



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Determinación de polifenoles totales de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*)
considerado como alimento funcional y su predicción *in silico* del efecto
biológico.**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA

PRESENTA
Miriam Denise Hernandez Camacho

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

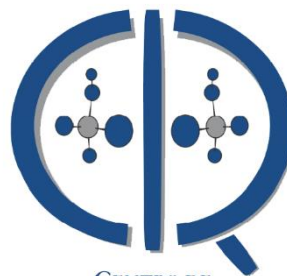
Cuernavaca, Morelos

noviembre 2022

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio 321 del área de productos naturales dentro del Centro de Investigaciones Químicas, en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**



**CENTRO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICAS**

Participación en congresos

Este trabajo fue presentado en la sesión de carteles virtuales, con el nombre: “Determinación de polifenoles totales de la col de repollo y su predicción *in silico* del efecto biológico”, evento organizado por el Centro de Investigaciones Químicas y llevado a cabo el 3 de mayo del 2021 en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos en su 25 aniversario.

Dedicatorias

Esta tesis la dedico a mis padres, Ray y Luz; a mis hermanos Erik y Jiroo, ustedes han sido la fortaleza en mi vida.

Por su incansable esfuerzo, por darme ánimos para no rendirme y siempre confiar en mí. Evolucionar duele, sin embargo, hacerlo a su lado entre amenas conversaciones atenúa lo negativo.

Agradecimientos

A mi alma máter, por brindarme un lugar de inspiración donde seguir aprendiendo.

A mis profesores por haberme brindado parte de su vida y tiempo para compartir sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio 321 del Centro de Investigaciones Químicas por su forma genuina de brindarme apoyo y guiarme, en especial a la Mtra. Araceli, Carlos y América.

A mi directora de tesis, la Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica, por guiarme, su trato amable y su paciencia.

Resumen

La col o *Brassica oleracea* var *capitata* es considerado un alimento funcional no solo por su valor nutricional sino por su contenido de metabolitos secundarios como glucosinolatos y flavonoides que le otorgan una valiosa actividad biológica anticancerígena y antioxidante. En este proyecto de tesis se estableció el contenido de polifenoles totales en los extractos metanólicos de la col fresca, del bagazo y el jugo de este vegetal y se buscaron los compuestos fenólicos reportados en la literatura y mediante el uso de quimioinformática se determinaron los posibles blancos biológicos.

En primer lugar, se llevó acabo la obtención de los extractos metanólicos antes mencionados, así como la obtención de tres fases de polaridad creciente (hexano, CH₂Cl₂/AcOEt y MeOH/H₂O) de cada extracto por extracción líquido-líquido. Posteriormente se utilizó el método Folin-Ciocalteu para establecer el contenido de polifenoles totales de cada uno de estos. Los resultados de la cantidad de polifenoles totales respecto a los extractos metanólicos iniciales (col fresca **A**, bagazo de col **B** y jugo liofilizado **C**) mostraron una mayor concentración en el extracto de jugo liofilizado de col (5.72 mg Eq. ácido gálico/g), en el caso de las extracciones liquido-liquido, el extracto de la fase orgánica (CH₂Cl₂/AcOEt) del bagazo de col **H** (12.10 mg Eq. ácido gálico/g) tuvo la mayor concentración. Por otro lado, la fase orgánica de col fresca **E**, mostro un aumento del 10 % más de concentración de polifenoles comparadas con las de su respectivo extracto metanólico inicial.

Para buscar actividad biológica *in silico* se seleccionaron 10 compuestos fenólicos encontrados en col y reportados en la literatura (**21-30**). Se utilizaron los programas quimioinformáticos de acceso libre: data Warrior, SwissADME, Molinspiration y para establecer sus parámetros o descriptores moleculares y PassOnline para la predicción de actividad biológica *in silico* En cuanto al estudio quimioinformático de polifenoles presentes en col, se determinaron el log*P*, número de aceptores de enlace de hidrógeno, número de donadores de enlace de hidrógeno y área de superficie polar de **21-30** y se encontró de manera general actividad antioxidante *in silico* para los mismos.

En conjunto los resultados muestran al extracto metanólico del bagazo con el mayor contenido de polifenoles, el conjunto de compuestos fenólicos presentes reportados en la literatura hacen a la col un alimento funcional con posible actividad antioxidante.

Índice

Índice de figuras	1
Índice de tablas.....	2
Abreviaturas	3
1. Introducción.....	5
2. Antecedentes.....	6
2.1 Alimentos funcionales	6
2.2 <i>Brassica oleracea</i> L.....	9
2.3 <i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i> L.....	11
2.3.1 Antecedentes de fitoquímicos en col.....	14
2.3.2 Fitoquímicos y actividades farmacológicas de <i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i>	21
2.4 Método Folin-ciocalteu	24
2.5 Radicales libres y actividad antioxidante	27
2.5.1 Métodos para determinar actividad antioxidante.....	31
2.6 Quimioinformática	32
2.6.1 Quimioinformática aplicada a productos naturales	33
3. Justificación.....	36
4. Hipótesis.....	37
5. Objetivo general	38
5.1 Objetivos particulares.....	38
6. Materiales y métodos	39
6.1 Colecta del material Vegetal	39
6.2 Preparación de los extractos.....	39
6.2.1 Bagazo col.....	39
6.2.2 Col fresca.....	39
6.2.3 Jugo de col	39
6.3 Extracción líquido-líquido de los extractos de col fresca y bagazo de col.....	40
6.4 Polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu	41
6.5 Estudio quimioinformático de polifenoles en col.....	43
6.5.1 Molinspiration	43
6.5.2 SwissADME.....	44
6.5.3 Datawarrior	45

6.5.4 PASS online	46
7. Resultados	47
7.1 Rendimientos y análisis de extractos por cromatografía en capa fina.....	47
7.2 Contenido total de fenoles.....	49
7.2.1 Curva de calibración de ácido gálico.....	49
7.2.2 Contenido de polifenoles totales de las muestras de col	50
7.3 Resultados de quimioinformática	53
7.3.1 Propiedades o descriptores moleculares.....	54
7.3.2 Predicción de actividad biológica en Pass online.....	58
7.3.3 Predicción de actividad antioxidante <i>in silico</i> en Pass online.....	62
8. Conclusiones	64
Bibliografía.....	66

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes variedades de <i>Brassica oleracea</i> L, obtenidas mediante el cultivo de diferentes partes de la planta silvestre.	10
Figura 2. <i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i>	11
Figura 3. Estructura general de los glucosinolatos.	14
Figura 4. Esqueleto flavonoide y principales subclases de flavonoides.	18
Figura 5. Biosíntesis de compuestos fenólicos a través de la ruta shikimato/ fenilpropanoide y la ruta acetato/ malonato.	20
Figura 6. Reacción entre el reactivo Folin y el ácido gálico (compuesto fenólico).	26
Figura 7. Diagrama de orbital molecular del oxígeno molecular (izquierda) y números cúanticos de spin o giro de un electrón sobre su propio eje (derecha).	28
Figura 8. Reducción parcial del oxígeno molecular en su estado basal.	29
Figura 9. Diagrama de bipartición de los extractos de col	41
Figura 10. Espectrofotómetro Multiskan GO	42
Figura 11. Interfaz del programa quimioinformático Molinspiration online, (https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties).	44
Figura 12. Sitio web SwissADME del instituto suizo de bioinformática, (http://www.swissadme.ch/)	44
Figura 13. Datawarrior, programa de fuente abierta.	45
Figura 14. Interfaz del sitio web PASS online con la introducción de un código SMILES. (http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/)	46
Figura 15. Perfil de cromatografía en capa fina de las fases de col fresca hexánica (D), col bagazo hexánica (G), col fresca orgánica (E) y col bagazo CH ₂ Cl ₂ : AcOEt (H) revelados con (NH ₄ CeSO ₄) ₄ y luz UV.	48
Figura 16. Curva de calibración de ácido gálico.	49
Figura 17. Esquema de los cambios de coloración en las diferentes muestras y fases. En el pozo 1A se colocó agua, en 2A (amarillo) el reactivo Folin-Ciocalteu puro.	50
Figura 18. Predicción de actividad biológica para el compuesto quercetina por Pass online.	58

Índice de tablas

Tabla 1. Lista de algunos compuestos encontrados en alimentos funcionales, fuentes y beneficios (modificado de Kaur & Das, 2011).	8
Tabla 2. Clasificación taxonómica de col (<i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i>).	11
Tabla 3. valor nutricional de <i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i> /100 g.....	13
Tabla 4. Composición de minerales y vitaminas en col.....	13
Tabla 5. Esqueletos estructurales básicos de compuestos fenólicos.....	16
Tabla 6. Fitoquímicos reportados en <i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i>	22
Tabla 7. Campo de acción de la quimioinformática.....	32
Tabla 8. Rendimientos de los extractos metanólicos y fases de col	47
Tabla 9. Concentraciones de ácido gálico	49
Tabla 10. Resultados del contenido total de polifenoles en los extractos y fases de col...	51
Tabla 11. Propiedades moleculares de los compuestos 21-30	57
Tabla 12. Resultados del espectro de actividad de los compuestos fenólicos 21, 22, 23, 24 y 25	60
Tabla 13. Resultados del espectro de actividad de los compuestos fenólicos 26, 27, 28, 29 y 30 obtenidos por PASS online.	61
Tabla 14. Resultados de la predicción de la actividad antioxidante en PASS online para los compuestos fenólicos 21- 30 reportados en <i>Brassica oleracea</i> var <i>capitata</i>	63

Abreviaturas

Å ²	Angstroms
A.E.H	Aceptor de enlace de hidrógeno
ABTS	2,2- azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AcOEt	Acetato de etilo
ADME	Adsorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cm	centímetro
CoA	Coenzima A
D.E.H	Donador de enlace de hidrógeno
DPPH	<i>2,2 difenil 1- picrylhydrazyl</i>
dS/m	<i>DeciSiemens/meter</i>
E.R	Enlaces rotacionales
Eq	Equivalentes
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
F-C	Folin- Ciocalteu
F-D	Folin- Denis
FFC	<i>Functional Food Center</i>
FOSHU	<i>Foods for Specified Health Use</i>
g	gramos
EAG/g	Equivalente de ácido gálico
g/mol	gramos/mol
GLCs	glucosinolatos
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i>
Kcal	Kilocalorías
Kg	Kilogramos
L.	Linneo, Carlos
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LogP	Coeficiente de partición
mBar	milibar
MeOH	metanol
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
N	Nitrógeno
NA	Número de átomos
NADPH	Nicotiamida Adenina Dinucleotido Fosfato
nm	nanómetros
CARO	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
<i>p</i>	<i>Para</i>
Pa	Probabilidad de ser activo

PAL	<i>Phenylalanine ammonia lyase</i>
PASS	<i>Prediction and Assistant Experimental Design</i>
pH	Potencial de hidrógeno
Pi	Potencial de ser inactivo
PM	Peso molecular
PN	Producto natural
PSA	<i>Polar Surface area</i>
R	Cadena lateral
rpm	revoluciones por minuto
SET	<i>Single electron transfer</i>
SMILE	<i>Simplified molecular input line entry system</i>
SOD	Superóxido dismutasa
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
var	Variedad
ω -3	Omega-3

1. Introducción

El consumo de diversas verduras tiene grandes beneficios sobre la salud humana, gracias a su relación en la prevención de muchas enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades neurológicas y diversos tipos de cáncer. En las últimas décadas los alimentos funcionales han tomado el interés de varios investigadores, ya que producen beneficios sustanciales en la prevención y el tratamiento de enfermedades.

En este sentido, los vegetales crucíferos pertenecientes a la especie *Brassica oleracea* son cultivados y consumidos en todo el mundo, tienen una gran importancia agronómica y económica. El brócoli, las coles de Bruselas, la kale o col rizada, así como la col, son ejemplos de estos vegetales, Este trabajo centra su estudio en *Brassica oleracea* var. *capitata* o col que es uno de los vegetales crucíferos más importantes, proveniente de Asia, costa sur y oeste de Europa, en México también es consumido en ensaladas y también guisada. Además de su importancia en la gastronomía, este vegetal es considerado un alimento funcional debido a las actividades farmacológicas reportadas y debido a que contiene metabolitos secundarios que son responsables del potencial farmacológico al ser consumidos, tales como vitaminas, compuestos organosulfurados como los glucosinolatos y sus derivados hidrolizados, los isotiocianatos y los polifenoles. Dentro de este último grupo de compuestos se les relaciona con combatir las especies reactivas de oxígeno y por su actividad antioxidante que a su vez ayuda a combatir infecciones

El objetivo de este trabajo es cuantificar los polifenoles totales del jugo y dos extractos metanólicos de la col en fresco y su bagazo para relacionarlo con un estudio quimioinformático de actividad biológica con los polifenoles reportados en la literatura para la col.

2. Antecedentes

2.1 Alimentos funcionales

La ciencia de los alimentos funcionales es la convergencia de dos eventos importantes en nuestras vidas: dieta y salud. La asociación entre comida y enfermedad es ampliamente reconocida como la base de la prevención nutritiva. La visión de desarrollar alimentos funcionales refleja una filosofía oriental en la que: “la medicina y la comida tienen un origen en común”.

La visión de desarrollar alimentos funcionales surgió por primera vez en Japón en los años 80 cuando se enfrentaron a la escalada de costos por atención médica. El ministerio de salud y enfermedad inició un sistema regulatorio para aprobar ciertos alimentos con beneficios para la salud comprobados y su objetivo principal era mejorar la salud de la población que envejecía en la nación. En 1984 el ministerio de educación, ciencia y cultura en Japón comenzó un proyecto nacional para explorar el vínculo entre la alimentación y las ciencias médicas. (Henry, 2010).

En 1991 la ley japonesa incorporó la definición: “Foods For Specified Health Use” (FOSHU) o “Alimentos para uso específico de la salud”, que permitió las primeras declaraciones de propiedades saludables en el etiquetado de los alimentos. Los FOSHU son alimentos que presentan efectos benéficos en la salud al formar parte de una dieta balanceada y que no son suplementos.

Una de las definiciones más actuales fue introducida por el Functional Food Center (FFC), que menciona a los alimentos funcionales, como alimentos naturales o procesados que contienen compuestos biológicamente activos conocidos o desconocidos; que en cantidades definidas, eficaces y no tóxicas proporcionan un beneficio para la salud clínicamente probado y documentado, así como la prevención, manejo o tratamiento de las enfermedades crónicas.

Los compuestos bioactivos los cuales son considerados ser la fuente de funcionalidad de los alimentos, son metabolitos secundarios, presentes generalmente en pequeñas cantidades que pueden ejercer acciones antioxidantes, cardioprotectoras y efectos quimiopreventivos” entre otros. (Chequer et al., 2013).

Los alimentos funcionales son clasificados dependiendo su origen o modificación:

- Productos alimenticios fortificados, por ejemplo: pan fortificado con calcio o con omega-3 (ω -3).
- Alimentos liberados para contrarrestar los compuestos anti nutricionales producidos por el procesamiento, por ejemplo: un compuesto tóxico o un alérgeno.
- Materias primas alimentarias que se mejoran aumentando componentes específicos por cambios en la alimentación de los animales, por ejemplo, huevos o carnes con alto contenido de ácidos grasos ω -3 o en algunos otros nutrientes de frutas y verduras, en la que factor que contribuye a la salud ha aumentado en algunos tratamientos anteriores a la cosecha.
- Nuevos alimentos con un beneficio para la salud, producidos por manipulación genética o selección de nuevas variedades no consumidas antes por ejemplo arroz con alto contenido de hierro o vitamina B.

Así, los productos naturales tradicionales que contienen componentes que influyen en la salud, no son estrictamente alimentos funcionales, por ejemplo, el jugo de arándano que influye positivamente en infecciones del tracto urinario, no es un alimento funcional cuando es consumido como tal. Sin embargo, si el jugo o su ingrediente que contribuye a la salud en forma aislada es añadido a otro alimento para mejorar positivamente la salud, el desarrollado es un alimento funcional (Kaur & Das, 2011).

Comprender el requisito de las características de los alimentos para abordar problemas de salud específicos y la contribución de ingredientes alimentarios específicos hacia tal beneficio definitivamente ayuda para el desarrollo de alimentos funcionales. La tabla 1, enumera varios compuestos encontrados en alimentos funcionales con su efecto benéfico, como por ejemplo prebióticos y probióticos, carotenoides y flavonoides.

Tabla 1. Lista de algunos compuestos encontrados en alimentos funcionales, fuentes y beneficios (modificado de Kaur & Das, 2011).

Compuestos funcionales	Fuente/alimento	Efectos benéficos
Antocianinas, catequinas, cianidina, flavonoles, miricetina y quercetina	Piel de uvas, jugo, y vino (de uvas rojas), frutos rojos y berenjena	Actividad antioxidante, inhibe la oxidación de LDL, captadores de superóxido
Carotenoides y licopeno	Tomates, zanahorias, pimientos, vegetales de hoja verde, frutas y aceites de palma.	Actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, inhibe la oxidación de LDL, disminuye el riesgo de enfermedad Cardiovascular.
Flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonoles, y flavan- 3-ol)	Apio, perejil, cítricos, cebollas, té, verde, frijoles, tomates, cacao, manzanas, frutos rojos y chocolate	Antioxidante, antiproliferativo, antihipertensivo, anticancerígeno, antitrombótico, detención del ciclo celular, inducción e inhibición de enzimas del metabolismo de fármacos fase 2 y fase 1 respectivamente, inhibición de la oxidación de LDL y mejora del tono vascular.
Ácido gálico, sulfuros y tioles, quercetina y compuestos orgánicos de azufre	Ajo, cebolla y brócoli (vegetales crucíferos)	Disminución de la presión arterial
Ácidos fenólicos y ácidos grasos monoinsaturados	Café, té verde, té negro, salvado de cereales, frutas, aceite de oliva virgen extra	Antiinflamatorio
Lignan	Linaza, frutas y verduras	Estrogénico
Estilbenos	Uvas y cacahuates	Antioxidante, cardioprotectivo
Prebióticos	Plátano, ajo, cebollas, leche, miel, alcachofas.	Estimula el crecimiento y / o la actividad útil de bacterias en el colon, por lo que mejora la salud del huésped.
Probióticos	Productos lácteos o fermentados	Brinda soporte a la salud del tracto intestinal, incrementa la inmunidad.

