3 correspondientes a cada formulación (65/35 y 75/25 p/v) conteniendo cantidades de harina de moringa germinada entre 9 y 26% y, además, se elaboraron barritas en ausencia de moringa que representaron las barritas control. Las barritas obtenidas se denominaron de la siguiente manera: 6MSP, 9MSP, 12MSP, 18MSP, 19MSP y 26MSP, según la cantidad de harina de moringa germinada incluida: 6%, 9%, 12%, 18%, 19% y 26%, respectivamente. Las barritas 9MSP, 18MSP y 26MSP correspondieron a la formulación 65/35 p/v, mientras que las barritas 6MSP, 12MSP y 19MSP correspondieron a la formulación 75/25 p/v (**Figura 5**).

Considerando que la fracturabilidad, definida como la fuerza aplicada por los dientes molares para desmenuzar los alimentos, es uno de los atributos más importantes de las barritas de cereales (Kumar y col., 2018), se realizó un análisis preliminar de fracturabilidad descriptivo en los prototipos de barritas elaborados con el fin de seleccionar la formulación óptima. Este ensayo se llevó a cabo por 10 panelistas entrenados reclutados entre el personal de la empresa Wipala Healthy Snacks (Guayaquil), uno de los principales productores de este tipo de snacks en Ecuador y no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en la fracturabilidad entre las diferentes formulaciones de las barritas estudiadas. Sin embargo, se observó que las formulaciones que contenían una proporción de 65/35 p/v mostraban una mejor consistencia que aquellas que contenían una proporción de 75/25. Teniendo en cuenta este resultado, junto con el hecho de que en las barritas son preferibles bajos valores de fracturabilidad y de que la adición de mayores cantidades de harina de moringa germinada podría mejorar el potencial nutricional y bioactivo de estos alimentos, seleccionamos el prototipo 18MSP como la formulación óptima que cumplía con estos requisitos.

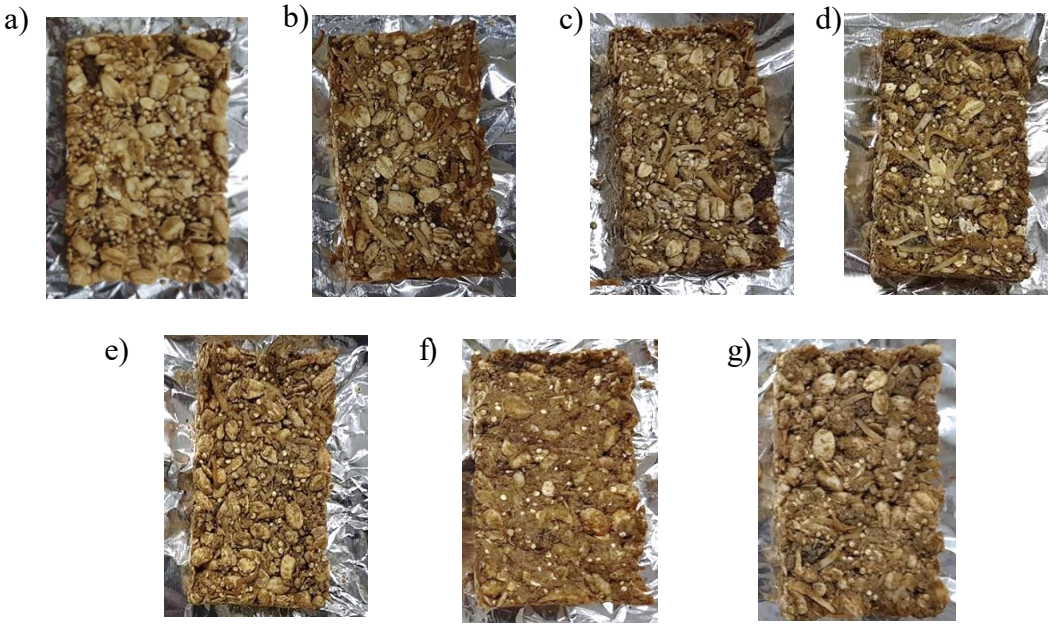


Figura 5. Barritas desarrolladas incorporando harina de moringa germinada. a) Barrita control, b) 9MSP, c) 18MSP; d) 26MSP, e) 6MSP, f) 12MSP, g) 19MSP

Tanto en la formulación seleccionada (18MSP) como en la barrita control (0MSP) se analizó, en primer lugar, la composición proximal. Los resultados indicaron que la adición de harina de moringa germinada incrementó significativamente ($p \leq 0,05$) el contenido de proteínas y cenizas (48%) y de grasa (328%) en comparación con el prototipo control, mientras que se observó una disminución del contenido de humedad (8%) y de hidratos de carbono totales (15%). El contenido de humedad de la barrita 18MSP es inferior al de otras barritas desarrolladas a partir de frutas, pseudocereales y cereales (Da Silva y col., 2014; Momanyi y col., 2020; Singh y col., 2022). Un bajo contenido en humedad es un atributo deseable en este tipo de snacks que garantiza una mayor vida útil y seguridad desde el punto de vista microbiológico, así como para obtener barritas con textura crujiente más atractivas para los consumidores (Momanyi y col., 2020). La harina de moringa germinada es una buena fuente de proteínas y minerales, como se ha demostrado en la publicación 1 y han descrito otros autores (León-López y col., 2019), lo que explica el mayor contenido de proteínas y cenizas encontrado en la formulación 18MSP en comparación con la barrita control. La semilla de moringa contiene, además, altos niveles de lípidos (13-46%) (Saa y col., 2019), principalmente ácidos grasos insaturados (Al Juhaimi y col., 2017), responsables del mayor contenido lipídico en la barrita 18 MSP en comparación con el control. La reducción del contenido de carbohidratos en esta barrita podría atribuirse a la sustitución de la avena, excelente fuente de

almidón, por la harina de moringa germinada que contiene menores niveles de almidón. El contenido de proteínas en la barrita 18MSP desarrollada es superior a los reportados en otras barritas saludables enriquecidas con quínoa, maíz, lenteja y garbanzo (Kaur y col., 2018; Figuereido de Sousa y col., 2019; Rajagukguk y col., 2022), así como en galletas suplementadas con harina de hoja de moringa (Hedhili et al., 2021). En cambio, el contenido de grasa es inferior al encontrado en barritas probióticas de garbanzo y lenteja verde (Rajagukguk y col., 2022). Nuestros resultados relativos al aumento del contenido de proteínas y cenizas en la barrita enriquecida con harina de moringa germinada están de acuerdo con los encontrados en bizcochos, pastas y panes en los que se sustituyó la harina de trigo por harina de moringa germinada o de semillas de moringa (Chinma y col., 2014b; Bolarinwa y col., 2019; Aderinola y col., 2020; Rabie y col., 2020).

Además, se analizó el contenido de vitaminas B_1 y B_2 en las barritas y la formulación 18MSP mostró un contenido de tiamina ligeramente superior (983 µg/100 g ps) que la barrita control (961 µg/100 g ps), mientras que los niveles de riboflavina fueron más de 15 veces superiores en la barrita 18MSP que en la control. Como se comentó en la discusión de la publicación 1, la harina de moringa germinada obtenida a 36 °C durante 96 h presenta altos niveles de tiamina y riboflavina, por lo que su incorporación como ingrediente para el desarrollo de snacks y de otros alimentos puede ser un enfoque dietético interesante para aumentar la ingesta de ambas vitaminas en la población. No existen datos en la bibliografía reciente sobre el contenido de vitaminas B_1 y B_2 en barritas de cereales. Sin embargo, el contenido de ambas vitaminas observado en la barrita 18MSP es mayor que el observado en otros productos horneados elaborados con harina de multicereales (Škrovánková y Sikorová, 2010).

Con respecto al contenido de minerales, la barrita 18MSP presentó concentraciones significativamente mayores ($p \leq 0,05$) de Ca, Mg, K, P, Fe y Zn, así como niveles más bajos de Na que la formulación control. No se observaron, sin embargo, diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en los contenidos de Mn y Cu entre ambas formulaciones. Estudios previos han demostrado que las semillas de moringa son una fuente notable de Ca, Mg, K y P (Ijarotimi y col., 2013; Olagbemide y Alikwe, 2014; Gopalakrishnan y col., 2016), resultados que concuerdan con el contenido mineral observado en el snack 18MSP. Los niveles de Ca, Mg, Zn y K en esta barrita fueron considerablemente superiores que los registrados en otras formulaciones de barritas derivadas de cereales, legumbres y frutos secos (Abidin y col., 2020; Momanyi y col., 2020; Silva Lima y col., 2021). Hay que destacar el reducido contenido de Na

en la barrita 18MSP, atributo deseable teniendo en cuenta las recomendaciones actuales de la Organización Mundial de la Salud sobre la reducción de la ingesta de sal en la dieta para prevenir enfermedades cardiovasculares (WHO, 2012). El alto contenido de minerales en las barritas de moringa desarrolladas las convierte en un alimento atractivo que podría contribuir de manera notable a la ingesta diaria necesaria de micronutrientes ya que, de acuerdo con los resultados expuestos, el consumo de dos barritas 18MSP (70 g) al día proporcionaría, por ejemplo, el 49% y el 35% de la ingesta diaria recomendada de Mg y P, respectivamente, (EFSA, 2015).

Teniendo en cuenta el alto contenido lipídico de la barrita 18MSP (11,2% ps), se consideró de gran interés conocer su composición en ácidos grasos. Se identificaron 9 ácidos grasos en la formulación control, mientras que la barrita 18MSP contenía 17 ácidos grasos diferentes y la incorporación de harina de moringa germinada contribuyó de forma significativa a los niveles de ácidos grasos tanto insaturados como saturados. El ácido oleico (C18:1n9c) fue el ácido graso más abundante, seguido del láurico (C12:0) y palmítico (C16:0). Estos resultados concuerdan con la composición de ácidos grasos de la semilla de moringa y de la moringa germinada descrita en trabajos recientes (El-Baset Salama y col., 2020; Gharsallah y col., 2021). El aumento del contenido de ácidos grasos insaturados en la formulación 18MSP se debió, principalmente, al incremento de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), mientras que se observó una reducción del 34% en los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en comparación con la barrita control. La sustitución de la harina de avena y quinoa, que son buenas fuentes de PUFA (Aparicio-García y col., 2021a; Rodríguez Gómez y col., 2021), por harina derivada de la semilla de moringa, que contiene bajos niveles de PUFA (Gu et al., 2020), explica la reducción de estos ácidos grados en la barrita 18MSP. No obstante, hay que señalar que los ácidos grasos insaturados (57% del contenido total de ácidos grasos, 49% MUFA y 8% PUFA) fueron los predominantes en la composición de la barrita 18MSP, mientras que los ácidos grasos saturados representaron el 43%. Estudios recientes han revelado que la ingesta de MUFA reduce los niveles de triglicéridos séricos, el colesterol total, el colesterol LDL y las lipoproteínas/apolipoproteínas aterogénicas, mientras que aumenta el colesterol HDL (DiNicolantonio y O'Keefe, 2018a,b; Ulug y Nergiz-Unal, 2021) y mejora la composición de la microbiota intestinal (López-Salazar y col., 2021). Wiercioch y col. (2018) han puesto de manifiesto que la mayoría de las barritas disponibles en el mercado muestran un perfil de ácidos grasos poco saludable, donde los ácidos grasos saturados son los más abundantes, representando más del 68% del contenido total. Por otro lado, hay que señalar que el ácido

oleico presenta alta estabilidad a la oxidación (Fuentes de Mendoza y col., 2015) y su presencia en las barritas derivadas de moringa podría mejorar su vida útil. Por lo tanto, la incorporación de la harina de moringa germinada en la formulación de barritas enriquecidas representa una estrategia prometedora para mejorar las propiedades nutricionales y saludables, así como la vida útil de este tipo de snacks de alto consumo en la población.

Con respecto a la composición de aminoácidos, la incorporación de la harina de moringa germinada incrementó aproximadamente un 26% el contenido de aminoácidos totales de la barrita 18MSP en comparación con la barrita control, resultados en consonancia con obtenidos por Ijarotimi y col. (2013) que observaron un aumento del contenido total de aminoácidos (tanto esenciales como no esenciales) en las semillas de moringa tras la germinación. Con respecto a los aminoácidos esenciales, leucina, fenilalanina y valina fueron los mayoritarios y se observó un aumento significativo ($p \leq 0,05$) en los contenidos de histidina, valina, metionina, isoleucina, phenilalanina, tirosina y treonina en el prototipo 18MSP. Sin embargo, los niveles de cisteína y lisina disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) en la barrita 18MSP con respecto al control. La presencia de la harina de moringa germinada en la barrita 18MSP incrementó un 36% el contenido de los aminoácidos no esenciales y el ácido glutámico fue el más abundante, seguido de la arginina, mientras que el ácido aspártico y prolina no se modificaron con respecto a la barrita control. La sustitución de la avena, que es una fuente importante de ambos aminoácidos, por la harina de moringa germinada, que contiene bajos niveles de cisteína y en la que la lisina es el aminoácido limitante, explica los resultados obtenidos. La mayoría de matrices vegetales empleadas comúnmente para el desarrollo de barritas y otros snacks presentan escasos niveles de aminoácidos esenciales, por lo que es de destacar la presencia de todos los amionoácidos esenciales en la barrita 18MSP, la mayoría de ellos en alta cantidad, lo que sugiere que la harina de moringa germinada es una alternativa prometedora a las matrices vegetables habituales para la producción de snacks más nutritivos y saludables.

Del mismo modo que se realizó en la pasta, en las barritas se evaluó el impacto de la adición de la harina de moringa germinada en el contenido de compuestos con actividad biológica. Los niveles de GABA en el prototipo 18MSP (36 mg/100 g ps) fue un 20% superior al de la barrita control debido, sin duda, al incremento del contenido de este compuesto durante la germinación de la moringa, como se ha explicado con anterioridad. El desarrollo de alimentos enriquecidos en GABA ha despertado un interés creciente en los últimos años, existiendo diversos estudios recientes realizados con el propósito de enriquecer zumos y bebidas vegetales con este compuesto mediante procesos fermentativos (Cataldo y col., 2020;

Hong Le y col., 2021; Cunha y col., 2022). Sin embargo, la suplementación de alimentos con GABA mediante germinación proporciona un enfoque innovador para mejorar el estado de salud de los consumidores. En este sentido, las barritas de harina de moringa germinada enriquecidas en GABA son alimentos atractivos para el consumidor, que se puede beneficiar de las propiedades nutricionales y saludables de la moringa y de los efectos promotores de la salud del GABA a través de un alimento que se puede consumir entre horas para saciar temporalmente la sensación de hambre.