2.2 *Brassica oleracea* L

Dentro de los alimentos funcionales se tiene a los vegetales *Brassica* o crucíferos, los cuales pertenecen a la familia Brassicaceae, originaria de la región Iran-Turkmenia. Esta familia es relativamente grande con alrededor de 3780 especies y 338 géneros, contiene numerosas plantas oleaginosas, medicinales y forrajeras, así como plantas domesticadas, usadas como alimento y condimentos, por ejemplo; la col, los rábanos y la mostaza. También incluye al modelo *Arabidopsis thaliana* L., cuya importancia se debe a su utilidad para llevar a cabo estudios genéticos y de desarrollo vegetal (Rojas Chavéz & Vibrans, 2012). La mayoría de las especies de la familia son hierbas anuales o perennes y casi todas las especies se distinguen por tener flores cruciformes con cuatro pétalos y seis estambres (cuatro largos y dos cortos).

Brassica oleracea L es una de las especies miembro de esta familia, la cual abarca las principales formas de coles domesticadas. Esta especie ha sido cultivada por al menos 2,000 años, posiblemente mucho más y una amplia variedad de formas han sido desarrolladas. Las variedades de estas coles fueron modificadas por humanos, mediante el cultivo selectivo de diferentes partes de la planta silvestre. Algunas variedades son *acephala* (col rizada y acelgas), *botrytis* (coliflor), *capitata* (col), *gemmifera* (col de Bruselas), *gongylodes* (col rábano o colinabo) e *italica* (brócoli). Según se fue domesticando la planta silvestre de la especie *Brassica oleracea*, cuya parte comestible eran sus hojas, se fueron seleccionando y reproduciendo las plantas con las hojas más grandes. Dicho proceso dio lugar al desarrollo de lo que hoy día conocemos como kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), o 'repollo sin cabeza'. Luego hubo preferencia de parte de algunas personas por las plantas de kale que presentaban un mazo o racimo de hojas tiernas más compacto, las mismas agrupadas en el ápice terminal o yema apical del tallo de la planta. Una continua selección y propagación de plantas con dichas características se estuvo llevando a cabo a través de cientos de generaciones de planta, lo que eventualmente dio lugar a lo que hoy día conocemos como la planta de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) o 'repollo con cabeza' (figura 1).

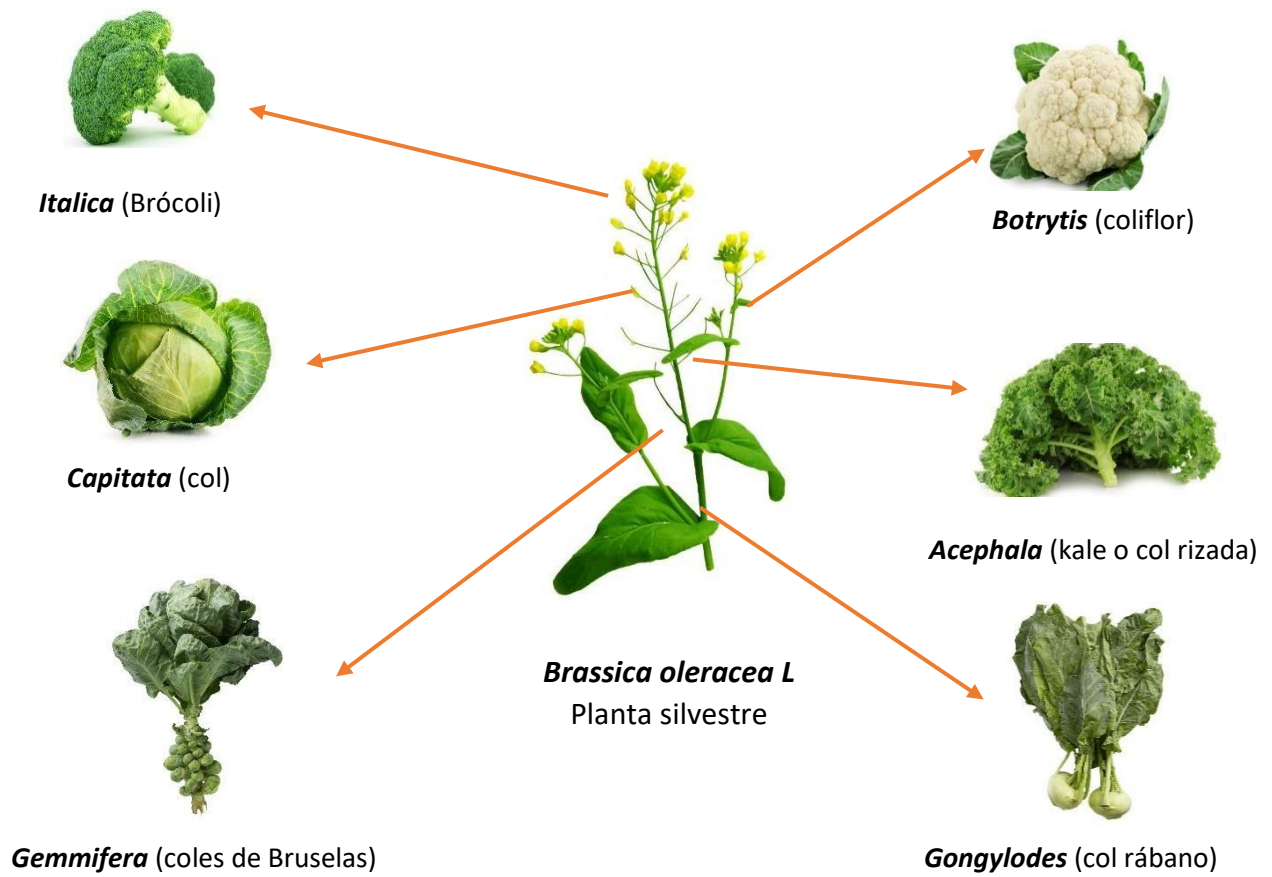


Figura 1. Diferentes variedades de *Brassica oleracea* L, obtenidas mediante el cultivo de diferentes partes de la planta silvestre.

2.3 *Brassica oleracea* var *capitata* L

La col o repollo (*Brassica oleracea* var *capitata* L) fue introducida a los Estados Unidos de América durante el siglo XVI por Jacques Cartier en 1541 e introducciones posteriores se realizaron por los primeros colonos. Su nombre en inglés, “cabbage”, se deriva de la palabra francesa “caboche” que significa cabeza (Fornaris, 2005). En Latinoamérica fue introducida por colonos españoles y portugueses. Es la hortaliza más importante dentro de la familia Brassicaceae en todo el mundo, siendo China, India, Rusia y Corea, los principales países productores. En México el cultivo de col encabeza la lista de consumo con respecto de las demás crucíferas; brócoli, coliflor, col de bruselas, etc.

a) Taxonomía

Según la USDA, la clasificación taxonómica de la col o repollo es la siguiente (tabla 2):

Tabla 2. Clasificación taxonómica de col (*Brassica oleracea* var *capitata*).

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase	<i>Dilleniidae</i>
Orden	<i>Capparales</i>
Familia	<i>Brassicaceae</i> o <i>cruciferae</i>
Género	<i>Brassica</i> L
Especie	<i>Brassica oleracea</i> L
Variedad	<i>Capitata</i>



Figura 2. *Brassica oleracea* var *capitata*

b) Características morfológicas

El tallo de la planta del repollo es mayormente no-ramificado, corto y grueso, y sus hojas son de superficie cerosa. Un corte longitudinal de la cabeza nos permite observar que la planta del repollo es realmente un ápice de crecimiento terminal grande. Esta planta puede alcanzar una altura de hasta 40 a 60 cm al madurar. Sus primeras hojas (las hojas inferiores) son de superficie lisa o algo abollada, a menudo divididas, y algo carnosas. Estas se expanden completamente, en algunos casos alcanzando hasta 45 cm de largo y de 30 a 60 cm de ancho. Las primeras hojas del tallo son relativamente más pequeñas y estrechas, siendo algunas de ellas abrazadoras, que se van doblando hacia el centro de la planta. Como resultado, la cabeza se va formando a partir de un desarrollo denso de hojas alrededor del punto de crecimiento, siguiendo las hojas una secuencia en forma de espiral y formando una roseta compacta. Su peso generalmente varía entre 1- 5 kg.

El color del repollo es generalmente verde, en diversas tonalidades, incluyendo verde azulado y grisáceo. Hay también repollos de hojas rojas o púrpura. En el caso del repollo de tipo "savoy", el cual se distingue por sus hojas bastante arrugadas, el mismo pertenece a la misma especie, pero a una variedad botánica diferente (*Brassica oleracea* var. *sabauda* L). En cuanto a la forma de la cabeza del repollo, hay tres tipos principales: redonda, ovalada o achatada (Fornaris, 2005).

c) Condiciones de cultivo

El repollo puede ser sembrado a mediados de abril o agosto. La cosecha ocurre dependiendo de la variedad entre 120 a 150 días después de la siembra (Zamora, 2016). La temperatura óptima para su crecimiento está en los 17 °C y le favorecen temperaturas frescas con máximas de alrededor de 25 °C. Es un cultivo de estación fría y la humedad ambiental lo beneficia. Con plantas desarrolladas, una exposición al frío durante un tiempo prolongado induce a la producción temprana de flores y semillas. El repollo es moderadamente tolerante a la salinidad (hasta 4 dS/m) y a la acidez del suelo, con un pH óptimo entre 6.0 y 6.8 (Vigliola, 2010).

Valor nutricional

El valor nutricional de la col se muestra en la tabla 3 (Ogbede *et al.*, 2015). Evidentemente el agua es el mayor componente de este vegetal con un valor del 87.93 %, mientras que su contenido de grasas es relativamente bajo con 0.31 % de su composición total.

Tabla 3. Valor nutricional de *Brassica oleracea var capitata*/100 g

Parámetro	Composición(%)
Agua	87.93 ± 0.54
Materia inorgánica	1.05 ± 0.10
Grasa	0.31 ± 0.06
Fibra	3.77 ± 0.11
Proteína	1.94 ± 0.10
Carbohidrato	4.52 ± 0.22
Energía metabolizable (Kcal/100)	28.72 ± 0.71

* Los valores son la media ± error estándar de determinaciones por triplicado

La col se caracteriza también por un rico contenido de minerales que son esenciales en el ser humano para una mejor nutrición y una vida más sana, siendo el potasio el que se encuentra en mayor cantidad en este vegetal con 678 mg/100g, también es una excelente fuente de vitamina C y ácido fólico (tabla 4) (Ogbede *et al.*, 2015).

Tabla 4. Composición de minerales y vitaminas en col

Parámetros	Composición(mg/100g)
Sodio	176 ± 1.16
Potasio	678 ± 2.65
Calcio	28.9 ± 1.51
Manganeso	0.67 ± 0.02
Cobre	0.05 ± 0.003
Hierro	2.15 ± 0.10
Zinc	2.11 ± 0.04
Fosforo	26.92 ± 0.47
Ácido fólico	86.30 ± 0.69
Vitamina A	7.14 ± 0.13
Vitamina C	56.37 ± 5.21

* Los valores son la media ± error estándar de determinaciones por triplicado. Tabla 3, 4 recuperadas y modificadas de Ogbede *et al.*, 2015.

2.3.1 Antecedentes de fitoquímicos en col

La col tiene la ventaja no solo de proveer nutrientes sino también compuestos fitoquímicos popularmente considerados como benéficos para el bienestar y la salud humana, en ocasiones son inapropiadamente referidos como fitonutrientes, sin embargo, no son considerados esenciales como las proteínas, grasas, minerales y vitaminas. En general, los fitoquímicos son metabolitos secundarios en el metabolismo de la planta, que son sintetizados como un sistema de defensa y son responsables de proveer a la planta su color, aroma y sabor.

En particular, la col es rica en compuestos fitoquímicos, reconocidos como metabolitos secundarios bioactivos que tienen, diferentes objetivos moleculares dentro de las células. Este vegetal es rico en glucosinolatos (GLCs), sus productos de hidrólisis (isotiocianatos e indoles) y compuestos fenólicos que incluyen a los flavonoides y no flavonoides (Favela-González et al., 2020).

a) Glucosinolatos (GLCs)

Los glucosinolatos son aniones solubles en agua presentes en 16 familias de angiospermas dicotiledóneas incluyendo un amplio número de especies comestibles (Favela-González et al., 2020). Son un grupo pequeño pero diverso de más de 130 compuestos que contienen azufre y nitrógeno encontrados casi exclusivamente en las plantas crucíferas (1 % de su peso en seco). La estructura de los GLCs contiene una β -D-glucopiranososa unida a través de un átomo de azufre a un *N*-hidroxisulfato con una cadena lateral (R) (figura 3).

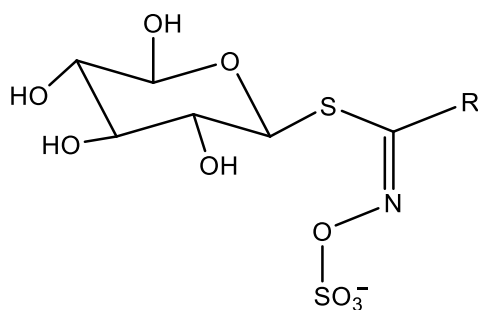
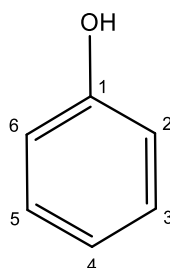


Figura 3. Estructura general de los glucosinolatos.

b) Compuestos fenólicos (Polifenoles)

Estos compuestos se caracterizan por tener al menos un grupo aromático unido directamente a uno o más grupos hidroxilo. El fenol (**1**) es la estructura en la que se basa todo este grupo. El anillo aromático en este caso es el benceno (Vermerris & Nicholson, 2006).

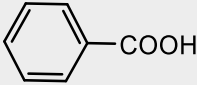
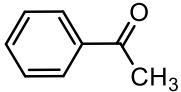
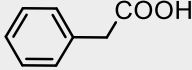
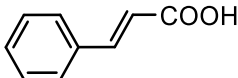
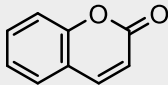
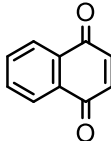
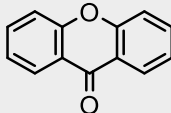
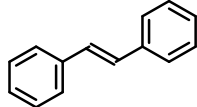
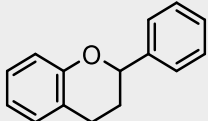


(1)

El rango de los compuestos fenólicos varía desde simples, de bajo peso molecular, compuestos mono-aromáticos hasta grandes complejos como taninos y polifenoles derivados. Se puede clasificar por el número y disposición de sus átomos de carbono (Tabla 5) (Vermerris & Nicholson, 2006).

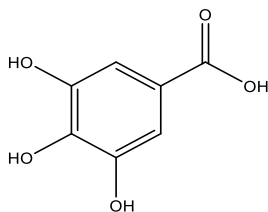
Los compuestos fenólicos que ocurren naturalmente en el tejido vegetal, se pueden clasificar en dos grupos, los flavonoides y los no flavonoides: tradicionalmente los alimentos procesados y bebidas, tales como el té negro, vino tinto, café y cocoa pueden contener productos de transformación fenólica que se describen como polifenoles derivados (Crozier *et al.*, 2009).

Tabla 5. Esqueletos estructurales básicos de compuestos fenólicos

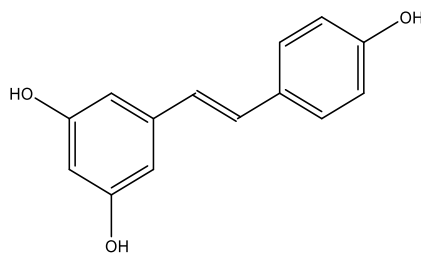
Esqueleto	Clasificación	Estructura básica
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos	
C ₆ -C ₂	Acetofenonas	
C ₆ -C ₂	Ácido fenilacético	
C ₆ -C ₃	Ácidos hidroxicinámicos	
C ₆ -C ₃	Cumarinas	
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenos	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	

I) No flavonoides

Los principales no flavonoides de importancia dietética, son los ácidos fenólicos C_6-C_1 , como el ácido gálico (2), de importancia notable, el pues es el precursor biosintético, de los taninos hidrolizables, los hidroxicinamatos C_6-C_3 , y sus derivados conjugados, así como los estilbenos polifenólicos $C_6-C_2-C_6$ (Tabla 5). El resveratrol (3) es un estilbeno encontrado principalmente en uvas y el vino tinto.



Ácido gálico (2)



Resveratrol (3)

II) Flavonoides

Son compuestos de 15 carbonos con unidades $C_6-C_3-C_6$ (4), que tienen más de un grupo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo. El esqueleto flavonoide está caracterizado por dos anillos de benceno (C_6) y un anillo heterocíclico oxigenado (C_3). Son los más numerosos de los compuestos fenólicos y se encuentran en todo el reino vegetal, presentes particularmente en la epidermis de las hojas y en la cáscara de frutas.

Las principales subclases de flavonoides en la dieta son los flavonoles (5), flavonas (6), flavan-3-oles (7), antocianidinas (8), flavanonas (9) e isoflavonas (10), mientras que las que son relativamente menores como los componentes de la dieta son dihidroflavonoles (11), flavan-3,4-dioles (12), cumarinas (13), chalconas (14), dihidrochalconas (15) y auronas (16). El esqueleto flavonoide básico puede tener numerosos sustituyentes (figura 4).

Los azúcares son muy comunes, con la mayoría de flavonoides que existen naturalmente como glucósidos. Mientras que ambos, azúcares y grupos hidroxilo aumentan la solubilidad en agua de los flavonoides, otros sustituyentes, como grupos metilo y unidades isopentilo, hacen flavonoides lipofílicos. (Ø. Andersen et al., 2006).

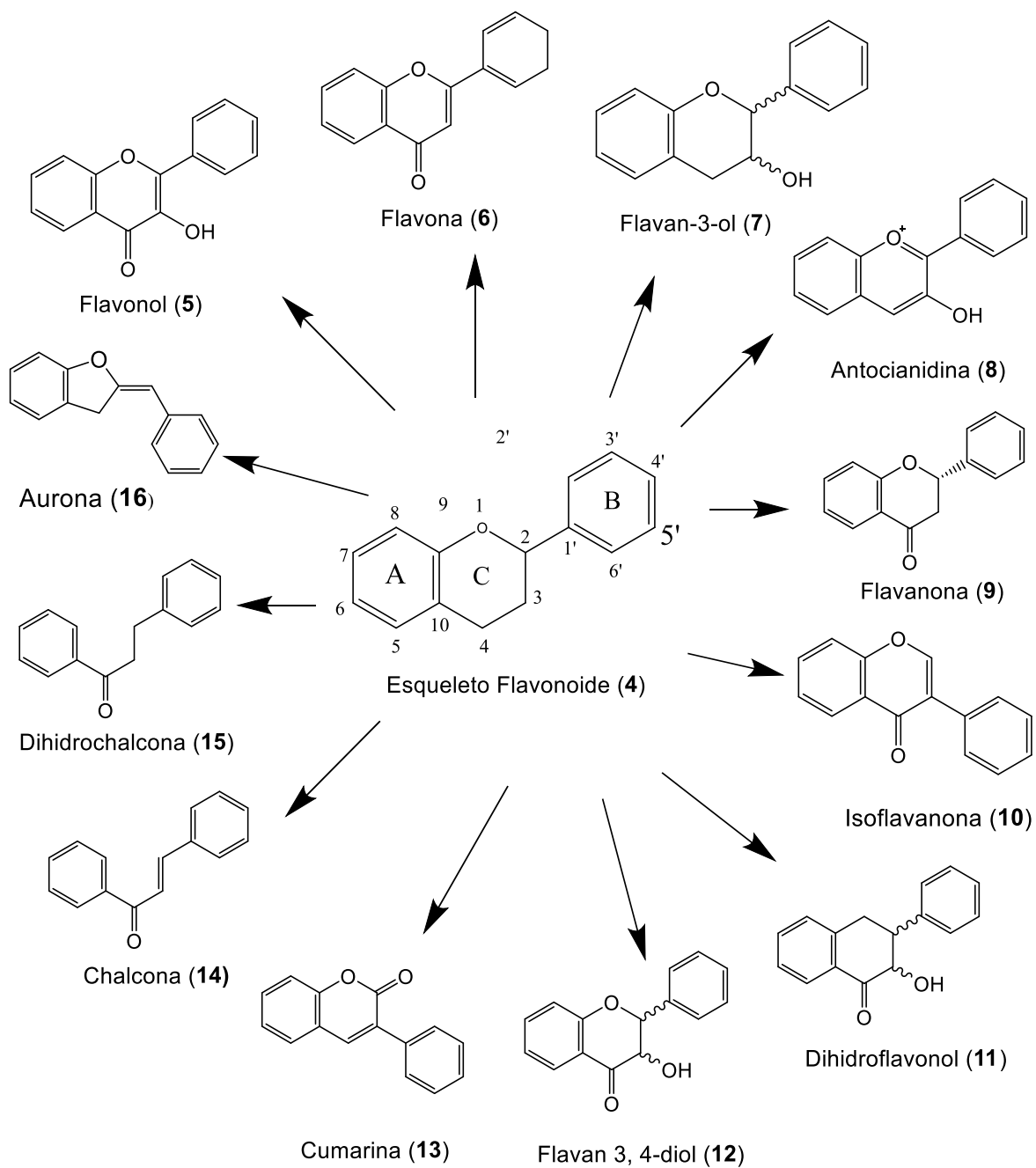


Figura 4. Esqueleto flavonoide y principales subclases de flavonoides.

Biosíntesis de flavonoides

El término compuestos fenólicos se usa estrictamente para referirse a metabolitos naturales que surgen biogenéticamente de la ruta shikimato /fenilpropanoide, que proporciona directamente fenilpropanoides (ácidos hidroxicinámicos y cumarinas) así como la ruta acetato-malonato policétido, que puede producir fenoles simples o ambos. Estas vías producen una variedad de compuestos monoméricos y poliméricos (el término polifenoles define aquellos con más de un anillo fenólico) que cumplen una amplia gama de roles fisiológicos en las plantas (Dewick, 2009).

Las plantas adaptadas a la tierra aparecieron entre 480 y 360 millones de años atrás, a mediados de la era paleozoica. La habilidad para sintetizar compuestos fenólicos, ha sido seleccionada a través del curso de la evolución en diferentes linajes de plantas cuando tales compuestos abordaban necesidades específicas, permitiendo así a las plantas hacer frente a los desafíos ambientales en constante cambio durante el tiempo evolutivo. Por ejemplo, la adaptación exitosa a la tierra de algunos miembros de las *Charophyceae*, que se consideran prototipos de plantas anfibias que presumiblemente precedieron a las verdaderas plantas terrestres cuando emergieron de un medio acuático a la tierra, lograron su adaptación mediante la formación de compuestos fenólicos como protectores para la luz ultravioleta. La región ultravioleta de la radiación solar es capaz de promover la ruptura de enlaces químicos, de ahí que los compuestos orgánicos de los organismos primordiales eran viables solo en medio acuático, protegidos por la absorción de UV del oxígeno del agua. Así, hace unos 500 millones de años, la diferencia química más sobresaliente entre los protistas acuáticos y plantas terrestres es la explotación de la ruta del shikimato. (Cheynier *et al.*, 2013).

La ruta del shikimato proporciona aminoácidos aromáticos, particularmente los aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano. Esta vía es empleada por microorganismos y plantas, pero no por animales; en consecuencia, los aminoácidos aromáticos figuran entre los aminoácidos esenciales que el humano obtiene a través de la dieta. Los compuestos fenólicos también se sintetizan a través de esta ruta y la ruta del acetato-malonato (policétido), convergiendo así ambas rutas.

La ruta del shikimato proporciona la síntesis del aminoácido aromático fenilalanina que es un sustrato clave para la enzima de la ruta fenilpropanoide, fenilalanina amoniaco liasa (PAL), Esta última desamina al ácido aminocinámico, que luego se convierte en *p*-cumarina CoA. Este *p*-cumarato activado reacciona con malonil-CoA que involucra la enzima clave chalcona sintasa y la producción de chalconas. Después de la isomerización del producto, es sintetizado el compuesto naringenina el precursor de otros flavonoides (figura 5).

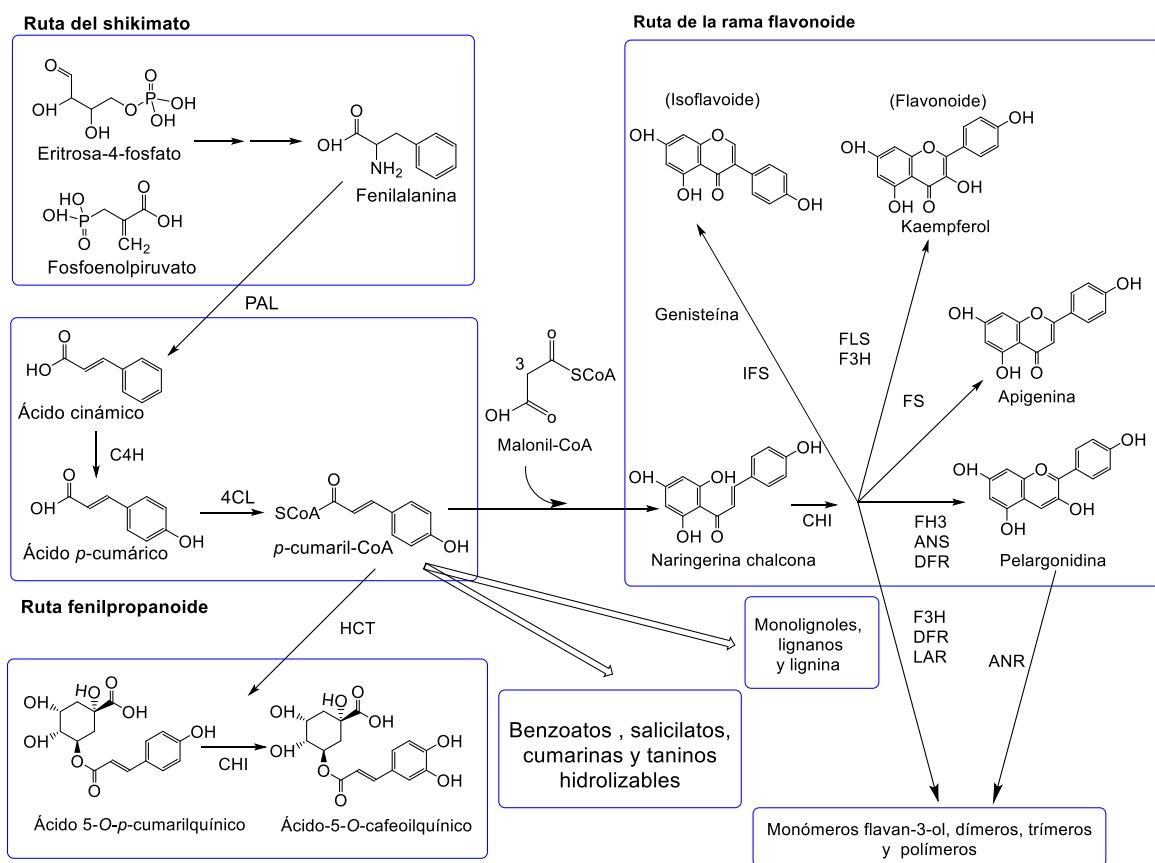


Figura 5. Biosíntesis de compuestos fenólicos a través de la ruta del shikimato/ fenilpropanoide y la ruta acetato/ malonato.

2.3.2 Fitoquímicos y actividades farmacológicas de *Brassica oleracea* var *capitata*.

En *Brassica oleracea* var *capitata* la actividad biológica es el resultado de la acción concertada de un amplio espectro de los fitoquímicos anteriormente mencionados (compuestos fenólicos y glucosinolatos).

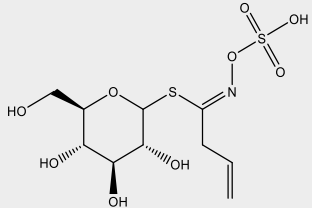
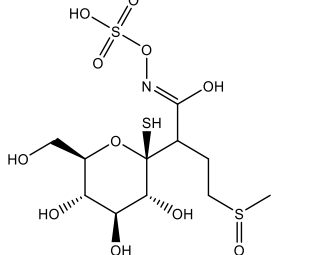
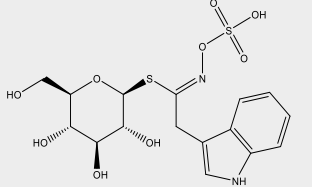
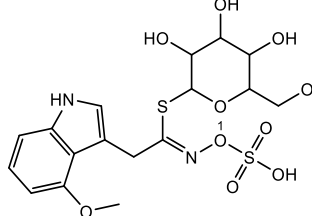
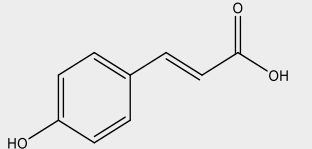
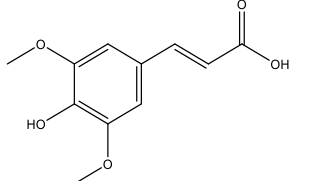
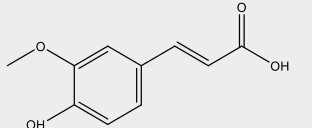
Estudios *In vitro* en *In vivo*, así como datos epidemiológicos confirman sus beneficios sobre la salud humana. El consumo de este vegetal ha sido asociado con la disminución del riesgo de padecer ciertos cánceres comunes como el cáncer de colon, próstata, mama, riñón y páncreas. También se ha reportado el efecto preventivo de este vegetal en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y diabetes tipo 2.

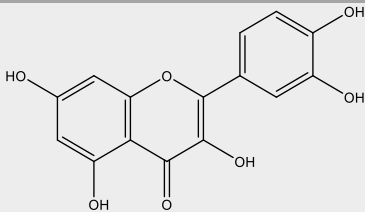
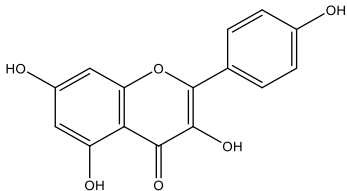
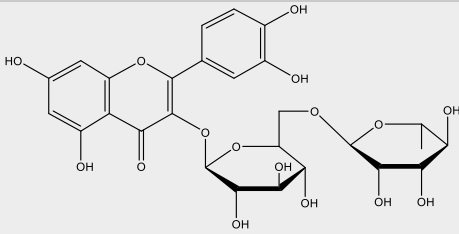
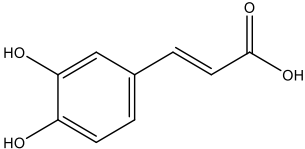
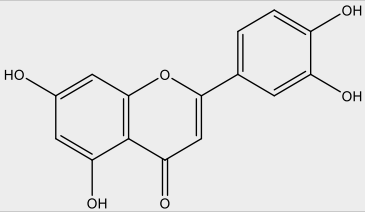
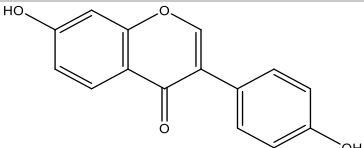
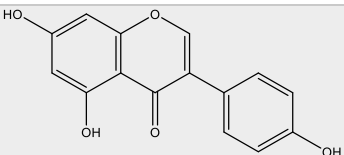
En *Brassica oleracea* var *capitata*, se han identificado los flavonoides; miricetina, quercetina (**24**), kaempferol (**25**), luteolina (**28**), delfinidina, cianidina, y pelargonidina. (Franke *et al.*, 2004). Particularmente, kaempferol y quercetina, han demostrado tener actividad antioxidante, antiinflamatoria y anticarcinogénica (Manach *et al.*, 2004).

Además de compuestos flavonoides se han encontrado ácidos fenólicos, metabolitos secundarios derivados de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, como son los derivados de ácidos cinámicos: ácido *p*-cúmarico (**21**), ácido sinápico (**22**), ácido ferúlico (**23**), ácido cafeico (**27**) y vanílico, basados en el tiempo de retención en cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas (Park *et al.*, 2014).

Los glucosinolatos sinigrina (**17**), glucoiberina (**18**) y glucobrasicina (**19**) han sido reportados como los más abundantes en este vegetal. Los glucosinolatos y compuestos fenólicos con algunas de sus actividades farmacológicas reportadas se enlistan en la tabla 6.

Tabla 6. Fitoquímicos reportados en *Brassica oleracea* var *capitata*.

n°	Nombre de compuesto y tipo de metabolito	Estructura	Actividad biológica	Referencia
17	Sinigrina (glucosinolato alifático)		Agente quimioprotectivo	(Šamec et al., 2016)
18	Gluciberina (glucosinolato alifático)		Agente quimioprotectivo	(Šamec et al., 2016)
19	Glucobrasicina (glucosinolato indólico)		Agente quimioprotectivo	Kusznierewicz et al., 2008)
20	4-metoxi glucobrasicina (Ácido hidroxicinámico)		Agente quimioprotectivo	Šamec et al., 2016
21	Ácido <i>p</i> -cúmarico (ácido hidroxicinámico)		Antioxidante	Kusznierewicz et al., 2008)
22	Ácido sinápico (ácido hidroxicinámico)		Antioxidante	(Koss-Mikołajczyk et al., 2019)
23	Ácido ferúlico (ácido hidroxicinámico)		Antioxidante	Manchali et al. 2012

n°	Nombre de compuesto Y tipo de metabolito	Estructura	Actividad biológica	Referencia
24	Quercetina (Flavonol)		Previene la enfermedad coronaria e inflamación crónica, suprime la proliferación celular en líneas de cáncer de intestino	(Singh et al., 2006); (Mageney et al., 2017)
25	Kaempferol (Flavonol)		Prevención de aterosclerosis e inhibición del crecimiento de líneas de bacterias positivas y bacterias gram negativas)	(Ahmed & Rao, 2014); (Mageney et al., 2017)
26	Rutina (Glucósido flavonoide)		Antioxidante	(Ahmed & Rao, 2014)
27	Ácido cafeico (ácido hidroxicinámico)		Antioxidante	(Park et al., 2014)
28	Luteolina (flavona)		Fitoestrógeno con funciones antibacteriales y antiinflamatorias, inductor de apoptosis.	(Mageney et al., 2017)
29	Dadzeína (Isoflavona)		Sugerida para ejercer beneficios coronarios, reducir directamente aterosclerosis y bajo colesterol LDL.	(Kuhnle et al., 2009); (Erdman et al., 2007)
30	Genisteína (Isoflavona)		Similar a Dadzeína	(Erdman et al., 2007)

2.4 Método Folin-ciocalteu

La extracción exhaustiva, generalmente seguida de una purificación, es esencial para el análisis de polifenoles de frutas u otros materiales vegetales. Debido a la amplia gama de compuestos, se han publicado muchos métodos diferentes, pero solo unos pocos son universalmente aplicables.

Los métodos para la determinación de fenoles se pueden clasificar en tres grupos: parámetros de suma simple, técnicas cromatográficas y métodos quimiométricos. La cuantificación del contenido total de polifenoles o de subclases simples se lleva a cabo principalmente por medidas fotométricas. El método más común para la cuantificación de fenoles está basado en la reacción del reactivo Folin-Ciocalteu. Muchos métodos con ligeras modificaciones han sido publicados, siendo el método de Singleton & Rossi uno de los más citados. (Weber et al., 2014).

El reactivo Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{42}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que reacciona con fenoles y sustancias reductoras no fenólicas para formar cromógenos este último puede ser detectado espectrofotométricamente ya que en condiciones alcalinas el oxotungstato y oxomolibdato formados en esta reacción redox muestran una coloración azul proporcional a la concentración de fenoles. El ensayo Folin-Ciocalteu es una reacción basada en la transferencia de electrones, que mide la capacidad reductora de un antioxidante. Ha sido ampliamente usado en estudios clínicos y nutricionales para medir el contenido total de polifenoles en alimentos derivados de plantas y muestras biológicas.