La incorporación de la harina de moringa germinada también incrementó considerablemente el contenido de glucosinolatos individuales y totales en las barritas. El contenido de glucomoringina se incrementó 148 veces en el prototipo 18MSP con respecto a la barrita control, representando el 96% del total de glucosinolatos en la formulación 18MSP. Esta barrita también mostró pequeñas cantidades de glucosinalbina (1,1 µmol/g ps) y glucotropaeolina (0,21 µmol/g ps), compuestos detectados en la barrita control. Como se comentó en el caso de la pasta enriquecida con harina de moringa germinada, la glucomoringina es el principal glucosinolato identificado en las semillas de moringa, al igual que en publicaciones previas (Amaglo y col., 2010; Maldini y col., 2014; Chen y col., 2019a), si bien también se han encontrado pequeñas cantidades de glucotropaeolina y glucosinalbina (Maldini y col., 2014). La presencia de estos glucosinolatos en el snack 18MSP es de gran interés ya que estos glucosinolatos han mostrado potencial quimioprotector al ejercer efectos citoprotectores, anticancerígenos y antioxidantes (Fahey y col., 2018). En este sentido, el consumo de las barritas enriquecidas con harina de moringa germinada podría proporcionar una amplia variedad de beneficios para la salud.

Posteriormente, se determinó el contenido de compuestos fenólicos solubles en las barritas elaboradas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos empleando el reactivo de Folin en la pasta suplementada con harina de moringa germinada (Publicación 2), en esta ocasión realizamos el ensayo empleando el reactivo Fast Blue BB. Este ensayo se basa en la reacción de la sal de diazonio Fast Blue BB con los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos en condiciones alcalinas y la formación de un complejo estable que presenta un máximo de absorción a 420 nm. Este ensayo se ha aplicado muy recientemente para cuantificar compuestos fenólicos totales en una amplia gama de matrices como legumbres y otras semillas, aceite y frutos secos (Pico y col., 2020; Siano y col., 2022), incluso en orina de individuos que han consumido alimentos ricos en compuestos fenólicos (Hinojosa-Nogueira y col., 2017) y ha mostrado una alta sensibilidad y fiabilidad, al no mostrar sesgos significativos por interferencia

con compuestos no fenólicos (Hinojosa-Nogueira y col., 2017; Pico y col., 2020; Siano y col., 2022). Empleando este ensayo, la barrita control mostró niveles de compuestos fenólicos libres de 267,4 mg GAE/100 g ps, que aumentaron un 71% en la barrita 18MSP. La germinación ha demostrado potenciar el contenido fenólico total en una amplia gama de semillas (Aparicio-García y col., 2020, 2021a; Tomé-Sánchez y col., 2020; Bautista-Expósito y col., 2021). Las plantas activan estrategias de adaptación en respuesta al estrés abiótico, como las altas temperaturas, que implican activación de la fenilalanina amoníaco liasa (PAL), enzima responsable de la síntesis de compuestos fenólicos. La activación de las celulasas endógenas de las semillas, endoxilanasas y esterasas durante la germinación conduce a la alteración de los componentes de la pared celular y la liberación de ácidos fenólicos ligados (Sharma y col., 2019), que también podría contribuir a los altos niveles de compuestos fenólicos libres en la harina de moringa germinada y, en consecuencia, en las barritas 18MSP. A pesar de que no se analizaron los compuestos fenólicos individuales en esta harina de moringa germinada, León-López y col., (2019) han descrito que temperaturas altas de germinación (32-40 °C) favorecen la acumulación de compuestos fenólicos en la semilla de moringa. De este modo, el empleo de una temperatura de germinación más elevada (36 °C) en combinación con un tiempo de germinación más prolongado (96 h), condiciones utilizadas para la obtención de las harinas de moringa germinada utilizada en la elaboración de la barrita 18MSP, explicaría el aumento de compuestos fenólicos libres, en contraposición con los resultados observados en la pasta enriquecida con la MSP obtenida a 28 °C durante 24 h (Publicación 2). Teniendo en cuenta que diversos compuestos fenólicos han demostrado potente actividad antioxidante, además de presentar actividad anticancerígena y antiinflamatoria (Liu y col., 2022; Matulja y col., 2022), el desarrollo de barritas enriquecidas en compuestos fenólicos es de indudable interés.

Con respecto a la actividad antioxidante determinada por el método ORAC, la barrita 18MSP mostró un valor elevado (647,2 mg TE/100 g ps), que fue un 22% superior a la observada en la barrita de control. El incremento del potencial antioxidante de la barrita al incorporar la harina de moringa germinada puede atribuirse a la acumulación de compuestos con actividad captadora de peroxilos durante la germinación de semillas de moringa (León-Lopez y col., 2019). Los ácidos fenólicos y los flavonoides, compuestos con reconocida actividad antioxidante (Gu y col., 2020), que han sido identificados en el aceite de semilla de moringa (Gharsallah et al., 2021) podrían contribuir a los altos valores de actividad antioxidante observados en la formulación 18MSP en comparación con la barrita control. Por su parte, el GABA y los glucosinolatos también han mostrado capacidad de neutralización de

radicales libres (Burĉul y col., 2018; Zhao y col., 2021; Tu y col., 2022), y podrían ser responsables, junto con los compuestos fenólicos y las vitaminas presentes en la harina de moringa germinada, de la alta capacidad antioxidante observada en la barrita 18MSP.

Con el objetivo de conocer la percepción de los consumidores acerca de las barritas enriquecidas en moringa desarrolladas, se realizó un análisis sensorial empleando un panel de 30 catadores que consumían barritas de cereales al menos una vez por semana. Se evaluaron 5 atributos sensoriales (apariencia, aroma, sabor, textura y aceptabilidad general) empleando una escala hedónica con 7 puntuaciones (-3, -2, -1, 0, +1, +2, +3), donde los valores negativos indican desagrado y los positivos agrado, y el valor absoluto indica la magnitud del desagrado/agrado. Los resultados indicaron que la incorporación de la harina de moringa germinada a la barrita afectó notablemente la percepción de los diferentes parámetros evaluados por parte de los panelistas. La textura y el aroma fueron los atributos mejor valorados en la barrita 18MSP, obteniendo mejor puntuación que la barrita control y fueron evaluados con la máxima puntuación por parte del 60-70% de los panelistas. No se observaron diferencias significativas para el atributo apariencia entre las barritas control y 18MSP, resultados de gran relevancia ya que la apariencia es uno de los parámetros más importantes que determinan la elección de un producto (Ciurzyńska y col., 2019). Las diferencias más importantes entre ambas formulaciones de barritas se observaron en el sabor, atributo que recibió peores valoraciones en la barrita 18MSP que en la control. El amargor y la astringencia son atributos asociados al sabor de la semilla de moringa, debido a la presencia de glucosinolatos, compuestos fenólicos y ácidos grasos insaturados (Chinma y col., 2014b, Methakullawat y Lorjaroenphon, 2019). Estos atributos probablemente sean responsables de la peor valoración del sabor de las barritas suplementadas con la harina de moringa germinada en comparación a la barrita control. A pesar de esta valoración, hay que destacar que el sabor del prototipo 18MSP fue bien valorado por el 40% de los panelistas. La incorporación de plátano y coco deshidratados en mayores niveles o la incorporación de nuevos ingredientes saludables que sean sabrosos y enmascaren el regusto amargo de la moringa germinada, así como la realización de procesos para eliminar este amargor de la semilla de moringa podrían mejorar su sabor (Ogunsina y col., 2011). A pesar de que el sabor fue el atributo peor valorado, la aceptabilidad sensorial general de la barrita suplementada con moringa fue satisfactoria y gustó al 70% de los panelistas, teniendo en cuenta que es un alimento nuevo con el que los consumidores están poco familiarizados. Estudios previos han puesto de manifiesto que los beneficios para la salud es uno de los principales factores que motivan las opciones de consumo

(Pink y col., 2022) y que más del 70% de los consumidores ingerirían más alimentos derivados de vegetales si contasen con efectos saludables demostrados (Mäkinen y col., 2015). Además, un estudio reciente ha evidenciado que el empleo de vegetales locales cultivados en zonas de proximidad incrementa la probabilidad de consumir alimentos derivados de los mismos (Jaeger y Giacalone, 2021). El conjunto de estos hallazgos junto con los altos valores de aceptabilidad general encontrados en nuestro estudio sugiere que las barritas enriquecidas con harina de moringa germinada presentan alta probabilidad de ser consumidos por la población.

Considerando que la disposición a comprar y consumir un alimento no depende solo de sus características sensoriales sino también de su precio, se realizó una estimación de los costes potenciales derivados de la producción industrial de las barritas suplementadas con un 18% de harina de moringa germinada y del precio de venta. Para el cálculo de los costes de producción se consideró una producción de 25.000 unidades y se tuvo en cuenta el coste de los materiales, mano de obra, costes indirectos e impuestos y se calculó el coste de producción por unidad de barrita. Se calculó, también, la eficiencia del proceso teniendo en cuenta las diferentes etapas de producción, que fue de aproximadamente del 90%. Se estimó que por cada 45.000 g de la mezcla de materias primas/hora se podría obtener unas 1.160 barritas de 35 g, con un coste de producción de 45 dólares ($). Para calcular el coste de venta se tuvieron en cuenta los costes unitarios de producción y el margen de contribución, considerando el precio medio de los snacks tipo barrita en Ecuador. El coste estimado de venta resultó ser de $ 0,75. En Ecuador, este tipo de barritas tienen un coste unitario de mercado en el rango $ 0,36-1,14, siendo el precio medio unitario de $ 0,62. Teniendo en cuenta el alto valor añadido de la barrita 18MSP, que añade un plus en nutrientes y compuestos bioactivos beneficiosos para la salud, y que la salud es uno de los principales motores que determinan la elección de un alimento y la disposición a pagar más por parte del consumidor (Timpanaro y col., 2020; Pink y col., 2022), podemos inferir que $ 0,75 sería un precio aceptable para una barrita enriquecida en moringa para los consumidores ecuatorianos.

Con el fin de conocer la actitud del consumidor ecuatoriano sobre los snacks tipo barrita y su conocimiento sobre los beneficios saludables de la moringa, así como su disposición a comprar barritas enriquecidas con moringa, se realizó un cuestionario con 10 preguntas a ecuatorianos jóvenes (20-34 años) de clase social media (con ingresos iguales o superiores al salario básico). Se garantizó el anonimato de los participantes con el fin de contrarrestar las inclinaciones a ofrecer respuestas "socialmente correctas". El cuestionario comprendía preguntas dedicadas a la frecuencia de consumo de barritas, los motivos que influyen en su

consumo, el conocimiento de los participantes sobre la moringa y sus beneficios nutricionales y en salud, la predisposición a comprar una barrita enriquecida con moringa y el precio máximo que como potencial consumidor estaría dispuesto a pagar por esta nueva barrita. Se realizaron un total de 104 cuestionarios válidos, que se consideraron una muestra representativa de la población de referencia (población adulta de 20-34 años de Guayaquil, estimada en 592.736 personas) (INEC, 2011). El cuestionario realizado indicó que el 29% de los encuestados consume barritas dos o más veces a la semana, el 33% una vez a la semana, el 20% una vez al mes y el 18% dos o tres veces al mes. La frecuencia de consumo de barritas por parte de los consumidores ecuatorianos es inferior a la publicada por Leite Munhoz y col. (2014) en consumidores brasileños, quienes indicaron una frecuencia de consumo de barritas de cereales de tres veces a la semana en el 60% de los encuestados. En cambio, Costa y col. (2021), encontraron que el 17% de los encuestados brasileños consumían barritas de cereales de 1 a 4 veces por semana. La principal razón señalada por los encuestados ecuatorianos para consumir barritas fue su sabor (34%), seguido de su valor nutricional y el hecho de que sea un alimento que proporciona energía (25%), la posibilidad de que su consumo contribuya a la prevención de enfermedades (18%), la facilidad de consumo (12%) y otras razones (11%). Con respecto al conocimiento sobre la moringa, el 52% de los encuestados declaró conocer sus beneficios nutricionales y en la salud, mientras que el 48% desconocía sus efectos saludables. Por último, en cuanto a la intención de compra, el 79% de los participantes indicaron que probablemente comprarían barritas que contienen moringa, lo que sugiere que el alimento desarrollado en esta Tesis Doctoral representa una oportunidad de innovación en el nicho de mercado de los snaks tipo barritas en Ecuador. La moringa es un árbol muy conocido en Ecuador, donde se consumen sus hojas desde tiempos ancestrales por sus propiedades nutricionales y promotoras de salud (Guaycha-Pérez y col., 2017), y es de cultivo local, hecho que explicaría la alta intención de compra observada. Así mismo, se ha descrito que los ingredientes novedosos se consideran más aceptables para el consumo si se incluyen en un producto que se percibe como apropiado para llevar ingredientes novedosos (Stone y col., 2022), siendo los snacks tipo barrita uno de los alimentos en los que más se innova en cuanto a ingredientes funcionales se refiere.

Con respecto a la pregunta relativa a la disposición de los participantes a pagar por la barrita, el 69% de los encuestados declaró que estarían dispuestos a pagar entre $ 0,5 y 1,0 por la compra de una barrita enriquecida con moringa, mientras que el 22% estaría dispuesto a pagar este producto a un precio superior, entre $ 1,5- 2,0, el 8% de los participantes estaría dispuesto a pagar entre $ 2,5 y 3,0 por este producto, y solo el 1% de los participantes aceptaría

un precio entre $ 3,5 y 4,0. Teniendo en cuenta que el coste unitario de producción se estimó en 0,45 $ y que el coste de venta propuesto fue de $ 0,75-1,0 por barrita (0,9-1,0 € en el caso de su venta en Europa) podría considerarse un precio aceptable para el consumidor, pero también rentable para la industria manufacturera. Estos resultados están de acuerdo con un estudio reciente que propone un precio de 1 € para una barrita de cereales elaborada con subproductos de la industria cervecera (Stelick y col., 2021).

VI. CONCLUSIONES

1. Las condiciones de germinación (tiempo y temperatura) afectaron al contenido de nutrientes y compuestos bioactivos, así como a la actividad antioxidante de las harinas de moringa germinada.
2. La germinación modificó la composición proximal de las harinas de moringa, causando un incremento del contenido proteico y una disminución del contenido de hidratos de carbono y cenizas, si bien el contenido lipídico y de fibra dietética apenas se vio afectado.
3. La temperatura de germinación ejerció mayor influencia que el tiempo sobre el contenido de tiamina y riboflavina en las harinas de moringa. Temperaturas de 28 °C y 36 °C no causaron modificaciones relevantes del contenido de tiamina, mientras que 32 °C causó una disminución de su contenido. En cambio, la acumulación de riboflavina se vio favorecida por la temperatura de 28 °C, mientras que temperaturas superiores no afectaron o bien disminuyeron sus niveles.
4. La glucomoringina fue el glucosinolato mayoritario en las harinas de moringa, seguido de la sinalbina. Los niveles de glucomoringina aumentaron tras la germinación a 28 °C y 96 h y a 32-36 °C durante 24-60 h, disminuyendo en el resto de las condiciones ensayadas. El contenido de sinalbina, en cambio, disminuyó en las harinas de moringa en todas las condiciones de germinación estudiadas. El contenido de glucosinolatos totales disminuyó cuando la germinación se realizó a temperaturas elevadas (32-36 °C) en combinación con tiempos largos (96 h), o temperaturas más bajas (28 °C) en combinación con tiempos cortos (≤60 h).
5. En las harinas de moringa germinada el contenido de GABA se vio incrementado especialmente cuando se emplearon tiempos largos (96 h) y la actividad antioxidante en a tiempos cortos de germinación (24 h).
6. La Metodología de Superficie de Respuesta permitió identificar 28 °C y 24 h como las condiciones óptimas de germinación para maximizar los niveles de riboflavina y la actividad antioxidante en las harinas de moringa, mientras que la temperatura de 36 °C en combinación con tiempos de 24 y 96 h maximizaron los niveles de tiamina y GABA, respectivamente.
7. La incorporación de harina de moringa germinada obtenida a 28 °C durante 24 h en el rango 5-30% (p/p) en sustitución de la harina de trigo permitió la obtención de pasta tipo tallarines con mayor contenido de proteína, grasa, fibra dietética, cenizas, tiamina,

riboflavina, GABA y glucosinolatos totales e individuales, así como mayor actividad antioxidante y menor contenido de hidratos de carbono que la pasta control. Las pastas suplementadas con harina de moringa germinada presentaron propiedades reológicas adecuadas, así como propiedades sensoriales aceptables cuando se incorporaron en el rango 5-10%.

8. La adición al 18% de harina de moringa germinada obtenida a 36 °C durante 96 h posibilitó la obtención de un snack tipo barrita de cereales con niveles superiores de proteína, grasa, tiamina, riboflavina, aminoácidos totales y contenido relativo de ácidos grasos insaturados, así como menor contenido en hidratos de carbono que la barrita control. La barrita suplementada con moringa, además, fue una excelente fuente de GABA y de glucosinolatos y mostró alta actividad antioxidante y buena aceptabilidad sensorial, así como una intención de compra favorable por parte de los consumidores.

9. La germinación es una alternativa natural, económica y sostenible para mejorar la calidad nutricional y el contenido de compuestos bioactivos de las harinas de semilla de moringa, que pueden ser utilizadas como ingredientes con valor añadido para la obtención de pastas y snacks nutritivos y saludables.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abarikwu, S. O., Benjamin, S., Ebah, S. G., Obilor, G., Agbam, G. (2017a). Protective effect of *Moringa oleifera* against $HgCl_2$-induced hepato and nephro-toxicity in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28, 337-345.

Abarikwu, S. O., Benjamin, S., Ebah, S. G., Obilor, G., Agbam, G. (2017b). Oral administration of *Moringa oleífera* oil but not coconut oil prevents mercury-induced estitcular toxicity in rats. *Andrologia*, 49, e12597.

Abd-Rabou, A. A., Zoheir, M. A., Kishta, M. S., Shalby, A. B., Ezzo, M. I. (2016). Nano-micelle of *Moringa oleifera* seed oil triggers mitochondrial cancer cell apoptosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17, 4928-4933.

Abdulkarim, S. M., Long, O. M., Muhammad, S. K. S., Ghazali, H. M. (2005). Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aquous enzymatic methods. *Food Chemistry*, 93, 253-263.

Abidin, Z., Mohd Zin, Z., Abdullah, M. A. A., Rusli, N. D. B., & Zainol, M. K. (2020). Physicochemical properties and sensory acceptance of Canavalia ensiformis tempeh energy bar. *Food Research,* 4, 1637-1645

Abiodun, O. A., Adegbite, J. A., Omolola, A. O. (2012). Chemical and physicochemical properties of Moringa flours and oil. *Global Journal of Science Frontier Research Biological Sciences*, 12, 1-7.

Adebayo, I. A., H. Arsad, N. N. S. b. N. M. Kamal, Samian, M. R. (2020). The hexane fraction of the *Moringa oleifera* Lam seed extract induces apoptosis, causes cell cycle arrest, and modulates expression of HSP60, NPM, PGK1, RCN1, and PDIA1 in MCF7 cells. *South African Journal of Botany*, 129, 379-387.

Aderinola, T. A., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M., Aluko, R. E. (2018). Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*, 4, e00877.

Aderinola, T. A., Lawal, O. E., Oluwajuyitan, T. D. (2020). Assessment of nutritional and microbiological properties of biscuit supplemented with *Moringa oleifera* seed protein concentrate. *Journal of Food Engineering and Technology*, 9, 22-29.

Aderonke Otunola, G., Jude Folayan, A. (2018). Chemical composition, antibacterial and in vitro anti-inflammatory potentials of essential oils from different plant parts of *Moringa oleífera* Lam. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 14, 210-220.

AESAN (2020). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el impacto del consumo de alimentos "ultra-

procesados" en la salud de los consumidores. Nº referencia: AESAN-2020-003. Autores: Oliag, P. T., Cámara Hurtado, M., Daschner, A., López García, E., Marín Sillué, S., Martínez Hernández, J. A., Morales Navas, F. J.

Agerbik, N., Olsen, C.E. (2012). Glucosinolate structures in evolution. *Phytochemistry*, 77, 16-45.

Aja, P. M., Ibiam, U. A., Uraku, A. J., Orji, O. U., Offor, C. E., Nwali, B. U. (2013). Comparative proximate and mineral composition of *Moringa oleifera* leaf and seed. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 2, 137-141.

Al Juhaimi, F., Ghafoor, K., Babiker, E. E., Matthäus, B., Özcan, M. M. (2017). The biochemical composition of the leaves and seeds meals of moringa species as non-conventional sources of nutrients. *Journal of Food Biochemistry*, 41, 1–7.

Aloo, S. O., Ofosu, F. K., Daliri, E. B. M., Oh, D. H. (2021a). UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS metabolite profiling of the antioxidant and antidiabetic activities of red cabbage and broccoli seeds and sprouts. *Antioxidants*, 10, 852.

Aloo, S. O., Ofosu, F. K., Kilonzi, S. M., Shabbir, U., Oh, D. H. (2021b). Edible plant sprouts: Health benefits, trends, and opportunities for novel exploration. *Nutrients*, 13, 2882.

Al-Malki, A. L., El Rabey, H. A. (2015). The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. *BioMed Research International*, Article ID 381040.

Al-Said, M. S., Mothana, R. A., Al-Yahya, M. A., Al-Blowi, A. S., Al-Sohaibani, M., Ahmed, A. F., Rafatullah, S. (2012). Edible oils for liver protection: Hepatoprotective potentiality of *Moringa oleifera* seed oil against chemical-induced hepatitis in rats. *Journal of Food Science*, 77, 124-130.

Aluko, O., Brai, M. R., & Adelore, A. O. (2013). Evaluation of sensory attributes of snack from maize-moringa seed flour blends. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 7, 944-946.

Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Lo Curto, R. B., Rosa, E. A. S., Lo Turco, V., Giuffrida, A., Curto, A. Lo, Crea, F., Timpo, G. M. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122, 1047–1054.

Amina, M., Bhat, R. S., Al-Dbass, A. M., Musayeib, N. M., Fahmy, R., Alhadlaq, L., El-Ansary, A. (2021). The protective effect of *Moringa oleifera* plant extract against glutamate-induced DNA damage and reduced cell viability in a primary retinal ganglion

cell line. *PeerJ*, 9, e11569.

Amrein, M. A., Scholz, U., Inauen, J. (2021). Compensatory health beliefs and unhealthy snack consumption in daily life. *Appetite*, 157, 104996.

Andini, S., Dekker, P., Gruppen, H., Araya-Cloutier, C., Vincken, J.P. (2019). Modulation of glucosinolate composition in *Brassicaceae* seeds by germinatin and fungal elicitaion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 12770–12779.

Anhwange, B. A., Ajibola, V. O., Oniye, S. J. (2004). Amino acid composition of the seeds of *Moringa oleifera* (Lam), *Detarium microcarpum* (Guill & Sperr) and *Bauhinia monandra* (Linn.). *Chemclass Journal*, 1, 9-13.

Anwar, F., Ashraf, M., & Bhanger, M. I. (2005). Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82, 45-51.

Anwar, F., Rashid, U. (2007). Physico-chemical characteristics of *Moringa oleifera* seeds and seed oil from a wild provenance of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 39, 1443-1453.

Aparicio-García, N., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., & Peñas, E. (2020). Changes in protein profile, bioactive potential and enzymatic activities of gluten-free flours obtained from hulled and dehulled oat varieties as affected by germination conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 134, 109955.

Aparicio-García, N., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Peñas, E. (2021a). Sprouted oat as a potential gluten-free ingredient with enhanced nutritional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 338, 127972.

Aparicio-García, N., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., Peñas, E. (2021b). Production and characterization of a novel gluten-free fermented beverage based on sprouted oat flour. *Foods*, 10, 139.

Apeh, V. O., Asogwa, E., Chukwuma, F. I., Okonkwo, O. F., Nwora, F., Uke, R. (2022). Chemical analysis and in silico anticancer and anti-inflammatory potentials of bioactive compounds from *Moringa oleifera* seed oil. *Advances in Traditional Medicine*, 22, 59-74.

Araújo, L. C. C., Santos Aguiar, J., Napoleão, T. H., Barreto Mota, F. V., Souza Barros, A. L., Moura, M. C., Cavalcanti Coriolano, M., Breitenbach Barroso Coelho, L. C., Goncalves Silva, T., Guedes Paiva, P. M. (2013). Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PloS One*, 8, e81973.

Asaduzzaman, A. K. M., Hasan, I., Chakrabortty, A., Zaman, S., Islam, S. S., Ahmed, F. R. S., Ahsanul Kabir, K. M., Nurujjaman, M. D., Belal Uddin, M., Taufiq Alam, M., Kumar Shaha, R., Kabir, S. R. (2018). *Moringa oleifera* seed lectin inhibits Ehrlich ascites

carcinoma cell growth by inducing apoptosis through the regulation of Bak and NF-κB gene expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1936-1944.

Atudorei, D., Stroe, S. G., Codină, G. (2021). Impact of germination on the microstructural and physicochemical properties of different legume types. *Plants*, 10, 592.

Atwell, L. L., Beaver, L. M., Shannon, J., Williams, D. E., Dashwood, R. H., & Ho, E. (2015). Epigenetic regulation by sulforaphane: opportunities for breast and prostate cancer chemoprevention. *Current Pharmacology Reports*, 1, 102-111.

Azad, A. K., Rasul, M. G., Khan, M. M. K., Sharma, S. C., & Islam, R. (2015). Prospect of Moringa seed oil as a sustainable biodiesel fuel in Australia: A review. *Procedia Engineering*, 105, 601-606.

Bag, S., Mondal, A., Majumder, A., Banik, A. (2022). Tea and its phytochemicals: Hidden health benefits & modulation of signaling cascade by phytochemicals. *Food Chemistry*, 371, 131098.

Baker, M. T., Lu, P., Parrella, J. A., Leggette, H. R. (2022). Consumer acceptance toward functional foods: A scoping review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19, 1217.

Bao, Y., Xiao, J., Weng, Z., Lu, X., Shen, X., Wang, F. (2020). A phenolic glycoside from Moringa oleifera Lam. improves the carbohydrate and lipid metabolisms through AMPK in db/db mice. *Food Chemistry*, 311, 125948.

Barakat, H., Ghazal, G. A. (2016). Physicochemical properties of *Moringa oleifera* seeds and their edible oil cultivated at different regions in Egypt. *Food and Nutrition Sciences*, 7, 472-484.

Barba, F. J., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Khelfa, A., Zhu, Z., Koubaa, M. (2016). Bioavailability of glucosinolates and their breakdown products: impact of processing. *Frontiers in Nutrition*, 3, 24.

Bauer, J. M., Aarestrup, S. C., Hansen, P. G., Reisch, L. A. (2022). Nudging more sustainable grocery purchases: Behavioural innovations in a supermarket setting. *Technological Forecasting and Social Change*, 179, 121605.

Bautista-Expósito, S., Vandenberge, A., Peñas, E., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. (2021). Lentil and fava bean with contrasting germination kinetics: A focus on digestion of proteins and bioactivity of resistant peptides. *Frontiers in Plant Science*, 12, 754287.

Bayomy, H., Alamri, E. (2022). Technological and nutritional properties of instant noodels enriched with chickpea and lentil flour. *Journal of King Saud University-Science*, *34*, 101833.

Bellostas, N., Sørensen, A. D., Sørensen, J. C., & Sørensen, H. (2007). Genetic variation and metabolism of glucosinolates. *Advances in Botanical Research*, 45, 369-415.

Bennet, R., Mellon, F., Foild, N., Pratt, J., Dupont, M., Perkins, L., & Kroon, P. (2003). Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative ans reproductive tissues of the multi-purpose tree *Moringa oleifera. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3546-3553.

Benincasa, P., Falcinelli, B., Lutts, S., Stagnari, F., Galieni, A. (2019). Sprouted grains: A comprehensive review. *Nutrients*, 11, 421.

Bolarinwa, I. F., Aruna, T. E., Raji, A. O. (2019). Nutritive value and acceptability of bread fortified with moringa seed powder. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 18, 195-200.

Bhinder, S., Singh, N., Kaur, A. (2022). Impact of germination on nutraceutical, functional and gluten free muffin making properties of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Food Hydrocolloids*, 124, 107268.

Boscaro, V., Boffa, L., Binello, A., Amisano, G., Fornasero, S., Cravotto, G., Gallicchio, M. (2018). Antiproliferative, proapoptotic, antioxidant and antimicrobial effects of *Sinapis nigra* L. and *Sinapis alba* L. extracts. *Molecules*, 23, 3004.