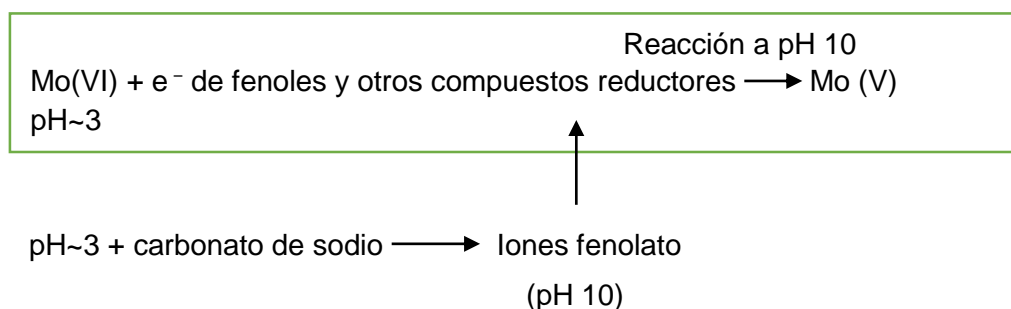
Los resultados del ensayo Folin-Ciocalteu correlacionan muy bien con aquellos obtenidos en otros ensayos antioxidantes usados en el análisis de alimentos, tales como: ORAC, ABTS y DPPH (Lamuela-Raventós, 2017).

Como antecedente histórico el ensayo F-C fue generado con la finalidad de mejorar el ensayo Folin-Denis (F-D), el cual fue diseñado para determinar indirectamente la concentración de proteína total midiendo el contenido de tirosina y triptófano. El principio de ambos métodos está basado en la reacción entre el reactivo oxidante y el triptófano/tirosina, resultando en una formación de color azul proporcional a la concentración de la proteína.

La principal diferencia entre el ensayo F-D y el F-C es la proporción de molibdeno (Mo) usado para preparar el reactivo. Folin y Ciocalteu incrementaron el contenido de Mo para prevenir la formación de un precipitado blanco observado en el ensayo F-D. El método F-C es más sensible y reproducible que el método F-D.

A pesar de que la naturaleza química del reactivo Folin-Ciocalteu no ha sido elucidada, se cree que está compuesto de un heteropoliácido-fosfotungstato/molibdato. Así mismo la naturaleza química exacta es desconocida, se piensa que la reacción en el método F-C que dirige el cambio en las especies a una tonalidad azul es posiblemente debida al complejo $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^4$ formado. Sin embargo, se asume que la reacción F-C involucra secuencias de reacciones de reducción reversible de uno o dos electrones. De los componentes del reactivo F-C, los molibdatos se reducen más fácilmente que los tungstatos y, por lo tanto, se sugiere que la mayoría de las reacciones de transferencia de electrones en el ensayo se encuentran entre los reductores y los molibdatos como se muestra en ecuación (31).

Durante el ensayo F-C, inicialmente, el reactivo tiene un pH ácido y es necesario alcanzar un pH 10 para que los compuestos fenólicos y el reactivo F-C reaccionen, este pH se alcanza mediante la adición de carbonato de sodio. Bajo estas condiciones básicas, la disociación de un protón fenólico conduce a la formación de iones fenolato, capaces de reducir el reactivo F-C (Sánchez-Rangel et al., 2013).



En reacción con un reductor (ácido gálico), se forma el azul del molibdeno y el estado de oxidación medio del metal esta entre 5 y 6 (Anjali & Seth, 2015).

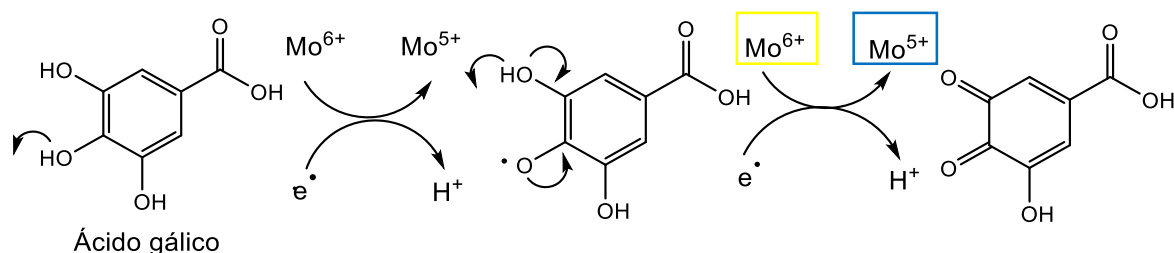
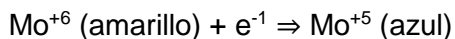
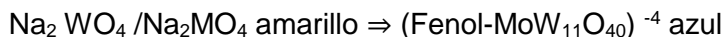


Figura 6. Reacción entre el reactivo Folin y el ácido gálico (compuesto fenólico).

Para este método se han impuesto pasos y condiciones obligatorias para obtener datos fiables y predecibles que se enlistan a continuación:

- (1) Relación de volumen adecuada del álcali y el reactivo F-C.
- (2) Tiempo de reacción óptimo y temperatura para el desarrollo del color.
- (3) Monitoreo de densidad óptica a 760 nm.
- (4) Uso de ácido gálico, como fenol estándar de referencia.

El porcentaje de aumento en la absorbancia para diferentes soluciones de referencia (ácido gálico, ácido tánico, catequina, pirogálico) ha sido comparado a longitudes de onda de 691, 715, 760 y 800 nm. Los análisis estadísticos indican un significativo incremento en la absorbancia a 760 nm comparado con los datos de todas las soluciones a 691 y 715 nm. La absorbancia a 800 nm fue mayor que en las otras longitudes de onda; sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo para la proporción en 760 nm, lo que sugiere que este parámetro es estable, según lo determinado por la Farmacopea Europea. La cinética de reacción con respecto al período de tiempo anterior a la medición espectrofotométrica. El aumento en el porcentaje de absorbancia se determinó para cada solución con respecto a los períodos de tiempo de 10, 20, 30 y 40 min.

Estos datos mostraron que la reacción de Folin-Ciocalteu fue estable durante el período analizado, ya que a los 30 min la absorbancia aumentó menos del 5% del valor a los 10 minutos y no disminuyó entre 30 y 40 minutos. Estos resultados sugieren un período de 30 min para la medición espectrofotométrica (Anjali & Seth, 2015). El contenido total de fenoles, usando el ácido gálico como sustancia de referencia es expresado en gramos de equivalente de ácido gálico o (GAE/g) por sus siglas en inglés *Gallic acid Equivalent*.

Hoy en día, el reactivo Folin-Ciocalteu está disponible comercialmente en muchas empresas, por lo que este método se utiliza ampliamente para cuantificar compuestos fenólicos simples y polifenoles, de extractos derivados de plantas, así como alimentos y bebidas. La farmacopea incluye el ensayo F-C y en Europa ha sido adoptado como el procedimiento oficial para medir los niveles fenólicos totales en vinos.

2.5 Radicales libres y actividad antioxidante

El oxígeno apareció hace 2.2 billones de años, en cantidades representativas, debido a la fotosíntesis de cianobacterias y microalgas, las cuales evolucionaron para usar la energía solar, dióxido de carbono y agua como donante de electrones para su metabolismo, como consecuencia el oxígeno era liberado como subproducto, esto dio lugar a que este gas se acumulara en la atmosfera en grandes cantidades. Esto tuvo la ventaja de la formación de la capa de ozono en la estratosfera que protege a los organismos vivos de la radiación UV. Presumiblemente el ser humano es descendiente de organismos que se adaptaron al aumento de oxígeno en la tierra, gracias a la evolución de los sistemas antioxidantes que ayudaron a mitigar los efectos nocivos de vivir en la tierra en ambientes altamente tóxicos.

El oxígeno molecular en su forma más estable (que es la forma que se encuentra en el aire que nos rodea), se puede considerar como un radical libre pues tiene dos electrones no apareados, con el mismo número cuántico de giro o spin, como se puede observar en el diagrama de orbitales moleculares del oxígeno molecular (figura 7), esto hace al oxígeno un potente agente oxidante, ya que es capaz de aceptar electrones, sin embargo, si el O₂ oxidara una molécula no radical y aceptara un par de electrones, estos electrones deberían tener el mismo giro (paralelo) para poder ocupar los orbitales vacantes en el orbital de antienlace.

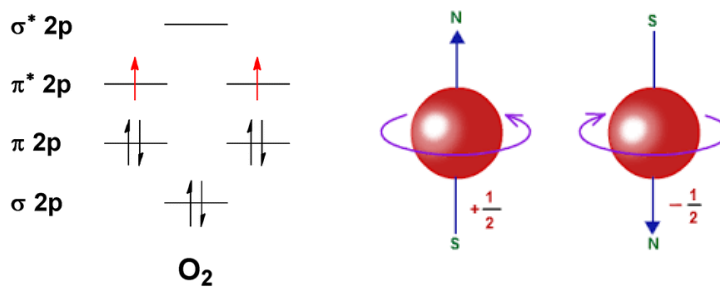


Figura 7. Diagrama de orbital molecular del oxígeno molecular (*izquierda*) y números cuánticos de spin o giro de un electrón sobre su propio eje (*derecha*).

Un par de electrones en un orbital atómico o molecular no cumplen con este criterio puesto que tienen giro antiparalelo de $+1/2$ y $-1/2$ (figura 7). Esta restricción de giro hace que el, O_2 acepte sólo un electrón a la vez y explica por qué reacciona lentamente con la mayoría de las moléculas no radicales. Por el contrario, reacciona notablemente rápido con radicales por transferencia de un solo electrón y esto hace que genere otras moléculas radicales.

Un radical libre, se define como cualquier especie que contiene un electrón desapareado, y, como se observa en la figura 7, es aquel que ocupa un orbital atómico o molecular por sí mismo. Esto hace a muchos radicales inestables y altamente reactivos.

El oxígeno molecular en su estado basal es poco reactivo y su reducción completa con $4e^-$ resulta en la formación de agua. Sin embargo, su reducción parcial genera especies reactivas de oxígeno (ERO), incluyendo el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$). La primera reacción en la reducción parcial del oxígeno molecular es la adición de un electrón para formar O_2^- . Este puede ser protonado a pH bajo para formar el radical perhidroxilo (HO_2). El O_2^- y HO_2 sufren una dismutación espontánea para producir H_2O_2 . El H_2O_2 es estable y menos reactivo que el O_2^- . Sin embargo, en la presencia de metales de transición reducidos como el Fe^{2+} , que pueden estar libres o formando complejos con agentes quelantes o proteínas, puede ocurrir la formación del ($\bullet OH$) (figura 8).

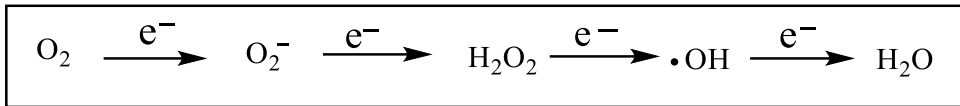


Figura 8. Reducción parcial del oxígeno molecular en su estado basal.

El radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) es un oxidante muy fuerte y puede iniciar reacciones en cadena de radicales con una gran variedad de moléculas orgánicas, esto puede llevar a la peroxidación de lípidos, inactivación de enzimas, y degradación de ácidos nucleicos. La mayoría de las moléculas biológicas no son radicales y cuando un radical libre reacciona con un no radical, se forma un nuevo radical y sucede una reacción en cadena.

Los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno se derivan de procesos metabólicos normales, esenciales en el cuerpo humano o desde fuentes exteriores como la exposición a los rayos X, el ozono, el tabaquismo, contaminantes del aire y productos químicos industriales.

La formación de radicales libres ocurre continuamente en las células como consecuencia de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Por ejemplo, las enzimas NADPH oxidasa en células fagocitarias cataliza la reducción mono electrónica del oxígeno molecular para producir el radical superóxido. La fagocitosis es la capacidad que tienen cierto tipo de células de ingerir otras partículas como una respuesta inmune a patógenos, sin embargo, una mayor exposición al medioambiente y los altos niveles de xenobióticos en la dieta resultan en una mayor generación de ERO, rompiendo la homeostasis (equilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y los sistemas antioxidantes).

Las ERO son responsables del estrés oxidativo, un desequilibrio en cualquier célula, tejido u órgano entre la cantidad de radicales libres y la capacidad de los sistemas de desintoxicación y reparación. El daño oxidativo sostenido solo se produce en condiciones de estrés oxidativo, cuando los sistemas de desintoxicación y reparación son insuficientes. El daño inducido por radicales libres, cuando no se repara, destruye lípidos, proteínas, ARN y ADN, y puede contribuir a la enfermedad. El estrés oxidativo se ha implicado como un factor que contribuye al cáncer; la aterosclerosis (endurecimiento de las arterias), artritis, diabetes, la enfermedad renal, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esquizofrenia, el trastorno bipolar, el enfisema y cataratas.

El desarrollo de los radicales libres es inevitable, sin embargo, el cuerpo humano se ha adaptado, estableciendo y manteniendo mecanismos de defensa que reducen su impacto.

Los dos principales sistemas de defensa del cuerpo son enzimáticos, enzimas desintoxicantes de radicales libres y los no enzimáticos, sustancias químicas antioxidantes. Los sistemas de enzimas desintoxicantes de radicales libres son responsables de proteger el interior de las células del daño de los radicales libres.

Un antioxidante es cualquier molécula que puede bloquear los radicales libres para que no roben electrones, los antioxidantes retrasan o inhiben el daño celular.

La actividad antioxidante es definida como una limitación de la oxidación de proteínas, lípidos, ADN y otras moléculas, que se produce al bloquear la etapa de propagación en las reacciones de cadena oxidativa (Huang et al., 2005). Los tres mayores sistemas antioxidantes enzimáticos, son:

1. Superóxido dismutasa (SOD)
2. Catalasa
3. Glutatión peroxidasa

Los sistemas antioxidantes no enzimáticos se clasifican ampliamente como compuestos químicos hidrofílicos (solubles en agua) o hidrofóbicos (solubles en lípidos), y esta clasificación determina dónde actúan en el cuerpo. Los antioxidantes hidrofílicos actúan en el citosol de las células o en fluidos extracelulares como la sangre. Los antioxidantes hidrofóbicos son los principales responsables de proteger las membranas celulares del daño de los radicales libres. El cuerpo puede sintetizar algunos antioxidantes, pero otros deben obtenerse de la dieta. Hay dos antioxidantes químicos que el cuerpo sintetiza:

1. **Glutatión.** Esta molécula está compuesta de tres aminoácidos y se encuentra en altas concentraciones en las células. El aminoácido cisteína del glutatión contiene un grupo azufre que puede donar un electrón a un radical libre, estabilizándolo. Después de que el glutatión ha perdido su electrón, se regenera enzimáticamente para que pueda realizar su función antioxidante una vez más.

2. **Ácido úrico.** Esta molécula es un intermediario metabólico en la descomposición de nucleótidos como la adenina, que se encuentra en el ADN y el ARN, entre otras macromoléculas. Circula a altas concentraciones en la sangre y desactiva los radicales libres circulantes.

Antioxidantes obtenidos de la dieta

Los antioxidantes obtenidos de la dieta, incluyen compuestos polifenólicos como ácidos fenólicos y flavonoides, vitaminas A, C, E y carotenoides, se cree que son nutrientes efectivos en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Los antioxidantes se han vuelto un tema de interés, para el público general, médicos, expertos en nutrición e investigadores de ciencias de la salud y la alimentación, para conocer la capacidad antioxidante y los componentes de los alimentos que consumimos. Esto ha dirigido al desarrollo de métodos para la determinación de esta actividad antioxidante, en plantas, frutas y verduras. En consecuencia, el requisito de un ensayo estándar es muy importante para poder comparar los resultados de diferentes laboratorios y la validación de la conclusión.

2.5.1 Métodos para determinar actividad antioxidante

Sobre la base de las reacciones químicas involucradas, la mayoría de los ensayos de capacidad antioxidante pueden dividirse en dos categorías:

1. Ensayos basados en reacciones de transferencia de átomo de H (*Hydrogen Atom transfer*, HAT)
2. Ensayos basados en reacciones de transferencia de un electrón (*single electron transfer*, SET).

Los métodos basados en HAT miden la capacidad de un antioxidante para atrapar los radicales libres mediante la donación de hidrógeno. Estos métodos son independientes del pH y generalmente son bastante rápidos, por lo general se completan en segundos a minutos. Un ejemplo es el ensayo ORAC por sus siglas en inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity o Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (CARO) en español. Los métodos basados en SET miden la capacidad de un antioxidante como la reducción de un oxidante, incluidos metales, carbonilos y radicales, que cambian de color cuando se reducen, el grado de cambio de color está correlacionado con las concentraciones de antioxidantes de la muestra, dependen del pH y se basan en el porcentaje de disminución del producto en lugar de la cinética, siendo generalmente más lento que los métodos basados en HAT.

La capacidad Antioxidante para Reducir el ion Férrico (Ferric Ion Reducing antioxidant power, FRAP), el ensayo de fenoles totales por el reactivo Folin-Ciocalteu (FCR), la capacidad antioxidante de equivalentes de Trolox (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity, TEAC) y el ensayo DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) se basan en mecanismos de reacción SET (Bartosz, 2010).

2.6 Quimioinformática

El término quimioinformática hace referencia al uso de técnicas computacionales e informativas para comprender y dar solución a diversos problemas que se presentan en química. Estas técnicas son útiles en el descubrimiento de fármacos, en los que se evalúa un gran número de compuestos para determinar sus propiedades específicas.

Con el uso de la quimioinformática, los especialistas en esta área buscan y recopilan datos moleculares sobre propiedades físicas, elucidación y representación de estructuras químicas, sistemas de diseños de síntesis asistida por ordenador y relación estructura-actividad cuantitativa, grupos funcionales moleculares y sitios de acoplamiento, y otros parámetros. El campo de acción de esta disciplina se esquematiza en la tabla 7, que abarca desde la recolección, análisis y gestión de datos químicos, hasta la predicción del comportamiento de moléculas orgánicas en seres vivos.

Tabla 7. Campo de acción de la quimioinformática.