Boukandoul, S., Casal, S., Cruz, R., Pinho, C., Zaidi, F. (2017). Algerian *Moringa oleifera* whole seeds and kernels oils: Characterization, oxidative stability, and antioxidant capacity. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119, 1600410.

Bridgemohan, P., Bridgemohan, R., Mohamed, M. (2014). Chemical composition of a high protein animal supplement from *Moringa oleifera*. *African Journal of Food Science and Technology*, 5, 125-128.

Brilhante, R. S. N., Alencar Sales, J., Santos Pereira, V.., de Souza Collares Maia Castelo-Branco, D., de Aguiar Cordeiro, R., de Souza Sampaio, C. M., de Araújo Neto Paiva, M., Feitosa dos Santos, J. B., Costa Sidrim, J. J., Gadelha Rocha, M. F. (2017). Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10, 621–630.

Brufau, G., Canela, M. A., Rafecas, M. (2008). Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. *Nutrition Research*, 28, 217-225.

Budda, S., Butryee, C., Tuntipopipat, S., Rungsipipat, A., Wangnaithum, S., Lee, J. S., Kupradinun, P. (2011). Suppressive effects of *Moringa oleifera* Lam. pod against mouse colon carcinogenesis induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12, 3221-3228.

Bukowska, B., Duchnowicz, P. (2022). Molecular mechanism of action of selected substances involved in the reduction of benzo[a]pyrene-induced oxidative stress. *Molecules*, 27, 1379.

Burĉul, F., Mekinić, I. G., Radan, M., Rollin, P., Blažebic, I. (2018). Isothiocyanates: cholinesterase inhibiting, antioxidant, and anti-inflammatory actvity. *Journal of the Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33, 577-582.

Cáceres, P. J., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., Frias, J. (2014). Assessment of proximate composition, dietary fiber, phytic acid and protein hydrolysis of germinated Ecuadorian brown rice. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69, 261–267.

Cáceres, P. J., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C., Amigo, L., Frias, J. (2017). Enhancement of biologically active compounds in germinated Brown rice and the effect of sun-drying. *Journal of Cereal Science*, 73, 1-9.

Cardone, G., Grassi, S., Scipioni, A., Marti, A. (2020). Bread-making performance of durum wheat as affected by sprouting. *LWT-Food Science and Technology*, 134, 110021.

Carrera-Castaño, G., Calleja-Cabrera, J., Pernas, M., Gómez, L., Oñate-Sánchez, L. (2020). An updated overview on the regulation of seed germination. *Plants*, 9, 703.

Cataldo, P. G., Villegas, J. M., de Giori, G. S., Saavedra, L., Hebert, E. M. (2020). Enhancement of γ-aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108792.

Chandrashekar, S., Vijayakumar, R., Chelliah, R., Oh, D. H. (2020). Identification and purification of potential bioactive peptide of *Moringa oleifera* seed extracts. *Plants*, 9, 1445.

Chang, H. C., Wu, L. C. (2008). Texture and quality properties of Chinese fresh egg noodles formulated with green seaweed (*Monostroma nitidum*) powder. *Journal of Food Science*, 73, S398-S404.

Chapman, J., Power, A., Netzel, M., Sutanbawa, Y., Smyth, H. E., Truong, V. K., Cozzolino, D. (2021). Challenges and opportunities of the fourth revolution: a brief insight into the future of food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62, 2845-2853.

Chatepa, L. E. C., Mbewe, E. C. (2018). Proximate, physical and chemical composition of leaves and seeds of Moringa (*Moringa oleifera*) from Central Malawi: A potential for increasing animal food supply in the 21st century. *African Journal of Agricultural Research*, 13, 2872-2880.

Cheenpracha, S., Park, E. J., Yoshida, W. Y., Barit, C., Wall, M., Pezzuto, J. M., Chang, L. C.

(2010). Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 6598-6602.

Chen, K., Arora, R. (2011). Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). *Plant Science*, 180, 212-220.

Chen, R., Wang, X. J., Zhang, Y. Y., Xing, Y., Yang, L., Ni, H., Li, H. H. (2019a). Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds. *Food Chemistry*, 300, 125162.

Chen, C., Zhou, X., He, J., Xie, Z., Xia, S., & Lu, G. (2019b). The roles of GABA in ischemia-reperfusion injury in the central nervous system and peripheral organs. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 4028394.

Chinma, C. E., Abu, J. O., Akoma, S. N. (2014a). Effect of germinated tigernut and moringa flour blends on the quality of wheat-based bread. *Journal of Food Processing and Preservation,* 38, 721-727.

Chinma, C. E., Gbadamosi, K. B., Ogunsina, B. S., Oloyede, O. O., Salami, S. O. (2014b). Effect of addition of germinated moringa seed flour on the quality attributes of wheat-based cake. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38, 1737-1742.

Cho, H. J., Lim, D. Y., Kwon, G. T., Kim, J. H., Huang, Z., Song, H., Oh, Y.S., Kang, Y.H., Lee, K.W., Dong, Z. y Park, J. H. Y. (2016). Benzyl isothiocyanate inhibits prostate cancer development in the transgenic adenocarcinoma mouse prostate (TRAMP) model, which is associated with the induction of cell cycle G1 arrest. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 264.

Cho, D. H., & Lim, S. T. (2018). Changes in phenolic acid composition and associated enzyme activity in shoot and kernel fractions of brown rice during germination. *Food Chemistry*, 256, 163-170.

Cirmi, S., Ferlazzo, N., Gugliandolo, A., Musumeci, L., Mazzon, E., Bramanti, A., Navarra, M. (2019). Moringin from *Moringa oleifera* seeds inhibits growth, arrests cell-cycle, and induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells through the modulation of NF-κB and apoptotic related factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1930.

Ciurzyńska, A., Cieśluk, P., Barwińska, M., Marczak, W., Ordyniak, A., Lenart, A., Janowicz, M. (2019). Eating habits and sustainable food production in the development of innovative "healthy" snacks. *Sustainability*, 11, 2800.

Compaoré, W. R., Nikièma, P. A., Bassolé, H. I. N., Savadogo, A., Mouecoucou, J. (2011).

Chemical composition and antioxidative properties of seeds of *Moringa oleifera* and pulps of *Parkia biglobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in Burkina Faso. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 3, 64-72.

Connolly, E. L., Sim, M., Travica, N., Marx, W., Beasy, G., Lynch, G. S., Bondonno, C. P., Lewis, J. R., Hodgson, J. M., Blekkenhorst, L. C. (2021). Glucosinolates from cruciferous vegetables and their potential role in chronic disease: Investigating the preclinical and clinical evidence. *Frontiers in Pharmacology*, 12:767975.

Costa, I. M., da Silva, S. S. V., Silva, A. N. A., de Oliveira, F. M., Gonçalves, A. C. A., Trombete, F. M., Kobori, C. N. (2021). Physicochemical and sensory analysis of salted cereals bars developed with vegetables rich in carotenoids. *Research, Society and Development*, 10, e44210212824.

Cunha, D. S., Coelho, M. C., Ribeiro, S. C., Silva, C. C. G. (2022). Application of *Enterococcus malodoratus* SJC25 for the manufacture of whey-based beverage naturally enriched with GABA. *Foods*, 11,447.

Da Silva, E. P., Siqueira, H. H., do Lago, R. C., Rosell, C. M., Vilas Boas, E. V. D. B. (2014). Developing fruit-based nutritious snack bars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 52-56.

De Andrade Luz, L., Rossato, F. A., Costa, R. A. P., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Coelho, L. C. B. B. (2017). Cytotoxicity of the coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) to B16-F10 melanoma cells. *Toxicology in Vitro*, 44, 94-99.

D'egidio, M. G., Mariani, B. M., Nardi, S., Novaro, P., Cubadda, R. (1990). Chemical and technological variables and their relationships: A predictive equation for pasta cooking quality. *Cereal Chemistry*, 67, 275-281.

Dhawi, F., El-Beltagi, H. S., Aly, E., Hamed, A. M. (2020). Antioxidant, antibacterial activities and mineral content of buffalo yoghurt fortified with fenugreek and *Moringa oleifera* seed flours. *Foods*, 9, 1157.

DiNicolantonio, J. J., O'Keefe, J. H. (2018a). Effects of dietary fats on blood lipids: a review of direct comparison trials. *Open Heart*, 5, e000871.

DiNicolantonio, J. J., O'Keefe, J. H. (2018b). Importance of maintaining a low omega–6/omega–3 ratio for reducing inflammation. *Open Heart*, 5, e000946.

Ding, J., Hou, G. G., Nemzer, B. V., Xiong, S., Dubat, A., Feng, H. (2018). Effects of controlled germination on selected physicochemical and functional properties of whole-wheat flour and enhanced γ-aminobutyric acid accumulation by ultrasonication. *Food*

Chemistry, 243, 214-221.

Dorea, C. C. (2006). Use of *Moringa* spp. seeds for coagulation: a review of a sustainable option. *Water Supply*, 6, 219-227.

Dubey, K. D., Dora, J., Kumar, A., Gulsan, R. K. (2013). A multipurpose tree *Moringa oleifera*. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 2, 415-423.

Edeogu, C. O., Kalu, M. E., Famurewa, A. C., Asogwa, N. T., Onyeji, G. N., Ikpemo, K. O. (2019). Nephroprotective effect of *Moringa oleifera* seed oil on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: biochemical evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic pathways. *Journal of the American College of Nutrition*, 39, 307-315.

EFSA. (2010). Scientific opinion on dietary reference values for carbohydartes and dietary fibre. *EFSA Journal*, 8, 1462.

EFSA Panel on dietetic products, nutrition and allergies (NDA). (2015). Scientific opinion on dietary reference values for calcium. *EFSA Journal*, 13, 4101.

El Aziz, M. M. A., Ashour, A. S., & Melad, A. S. G. (2019). A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. *Journal of Nanomedicine Research*, 8, 282-288.

El-Baset Salama, M. A., Owon, M., Osman, M., Ibrahim, A., Matthäus, B. (2020). Effect of germination and roasting on oil profile of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2220-2229.

Elsayed, E. A., Sharaf-Eldin, M. A., Wadaan, M. (2015). In vitro evaluation of cytotoxic activities of essential oil from *Moringa oleifera* seeds on HeLa, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 4671-4675.

Engel, R.T., Schubert, H. (2005). Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 6, 233–237.

Eshak, E., Arafa, A. (2018). Thiamine deficiency and cardiovascular disorders. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28, 965-972.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56, 5-51.

Fahey, J.W. (2005). *Moringa oleifera*: A Review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Phytochemistry*, 47, 123-155.

Fahey, J. W., Olson, M. E., Stephenson, K. K., Wade, K. L., Chodur, G. M., Odee, D., Nouman, W., Massiah, M., Alt, J., Egner, P. A., Hubbard, W. C. (2018). The diversity of chemoprotective glucosinolates in Moringaceae (*Moringa* spp.). *Scientific Reports*, 8, 1-

14.

Faisal, M. I., Iqbal, S., Basra, S. M. A., Afzal, I., Saddiq, M. S., Bakhtavar, M. A., Hafeez, M. B., Rehman, H., Basit, A., Habib-ur-Rahman, M. (2020). Moringa landraces of Pakistan are potential source of premium quality oil. *South African Journal of Botany*, 129, 397-403.

Falowo, A. B., Mukumbo, F. E., Idamokoro, E. M., Lorenzo, J. M., Afolayan, A. J., Muchenje, V. (2018). Multi-functional application of *Moringa oleifera* Lam. in nutrition and animal food products: A review. *Food Research International*, 106, 317–334.

Famurewa, A. C., Aja, P. M., Nwankwo, O. E., Awoke, J. N., Maduagwuna, E. K., Aloke, C. (2019a). *Moringa oleifera* seed oil or virgin coconut oil supplementation abrogates cerebral neurotoxicity induced by antineoplastic agent methotrexate by suppression of oxidative stress and neutron-inflammation in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 43, e12748.

Famurewa, A. C., Asogwa, N. T., Aja, P. M., Akunna, G. G., Awoke, J. N., Ekeleme-Egedigwe, C. A., Maduagwuna, E. K., Folawiyo, A. M., Besong, E. E., Ekpono, E. U., Nwoha. (2019b). *Moringa oleifera* seed oil modulates redox imbalance and iNOS/NF-κβ/caspase-3 signaling pathway to exert antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic mechanisms against anticancer drug 5-fluorouacil-induced nephrotoxicity in rats. *South African Journal of Botany*, 127, 96-103.

FAO/WHO (2001). Human vitamina and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Tailandia. Disponible en: https://www.fao.org/3/y2809e/y2809e.pdf (consultado por última vez el 18/04/2022).

FAO, IFAD, UNICEF, WFP, WHO (2019). The state of food security and nutrition in the world 2019: Safeguarding against economic slowdowns and downturns. Rome, FAO. Disponible en: http://www.fao.org/3/ca5162en/ca5162en.pdf (consultado por última vez el 20/04/2022).

Feng, X., Ma, J., Liu, Z., Li, X, Wu, Y., Hou, L. (2021). Analysis of glucosinolate content and metabolism related genes in different parts of chinese flowering cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 12, 767898.

Fernandes, Â., Bancessi, A., Pinela, J., Dias, M. I., Liberal, Â., Calhelha, R. C.,Ćirić, A., Soković, M., Catarino, L., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L. (2021). Nutritional and phytochemical profiles and biological activities of *Moringa oleifera* Lam. edible parts from Guinea-Bissau (West Africa). *Food Chemistry*, 341, 128229.

Fernandez-Orozco, R., Piskula, M. K., Zielinski, H., Kozlowska, H., Frias, J., Vidal-Valverde, C. (2006). Germination as a process to improve the antioxidant capacity of *Lupinus angustifolius* L. var. Zapaton. *European Food Research and Technology*, 223, 495-502.

Figuereido de Sousa, M., Guimarães, R. M., de Oliveira Araújo, M., Barcelos, K. R., Carneiro, N. S., Lima, D. S., Costa D., de Aleluia K.B., Fernandes, K. F., Mayra Conceição Martins, M. C., Egea, M. B. (2019). Characterization of corn (*Zea mays* L.) bran as a new food ingredient for snack bars. *LWT-Food Science and Technology*, 101, 812-818.

Fila, M., Chojnacki, C., Chojnacki, J, Blasiak, J. (2021). Nutrients to improve mitochondrial function to reduce brain energy deficit and oxidative stress in migraine. *Nutrients*, 13, 4433.