Disciplina	Campo de acción
Quimioinformática	Recolección, análisis y gestión de datos químicos. Representación gráfica de datos y modelamiento molecular. Diseño y organización de base de datos. Predicción de la estructura química y propiedades biológicas de análogos químicos. Análisis de la similitud y diversidad molecular. Optimización y diseño de compuestos y librerías químicas. Diseño de algoritmos y estrategias de búsqueda en bases de datos. Estudio cualitativo y cuantitativo de la estructura-actividad de las librerías químicas. Disertación teórica sobre la información aplicada a problemas químicos. Desarrollo de modelos estadísticos y nuevos descriptores en química orgánica. Predicción del comportamiento de moléculas orgánicas en seres vivos.

2.6.1 Quimiinformática aplicada a productos naturales

Los productos naturales (PN) tienen un largo historial de uso como componentes de medicinas tradicionales y remedios basados en hierbas. Incluso para el descubrimiento moderno de fármacos de moléculas pequeñas siguen siendo la fuente más prolífica de inspiración. De hecho, aproximadamente dos tercios de todos los fármacos de moléculas pequeñas aprobados entre 1981 y 2019 están relacionados, en diferentes grados, con los PN.

Mientras que solo el 5% de los medicamentos que se han introducido en el mercado durante este período de tiempo son PN inalterados, 28% son derivados de PN, y 35% imitan y / o contienen un farmacóforo PN (Chen & Kirchmair, 2020).

Los PN son muy diversos en sus estructuras y propiedades fisicoquímicas. Muchos de ellos tienen propiedades fisicoquímicas y ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) favorables; otros están claramente más allá de lo que generalmente se considera como un espacio químico similar a las drogas.

Establecer la actividad biológica de un producto natural, así como el descubrimiento de fármacos derivados de productos naturales puede ser un proceso largo, debido a la complejidad en la estructura de estos. Comenzando desde la obtención de los extractos, los ensayos *In vitro* de actividad biológica, la identificación y aislamiento de los compuestos bioactivos desde una mezcla compleja, la determinación del modo de acción, el reabastecimiento de compuestos de interés (por ejemplo, a través de síntesis química total), y el perfil de todas las propiedades farmacológicas, farmacocinéticas y toxicológicas requieren experiencia, esfuerzos sustanciales, tiempo, fondos y no hay garantía de éxito.

Los métodos computacionales pueden hacer contribuciones sustanciales al descubrimiento de fármacos basados en PN y ayudar a los experimentadores durante el descubrimiento, ya que ayudan a identificar los productos naturales bioactivos y también en la priorización de materiales (vegetales) para las pruebas.

Existen varios programas de fuente abierta, gratuita y grandes colecciones virtuales con una amplia gama de bases de datos que permiten predecir la actividad biológica de los compuestos aislados de productos naturales.

En este proyecto se utilizó el sitio web PASS online, para evaluar los compuestos fenólicos encontrados en *Brassica oleracea* var *capitata* que han sido reportados en la literatura. El programa informático PASS (Prediction and Assistant Experimental Design) permite estimar el perfil probable de actividad biológica de un compuesto orgánico similar a un fármaco. La estimación se basa en un análisis de las relaciones estructura-actividad para un amplio conjunto de información que implica sustancias farmacológicas, candidatos a fármacos en diversas etapas de la investigación clínica y preclínica, agentes y compuestos para los que se conoce información específica sobre toxicidad. Es importante mencionar que los resultados son dados en probabilidades de ser activo (P_a) y probabilidades de ser inactivo (P_i) con lo cual se determina la posible actividad de un compuesto.

La predicción de la actividad biológica utilizando programas quimioinformáticos, tiene como principales objetivos: la planificación de pruebas biológicas, la planificación de síntesis química, el descubrimiento de nuevos tipos de actividad para compuestos conocidos, así como la evaluación de riesgos de seguridad y uso de compuestos químicos.

La evaluación de compuestos fenólicos conocidos como los ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, permitió descubrir la actividad de estos compuestos en ciertos objetivos biológicos, así como reafirmar su capacidad antioxidante y estabilizadora de radicales libres que se les otorga debido a sus estructuras químicas.

Estos programas quimioinformáticos también nos permiten calcular diversas propiedades moleculares como: peso molecular (**PM**), coeficiente de partición octanol/agua (**logP**), número de átomos (**N.A**), número de enlaces rotacionales (**# E.R**), número de aceptores de enlace de hidrógeno (**# A. E.H**), número de donadores de enlace de hidrógeno (**# D.E.H**) y el área de superficie polar (**PSA**).

Estas propiedades excepto el **# E.R** han demostrado tener una influencia significativa en la biodisponibilidad y penetración de estos compuestos en las membranas biológicas, así como su absorción oral de acuerdo con la regla de cinco de Lipinski, permitiendo establecer así la similitud de estos con ciertos fármacos.

La regla de cinco de Lipinski, se deriva de un análisis de compuestos de una amplia base de datos, identificando características que son de importancia en compuestos que puedan absorberse por vía oral. Estos factores involucran números que son múltiplos de cinco.

- Un peso molecular menor a 500g/mol
- No más de 5 grupos donadores de enlace de hidrógeno
- No más de 10 grupos aceptores de enlace de hidrógeno
- Un valor de **logP** calculado menor que 5 (logP es una medida de la hidrofobicidad de un fármaco; conocido como coeficiente partición octano/ agua).

La optimización de la biodisponibilidad de los productos naturales con actividad biológica es un área de enfoque de investigación para la comunidad científica. La aplicación de modelos generados *in silico* contribuye a entender los mecanismos de acción de los principios activos de los medicamentos o a mejorar las propiedades de los mismos. Un ejemplo es la optimización de los fármacos de origen natural.

En la actualidad se hacen esfuerzos para mejorar las propiedades de estos medicamentos (como reducir efectos secundarios) o buscar actividades biológicas potenciales de compuestos químicos aislados de fuentes naturales por ello, la importancia de utilizar herramientas computacionales (Saldívar-González et al., 2017).

Por ello, se utilizaron varios programas de fuente abierta, gratuita con una amplia gama de bases de datos que permitieron establecer las propiedades moleculares y la actividad biológica de los compuestos fenólicos **21-30**.

3. Justificación

Los vegetales crucíferos (*Brassica oleracea*) son importantes tanto en su uso agrícola, gastronómico, además de su alto contenido nutricional y de fitoquímicos organosulfurados y polifenoles, estos últimos son de gran importancia farmacológica, porque se les ha atribuido su actividad antioxidante y quimiopreventiva.

De las variedades más representativas de estos vegetales se encuentra *Brassica oleracea* var *capitata* o col, la cual contiene metabolitos secundarios considerados la fuente de funcionalidad de este alimento con beneficios para la salud humana y cuyo consumo se ha relacionado con una disminución del riesgo de padecer ciertas enfermedades crónicas. Algunos ejemplos de compuestos bioactivos en esta especie vegetal son las vitaminas, minerales, glucosinolatos y compuestos fenólicos. Es importante el reconocimiento de las propiedades antioxidantes de los polifenoles y su posible rol en la prevención de varias enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.

Por lo tanto, este proyecto de investigación, se centra en determinar el contenido de compuestos fenólicos totales de dos extractos metanólicos y jugo del vegetal *Brassica oleracea* var. *capitata* L (col), así como la predicción de su actividad biológica *in silico* con el uso de programas quimioinformáticos.

4. Hipótesis

Los extractos de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) tendrán presencia de polifenoles, los cuales estarán relacionados con su actividad antioxidante *in silico*.

5. Objetivo general

Determinar el contenido de fenoles totales de tres muestras de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) y predecir su potencial actividad antioxidante *in silico*.

5.1 Objetivos particulares

1. Obtener el jugo liofilizado y los extractos metanólicos del bagazo y col fresca adquiridas en un mercado local.
2. Fraccionar los extractos metanólicos por medio de extracción líquido-líquido con disolventes de polaridad creciente.
3. Determinar el contenido de polifenoles totales de los extractos y sus fracciones por el método de Folin-Ciocalteu.
4. Analizar los polifenoles reportados en la literatura y predecir su actividad biológica, así como sus propiedades moleculares mediante el uso de Molinspiration, PassOnline, Data Warrior y SwissADME.

6. Materiales y métodos

6.1 Colecta del material Vegetal

La col (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) fue obtenida en el mercado local, Adolfo López Mateos en el centro de Cuernavaca Morelos, estas fueron cosechadas en el municipio de Tecamachalco, estado de Puebla.

6.2 Preparación de los extractos

6.2.1 Bagazo col

A una col de 4.89 kg se le quitaron las primeras dos capas externas de hojas que la recubren, se lavó con agua, se cortó a la mitad y posteriormente en trozos para ser procesada en un extractor de jugos convencional marca TurMix (el jugo fue procesado como se muestra en la sección 6.2.3).

Una vez obtenido el bagazo fresco (2.45 kg), se colocó en un recipiente de vidrio y se agregó metanol hasta cubrir totalmente el bagazo, el recipiente se cubrió con papel periódico para evitar la exposición a la luz y se maceró 72 horas por triplicado. El disolvente obtenido fue filtrado y evaporado con un rotavapor a 48°C y aplicación del sistema de vacío.

6.2.2 Col fresca

Se picó la mitad de una col (1.67 kg) en trozos de aproximadamente 0.5 cm, se vertieron en un recipiente de vidrio envuelto en papel periódico, para evitar la exposición a la luz y se maceraron durante 72 horas por triplicado. El disolvente obtenido al igual que el bagazo fue filtrado y evaporado con rotavapor a presión reducida.

6.2.3 Jugo de col

El jugo obtenido (1.7 L) se filtró mediante dos telas, una de algodón y una tela filtrante de monofilamento, por duplicado, se tomaron muestras del jugo y se vertieron en tubos de centrífuga (12.5 ml), se colocaron en la centrífuga (clinical centrifuge Z100A Labret) a 2000 rpm durante 15 min. El jugo centrifugado, se decantó y se almacenó a 0° C en recipientes de vidrio envueltos con papel aluminio, para su posterior liofilización.

El jugo previamente centrifugado y descongelado (75 ml) a temperatura ambiente, se vertió en un matraz fast-freeze, el cual fue colocado en una tina con acetona y hielo seco, se giró el matraz continuamente hasta lograr una congelación uniforme del jugo a una temperatura aproximada de -78°C. Una vez que el jugo se congeló uniformemente se colocó la tapa del matraz fast-freeze, y se conectó a las válvulas de la liofilizadora por medio de un adaptador,

la liofilizadora previamente había alcanzado una temperatura de -40°C y una presión de 0.133mBar , la muestra de jugo se permaneció en la liofilizadora hasta que el hielo desapareció por completo de la parte externa del frasco y la muestra se encontraba a temperatura ambiente y totalmente seca.

6.3 Extracción líquido-líquido de los extractos de col fresca y bagazo de col

Se realizaron extracciones líquido-líquido para cada uno de los extractos, de la col fresca y del bagazo con la finalidad de separar los compuestos más polares de los menos polares contenidos en el extracto.

Se pesaron 30 g del extracto de col en un vaso de precipitados, el extracto se disolvió en 100 ml de un sistema $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (8:2), el extracto disuelto se vertió en un embudo de separación y se agregaron 50 ml de hexano, se mezcló y esperó un par de minutos para la separación de fase hidroalcohólica y hexánica, este proceso fue realizado tres veces consecutivas (figura 9).

A partir de la fase hidroalcohólica inicial, se agregó un sistema $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (6:4), completando así 150ml, a esta fase se le añadió un sistema de 100ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (67:33), se agitó y se esperó a la separación de fase acuosa y fase orgánica (por triplicado). Se concentró la fase orgánica ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$) y posteriormente la fase hexánica.

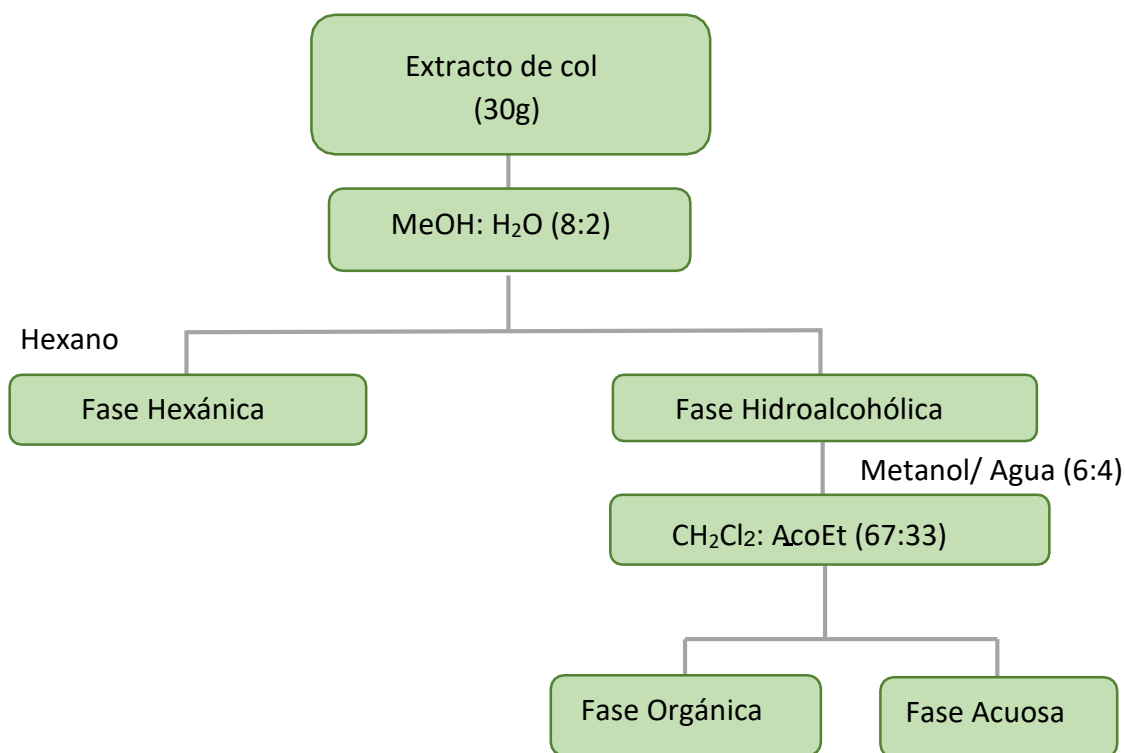


Figura 9. Diagrama de bipartición de los extractos metanólicos de col.

6.4 Polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles se llevó a cabo mediante el método Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al., 1999. Se preparó una curva de calibración de ácido gálico con concentraciones de 100, 75, 50, 25, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$.

Se utilizaron 10 mg de los extractos metanólicos de col fresca (**A**), bagazo de col (**B**) y jugo liofilizado de col (**C**), así como las fases de: col fresca Hex (**D**), col fresca Org (**E**), col fresca Ac (**F**), col bagazo Hex (**G**), col bagazo Org (**H**), col bagazo Ac (**I**), obtenidas por extracción líquido-líquido. Los extractos de 10 mg de cada muestra, fueron pesados en viales transparentes y se añadió 1 ml de agua destilada para disolverlos, obteniendo así concentraciones de 10 mg/ml.

Las muestras fueron transferidas a viales ámbar en una cantidad de 300µl y se añadió a cada una, 450µl de reactivo Folin (diluido 1 en 2 con agua destilada), se dejó reposar durante 5 minutos, luego se adicionó 450µl de Na₂CO₃ al 7.5% y por último 1800 µl de agua destilada. Las muestras fueron agitadas y puestas en una caja ausente de luz, se esperó 30 minutos, posteriormente se tomaron 200µl de cada muestra y se colocaron en una microplaca de 96 pozos (Corning 96-Well), para realizar la lectura de absorbancias. La absorbancia se midió a 760 nm con un espectrofotómetro Multiskan GO (figura 10).

Para para obtener el contenido total de fenoles, expresado en mg / Eq. de ácido gálico/ g del extracto, se utilizó la siguiente ecuación:

$$C = \frac{c \cdot V}{m} \quad \text{Donde:}$$

C: contenido total de fenoles mg Eq. de ácido gálico/ g del extracto en seco

c: concentración de ácido gálico obtenido de la curva de calibración en mg/ml

V: Volumen del extracto en ml

m: masa del extracto en gramos



Figura 10. Espectrofotómetro Multiskan GO

Las fases **D**, **G**, **E** y **H** se analizaron por cromatografía en capa fina, se utilizó un sistema 8:2 Hex/AcOEt en **D** y **G**, para las fases **E** y **H** un sistema 95:5 CH₂Cl₂/MeOH, fueron observadas con lámpara de radiación ultravioleta a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm y posteriormente fue revelado en luz visible usando un revelador de sulfato cérico amoniacal.

6.5 Estudio quimioinformático de polifenoles en col

Para la obtención de los descriptores moleculares (propiedades fisicoquímicas) y la predicción de la actividad biológica se utilizaron los programas quimioinformáticos molinspiration, SwissADME, Datawarrior, PASS online y se analizaron las estructuras químicas de los compuestos fenólicos: ácido *p*-cúmarico (**21**) (Kusznierewicz *et al.*, 2008), ácido sinapico (**22**) (Koss-Mikołajczyk *et al.*, 2019), ácido ferúlico (**23**) (Manchali *et al.* 2012), quercetina (**24**) (Mageney *et al.*, 2017), kaempferol (**25**) (Ahmed & Rao, 2014), rutina (**26**) (Ahmed & Rao, 2014), ácido cafeico (**27**) (Park *et al.*, 2014), luteolina (**28**) (Mageney *et al.*, 2017), daidzeína (**29**) (Kuhnle *et al.*, 2009) y genisteína (**30**) (Erdman *et al.*, 2007), con la finalidad de asignar su diversidad química, estudiando la distribución de propiedades moleculares importantes: peso molecular (**PM**), coeficiente de partición octanol/agua (**logP**), número de átomos (**N.A**), número de enlaces rotacionales (**# E.R**), número de aceptores de enlace de hidrógeno (**# A. E.H**), número de donadores de enlace de hidrógeno (**# D.E.H**) y el área de superficie polar (**PSA**).

6.5.1 Molinspiration

Para valorar las propiedades fisicoquímicas de los compuestos fenólicos, se utilizó el programa en línea Molinspiration Cheminformatics <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> (Figura 11). Molinspiration ofrece un conjunto de herramientas de procesamiento molecular y cálculo de propiedades y visualización de moléculas en 3D, entre otras. Para este caso se introdujeron códigos SMILES para el cálculo de las propiedades moleculares donde se evalúan los criterios establecidos por las reglas de Lipinski, así como el número de violaciones a estas, el coeficiente de partición octanol/agua (logP) y el área de superficie polar PSA.