Flora, S. J., Pachauri, V. (2011). Moringa (*Moringa oleifera*) seed extract and the prevention of oxidative stress. En *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention Academic Press*, 775-785.

Foidl, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001). The potential of Moringa oleifera for agricultural and industrial uses. The miracle tree: The multiple attributes of Moringa. En: 1st What Development Potential for Moringa products?, Dar Es Salaam, Tanzania, 20, 45-76.

Föster, N., Ulrich, C., Schreiner, M., Müller, C. T., Mewis, I. (2015). Development of a reliable extraction and quantification method of glucosinolates in *Moringa oleifera*. *Food Chemistry*, 166, 456-464.

Fowoyo, P. T., Oladoja, E. O. (2015). Phytochemical screening, nutritional composition and antimicrobial activity of *Moringa oleifera* seed and leaf extract against selected gastrointestinal pathogens. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 10, 116-124.

Fradinho, P., Niccolai, A., Soares, R., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I, Raymundo, A. (2020). Effect of *Arthrospira platensis* (spirulina) incorporation on the rheological and bioactive properties of gluten-free fresh pasta. *Algal Research*, 45, 101743.

França, F. R. M., dos Santos Freitas, L., Ramos, A. L. D., da Silva, G. F., Brandão, S. T. (2017). Storage and oxidation stability of commercial biodiesel using *Moringa oleifera* Lam. as an antioxidant additive. *Fuel*, 203, 627-632.

Fu, X., Su, J., Hou, L., Zhu, P., Hou, Y., Zhang, K., Li, H., Liu, X., Jia, C., Xu, J. (2021). Physicochemical and thermal characteristics of *Moringa oleifera* seed oil. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 4, 685-695.

Fuel, M., Mesas, C., Martínez, R., Ortiz, R., Quinonero, F., Prados, J., Porres, J. M., Melguizo,

C. (2021). Antioxidant and antiproliferative potential of ethanolic extracts from *Moringa oleifera*, *Tropaeolum tuberosum* and *Annona cherimola* in colorrectal cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 143, 112248.

Fuentes de Mendoza, M., Miguel Gordillo, C. D., Ranalli, A., Franco Baltasar, M. N., Martínez Cano, M., & Martín Vertedor, D. (2015). Chemical composition and sensory evaluation of virgin olive oils from "Morisca" and "Carrasqueña" olive varieties. *Grasas y Aceites*, 66.

Fuglie L.J. (2001). Combating malnutrition with Moringa. En: J. Lowell, L.J. Fuglie (Ed.), The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa. *CTA Publication, Wageningen, The Netherlands*, 117-136.

Galuppo, M., Nicola, G. R. D., Iori, R., Dell'Utri, P., Bramanti, P., Mazzon, E. (2013). Antibacterial activity of glucomoringin bioactivated with myrosinase against two important pathogens affecting the health of long-term patients in hospitals. *Molecules*, 18, 14340-14348.

Galuppo, M., Giacoppo, S., De Nicola, G. R., Iori, R., Navarra, M., Lombardo, G. E., Bramanti, P., Mazzon, E. (2014). Antiinflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Fitoterapia*, 95, 160-174.

Gharsallah, K., Rezig, L., Msaada, K., Chalh, A., Soltani, T. (2021). Chemical composition and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil. *South African Journal of Botany*, 137, 475-482.

Ghazali, H. M., Mohammed, A. S. (2011). Moringa (*Moringa oleifera*) seed oil: composition, nutritional aspects, and health attributes. In *Nuts and seeds in health and disease prevention. Academic Press*, 787-793.

Giacoppo, S., Galuppo, M., De Nicola, G. R., Iori, R., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2015). 4(α-l-rhamnosyloxy)-benzyl isothiocyanate, a bioactive phytochemical that attenuates secondary damage in an experimental model of spinal cord injury. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 80-88.

Giacoppo, S., Rajan, T. S., De Nicola, G. R., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., Mazzon, E. (2017a). The Isothiocyanate isolated from *Moringa oleifera* shows potent anti-inflammatory activity in the treatment of murine subacute Parkinson's disease. *Rejuvenation Research*, 20, 50-63.

Giacoppo, S., Rajan, T. S., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., Mazzon, E. (2017b). The α-cyclodextrin complex of the Moringa isothiocyanate suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells through Akt and p38 inhibition.

Inflammation Research, 66, 487-503.

Giuberti, G., Rocchetti, G., Montesano, D., Lucini, L. (2021). The potential of *Moringa oleifera* in food formulation: A promising source of functional compounds with health-promoting properties. *Current Opinion in Food Science*, 42, 257-269.

González-Garza, N. G., Chuc Koyoc, J. A., Torres Castillo, J. A., García Zambrano, E. A., Betancur Ancona, D., Chel Guerrero, L., & Sinagawa García, S. R. (2017). Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (Moringa oleifera). *Journal of Food Science and Technology*, 54, 4268-4276.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumar, D.S. (2016). *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Science and Human Wellness*, 5, 49–56.

Graça, J., Godinho, C. A., Truninger, M. (2019). Reducing meat consumption and following plant-based diets: Current evidence and future directions to inform integrated transitions. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 380-390.

Grasi, S., Cardone, G., Bigagnoli, D., Marti, A. (2018). Monitoring the germinating process of wheat by non-conventional approaches. *Journal of Cereal Science*, 83, 180–187.

Gu, X., Yang, Y., Wang, Z. (2020). Nutritional, phytochemical, antioxidant, α-glucosidase and α-amylase inhibitory properties of *Moringa oleifera* seeds. *South African Journal of Botany*, 133, 151-160.

Guaycha-Pérez, N., Jaramillo-Jaramillo, C., Cuenca-Buele, S., Tocto-León, J., Márquez-Hernández, I. (2017). Estudios farmacognósticos y toxicológicos preliminares de hojas, tallo y raíz de moringa (*Moringa oleifera* Lam.). *Revista ciencia UNEMI*, 10(22), 60-68.

Gupta, S., Jain, R., Kachhwaha, S., Kothari, S. L. (2018). Nutritional and medicinal applications of *Moringa oleifera* Lam. Review of current status and future possibilities. *Journal of Herbal Medicine*, 11, 1–11.

Guzmán-Albores, J. M., Bojórquez-Velázquez, E., León-Rodriguez, A., de Jesús Calva-Cruz, O, Barba de la Rosa, A. P., Ruíz-Vladiviezo, V. M. (2021). Comparison of *Moringa oleífera* oils extracted with supercritical fluids and hexane and characterization of seed storage proteins in defatted flour. *Food Bioscience*, 40, 100830.

Hamza, A. A. (2010). Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam. seed extract on liver fibrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 345-355.

Hanschen, F. S., Kühn, C., Nickel, M., Rohn, S., Dekker, M. (2018). Leaching and degradation kinetics of glucosinolates during boiling of *Brassica oleracea* vegetables and the formation of their breakdown products. *Food Chemistry*, 263, 240-250.

Hashem, F. A., Motawea, H., El-Shabrawy, A. E., Shaker, K., El-Sherbini, S. (2012).

Myrosinase hydrolysates of *Brassica oleraceae* L. var. italic reduce the risk of colon cancer. *Phytotherapy Research*, 26, 743-747.

He, T. B., Huang, Y. P., Huang, Y., Wang, X. J., Hu, J. M., Sheng, J. (2018). Structural elucidation and antioxidant activity of an arabinogalactan from the leaves of *Moringa oleifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 126-133.

Headey, D., Heidkamp, R., Osendarp, S., Ruel, M., Scott, N., Black, R., Shekar, M., Bouis, H., Flory, A., Haddad, L., Walker, N. (2020). Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. *The Lancet*, 396, 519-521.

Hedhili, A., Lubbers, S., Bou-Maroun, E., Griffon, F., Akinyemi, B. E., Husson, F., Valentin, D. (2021). *Moringa oleifera* supplemented biscuits: Nutritional values and consumer segmentation. *South African Journal of Botany*, 138, 406-414.

Hinojosa-Nogueira, D., Muros, J. A., Rufián-Henares, J. A., Pastoriza, S. (2017). New method to estimate total polyphenol excretion: Comparison of Fast Blue BB versus Folin-Ciocalteu Performance in Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 4216-4222.

Hong Le, P., Parmentier, N., Trung Le, T., & Raes, K. (2021). Evaluation of using a combination of enzymatic hydrolysis and lactic acid fermentation for γ-aminobutyric acid production from soymilk. *LWT-Food Science and Technology*, 142, 111044.

Horstmann, S. W., Atzler, J. J., Heitmann, M., Zannini, E., Lynch, K. M., Arendt, E. K. (2019). A comparative study of gluten-free sprouts in the gluten-free bread-making process. *European Food Research and Technology*, 245, 617-629.

Hrubša, M., Siatka, T., Nejmanová, I., Vopršalova, M., Krčmová, L. K., Matoušová, K., Javorská, L., Macáková, K., Mercolini, L., Remião, F., Máťuš, M., Mladěnka, P. (2022). Biological properties of vitamins of the B-complex, part 1: Vitamins B_1, B_2, B_3 y B_5. *Nutrients*, 14, 484.

Ibrahim, R. E., El-Houseiny, W., Behairy, A., Mansour, M. F., Abd-Elhakim, Y. M. (2019). Ameliorative effects of *Moringa oleifera* seeds and leaves on chlorpyrifos-induced growth retardation, immune suppression, oxidative stress, and DNA damage in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 505, 225-234.

Idris, A. A., Ishag, G, O. (2020). Physicochemical properties and fatty acids composition of Sudanese *Moringa Oleifera* seed oil. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 7, 911-920.

Ijarotimi, O. S., Adeoti, O. A., Ariyo, O. (2013). Comparative study on nutrient composition,

phytochemical, and functional characteristics of raw, germinated, and fermented *Moringa oleifera* seed flour. *Food Science & Nutrition*, 1, 452-463.

INEC (2011). Instituto Nacional Ecuatoriano de Estadística y Censos. https://www.ecuadorencifras. gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/ (ultimo acceso: 29 mayo 2022).

Irakli, M., Lazaridou, A., Biliaderis, C. G. (2020). Comparative evaluation of the nutritional, antinutritional, functional, and bioactivity attributes of rice bran stabilized by different heat treatments. *Foods*, 10, 57.

Izadi, Z., Nasirpour, A., Garousi, G. (2012). Optimization of phytosterols dispersion in an oil/water emulsion using mixture design approach. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33, 1715-1722.

Jaafaru, M. S., Abd Karim, N. A., Eliaser, E. M., Maitalata Waziri, P., Ahmed, H., Barau M. M., Kong, L., Razis, A. F. A. (2018). Nontoxic glucomoringin-isothiocyanate (GMG-ITC) rich soluble extract induces apoptosis and inhibits proliferation of human prostate adenocarcinoma cells (PC-3). *Nutrients*, 10, 1174.

Jaeger, S. R., Giacalone, D. (2021). Barriers to consumption of plant-based beverages: A comparison of product users and non-users on emotional, conceptual, situational, conative and psychographic variables. *Food Research International*, 144, 110363.

Jaja-Chimedza, A., Graf, B. L., Simmler, C., Kim, Y., Kuhn, P., Pauli, G. F., Raskin, I. (2017). Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extract. *PloS One*, 12, e0182658.

Jaja-Chimedza, A., Zhang, L., Wolff, K., Graf, B. L., Kuhn, P., Moskal, K., Carmouche, R., Newman, S., Salbaum, J. M., Raskin, I. (2018). A dietary isothiocyanate-enriched moringa (*Moringa oleifera*) seed extracts improves glucose tolerance in a high-fat-diet mouse model and modulates the gut microbiome. *Journal of Functional Foods*, 47, 376-385.

Jahan, I. A., Hossain, M. H., Ahmed, K. S., Sultana, Z., Biswas, P. K., Nada, K. (2018). Antioxidant activity of *Moringa oleifera* seed extracts. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 18, 299-307.

Jan, R, Saxena, D. C., Singh, S. (2018). Comparative study of raw and germinated *Chenopodium* (*Chenopodium album*) flour on the basis of thermal, rheological, minerals, fatty acid profile and phytocomponents. *Food Chemistry*, 269, 173-180

Jeschke, V., Weber, K., Moore, S. S., Burow, M. (2019). Coordination of glucosinolate biosynthesis and turnover under different nutrient conditions. *Frontiers in Plant Science*,

10, 1560.

Jiang, L., Zhao, X., Xu, J., Li, C., Yu, Y., Wang, W., Zhu, L. (2019). The protective effect of dietary phytosterols on cancer risk: a systematic meta-analysis. *Journal of Oncology*, 2019, 1-11.

Jo, J. S., Bhandari, S. R., Kang, G. H., Shin, Y. K., Lee, J. G. (2022). Selection of broccoli (*Brassica oleracea* var. italic) on composition and content of glucosinolates and hydrolysates. *Scientia Horticulturae*, 298, 110984.

Jude-Ojei, B. S., Lola, A., Ajayi, I. O., Seun, I. (2017). Functional and pasting properties of maize 'Ogi'supplemented with fermented moringa seeds. *Journal of Food Processing and Technology*, 8, 10-4172.

Kaiser, A. E., Baniasadi, M., Giansiracusa, D., Giansiracusa, M., Garcia, M., Fryda, Z., Wong, T. L. (2021). Sulforaphane: A broccoli bioactive phytocompound with cancer preventive potential. *Cancers*, 13, 4796.

Kapse, G., Samadder, S. R. (2021). *Moringa oleifera* seed defatted press cake based biocoagulant for the treatment of coal beneficiation plant effluent. *Journal of Environmental Management*, 296, 113202.

Katan, M. B., Grundy, S. M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the managemente of blood colesterol levels. *Mayo Clinical Proceedings*, 78, 965-978.

Kaur, R., Ahluwalia, P., Sachdev, P. A., Kaur, A. (2018). Development of gluten-free cereal bar for gluten intolerant population by using quinoa as major ingredient. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 3584-3591.

Kawo, A., Abdullahi, B., Halilu, A., Gaiya, Z., Dabai, M., Dakare, M. (2009). Preliminary phytochemical screening, proximate and elemental composition of *Moringa oleifera* Lam seed powder. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 2, 96-100.

Kennedy, D. O. (2016). B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—a review. *Nutrients*, 8, 68.

Khan, J., Tousif, M. I., Saleem, M., Nazir, M., Touseef, S., Saleem, K., Asim, S., Khan, A., Asghar, M. A., Zengin, G., Shafiq, N., Qaisrani, M. M. (2021). Insight into the phytochemical composition, biological activities and docking studies of *Moringa oleifera* Lam. to authenticate its use in biopharmaceutical industries. *Industrial Crops & Products*, 172, 114042.