Enter SMILES
O=c2c(c1ccc(O)cc1)ccc3cc(O)cc(O)c23 [Clear](#)
 or draw molecule below

Calculate Properties
 Predict Bioactivity
 Galaxy 3D Generator

[Molinspiration home](#)
[Molinspiration products and services](#)
[Molinspiration services FAQ](#)
[Terms of service](#)

© Molinspiration Cheminformatics 2020

Figura 11. Interfaz del programa Molinspiration Cheminformatics online, (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

6.5.2 SwissADME

Este sitio web <http://www.swissadme.ch/>, del Instituto suizo de bioinformática, te permite calcular descriptores fisicoquímicos, así como predecir los parámetros de ADME, las propiedades farmacocinéticas, la naturaleza similar a la de un fármaco y la compatibilidad con la química medicinal de una o varias moléculas pequeñas para respaldar el descubrimiento de fármacos.

Mediante el uso de códigos SMILES se obtuvieron los descriptores químicos que al igual que molinspiration permiten evaluar los criterios de Lipinski (figura 12).

Swiss Institute of Bioinformatics

Home FAQ Help Disclaimer

This website allows you to compute physicochemical descriptors as well as to predict ADME parameters, pharmacokinetic properties, druglike nature and medicinal chemistry friendliness of one or multiple small molecules to support drug discovery.

The main article describing the web service and its underlying methodologies is SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* (2017) 7:42717.
 For details about development and validation of iLOGP, please refer to this article: iLOGP: a simple, robust, and efficient description of *n*-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *J. Chem. Inf. Model.* (2014) 54(12):3284-3301.
 For details about development and validation of the BOILED-Egg, please refer to this article: A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem* (2016) 11(11):1117-1121.

Developed and maintained by the Molecular Modeling Group of the SIB | Swiss Institute of Bioinformatics.

Enter a list of SMILES here:
OC1=CC=C(C=C1)O=C1C=CC=C1 caffeic acid
O=C1C=CC=C(C=C1)C(=O)C2=CC=CC=C2 c3

Figura 12. Sitio web SwissADME del instituto suizo de bioinformática, (<http://www.swissadme.ch/>)

6.5.3 Datawarrior

Es un programa de fuente abierta que permite la visualización de datos y estructuras en 2D y 3D, así como el análisis de reacciones químicas y cálculos de propiedades fisicoquímicas, generando los resultados en forma de tablas (figura 13). Este programa al igual que los anteriores tiene la opción de pegar el código SMILES o de construir la estructura química de los compuestos de interés. Este programa fue utilizado para corroborar los descriptores fisicoquímicos obtenidos de los programas molinspiration y SwissADME.

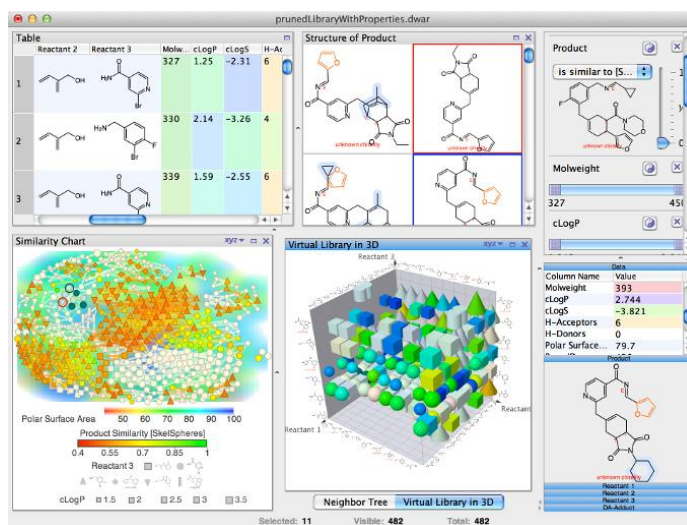


Figura 13. Datawarrior, programa de fuente abierta.

6.5.4 PASS online

Para la predicción de la actividad biológica por medio de este software, se realizó el registro como usuario en el sitio web: <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/> y se utilizaron los códigos SMILES de los compuestos para obtener la predicción. En la figura 14 se muestra la interfaz de la página web.

The screenshot shows the PASS online web interface. At the top, the logo "PASSonline" is displayed, along with the user name "Samir Castolo" and a "Log out" link. A navigation menu includes "Home", "Definition", "Products", "Services", "FAQ", and "Contacts". The main content area features several buttons: "Predict new compound", "View all results", "View change profile", "SMILES", "MOL file", and "Marvin JS". A large text input field contains the SMILES string OC1=C(C2=CC=C(O)C(O)=C2)OC3=C(O)C=CC=C3. Below the input field is a "Get prediction" button. At the bottom, there are radio buttons for "All", "Pa>Pi", "Pa>0,3", and "Pa>0,7", along with an "ok" button. A table displays the predicted activities:

Pa	PI	Activity
0,973	0,002	Membrane integrity agonist
0,969	0,002	HIF1A expression inhibitor
0,962	0,001	Peroxidase inhibitor
0,957	0,002	HMOX1 expression enhancer

Figura 14. Interfaz del sitio web PASS online con la introducción de un código SMILES. (<http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/>)

7. Resultados

7.1 Rendimientos y análisis de extractos por cromatografía en capa fina.

Se llevó a cabo la obtención de extractos de *Brassica oleracea var capitata* (col) como se describe a continuación: extracto metanólico de col fresca (**A**), bagazo de col (**B**) y jugo liofilizado de col (**C**); así como las fracciones gruesas obtenidas por extracción líquido-líquido de: col fresca Hexano (**D**), col fresca CH₂Cl₂/AcOEt (**E**), col fresca Acuosa (**F**), col bagazo Hexano (**G**), col bagazo CH₂Cl₂/AcOEt (**H**), col bagazo Acuosa (**I**).

Los rendimientos del extracto metanólico de col fresca (**A**) y bagazo de col (**B**) fueron del 3.32 % (91.6 g) y 5.8 % (144.2 g) respectivamente. Partiendo de una cantidad de 30 g de los extractos metanólicos (**A-B**), se obtuvieron las fases (**D-I**) cuyos rendimientos se muestran en la tabla 8. Los rendimientos mayoritarios se obtuvieron en las fases acuosas **F** e **I** para ambos extractos con un rendimiento de 94 % y 91 %, respectivamente. Esto se debe a que la humedad (agua) en la col corresponde a un 87.9% de su composición.

Tabla 8. Rendimientos de los extractos metanólicos y fases de col

Muestra		Peso (g)	Rendimiento (%)
Extracto MeOH de col fresca	(A)	91.6	3.32
Extracto MeOH bagazo de col	(B)	144.2	5.8
Jugo liofilizado de col	(C)	1.7 g	5.6
F. Hexánica de col fresca	(D)	0.2	0.7
F. Orgánica de col fresca	(E)	0.29	0.97
F. Acuosa col Fresca	(F)	28.2	94
F. Hexánica bagazo de col	(G)	0.7	2.3
F. Orgánica bagazo de col	(H)	0.5	1.7
F. Acuosa bagazo de col	(I)	27.3	91

Las fases **E** y **H** presentaron absorción de radiación UV a ambas longitudes de onda, lo cual es característico de compuestos polifenólicos, que presentan dobles enlaces conjugados en su estructura, la coloración roja bajo la luz UV a 365nm es característico de la presencia de clorofila. (figura 15).

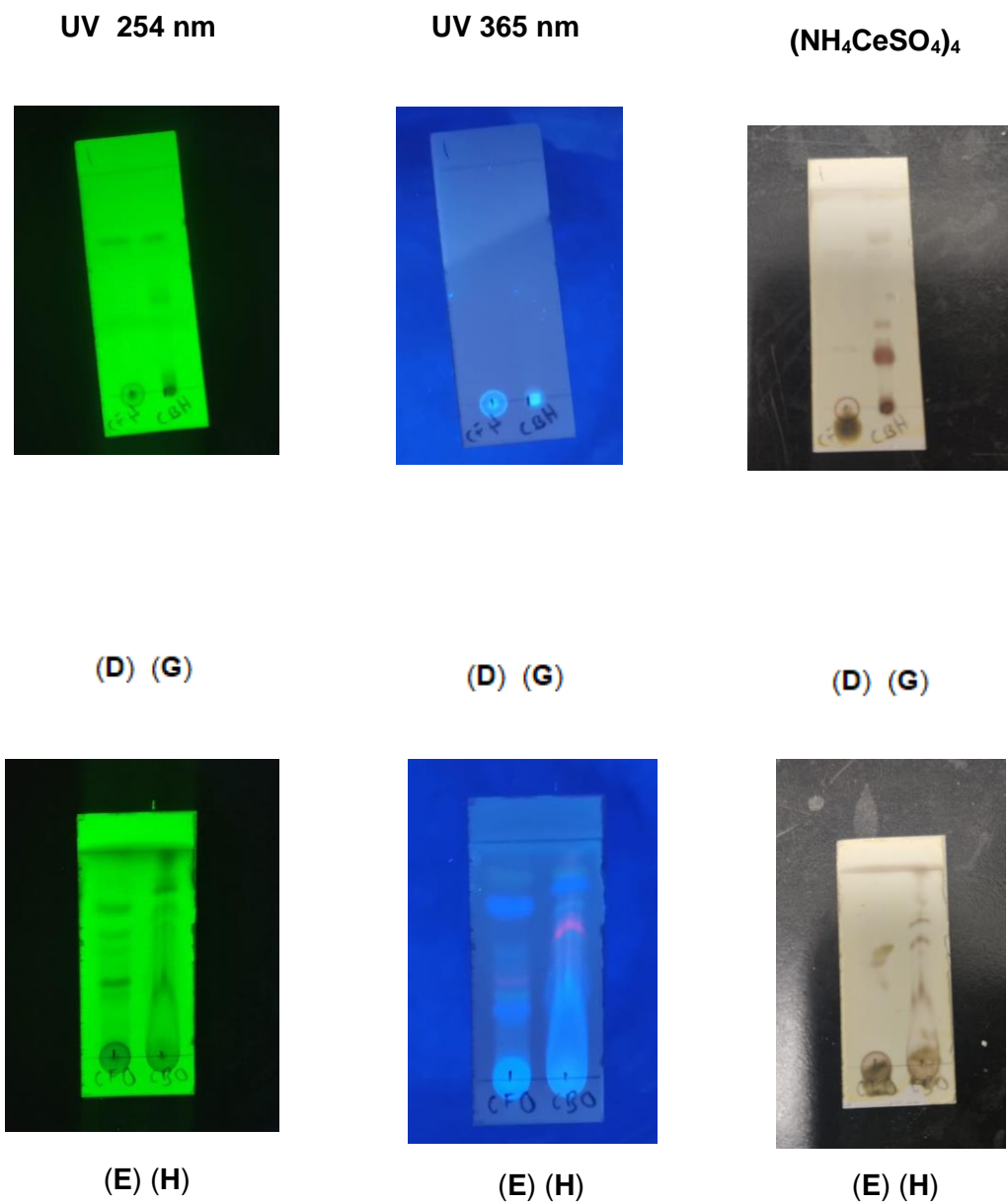


Figura 15. Perfil de cromatografía en capa fina de las fases de col fresca hexánica (D), col bagazo hexánica (G), col fresca orgánica (E) y col bagazo CH_2Cl_2 : AcOEt (H) revelados con $(\text{NH}_4\text{CeSO}_4)_4$ y luz UV.

7.2 Contenido total de fenoles

7.2.1 Curva de calibración de ácido gálico.

Se escogió el ensayo Folin-Ciocalteu por ser simple de realizar, directo y produce resultados consistentes, el ácido gálico se utilizó como estándar al ser un compuesto fenólico que tiene una buena reactividad con el reactivo Folin, transfiriendo un electrón a este y reduciéndolo.

De la curva de calibración de ácido gálico con concentraciones de 100, 75, 50, 25, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 9), se obtuvieron las absorbancias 0.602, 0.482, 0.307, 0.169, 0.095, 0.067 respectivamente. En la gráfica (figura 16) se observa la ecuación de la recta: $y = 0.0057x + 0.0335$ con un $R^2 = 0.9973$.

Tabla 9. Concentraciones de ácido gálico

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
100	0.602
75	0.482
50	0.307
25	0.169
10	0.095
5	0.067

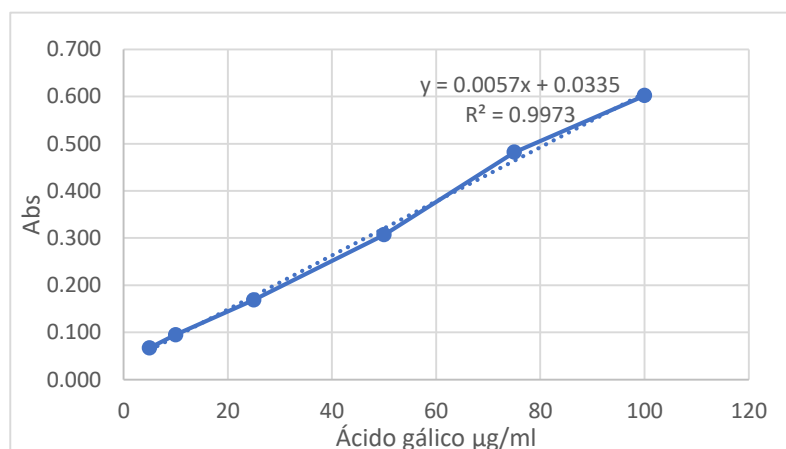


Figura 16. Curva de calibración de ácido gálico

Las diferentes concentraciones de ácido gálico utilizadas en la curva de calibración, viraron de color amarillo a color azul después de que el reactivo Folin fue añadido, debido a una reacción óxido-reducción entre el fenol y el molibdeno. Este cambio de tonalidad indica la reducción del reactivo Folin por el compuesto fenólico presente en la muestra, en este caso ácido gálico, específicamente de los molibdatos (Mo^{6+}) presentes en el reactivo cuya reducción a Mo^{5+} , otorga la característica tonalidad azul.

Las muestras de los extractos metanólicos y de las fases colocadas en la microplaca de 96 pozos, al igual que la curva de calibración con ácido gálico, cambiaron de una tonalidad amarilla a una tonalidad azul. Los pozos que contenían el extracto metanólico: **A** y **B**, así como las muestras con las fases: **E**, **H** e **I** mostraron una tonalidad azul notablemente más fuerte que las otras muestras (figura 17).

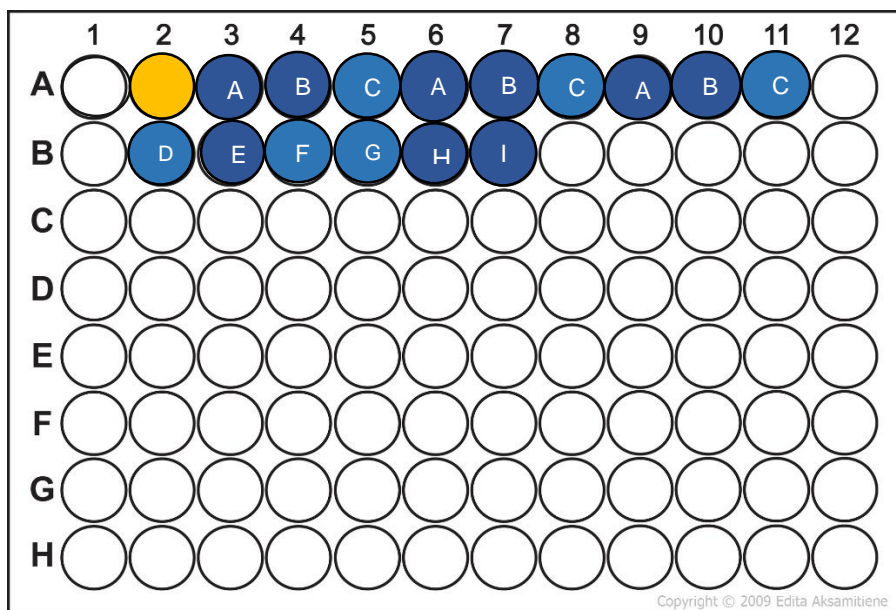


Figura 17. Esquema de los cambios de coloración en las diferentes muestras y fases (señaladas con la letra correspondiente a cada muestra). En el pozo 1A se colocó agua, en 2A (amarillo) el reactivo Folin-Ciocalteu puro.

7.2.2 Contenido de polifenoles totales de las muestras de col

El contenido total fenólico de los extractos metanólicos **A**, **B** y **C**, calculados con la curva de calibración, fueron 33.36, 44.82 y 57.16 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Los resultados de fenoles totales de las muestras **A-I**, se muestran en la tabla 10, con concentraciones que varían desde 1.44 hasta 12.10 mg Eq. Ácido gálico/g, las muestras del extracto metanólico con mayor concentración de fenoles totales son **B** y **C**, con valores de 4.48 y 5.72 Eq. ácido gálico/g, respectivamente y en el caso de las fases, **F**, **E** y **H**, con valores de 3.22, 4.33 y 12.10 Eq. ácido gálico/g, muestran las concentraciones más altas.

Tabla 10. Resultados del contenido total de polifenoles en los extractos y fases de col.

Muestra		Absorbancia promedio	Concentración de ácido gálico ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración de ácido gálico (mg/ml)	Contenido total de fenoles ($\text{mg Eq. ácido gálico/g}$)
Extracto MeOH col Fresca	A	0.224	33.36	0.033	3.34 ± 0.007
Extracto MeOH bagazo col	B	0.289	44.82	0.045	4.48 ± 0.01
Jugo liofilizado de col	C	0.359	57.16	0.057	5.72 ± 0.006
Fase					
Col Fresca Hex	D	0.153	20.96	0.021	2.10 ± 0.001
Col fresca Org	E	0.281	43.33	0.043	4.33 ± 0.004
Col fresca Ac	F	0.149	20.18	0.020	2.02 ± 0.001
Col bagazo Hex	G	0.116	14.39	0.014	1.44 ± 0.001
Col bagazo Org	H	0.723	120.96	0.121	$>12.10 \pm 0.001$
Col bagazo Ac	I	0.217	32.19	0.032	3.22 ± 0.001

*Los experimentos de los extractos metanólicos (**A-B**) llevaron a cabo por triplicado, en el caso de las fases resultantes de la extracción líquido-líquido de col (**D-H**), las muestras fueron llevadas a cabo por duplicado.

* El valor $120.96 \mu\text{g/ml}$ de ácido gálico sobrepasa la concentración máxima incluida en la curva de calibración.

El cálculo del contenido total de polifenoles muestra una mayor presencia de estos compuestos en el extracto del jugo liofilizado, así como una presencia significativa en el bagazo de col, cabe destacar que la prueba de Folin-Ciocalteu en un extracto de bagazo de esta especie no se ha reportado con anterioridad.

Previamente se reportaron valores que van desde los 6.09 – 12.26 mg/ Eq. ácido gálico/g extracto (Peñas et al., 2011), mayores a los encontrados en este trabajo, esto puede deberse a las diferentes zonas de recolección del vegetal en España, ya que las condiciones de cultivo pueden influir directamente en el contenido de los compuestos fenólicos.

Kusznierewicz et al., 2008 reportan valores de 2.41-4.91 mg/ Eq. ácido gálico/ g extracto, similares a los del presente estudio para los extractos de col fresca y bagazo de col, la diferencia en el tratamiento del vegetal para obtener el extracto puede influir en el resultado final de contenido de polifenoles.

La extracción líquido-líquido fue llevada a cabo, con la finalidad de atenuar las interferencias polares que pudieran estar presentes. En el caso de las fases orgánicas, las concentraciones de col fresca (**E**) y bagazo (**H**) mostraron un aumento comparadas con las concentraciones de su respectivo extracto metanólico inicial (**A-B**). Este incremento en las concentraciones puede atribuirse a la pérdida de interferencias polares (azúcares) después de la extracción con el sistema de baja polaridad diclorometano/ AcOEt, lo que permitió una mejor interacción de los compuestos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu, al momento de ser evaluadas estas fases nuevamente por este método.

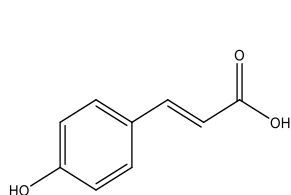
Las fases hexánicas **D** y **G** mostraron una disminución en su concentración de fenoles totales respecto a los extractos metanólicos (**A-B**). El hexano es un solvente aún menos polar que el metano y el diclorometano, característica que influyó en la extracción de los polifenoles, ya que existe evidencia de que los polifenoles son a menudo solubles en solventes orgánicos menos polares que el agua (Kim & Lee, 2005). Este debe ser el motivo por el cual el extracto metanólico mostró una mayor concentración de compuestos fenólicos que la extracción con hexano, lo que pudo notarse también en los bajos rendimientos obtenidos para estas fases, 0.7 % para la fase hexánica de col fresca **D** y 2.3 % para la fase hexánica bagazo de col **G**.

Por último las fases acuosas de col fresca (**F**) y bagazo (**I**) también disminuyeron, sin embargo, las concentraciones aún se encuentran dentro de los rangos reportados por

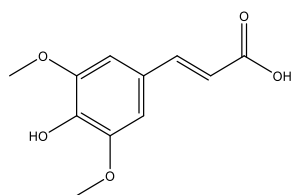
(Kusznierewicz et al., 2008), esto podría deberse a que los compuesto fenólicos tienen diferentes polaridades, por lo tanto la polaridad del solvente utilizado determina la extracción del tipo de compuesto fenólico. Esto también puede atribuirse a la naturaleza de la especie *Brassica oleracea* var *capitata* cuya composición contiene una gran cantidad de agua, por lo tanto, aumenta la posibilidad de contener compuestos fenólicos polares en estas fases (Nawaz et al., 2018).

7.3 Resultados de quimioinformática

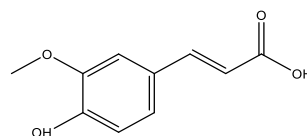
Con base en los reportes químicos de *Brassica oleracea* var *capitata* descritos en la literatura, se eligieron 10 compuestos fenólicos: ácido *p*-cúmarico (21), ácido sinápico (22), ácido ferúlico (23), quercetina (24), kaempferol (25), rutina (26), ácido cafeico (27), luteolina (28), daidzeína (29) y genisteína (30), para su estudio mediante los programas informáticos, molinspiration, data warrior y SwissADME del Instituto de bioinformática de suiza (*Swiss Institute of Bioinformatics*) y PASS online (*Prediction and Assistant Experimental Design*).



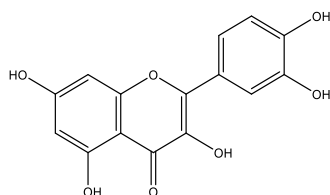
ácido *p*-cúmarico (21)



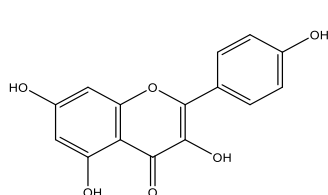
ácido sinápico (22)



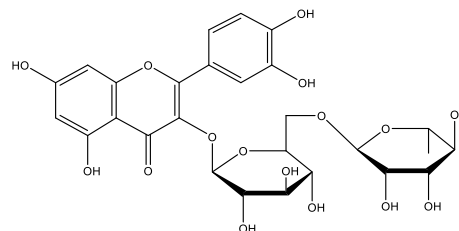
ácido ferúlico (23)



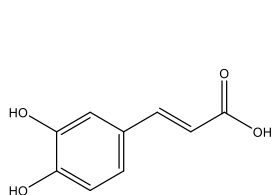
quercetina (24)



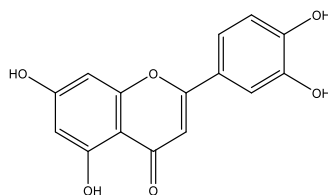
kaempferol (25)



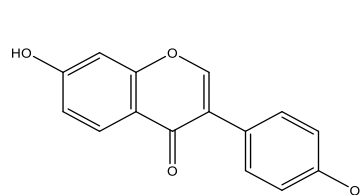
rutina (26)



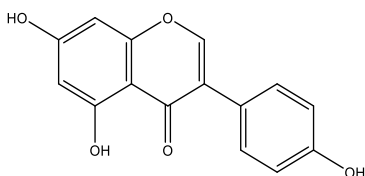
ácido cafeico (27)



luteolina (28)



daidzeína (29)



Genisteína (**30**)

7.3.1 Propiedades o descriptores moleculares

Para la primera parte se utilizaron tres programas informáticos: Molinspiration, Datawarrior y SwissADME para calcular las propiedades fisicoquímicas de los compuestos fenólicos **21-30**, obteniéndose el coeficiente de partición octanol/agua (**logP**), número de átomos (**N.A**), número de enlaces rotacionales (**# E.R**), número de aceptores de enlace de hidrógeno (**# A. E.H**), número de donadores de enlace de hidrógeno (**# D.E.H**) y el área de superficie polar (**PSA**), para cada uno de los compuestos. Se utilizaron los criterios de Lipinski para evaluar las propiedades moleculares de estos compuestos, lo que permite conocer su biodisponibilidad.

En la tabla 11, se muestran los resultados obtenidos de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos fenólicos y el número de violaciones a los criterios de Lipinski. Los pesos moleculares de los compuestos estudiados se encuentran en un rango de 164.16 - 610.52 g/mol para todos los compuestos, únicamente rutina (**26**) no cumple la regla de Lipinski, con un peso molecular mayor a 500g/mol.

Los valores de coeficiente de partición $\log P$ de (-1.06 – 2.56) cumplen con la regla de un $\log P < 5$, este valor describe la tendencia de un compuesto neutro (sin carga) a disolverse en un sistema bifásico inmiscible de lípidos (grasas, aceites y solventes orgánicos) y agua. En términos simples, mide cuanto de un soluto se disuelve en la porción de agua frente a la porción orgánica. El $\log P$ es una constante definida de la siguiente manera:

$$\text{Log}P = \text{Log}_{10} (\text{coeficiente de partición}) \quad \text{coeficiente de partición, } P = \frac{[\text{orgánico}]}{[\text{acuoso}]}$$

Según lo descrito por Bhal en 2007, un valor negativo para $\log P$ significa que el compuesto tiene una alta afinidad por la fase acuosa (es más hidrofílico) en cambio un valor positivo denota una mayor concentración en la fase lípida (el compuesto es más lipofílico), basado en esto, la tabla 11, muestra que la rutina (**26**) es el único compuesto con un valor negativo, lo que indica que está molécula por lo tanto, es más soluble en fase acuosa, el resto de compuestos fenólicos muestran valores positivos. Este descriptor puede ayudar a predecir

y comprender el transporte y el impacto de los productos químicos en los sistemas fisiológicos y ecológicos. En el descubrimiento de fármacos permite entender el comportamiento de un fármaco en el cuerpo.

La regla de cinco sugiere una pobre absorción oral con un # A.E.H > 10 y un # D.E.H >5 ya que es relativamente desfavorable para un compuesto formar un alto número de enlaces de hidrógeno, afectando inversamente el grado de permeabilidad a través de las membranas biológicas, presumiblemente debido a una alta penalización de desolvatación de agua, así como interacciones desfavorables del hidrógeno polarizado con las cadenas laterales de ácidos grasos alifáticos en el interior de la membrana (Chandrasekaran *et al.*, 2018). Según los resultados obtenidos para los compuestos fenólicos, rutina (**26**) viola el número de enlaces donadores y aceptores que se consideran favorables para una buena permeabilidad, el resto cumple con los valores establecidos como criterio.

Otro parámetro considerado comúnmente para cuantificar la polaridad se conoce como área de superficie polar (PSA), la cual es la suma de las contribuciones al área de superficie molecular (generalmente de van der Waals) de átomos polares como el oxígeno, el nitrógeno y sus hidrógenos adjuntos. El PSA de un compuesto puede relacionarse con la capacidad de una molécula de aceptar y donar enlaces de hidrógeno (Blake, 2000). Diversos autores reportan que los fármacos con biodisponibilidad oral ya comercializados tienen en su mayoría un PM < 500 y un PSA < 120 Å². (Turner & Agatonovic-Kustrin, 2006). En otro estudio, partiendo de los datos de 20 compuestos seleccionados, se ha demostrado que el PSA > 140 Å² da como resultado una administración oral incompleta (<10%) de absorción mientras que el PSA < 60 Å² da como resultado una absorción oral excelente (> 90%) (Edwards & Price, 2010).

Como se puede observar en la tabla 11, el ácido *p*-cúmarico **21**, el ácido sinápico **22**, el ácido ferúlico **23**, kaempferol **25**, ácido cafeico **27**, luteolina **28**, daidzeína **29** y genisteína **30** muestran un valor de PSA < 120 Å², mientras que quercetina **24** y rutina **26** un PSA > 120 Å²

Tabla 11. Propiedades moleculares de los compuestos 21-30

Compuesto	n°	PM(g/mol)	logP	logP	logP	N.A	# E.R	# A.E.H	# D.E.H	PSA	PSA	PSA
Ácido <i>p</i> -cúmarico	21	164.16	1.43	1.28	1.26	12	2	3	2	57.53	57.53	57.53
Ácido sinápico	22	224.21	1.26	0.98	1.31	16	4	5	2	76.00	75.99	75.99
Ácido ferúlico	23	194.19	1.25	1.05	1.36	14	3	4	2	66.76	66.76	66.76
Quercetina	24	302.24	1.68	1.49	1.23	22	1	7	5	131.35	127.45	131.36
Kaempferol	25	286.24	2.17	1.83	1.58	21	1	6	4	111.12	107.22	111.13
Rutina	26	610.52	-1.06	-1.25	-1.33	43	6	16	10	269.43	265.52	269.43
Ácido cafeico	27	180.16	0.94	0.78	0.93	13	2	4	3	77.75	77.76	77.76
Luteolina	28	286.24	1.97	1.99	1.73	21	1	6	4	111.12	107.22	111.13
Daidzeína	29	254.24	2.56	1.97	2.24	19	1	4	2	70.67	66.76	70.67
Genisteína	30	270.24	2.27	1.62	2.04	20	1	5	3	90.89	86.99	90.90

* PM= peso molecular, logP= coeficiente de partición octanol/agua N. A= número de átomos, # E.R = número de enlaces rotacionales, A.E.H= número de aceptores de enlace hidrógeno, # D.E.H= número de donadores de enlace de hidrógeno, PSA= área de superficie polar.

7.3.2 Predicción de actividad biológica en Pass online

Como segunda parte se obtuvo la predicción de las actividades biológicas en PASS online (21-30) y la probabilidad estimada para cada tipo de actividad. Como se mencionó en la sección de metodología los resultados son dados en probabilidades de ser activo (P_a) y probabilidades de ser inactivo (P_i), estos valores varían de cero a uno. Esta lista otorga también los principales efectos farmacológicos y mecanismos de acción que reflejan la interacción del compuesto de estudio con un objetivo biológico en un sistema de prueba experimental o clínico.

Se tomaron las primeras 10 probabilidades para cada uno de los compuestos, en donde los valores de P_a son mayores a los de P_i , ya que la posibilidad de encontrar experimentalmente una actividad determinada aumenta el valor de P_a y disminuye el valor de P_i . En la figura 18 se muestra un ejemplo de los resultados para la actividad biológica predicha para el compuesto quercetina (24).

All $P_a > P_i$ $P_a > 0,3$ $P_a > 0,7$

P_a	P_i	Activity
0,973	0,002	Membrane integrity agonist
0,969	0,002	HIF1A expression inhibitor
0,962	0,001	Peroxidase inhibitor
0,957	0,002	HMOX1 expression enhancer
0,951	0,001	CYP1A inducer
0,944	0,002	UGT1A6 substrate
0,945	0,004	CYP1A substrate
0,940	0,001	Antimutagenic
0,940	0,003	CYP1A1 substrate
0,939	0,002	UGT1A10 substrate

Figura 18. Predicción de actividad biológica para el compuesto quercetina por Pass online.

En la tabla 12, se muestran los resultados de las predicciones de la actividad biológica para los compuestos fenólicos del 21-25 y en la tabla 13 – del 26 -30. Las actividades biológicas registradas en las tablas se tomaron de las primeras 10 probabilidades arrojadas por el programa de ser activos (P_a), con valores del 80 – 90 % de probabilidad como se muestra en el ejemplo para quercetina (figura 18).

En código de colores se muestran las similitudes en la actividad biológica. Señalado en color verde los compuestos fenólicos de 21-28 tienen la probabilidad de actuar como agonistas de la integridad de la membrana, lo cual es esencial para la homeostasis celular,

previniendo el daño a la membrana que se relaciona con la patogénesis de la enfermedad en diferentes tejidos (Ammendolia *et al.*, 2021).

Los compuestos ácido p-cúmarico **21**, ácido sinápico **22**, ácido ferúlico **23**, kaempferol **25**, ácido cafeico **27**, luteolina **28** y genisteína **30** muestran una alta probabilidad de actuar como inhibidores de la enzima clordecona reductasa, enzima del hígado humano que se asemeja a la familia de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, denominadas aldo-ceto reductasas, las cuales catalizan la reducción de un sustrato que contiene un grupo carbonilo. La variabilidad de la concentración en el hígado de esta enzima puede tener un efecto dramático en la susceptibilidad al compuesto organoclorado clordecona, un plaguicida con efecto tóxico, cuya eliminación metabólica es controlada por la reducción catalizada por la clordecona reductasa (Molowa *et al.*, 1986).

Los compuestos **22**, **23**, **24** y **28** en rosa, muestran la probabilidad de actuar como antimutagénicos, que son agentes que interfieren con la mutagenicidad (producción de alteraciones del material genético celular (genes, cromosomas) que da lugar a una modificación permanente de la constitución hereditaria).

El ácido p-cumárico, ácido sinápico, ácido ferúlico y ácido cafeico en amarillo, muestran una similitud, con la probabilidad de ser activos como protectores mucomembranosos, compuestos que crean una capa protectora alrededor de la mucosa evitando su agresión por el contenido de ácido. Finalmente, la rutina **26** muestra actividades biológicas como hemostático, cardioprotector, anticancerígeno y vasoprotector.

Tabla 12. Resultados del espectro de actividad de los compuestos fenólicos **21, 22, 23, 24 y 25.**

Compuesto	Ácido <i>p</i> -cúmarico (21)	Ácido sinápico (22)	Ácido ferúlico (23)	Quercetina (24)	Kaempferol (25)
Actividad predicha	Inhibidor de feruloil esterasa	Inhibidor de feruloil esterasa	Agonista de la integridad de la membrana	Agonista de la integridad de la membrana	Inhibidor de la clordecona reductasa
	Agonista de la integridad de la membrana	Agonista de la integridad de la membrana	Inhibidor de la expresión de JAK2	Inhibidor de la expresión de HIF1A	Agonista de la integridad de la membrana
	Inhibidor de benzoato 4-monooxigenasa	Antimutagénico	Inhibidor de aril sulfotransferasa	Inhibidor de peroxidasa	Inhibidor de la expresión de HIF1A
	Protector mucomembranoso	Inhibidor de la expresión de JAK2	Tratamiento de afecciones preneoplásicas	Potenciador de la expresión HMOX1	Inhibidor de 2-deshidropantoato 2 – reductasa.
	Inhibidor de catecol oxidasa	Inhibidor aspulvinona dimetilaliltransferasa	Protector mucomembranoso	Inductor de CYP1A	Inhibidor de aril alcohol deshidrogenasa (NADP+)
	Inhibidor de la clordecona reductasa	Tratamiento de afecciones preneoplásicas	Inhibidor de la clordecona reductasa	Sustrato de UGT1A6	Inhibidor de quinasa
	Inhibidor de benzoilformato descarboxilasa	Protector mucomembranoso	Antimutagénico	Sustrato de CYP1A	Inhibidor de la <i>p</i> -benzoquinona reductasa (NADPH)
	Sustrato CYP2J	Inhibidor de clordecona reductasa	Inhibidor de aspulvinona dimetilaliltransferasa	Antimutagénico	Inhibidor de la permeabilidad de membrana
	Inhibidor de Piruvato descarboxilasa	Inhibidor de benzoato 4-monooxigenasa	Inhibidor de benzoato 4-monooxigenasa	Sustrato de CYP1A1	Inhibidor de peroxidasa
	Antimutagénico	Inhibidor de aril sulfotransferasa	Tratamiento de la mucositis	Sustrato de UGT1A10	Inhibidor de quercetina 2,3-dioxigenasa.