Khatkar, B. S. (2005). Dynamic rheological properties and bread-making qualities of wheat gluten: effects of urea and dithiothreitol. *Journal of the Science of Food and*

Agriculture, 85, 337-341.

Kim, M. J., Kwak, H. S., Kim, S. S. (2011). Effects of germination on protein, γ-aminobutyric acid, phenolic acids, and antioxidant capacity in wheat. *Molecules*, 23, 2244.

Kim, H. S., Lee, E. J., Lim, S. T., Han, J. A. (2015). Self-enhancement of GABA in rice bran using various stress treatments. *Food Chemistry*, 172, 657-662.

Kim, Y., Wu, A. G., Jaja-Chimedza, A., Graf, B. L., Waterman, C., Verzi, M. P., Raskin, I. (2017). Isothiocyanate-enriched moringa seed extract alleviates ulcerative colitis symptoms in mice. *PloS One*, 12, e0184709.

Kim, Y., Jaja-Chimedza, A., Merrill, D., Mendes, O., Raskin, I. (2018). A 14-day repeated-dose oral toxicological evaluation of an isothiocyanate-enriched hydro-alcoholic extract from *Moringa oleifera* Lam. seeds in rats. *Toxicology Reports*, 5, 418-426.

Klopsch, R., Baldermann, S., Hanschen, F. S., Voss, A., Rohn, S., Schreiner, M., & Neugart, S. (2019). Brassica-enriched wheat bread: Unraveling the impact of ontogeny and breadmaking on bioactive secondary plant metabolites of pak choi and kale. *Food Chemistry*, 295, 412-422.

Koehler, P., Hartmann, G., Wieser, H., Rychlik, M. (2007). Changes in folates, dietary fiber, and proteins in wheat as affected by germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4678-4683.

Kumar, A., Mohanty, V., Yashaswini, P. (2018). Development of high protein nutrition bar enriched with Spirulina plantensis for undernourished children. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 6, 835-844.

Lalas, S., Tsaknis, J. (2002). Characterization of *Moringa oleifera* seed oil variety "Periyakulam 1". *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 65-77.

Lanjwani, A. H., Ghanghro, A. B., Khuhawar, T. M. J., Lanjwani, M. F. (2021). Nutritional assessment and biological activity of *Moringa oleifera*. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences*, 64, 1-6.

Leelawat, S, Leelawat, K. (2014). *Moringa oleifera* extracts induce cholangiocarcinoma cell apoptosis by induction of reactive oxygen species production. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6, 183-189.

Leite Munhoz, C., Avellaneda Guimaraes, R. C., Nozaki, V. T., Argando˜na, E. J. S., Hiane, P. A., & Rodrigues Macedo, M. L. (2014). Preparation of a cereal bar containing bocaiuva: Physical, nutritional, microbiological and sensory evaluation. *Acta Scientiarum Technology*, 36, 553–560.

Lemmens, E., Moroni, A. V., Pagand, J., Heirbaut, P., Ritala, A., Karlen, Y., Kim-Anne, L., Van den Broeck, H. C., Brouns, F. J. P. H., De Brier, N., Delcour, J. A. (2019). Impact of cereal seed sprouting on its nutritional and technological properties: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *18*, 305–328.

León-López, L., Bañuelos-Piña, A. M., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., Contreras-Andrade, I., Sánchez-Magaña, L. M., Cuevas-Rodríguez, E. O. (2019). Optimisation of temperature and time for the dark germination bioprocess of *Moringa oleifera* seeds to boost nutritional value, total phenolic content and antioxidant activity. *International Food Research Journal*, 26, 831-839.

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 12791-12835.

Lesten, E. C. C., Emmanuel, C. M. (2018). Proximate, physical and chemical composition of leaves and seeds of Moringa (*Moringa oleifera*) from Central Malawi: A potential for increasing animal food supply in the 21st century. *African Journal of Agricultural Research*, *13*, 2872–2880.

Li, S., & Kallas, Z. (2021). Meta-analysis of consumers' willingness to pay for sustainable food products. *Appetite*, 163, 105239.

Li, J., Zhang, Z., Liu, X., Wang, Y., Mao, F., Mao, J., Lu, X., Jiang, D., Wan, Y., Lv, J. Y., Cao, G., Zhang, J., Zhao, N., Atkinson, M., Greiner, D. L., Prud´homme, G. J., Jiao, Z., Li, Y., Wang, Q. (2015). Study of GABA in healthy volunteers: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 260.

Li, Y. J., Ji, Q. Q., Wang, Z., Shen, L. H., He, B. (2020). *Moringa oleifera* seeds mitigate myocardial injury and prevent ventricular failure induced by myocardial infarction. *American Journal of Translational Research*, 12, 4511.

Liang, L., Wang, C., Li, S., Chu, X., Sun, K. (2019). Nutritional compositions of Indian Moringa oleifera seed and antioxidant activity of its polypeptides. *Food Science & Nutrition*, 7, 1754-1760.

Liao, P. C., Lai, M. H., Hsu, K. P., Kuo, Y. H., Chen, J., Tsai, M. C., Li, C. X., Yin, X. J., Chao, L. K. P. (2018). Identification of β-sitosterol as in vitro anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 10748-10759.

Limmongkon, A., Nopprang, P., Chaikeandee, P., Somboon, T., Wongshaya, P., Pilaisangsuree, V. (2018). LC-MS/MS profiles and interrelationships between the anti-

Inflammatory activity, total phenolic content and antioxidant potential of Kalasin 2 cultivar peanut sprout crude extract. *Food Chemistry*, 239, 569–578.

Liu, Y., Wang, X-Y., Wei, X-M., Gao, Z-T., Han, J-P. (2018). Values, properties and utility of different parts of *Moringa oleifera*: An overview. *Chinese Herbal Medicines*, 10, 371-378.

Liu, G., Zhu, W., Zhang, J., Song, D., Zhuang, L., Ma, Q., Yang, X., Liu, X., Zhang, J., Zhang, H., Wang, J., Liang, L. y Xu, X. (2022). Antioxidant capacity of phenolic compounds separated from tea seed oil in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 371, 131122.

Liu, K., Gao, M., Jiang, H., Out, S., Li, X., He, R., Li, Y. (2022). Light intensity and photoperiod affect growth and nutritional quality of brassica microgreens. *Molecules*, 27, 883.

Lombardo, M., Guseva, E., Perrone, M. A., Müller, A., Rizzo, G., Storz, M. A. (2021). Changes in eating habits and physical activity after COVID-19 pandemic lockdowns in Italy. *Nutrients*, 13, 4522.

Lopez-Rodriguez, N. A., Gaytán-Martínez, M., de la Luz Reyes-Vega, M., Loarca-Piña, G. (2020). Glucosinolates and isothiocyanates from moringa oleifera: Chemical and biological approaches. *Plant Foods for Human Nutrition*, 75, 447-457.

López-Salazar, V., Tapia, M. S., Tobón-Cornejo, S., Díaz, D., Alemán-Escondrillas, G., Granados-Portillo, O., Noriega, L., Tovar, A. R., Torres, N. (2021). Consumption of soybean or olive oil at recommended concentrations increased the intestinal microbiota diversity and insulin sensitivity and prevented fatty liver compared to the effects of coconut oil. *The Journal of Nutritional Biochemistry,* 94, 108751.

Luo, Y-W., Xie, W-H, Jin, X-X, Wang, Q, He, Y-J. (2014). Effects of germination on iron, zinc, caldium, manganese, and copper availability from cereals and legumes. *CyTA-Journal of Food*, 12, 22-26.

Luo, S., An, R., Zhou, H., Zhang, Ling, J., Hu, H. (2022). The glucosinolate profiles of *Brassicaceae* vegetables responded differently to quick-freezing and drying methods. *Food Chemistry*, 383, 132624.

Ma, Z. F., Ahmad, J., Zhang, H., Khan, I., Muhammad, S. (2020). Evaluation of phytochemical and medicinal properties of Moringa (*Moringa oleifera*) as a potential functional food. *South African Journal of Botany*, 129, 40-46.

Mabusela, S. P., Nkukwana, T. T., Mokoma, M., Muchenje, V. (2018). Layer performance, fatty acid profile and the quality of eggs from hens supplemented with *Moringa oleifera* whole seed meal. *South African Journal of Animal Science*, 48, 234-243.

Mahajan, S. G., Mali, R. G., Mehta, A. A. (2007a). Protective effect of ethanolic extract of seeds of Moringa oleifera Lam. against inflammation associated with development of arthritis in rats. *Journal of Immunotoxicology*, 4, 39–47.

Mahajan, S. G., Mali, R. G., Mehta, A. A. (2007b). Effect of *Moringa oleifera* Lam. seed extract on toluene diisocyanateinduced immune-mediated inflammatory responses in rats. *Journal of Immunotoxicology*, 4, 85–96.

Mahajan, S., Metha, A. (2008). Effect of *M. oleifera* Lam. Seed extract on ovalbumin-induced airway inflammation in guinea pigs. *Inhalation Toxicology Journal*, 20, 897.

Mahajan, S. G., Banerjee, A., Chauhan, B. F., Padh, H., Nivsarkar, M., Mehta, A. A. (2009). Inhibitory effect of n-butanol fraction of *Moringa oleifera* Lam. seeds on ovalbumin-induced airway inflammation in a guinea pig model of asthma. *International Journal of Toxicology*, 28, 519-527.

Maina, S., Misinzo, G., Bakari, G., & Kim, H. Y. (2020). Human, animal and plant health benefits of glucosinolates and strategies for enhanced bioactivity: A systematic review. *Molecules*, 25, 3682.

Mäkinen, O. E., Uniacke-Lowe, T., O'Mahony, J. A., Arendt, E. K. (2015). Physicochemical and acid gelation properties of commercial UHT-treated plant-based milk substitutes and lactore free bovine milk. *Food Chemistry*, 68, 630-638.

Maldini, M., Maksoud, S. A., Natella, F., Montoro, P., Petretto, G. L., Foddai, M., De Nicola, G. R., Chessa, M., Pintore, G. (2014). *Moringa oleifera*: study of phenolics and glucosinolates by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 49, 900-910.

Mangla, B., Javed, S., Sultan, M. H., Kumar, P., Kohli, K., Najmi, A., Alhazmi, H. A., Ahsan, W. (2021). Sulforaphane: A review of its therapeutic potentials, advances in its nanodelivery, recent patents, and clinical trials. *Phytotherapy Research*, 35, 5440-5458.

Marino, M., Martini, D., Venturi, S., Tucci, M., Porrini, M., Riso, P., Del Bo, C. (2021). An overview of registered clinical trials on glucosinolates and human health: The current situation. *Frontiers in Nutrition*, 8, 730906.

Martín, C., Martín, G., García, A., Fernández, T., Hernández, E. (2013). Potenciales aplicaciones de *Moringa oleífera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*, 36, 137–149.

Maruyama, S., Streletskaya, N. A., Lim, J. (2021). Clean label: Why this ingredient but not that one?. *Food Quality and Preference*, 87, 104062.

Mattes, R. D. (2018). Snacking: A cause for concern. *Physiology & Behavior*, 193, 279-283.

Matthew, O. J., Saidu, A. N., Jigam, A. A., Ocheme, O. B. (2021). Nutritional, antinutritional, and functional properties of different processed (soaking, germination, and boiling) flour

from *Moringa oleifera* Lam. (moringa) seed. *Journal of Food Processing and Preservation*, e16052.

Matulja, D., Vranješević F., Kolympadi Markovic, M.,Pavelić, S. K., Marković D. (2022). Anticancer activities of marine-derived phenolic compounds and their derivatives. *Molecules*, 27, 1449.

Mbah, B. O., Eme, P. E., Ogbusu, O. F. (2012a). Effect of cooking methods (boiling and roasting) on nutrients and anti-nutrients content of *Moringa oleifera* seeds. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11, 211-215.

Mbah, B. O., Eme, P. E., Paul, A. E. (2012b). Effect of drying techniques on the proximate and other nutrient composition of *Moringa oleifera* leaves from two areas in Eastern Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11, 1044-1048.

Mbithi-Mwikya, S., Van Camp, J., Yiru, Y., Huyghebaert, A. (2000). Nutrient and antinutrient changes in Finger Millet (*Eleusine coracan*) during sprouting. *LWT-Food Science and Technology*, 33, 9–14.

Megat Rusydi, M. R., Noraliza, C. W., Azrina, A., Zulkhairi, A. (2011). Nutritional changes in germinated legumes and rice varieties. *International Food Research Journal*, 18, 703-713.

Methakullawat, C., Lorjaroenphon, Y. (2019). Application of Moringa seed as sweetness-inducing substance. *Italian Journal of Food Science*, Special Issue, 1-7.

Miękus, N., Marszałek, K., Podlacha, M., Iqbal, A., Puchalski, C., Świergiel, A. H. (2020). Health benefits of plant-derived sulfur compounds, glucosinolates, and organosulfur compounds. *Molecules*, 25, 3804.

Minaiyan, M., Asghari, G., Taheri, D., Saeidi, M., & Nasr-Esfahani, S. (2014). Anti-inflammatory effect of *Moringa oleifera* Lam. seeds on acetic acid-induced acute colitis in rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4, 127-136.

Momanyi, D., Owino, W., & Makokha, A. (2020). Formulation, nutritional and sensory evaluation of baobab based ready-to-eat sorghum and cowpea blend snack bars. *Scientific African*, 7, e00215.

Monge, A., Silva Canella, D., López-Olmedo, N., Lajous, M., Cortés-Valencia, A., Stern, D. (2021). Ultraprocessed beverages and processed meats increase the incidence of hypertension in Mexican women. *British Journal of Nutrition*, 126, 600–611.

Moongngarm, A., Saetung, N. (2010). Comparison of chemical compositions and bioactive compounds of germinated rough rice and brown rice. *Food Chemistry*, 122, 782-788.

Motta-Romero, H., Santra, D., Rose, D., Zhang, Y. (2017). The dough rheological properties

and texture of gluten-free pasta based on proso millet flour. *Journal of Cereal Science*, 74, 238–243.

Muangnoi, C., Chingsuwanrote, P., Praengamthanachoti, P., Svasti, S., Tuntipopipat, S. (2012). *Moringa oleifera* pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell lines. *Inflammation*, 35, 445-455.

Munhoz, C. L., Guimarães, R. D. C. A., Nozaki, V. T., Sanjinez-Argandoña, E. J., Hiane, P. A., Macedo, M. L. R. (2014). Preparation of a cereal bar containing bocaiuva: physical, nutritional, microbiological and sensory evaluation. *Acta Scientiarum*. *Technology*, 36, 553-560.

Najdi Hejazi, S., Orsat, V. (2017). Optimization of the malting process for nutritional improvement of finger millet and amaranth flours in the infant weaning food industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68, 429-441.

Natsir, H., Wahab, A. W., Budi, P., Dali, S., Arif, A. R. (2019). Amino acid and mineral composition of *Moringa oleivera* leaves extract and its bioactivity as antioxidant. *Journal of Physics: Conference Series*, 1317, 012030.

Navyashree, N., Sngar, A. S., Sunil, C. K.,Venkatachalapathy, N. (2022). White finger millet (KMR-340): A comparative study to determine the effect of processing and their characterization. *Food Chemistry*, 374, 131665.

Ng, L. T., Huang, S. H., Chen, Y. T., Su, C. H. (2013). Changes of tocopherols, tocotrienols, γ-oryzanol, and γ-aminobutyric acid levels in the germinated brown rice of pigmented and nonpigmented cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 12604-12611.

Nguyen, H. D., Oh, H., Kim, M. S. (2022). An increased intake of thiamine diminishes the risk of metabolic síndrome in the Korean population with various comorbidities. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 16, 102443.

Oboh, G., Oyeleye, S. I., Akintemi, O. A., Olasehinde, T. A. (2018). *Moringa oleifera* supplemented diet modulates nootropic-related biomolecules in the brain of STZ-induced diabetic rats treated with acarbose. *Metabolic Brain Disease*, 33, 457–466.

Ogunsina, B. S., Radha, C., Govardhan Singh, R. S. (2010). Physicochemical and functional properties of full-fat and defatted Moringa oleifera kernel flour. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 2433-2439.

Ogunsina, B. S., Radha, C., Indrani, D. (2011). Quality characteristics of bread and cookies enriched with debittered *Moringa oleifera* seed flour. *International Journal of Food*

Sciences and Nutrition, 62, 185-194.

Oguntibeju, O. O., Aboua, G. Y., Omodanisi, E. I. (2020). Effects of *Moringa oleifera* on oxidative stress, apoptotic and inflammatory biomarkers in streptozotocin-induced diabetic animal model. *South African Journal of Botany*, 129, 354-365.

Oladipo, B., Betiku, E. (2019). Process optimization of solvent extraction of seed oil from Moringa oleifera: an appraisal of quantitative and qualitative process variables on oil quality using D-optimal design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101187.

Olaerts, H., Roye, C., Derde, L. J., Sinnaeve, G., Meza, W. R., Bodson, B., Courtin C. M. (2016). Impact of preharvest sprouting of wheat (*Triticum aestivum*) in the field on starch, protein, and arabinoxylan properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8324–8332.

Olagbemide, P. T., Philip, C. N. A. (2014). Proximate analysis and chemical composition of raw and defatted *Moringa oleifera* kernel. *Advances in Life Science and Technology*, 24, 92-99.

Olatosin, T. M., Akinduko, D. S., Uche, C. Z., Bardi, J. (2014). Effects of *Moringa oleifera* seed oil on acetaminophen-induced oxidative stress and liver damage in Wistar albino rats. *IOSR Journal of Pharmacological and Biological Sciences*, 9, 53-59.

Olson, M. E., Fahey, J. W. (2011). *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82, 1071-1082.

Olszewska, M. A., Granica, S., Kolodziejczyk-Czepas, J., Magiera, A., Czerwińska, M. E., Nowak, P., Rutkowska M., Wasińskia P. Owczarek, A. (2020). Variability of sinapic acid derivatives during germination and their contribution to antioxidant and anti-inflammatory effects of broccoli sprouts on human plasma and human peripheral blood mononuclear cells. *Food & Function*, 11, 7231-7244.

Omodanisi, E. I., Aboua, G. Y., Oguntibeju, O. O. (2017). Therapeutic potentials and pharmacological properties of *Moringa oleifera* Lam. in the treatment of diabetes mellitus and related complications. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 16, 1737-1746.

OMS, FAO, UNICEF, GAIN, MI, & FFI. (2009). Recomendaciones sobre el enriquecimiento de la harina de trigo y de maíz. Informe de reunión: Declaración de consenso provisional. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. Disponible en: https://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/wheat_maize_fort_es.pdf (consultado por última vez: 11/05/2022).

Ortega, A. (2003). A new role for GABA: Inhibition of tumor cell migration. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24, 151-154.

Otunola, G. A., Afolayan, A. J. (2018). Chemical composition, antibacterial and in vitro anti-inflammatory potentials of essential oils from different plant parts of Moringa oleifera lam. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 14, 210-220.

Owolabi, M. A., Ogah, C. O., Adebayo, K. O., Soremi, E. M. (2020). Evaluation of antidiabetic potential and biochemical parameters of aqueous pod extract of *Moringa oleifera* in alloxan diabetic rats. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 4, 50-57.

Owon, M., Osman, M., Ibrahim, A., Salama, M. A., Matthäus, B. (2021). Characterisation of different parts from *Moringa oleifera* regarding protein, lipid composition and extractable phenolic compounds. *Oilseeds & Fats Crops and Lipids*, 28, 45.

Oyeyinka, A. T., Oyeyinka, S. A. (2018). *Moringa oleifera* as a food fortificant: Recent trends and prospects. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *17*, 127–136.

Özcan, M. M., Ghafoor, K., Al Juhaimi, F., Ahmed, I. A. M., Babiker, E. E. (2019). Effect of cold-press and soxhlet extraction on fatty acids, tocopherols and sterol contents of the *Moringa* seed oils. *South African Journal of Botany*, 124, 333-337.

Pagand, J., Heirbaut, P., Pierre, A., Pareyt, B. (2017). The magic and challenges of sprouted grains. *Cereal Foods World*, 62, 221-225.

Palada, M. C. (2021). The role of moringa oleifera in agro-ecosystems: A review. *Acta Horticulturae*, 1306, 83-67.

Paliwal, R., Sharma, V., Pracheta, J. (2011). A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): A multipurpose tree with high economic and commercial importance. *Asian Journal of Biotechnology*, 3, 317–328.

Park, E. J., Cheenpracha, S., Chang, L. C., Kondratyuk, T. P., Pezzuto, J. M. (2011). Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by 4-[(2′-O-acetyl-α-L-rhamnosyloxy) benzyl] isothiocyanate from *Moringa oleifera*. *Nutrition and cancer*, 63, 971-982.

Pasqualone, A., Gambacorta, G., Summo, C., Caponio, F., Di Miceli, G., Flagella, Z., Marrese, P.P., Piro, G., Perrotta, C., De Bellis, L., Lenucci, M. S. (2016). Functional, textural and sensory properties of dry pasta supplemented with lyophilized tomato matrix or with durum wheat bran extracts produced by supercritical carbon dioxide or ultrasound. *Food Chemistry*, 213, 545-553.

Paucar-Menacho, L. M., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J., Peñas, E. (2017a). Optimization of germination time and temperatura to maximize the content of bioactive compounds and the antioxidant activity of purple corn (*Zea mays* L.) by response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 236-244.

Paucar-Menacho, L. M., Peñas, E., Dueñas, M., Frias, J., Martínez-Villaluenga, C. (2017b). Optimizing germination conditons to enhance the accumulation of bioactive compounds and the antioxidant activity of kiwicha (*Amaranthus caudatus*) using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 245-252.

Paucar-Menacho, L. M., Martínez-Villaluenga, C., Dueñas, M., Frias, J., Peñas, E. (2018). Response Surface optimisation of germiantion conditions to improve the accumulation of bioctive compounds and the antioxidant activity of quinoa. *International Journal of Food Science and Technology*, 53, 516-524.

Paulsen, E., Moreno, D. A., Periago, P. M., Lema, P. (2021). Influence of microwave bag vs. conventional microwave cooking on phytochemicals of industrially and domestically processed broccoli. *Food Research International*, 140, 110077.

Peñaranda, J. D., Bueno, M., Álvarez, F., Pérez, P. D., Perezábad, L. (2021). Sprouted grains in product development. Case studies of sprouted wheat for baking flours and fermented beverages. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 25, 100375.

Pereira, M. L., De Oliveira, H. D., De Oliveira, J. T. A., Gifoni, J. M., De Oliveira Rocha, R., De Oliveira Bezerra de Sousa, D., Vasconcelos, I. M. (2011). Purification of a chitin-finding protein from *Moringa oleífera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. *Protein and Peptide Letters*, 18, 1078-1085.

Perri, G., Coda, R., Rizzello, C. G., Celano, G., Ampollini, M., Gobbetti, M., De Angelis, M., Calasso, M. (2021). Sourdough fermentation of whole and sprouted lentil flours: In situ formation of dextran and effects on the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread. *Food Chemistry*, 355, 129638.

Pico, J., Pismag, R. Y., Laudouze, M., Martínez, M. M. (2020). Systematic evaluation of the Folin-Cioclateu and Fast Blue BB reactions during the analysis of total phenolics in legumes, nuts and plant sedes. *Food & Function*, 11, 9868-9880.

Pink, A. E., Stylianou, K. S., Lee, L. L., Jolliet, L. O., Cheon, B. K. (2022). The effects of presenting health and environmental impacts of food on consumption intentions. *Food Quality and Preference*, 98, 104501.

Plasek, B., Lakner, Z., Kasza, G., Temesi, A. (2020). Consumer evaluation of the role of functional food products in disease prevention and the characteristics of target groups. *Nutrients*, 12, 69.

Potestà, M., Minutolo, A., Gismondi, A., Canuti, L., Kenzo, M., Roglia, V., Macchi F., Grelli, S., Canini, A., Colizzi, V., Montesano, C. (2019). Cytotoxic and apoptotic effects of different extracts of *Moringa oleifera* Lam. on lymphoid and monocytoid

cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18, 5-17.

Quintanilha, G. E. O., Baptista, A. T. A., Gomes, R. G., Vieira, A. M. S. (2021). Yogurt production added ultrafiltered seed extract of Moringa oleifera Lam. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 37, 102159.

Rabie, M. M., Ibrahim, F. Y., Youssif, M. R. G., Ezz El-Ragal, N. M. (2020). Effect of *Moringa oleifera* leaves and seeds powder supplementation on quality characteristics of cookies. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 11, 65-73.

Ragusa, L., Picchi, V., Tribulato, A., Cavallaro, C., Lo Scalzo, R., Branca, F. (2017). The effect of the germination temperature on the phytochemical content of broccoli and rocket sprouts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68, 411-420.

Rahman, I. M., Barua, S., Nazimuddin, M., Begum, Z. A., Rahman, M. A., Hasegawa, H. (2009). Physicochemical properties of *Moringa oleifera* Lam. Seed oil of the indigenous-cultivar of Bangladesh. *Journal of Food Lipids*, 16, 540-553.

Rajan, T.S., De Nicola, G. R., Iori, R., Rollin, P., Bramanti, P., Mazzon, E. (2016a). Anticancer activity of glucomoringin isothiocyanate in human malignant astrocytoma cells. *Fitoterapia*, 110, 1–7.

Rajan, T. S., Giacoppo, S., Iori, R., De Nicola, G. R., Grassi, G., Pollastro, F., Bramanti, P., Mazzon, E. (2016b). Anti-inflammatory and antioxidant effects of a combination of cannabidiol and moringin in LPS-stimulated macrophages. *Fitoterapia*, 112, 104-115.

Rajendaran, C., Kirtana, S., Rashmi, V., Yadav, P., Anilakumar, K. R. (2020). Nutritional and anti-oxidant potential of commonly growing plant foods from southern India. *Defence Life Science Journal*, 5, 31-37.

Rajagukguk, Y. V., Arnold, M., Sidor, A., Kulczyński, B., Brzozowska, A., Schmidt, M., Gramza-Michałowska, A. (2022). Antioxidant activity, probiotic survivability, and sensory properties of a phenolic-rich pulse snack bar enriched with *Lactiplantibacillus plantarum*. *Foods*, 11, 309.

Rahmatullina, Y.R., Doronin, A.F., Vrzhesinskaya, O., Kodentsova, V. (2013). Content of Vitamins B_1 and B_2 in germinating grain. *Buletin of Experimental Biology and Medicine,* 154, 628–630.

Raman, J. K., Alves, C. M., Gnansounou, E. (2018). A review on moringa tree and vetiver grass–Potential biorefinery feedstocks. *Bioresource Technology*, 249, 1044-1051.

Ramachandran, C., Peter, K. V., Gopalakrishnan, P. K. (1980). Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. *Economic Botany*, 276-283.

Randriamboavonjy, J. I., Rio, M., Pacaud, P., Loirand, G., Tesse, A. (2017). *Moringa oleifera*

seeds attenuate vascular oxidative and nitrosative stresses in spontaneously hypertensive rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Article ID 4129459.

Rashid, U., Anwar, F., Moser, B. R., Knothe, G. (2008). *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. *Bioresource technology*, 99, 8175-8179.

Rashmi, D., Zanan, R., John, S., Khandagale, K., Nadaf, A. (2018). γ-Aminobutyric acid (GABA): Biosynthesis, role, commercial production, and applications. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 413-452.

Reglamento (EU) No 208/2013 de la Comisión del 11 de marzo de 2013 sobre los requisitos en materia de trazabilidad de los brotes y de las semillas destinadas a la producción de brotes. *Official Journal of the European Union*, L.68/16.

Rico, D., Peñas, E., García, M. C., Martínez-Villaluenga, C., Rai, D. K., Birsan, R. I., Frias, J., Martín-Diana, A. B. (2020). Sprouted barley flour as a nutritious and functional ingredient. *Foods*, 9, 296.

Rodríguez Gómez, M. J., Matías Prieto, J., Cruz Sobrado, V., & Calvo Magro, P. (2021). Nutritional characterization of six quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*) varieties cultivated in Southern Europe. *Journal of Food Composition and Analysis*, 99, 103876.

Rosental, L., Nonogaki, H., Fait, A. (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24, 1-15.

Saa, R. W., Fombang, E. N., Ndjantou, E. B., & Njintang, N. Y. (2019). Treatments and uses of *Moringa oleifera* seeds in human nutrition: A review. *Food Science and Nutrition*, 7, 1911–1919.

Saa, R. W., Nig, E. F., Radha, C., Ndjantou, E. B., Yanou, N. N. (2022). Effect of soaking, germination, and roasting on the proximate composition, antinutrient content, and some physicochemical properties of defatted *Moringa oleifera* seed flour. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46, e16329.

Sabale, V., Patel, V., Paranjape, A., Arya, C., Sakarka, R, S., Sabale, P. (2008). *Moringa oleifera* (Drumstick): An overview. *Pharmacognosy Reviews*, 2, 7.

Sahay, S., Yadav, U., Srinivasamurthy, S. (2017). Potential of *Moringa oleifera* as a functional food ingredient: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2, 31-37.

Sahumena, M., Andriani, R., Manangkara, M., Yamin, M. (2021). *In vitro* antioxidant activity test and determination of phenolic and flavonoid content of *Moringa oleifera* pulp and seeds. *Food Research*, 5, 59–65.

Sailaja, B. S., Aita, R., Maledatu, S., Ribnicky, D., Verzi, M. P., Raskin, I. (2021). Moringa isothiocyanate-1 regulates Nrf2 and NF-κB pathway in response to LPS-driven sepsis and

inflammation. *Plos One*, 16, e0248691.

Saini, R. K., Sivanesan, I., Keum, Y. S. (2016). Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. *Biotech*, 6, 1–14.

Saka, W. A., Ayoade, T. E., Akhigbe, T. M., Akhigbe, R. E. (2021). *Moringa oleifera* seed oil partially abrogates 2, 3-dichlorovinyl dimethyl phosphate (Dichlorvos)-induced cardiac injury in rats: evidence for the role of oxidative stress. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 32, 237-246.

Salama, M. A. E. B., Owon, M., Osman, M., Ibrahim, A., Matthäus, B. (2020). Effect of germination and roasting on oil profile of *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* seeds. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 2220-2229.

Salehi, B., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Cruz-Martins, N., Nigam, M., Mishra, A. P., Konovalov, D. A., Orobinskaya, V., Abu-Reidah, I., Zam, W., Sharopov, F., Venneri, T., Capasso, R., Kukula-Koch, W., Vawruszak, A., Koch, W. (2021). Phytosterols: From preclinical evidence to potential clinical applications. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 599959.

Sánchez-Rangel, K. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zeballos, L., Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Foliln-Ciocalteu assay rivisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5, 5990-5999

Sayeed, M. S. B., Karim, S. M. R. K., Sharmin, T., Morshed, M. M. (2016). Critical analysis on characterization, systemic effect, and therapeutic potential of beta-sitosterol: A Plant-derived orphan phytosterol. *Medicines*, 3, 29.

Shamlan, G., Al-Nouri, D. M., Alathbah, A. A., Arzoo, S., Habibullah, M. M. (2021). Antiarthritic, anti-inflammatory activity of *Moringa peregrina* seed oil and leaves in Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of King Saud University-Science*, 33, 101350.

Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24, 2452.

Shu, X. S., Wang, D. D., Zhao, Y. Y., Sun, Y. M., Hu, X. P., Huang, X. Y., Zeng, J. H., Li, C. Y., Zeng, Y., Wang, X. M.,He, Z. D., Ying, Y. (2018). Extract from *Moringa oleifera* seeds suppresses the epithelial-mesenchymal transition-mediated metastasis of gastric cancer by targeting the metastatic suppressor NDRG1. *Journal of Functional Foods*, 50, 93-103.

Siano, F, Vasca, E., Picariello, G. (2022). Accurate determination of total biophenols in unfractionated extra-virgin olive oil with the fast blue BB assay. *Food Chemistry*, 370,

130990.

Silva Lima, D., Buranelo Egea, M., de Campos Carvalho Cabassa, I., Borges de Almeida, A., Leal de Sousa, T., Mayara de Lima, T. (2021). Technological quality and sensory acceptability of nutritive bars produced with Brazil nut and baru almond coproducts. *LWT-Food Science and Technology*, 137, 110467.

Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., Singh, H. B. (2009). Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleífera*. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1109-1116.

Singh, G. R., Ogunsina, B. S., Radha, C. (2011). Protein extractability from defatted *Moringa oleifera* Lam seeds flour. *Ife Journal of Science*, 13, 121-127.

Singh, R. S., Negi, P. S., Radha, C. (2013). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. *Journal of Functional Foods*, 5, 1883-1891.

Singh, A. K., Rana, H. K., Tshabalala, T., Kumar, R., Gupta, A., Ndhlala, A. R., Pandey, A. K. (2020). Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop Moringa oleifera Lam: An overview. *South AfricanJjournal of Botany*, 129, 209-220.

Singh, A., Kumari, A., Chauhan, A. K. (2022). Formulation and evaluation of novel functional snack bar with amaranth, rolled oat, and unripened banana peel powder. *Journal of Food Science and Technology*, 1-11.

Škrovánková, S., Sikorová, P. (2010). Vitamin B_2 (riboflavin) content in cereal products. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 58, 377-382.

Soleimanian, Y., Goli, S. A. H., Varshosaz, J., Di Cesare Mannelli, L., Ghelardini, C., Cirri, M., Maestrelli, F. (2020). β-Sitosterol loaded nanostructured lipid carrier: Physical and oxidative stability, *in vitro* simulated digestion and hypocholesterolemic activity. *Pharmaceutics*, 12, 386.

Song, L., Du, A., Xiong, Y., Jiang, J., Zhang, Y., Tian, Z., Yan, H. (2016). Gamma-aminobutyric acid inhibits the proliferation and increases oxaliplatin sensitivity in human colon cancer cells. *Tumor Biology*, 37, 14885–14894.

Stelick, A., Sogari, G., Rodolfi, M., Dando, R., Paciulli, M. (2021). Impact of sustainability and nutritional messaging on Italian consumers' purchase intent of cereal bars made with brewery spent grains. *Journal of Food Science*, 86, 531-539.

Stevens, C. G., Ugese, F. D., Baiyeri, P. K. (2021). Variations in mineral and vitamin content of *Moringa oleifera* provenances across Nigeria. *Forests, Trees and Livelihoods*, 30, 106-115.

Stone, H., FitzGibbon, L., Millan, E., Murayama, K. (2022). Curious to eat insects? Curiosity as a key preditor of willingness to try novel food. *Appetite*, 168, 105790.

Sun, J., Chen, P. (2019). Quantification of total glucosinolates and isothiocyanates for common brassicaceous vegetables consumed in the US market using cyclocondensarion and thiocyanate ion measurement methods. *Journal of Analysis and Testing*, 3, 313-321.

Sun, C., Li, W., Liu, Y., Deng, W., Adu-Frimpong., M., Zhang, H., Wang, Q., Yu, J., Xu, X. (2019). In vitro/in vivohepatoprotective properties of 1-O-(4-hydroxymethylphenyl)-α-L-rhamnopyranoside from *Moringa oleifera* seeds against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110531

Teixeira, C., Nyman, M., Andersson, R., Alminger, M. (2016). Effects of variety and steeping conditions on some barley components associated with colonic health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4821-4827.

Tesfay, S. Z., Modi, A. T., Mohammed, F. (2016). The effect of temperature in moringa seed phytochemical compounds and carbohydrate mobilization. *South African Journal of Botany*, 102, 190-196.

Tian, J., Lu, Y., Zhang, H., Chau, C. H., Dang, H. N., Kaufman, D. L. (2004). γ-Aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model. *Journal of Immunology*, 173, 5298–5304.

Tian, B., Xie, B., Shi, J., Wu, J., Cai, Y., Xu, T., Deng, Q. (2010). Physicochemical changes of oat seeds during germination. *Food Chemistry*, 119, 1195‑1200

Timpanaro, G., Bellia, C., Foti, V. T., Scuderi, A. (2020). Consumer behaviour of purchasing biofortified food products. *Sustainability*, 12, 6297.

Tomé-Sánchez, I., Martín-Diana, A. B., Peñas, E., Bautista-Expósito, S., Frias, J., Rico, D., Gonzáles-Maillo L. y Martinez-Villaluenga, C. (2020). Soluble phenolic composition tailored by germination conditions accompany antioxidant and anti-inflammatory properties of wheat. *Antioxidants*, 9, 426.

Torres, A., Frias, J., Granito, M., Vidal-Valverde, C. (2007). Germinated *Cajanus cajan* seeds as ingredients in pasta products: Chemical, biological and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 101, 202-211.

Torri, L., Tuccillo, F., Bonelli, S., Piraino, S., & Leone, A. (2020). The attitudes of Italian consumers towards jellyfish as novel food. *Food Quality and Preference*, 79, 103782.

Tu, J., Kin, Y., Zhuo, J., Cao, X., Liu, G., Du, H. Liu, L., Wang, J., Xiao, X. (2022) Exogenous GABA improves the antioxidant and anti-aging abiility of silkworm (*Bombyx mori*). *Food*

Chemistry, 383, 132400.

Turgut, S. S., Karacabey, E., Küçüköner, E. (2014). Potential of image analysis based systems in food quality assessments and classifications. En: 9th Baltic Conference of Food Science and Technology, Jelgava, Latvia.

Ulug, E., Nergiz-Unal, R. (2021). Dietary fatty acids and CD36-mediated cholesterol homeostasis: potential mechanisms. *Nutrition Research Reviews*, 34, 64-77.

Vaknin, Y., Mishal, A. (2017). The potential of the tropical "miracle tree" *Moringa oleifera* and its desert relative *Moringa peregrina* as edible seed-oil and protein crops under Mediterranean conditions. *Scientia Horticulturae*, 225, 431–437.

Vatanparast, H., Islam, N., Masoodi, H., Shafiee, M., Patil, R. P., Smith, J., Whiting, S. J. (2020). Time, location and frequency of snack consumption in different age groups of Canadians. *Nutrition Journal*, 19, 1-9.

Vázquez-León, L. A., Páramo-Calderón, D. E., Robles-Olvera, V. J., Valdés-Rodríguez, O. A., Pérez-Vázquez, A., García-Alvarado, M. A., Rodríguez-Jimenes, G. C. (2017). Variation in bioactive compounds and antiradical activity of *Moringa oleifera* leaves: influence of climatic factors, tree age, and soil parameters. *European Food Research and Technology*, 243, 1593-1608.

Velázquez-Zavala, M., Peón-Escalante, I. E., Zepeda-Bautista, R., Jiménez-Arellanes, M. A. (2016). Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): usos potenciales en la agricultura, industria y medicina. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 22, 95–116.

Vyas, S., Kachhwaha, S., Kothari, S. L. (2015). Comparative analysis of phenolic contents and total antioxidant capacity of *Moringa oleifera* Lam. *Pharmacognosy Journal*, 7, 44-51.

Wang, C., Wu, R., Sargsyan, D., Zheng, M., Li, S., Yin, R., Su, S., Raskin, I., Kong, A-N. (2019a). CpG methyl-seq and RNA-seq epigenomic and transcriptomic studies on the preventive effects of Moringa isothiocyanate in mouse epidermal JB6 cells induced by the tumor promoter TPA. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 68, 69–78.

Wang, M., Zhang, Y., Leng, C., Li, X., Wang, P., Gu, Z., Yang, R. (2019b) Glucosinolates metabolism and redox state of Rocket (*Eruca sativa* Mill.) during germination. *Journal of Food Processing and Preservation,* 43, e14019

Wang, F., Long, S., Zhang, J., Yu, J., Xiong, Y., Zhou, W., Qiu, J., Jiang, H. (2020). Antioxidant activities and anti-proliferative effects of *Moringa oleifera* L. extracts with head and neck cancer. *Food Bioscience*, 37, 100691.

Weng, Zi-Jun, Wang, Be-Jen, & Weng, Yih-Ming (2020). Preparation of white salted noodles using rice flour as the principal ingredient and the effects of transglutaminase on noodle

qualities. *Food Bioscience*, 33, 100501.

Wiercioch, M., Szelag-Pieniek, S., Peszko, K., Baranowska-Bosiacka, I., Maciejewska, K., Łukomska, A., (2018). The fatty acids content in popular bars. *Polish Journal of Natural Sciences*, 33, 591–605.

WHO, FAO, UNICEF, GAIN, MI and FFI (2009). Recommendations on wheat and maize flour fortification. Meeting report: Interim consensus statement, 09.1.

WHO (2012). Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva.

Wu, W., Chen, J., Yu, D., Chen, S., Ye, X., Zhang, Z. (2021). Analysis of processing effects on glucosinolate profiles in red cabbage by LC-MS/MS in multiple reaction monitoring mode. *Molecules*, 26, 5171.

Xu, M., Jin, Z., Simsek, S., Hall, C., Rao, J., Chen, B. (2019). Effect of germination on the chemical composition, thermal, pasting, and moisture sorption properties of flours from chickpea, lentil, and yellow pea. *Food Chemistry*, 295, 579-587.

Yousaf, L., Hou, D., Liaqat, H., Shen, Q. (2021). Millet: a review of its nutritional and functional changes during processing. *Food Research International*, 142, 110197.

Zeng, W., Tao, H., Li, Y., Wang, J., Xia, C., Li, S., Wang, M., Wang, Q., Miao, H. (2021). The flavor of Chinese kale sprouts is affected by genotypic variation of glucosinolates and their breakdown products. *Food Chemistry*, 359, 129824.

Zhang, Z., Garzotto, M., Davis II, E.W., Mori, M., Stoller, W.A., Farris, P.E, Wong, C. P., Beaver, L. M., Thomas, G. V., Williams, D. E., Dashwood, R. H., Hendrix, D. A., Ho, E., Shannon, J. (2020). Sulforaphane bioavailability and chemopreventive activity in men presenting for biopsy of the prostate gland: a randomized controlled trial. *Nutrition and Cancer*, 72, 74–87.

Zhang, Z., Jackson, S. L., Martinez Steele, E., Gillespie, C., Yang, Q. (2022). Relationship between ultraprocessed food intake and cardiovascular health among U.S. adolescents: Results from the national health and nutrition examination survey 2007-2018. *Journal of Adolescent Health*, 70, 249-257.

Zhao, Y., Xie, C., Wang, P., Gu, Z., Yang, R. (2021). GABA regulates phenolics accumulatin in soybean sprouts under NaCl stress. *Antioxidants*, 10, 990.

Zieliński, H., Frias, J., Piskuła, M.K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C (2006). The effect of germination process on the superoxide dismutase-like activity and thiamine, riboflavin and mineral contents of rapeseeds. *Food Chemistry*, 99, 516–520.

Zunica, E. R., Yang, S., Coulter, A., White, C., Kirwan, J. P., Gilmore, L. A. (2021). *Moringa oleifera* seed extract concomitantly supplemented with chemotherapy worsens tumor

progression in mice with triple negative breast cancer and obesity. *Nutrients*, 13, 2923.