Tabla 13. Resultados del espectro de actividad de los compuestos fenólicos **26, 27, 28, 29** y **30** obtenidos por PASS online.

Compuesto	Rutina (26)	Ácido cafeico (27)	Luteolina (28)	Daidzeína (29)	Genisteína (30)
Actividad predicha	Hemostático	Inhibidor de feruloil esterasa	Inhibidor de clordecona reductasa	Inhibidor de aldehído oxidasa	Inhibidor de la expresión de H1F1A
	Inhibidor de permeabilidad de membrana	Agonista de la integridad de membrana	Agonista de la integridad de membrana	Inhibidor de histidina quinasa	Inhibidor de ubiquinol citocromo c reductasa
	Eliminador de radicales libres	Protector mucomembranoso	Inhibidor de la expresión HIF1A	Sustrato de CY2A6	Inhibidor de clordecona reductasa
	Cardioprotector	Inhibidor de 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa	Inhibidor de la permeabilidad de membrana	Inhibidor de la expresión de HIF1A	Sustrato CYP1A
	Inhibidor de peroxidasa lipídica	Inhibidor de 4-monooxigenasa	Inhibidor de 2-deshidropantotato 2-reductasa	Sustrato de CYP2A	Inhibidor de monoferol monooxigenasa.
	Agonista de la integridad de membrana	Inhibidor de catecol oxidasa	Inhibidor de aril-alcohol deshidrogenasa (NADP+)	Sustrato de CYP1A	Sustrato de CYP1B
	Inductor de CYP1A	Inhibidor difosfomevalonato descarboxilasa	Inhibidor de aldehído oxidasa	Agonista del regulador de conductancia de transmembrana CF	Sustrato de CYP2A6
	Anticancerígeno	Inhibidor de clordecona reductasa	Inhibidor de <i>p</i> -benzoquinona reductasa	Sustrato CYP1A2	Sustrato de CYP1A2
	Vasoprotector	Sustrato de CYP2J	Antimutagénico	Inhibidor ubiquinol-citocromo- c reductasa	Agonista de la integridad de membrana
	Inductor de CYP1A1	Inhibidor de benzoilformato descarboxilasa	Inhibidor de quinasa	Sustrato de CYP2012	Sustrato de CYP2A

7.3.3 Predicción de actividad antioxidante *in silico* en Pass online

Los compuestos fenólicos, tanto simples como polifenoles, como se había mencionado en su clasificación, se caracterizan por tener uno o más grupos hidroxilo, unidos a grupos aromáticos en su estructura química. Estos grupos hidroxilo pueden donar tanto protones (H^+) como electrones (e^-) en reacciones de carácter redox, permitiéndoles estabilizar así radicales libres o especies reactivas de oxígeno y mantener la homeostasis en los sistemas biológicos, este mecanismo de acción les confiere capacidad antioxidante y de eliminadores o captadores de radicales libres, así como de inhibir ciertas enzimas endógenas productoras de estas especies reactivas de oxígeno como la NADPH oxidasa, o inclusive frenar la reacción en cadena de peroxidación lipídica, la cual genera la oxidación de lípidos.

Por ello este trabajo se centró en la predicción de la actividad antioxidante, eliminadora de radicales libres, inhibidora de NADPH oxidasa e inhibidora de peroxidación lipídica de los compuestos fenólicos **21-30** (tabla 14).

El glucósido flavonoide rutina (**26**), presenta la mayor actividad antioxidante, con un 92 % de probabilidad para esta actividad, 98 % de probabilidad de ser activo como eliminador de radicales libres y un 98% como inhibidor de la peroxidación lipídica. Quercetina (**24**) muestra la actividad más alta como inhibidor de la enzima NADPH oxidasa con un 98 % de probabilidad.

Los compuestos fenólicos simples: ácido p-cumárico (**21**), ácido sinápico (**22**), ácido ferúlico (**23**) y ácido cafeico (**27**), muestran una probabilidad del 55 %, 57 %, 54 % y 60 % respectivamente, para ser activos como antioxidantes.

Los compuestos flavonoides (polifenoles): kaempferol (**25**), luteolina (**28**), genisteína (**30**), muestran una buena actividad como antioxidantes con una probabilidad 85 %, 77 % y 76 % respectivamente.

Al parecer esta tendencia en el aumento de la actividad antioxidante de los flavonoides (polifenoles) respecto a los ácidos fenólicos simples, está marcada por el aumento en el número de anillos aromáticos y grupos hidroxilo en su estructura química.

Tabla 14. Resultados de la predicción de la actividad antioxidante en PASS online para los compuestos fenólico **21- 30** reportados en *Brassica oleracea* var *capitata*.

Compuestos fenólicos		Actividad biológica							
		Antioxidante		Eliminador de radicales libres		Inhibidor de NADPH oxidasa		Inhibidor de peroxidación lipídica	
		Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi	Pa	Pi
Ácido p-cumárico	21	0.553	0.005	0.627	0.005	0.157	0.042	0.529	0.014
Ácido sinápico	22	0.576	0.005	0.732	0.004	0.184	0.030	0.612	0.008
Ácido ferúlico	23	0.540	0.005	0.731	0.004	0.198	0.026	0.618	0.008
Quercetina	24	0.872	0.003	0.811	0.003	0.982	0.002	0.788	0.004
Kaempferol	25	0.856	0.003	0.771	0.003	0.889	0.002	0.783	0.004
Rutina	26	0.923	0.003	0.988	0.001	0.850	0.002	0.987	0.001
Ácido cafeico	27	0.603	0.005	0.647	0.005	0.171	0.034	0.570	0.011
Luteolina	28	0.775	0.004	0.755	0.003	0.858	0.002	0.740	0.004
Dadzeína	29	0.623	0.004	0.353	0.022	0.372	0.006	0.537	0.013
Genisteína	30	0.765	0.004	0.458	0.013	0.470	0.004	0.667	0.006

Pa: probabilidad de ser activo; Pi: probabilidad de ser inactivo

8. Conclusiones

En el presente estudio se trabajó con el vegetal crucífero *Brassica oleracea* var *capitata* conocido como col, del cual se obtuvieron dos extractos metanólicos de col fresca y bagazo fresco con rendimientos de 3 % y 5.8 %, respectivamente, así como el jugo liofilizado con un rendimiento de 5.6%. A partir de los dos extractos se obtuvieron seis fracciones de polaridad creciente, las fases acuosas **F** (col fresca) e **I** (bagazo) se obtuvieron con un mayor rendimiento del 94 % y 91 % respecto a las otras fases, por lo cual se deduce que

Los extractos metanólicos **Ay B** mostraron concentraciones de polifenoles totales de 3.4 y 4.48 mg. Eq de ácido gálico/g, respectivamente. Las fracciones de mediana polaridad ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$) de la col fresca (**E**) con 4.33 mg. Eq ácido gálico/g y del bagazo (**H**) con 12.10 mg. Eq ácido gálico/g, fueron fracciones con mayor contenido total de polifenoles, seguida por las fases acuosas con 2.02 y 3.22 mg. Eq ácido gálico, para col fresca y bagazo respectivamente. Las fases hexánicas en cambio mostraron la menor cantidad de fenoles totales con 1.44 (bagazo) y 2.10 mg Eq. ácido gálico (col fresca), se observó que las fases de mediana polaridad tuvieron un mayor contenido de polifenoles respecto a los extractos de origen, indicando así la importancia de la polaridad del disolvente para la extracción de los compuestos fenólicos.

En cuanto al estudio quimioinformático de polifenoles presentes en col, se determinó que los compuestos **21-30** no presentaron un logP mayor a 2.24, A. E.H entre 3-16, número D.E.H 2-10 y el área de superficie polar (PSA) entre 57 y 269 lo que puede indicar que estos compuestos presentan la probabilidad de una buena lipofilicidad, permeabilidad y absorción oral.

Los compuestos fenólicos **21-30** evaluados en PassOnline muestran una alta probabilidad del 90 % al 80 % de actuar como agonistas de la integridad de la membrana, inhibidores de clordecona reductasa que es la enzima diana de un amplio grupo de fármacos destinados a disminuir las concentraciones plasmáticas de colesterol. Además, se encontró un efecto como eliminadores de radicales libres, inhibidores de NADPH oxidasa e inhibidores de peroxidación lipídica, todo esto relacionado con actividad antioxidante, siendo la rutina (**26**) con 92 % de Pa, seguida de quercetina (**24**) con un 87 % de Pa y kaempferol (**25**) con un 85 % Pa.

Finalmente, se puede concluir que la col sembrada en México es un vegetal con contenido de polifenoles, la mejor extracción de ellos con metanol a partir del bagazo. Los compuestos fenólicos reportados para la col lo hacen un alimento funcional con posible actividad antioxidante.

Bibliografía

- Ahmed, M. F., & Rao, A. S. (2014). Simultaneous determination of phenolic compounds in *brassica oleracea* l.var *capitata*. by high-performance liquid chromatography. *Academic Sciences*, 6(1), 1–4.
- Ammendolia, D. A., Bement, W. M., & Brumell, J. H. (2021). Plasma membrane integrity: implications for health and disease. *BMC Biology*, 19(1), 1–29.
<https://doi.org/10.1186/s12915-021-00972-y>
- Anjali, & Seth, V. (2015). International Journal of Food Science , Nutrition and Dietetics (IJFS) ISSN 2326-3350. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 04(1), 1–5. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-130006>
- Bartosz, G. (2010). Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. *Free Radical Research*, 44(7), 711–720.
<https://doi.org/10.3109/10715761003758114>
- Bhal, S. (2007). Log P — Making Sense of the Value. *Advanced Chemistry Development*, 1–4. https://www.acdlabs.com/download/app/physchem/making_sense.pdf
- Blake, J. F. (2000). Chemoinformatics - Predicting the physicochemical properties of “drug-like” molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(1), 104–107.
[https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00062-2)
- Chandrasekaran, B., Abed, S. N., Al-Attraqchi, O., Kuche, K., & Tekade, R. K. (2018). Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties. In *Dosage Form Design Parameters* (Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814421-3.00021-X>
- Dewick, P. M. (2009). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. In *John Wiley & Sons Ltd*.
- Edwards, M. P., & Price, D. A. (2010). Role of Physicochemical Properties and Ligand Lipophilicity Efficiency in Addressing Drug Safety Risks. In *Annual Reports in Medicinal Chemistry* (Vol. 45, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(10\)45023-X](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(10)45023-X)
- Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C. L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson,

- G., & Burrowes, J. (2007). Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *Journal of Nutrition*, 137(3). <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.718s>
- Favela-González, K. M., Hernández-Almanza, A. Y., & De la Fuente-Salcido, N. M. (2020). The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (Brassica) as antimicrobials and antioxidants: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13414>
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Kim, D. O., & Lee, C. Y. (2005). Extraction And Isolation Of Polyphenolics. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2, 471–482. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch28>
- Koss-Mikołajczyk, I., Kusznierevicz, B., Wiczowski, W., Płatosz, N., & Bartoszek, A. (2019). Phytochemical composition and biological activities of differently pigmented cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), 5499–5507. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9811>
- Kuhnle, G. G. C., Dell'Aquila, C., Aspinall, S. M., Runswick, S. A., Joosen, A. M. C. P., Mulligan, A. A., & Bingham, S. A. (2009). Phytoestrogen content of fruits and vegetables commonly consumed in the UK based on LC-MS and ¹³C-labelled standards. *Food Chemistry*, 116(2), 542–554. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.002>
- Kusznierevicz, B., Bartoszek, A., Wolska, L., Drzewiecki, J., Gorinstein, S., & Namieśnik, J. (2008). Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.007>
- Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications*, 107–115. <https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch6>

- Mageney, V., Neugart, S., & Albach, D. C. (2017). A guide to the variability of flavonoids in *Brassica oleracea*. *Molecules*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020252>
- Molowa, D. T., Shayne, A. G., & Guzelian, P. S. (1986). Purification and characterization of chlordecone reductase from human liver. *Journal of Biological Chemistry*, 261(27), 12624–12627. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)67136-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)67136-4)
- Nawaz, H., Shad, M. A., & Rauf, A. (2018). Optimization of extraction yield and antioxidant properties of *Brassica oleracea* Convar *Capitata* Var L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 242, 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.041>
- Ogbede, S. C., Saidu, A. N., Kabiru, A. Y., & Busari, M. B. (2015). Nutrient And Anti-Nutrient Compositions Of *Brassica Oleracae* Var. *Capitata* L. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 5(3), 2250–3013. <http://www.iosrphr.org/papers/v5i3/D053019025.pdf>
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educacion Quimica*, 28(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>
- Šamec, D., Pavlović, I., & Salopek-Sondi, B. (2016). White cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*): botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry Reviews*, 16(1), 117–135. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9454-4>
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K. P., & Rai, M. (2006). Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.017>
- Turner, J. V., & Agatonovic-Kustrin, S. (2006). In silico prediction of oral bioavailability. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 5, 699–724. <https://doi.org/10.1016/b0-08-045044-x/00147-4>
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2006). Families of phenolic compounds and means of classification. *Phenolic Compound Biochemistry*, 1–34. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7_1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Control Escolar de Licenciatura



VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaría Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Presente.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **HERNÁNDEZ CAMACHO MIRIAM DENISE** con número de matrícula **20144003159** cuyo título es:

Determinación de polifenoles totales de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) considerado como alimento funcional y su predicción *in silico* del efecto biológico.

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA**.

Cuernavaca, Mor a 12 de octubre de 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO
DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ
DRA. MAYRA YANETH ANTÚNEZ MOJICA
DR. HUGO MORALES ROJAS
DRA. MARÍA DE LOS ÁNGELES RAMÍREZ CISNEROS

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 00, Ext. 3270 / correo IICBA@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

HUGO MORALES ROJAS | Fecha:2022-10-12 12:01:34 | Firmante
MWD5L5P8RvRyolEUdpdq2ASnPMARIDG0j5LW2KjBhFWqm192p316k8BpbX+3Jjd/Yy5Wlu1wJ6y14zPqvBH+jzMFAQGTDCcmYlgb5hYap7GANasrFPLq4emLrdVb5R3oEdV15XD1pp/rtcgt8GucoeesVy3hfoziZDRf6+ISz5sq2lqNtmCqDojqV3cqi+kdvRxDjXzsvWlbczeF4QOPUhrusLKBODwz3HAVOloy6cFHlirDRDFGn3J9YRiWdXqeLrit0FXS4G9Eg79ioo119NUpkOyBeUeIEaPluKrAYIEtj+4VulHn735P7T5rmg348Ob8xqQwS1xPMXw==

SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO | Fecha:2022-10-12 12:33:10 | Firmante
hinXvd118dbHt8dep94wu609s2cYuwfY89CU7NBmzHLslncQE77cWIVAsXMYcBS3Funi+Yj63CoPXDMoPvcwQrB0oK4qygejvEriTyQ9CHzKNAeoTyccsGihlMO8YpH+V6Gwws6jgzZl5Hx7/vbBFCDETE7lQvX6JevRs3mUArzwtgEJDBg3mvyUhwYyChHY3O3YR+xOx5clrs6Rv2CbXm90zRIQW+O6uynqcyNdlhdAZyBlp+Z0lbXdoYjwLexzARkSAVmcLJrcM R4PA3kfO/QXk8YagjGLYm+2HBnTzstQgg9ghtbdv6y4HSGPO/FJiWmBbroNz7kzTnEUyog==

MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2022-10-12 13:25:20 | Firmante
EagMfp69hokBag88w8ycFGFHTvlfOOZne0/bbCIHMfN/QUUlXkUFqqs2PRvQuXHPJg958ayKp/05wpoq/sBLECvAc9SwOWqFqHmPwKfGqWnf1D+7fgcxERUnV9JecSrEcowt9UCakg3ICE2Q7sAAx/RoYCRtQ+N4Q1hXYyWdW3f8z6FvM26dEFGT1WlWRYZRYf8r1VIZimbduQC90E/pvKGStCXrk4bOmUHetebeIA7Z0jroJ2RSkrqJsa7Ry7TEsOd8WMI5qzTkfSj6adtvsKGOH3/PkwcgAy+Fnofrk4plhTERuJltzvOjVICXgASmHhRrCbazT4snA==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2022-10-12 17:43:06 | Firmante
ilwVeNl8p3xj5y8d4zlyNYAAUk+Kg/n+m6f2eLNGaqex4lacOjgmmPe4B1OtiN0m/dn8AkNkzLr6ImXjftqfXHY33RN6+6fcD/816wt1BNQ4+z0tFMDLjYzLrCSOG4yWWYabl+L6LPuiFnEo+q7DzRj7NdPPVH1aMrWYP3N6ZvsCXsAFvQZ+l2BT7f6JYmXQyZjUliY6/8akveoLWi8i/Pte2o29WotN5qP4W9DI8GxZD9X+bSoSGGMJfjJ996ZMMJEHdlHUmcvaCIPykT46iG4Lcx06iIzEHkWa5OKdv8gbyE7dlh6WeqlytbJailUuvqk6kLuqn0QlZ+sqQ==

MARIA DE LOS ANGELES RAMIREZ CISNEROS | Fecha:2022-10-14 09:23:57 | Firmante
IT5cs2LgJdnmSHKQBO6HWT/G1aOQUxsk/qSI9XdzwXu6+lw1rFyghdPQZYjqfHdRqJxg8d/dd/KxNSiNDJpf4ywPtO/RrCOPNvRL0jcZyPIHkD2Sim39d/5I4C5od5s+4+jw7Bj43LvI262fkv7I6iSCaT5dSuc0byy91GP690uyBwbMxuw5XaTaky3o6mKpvSDc95KXfSzyb/Ti9wpGsydydbp8StzLwSeffCeltiX6dcpwou8kb/8uhIRCDn+89NMJzOy0wJAeol38VRitpA6LKB/8HotxyjDMXVIHCYyYfCVLY1jhVmtSRBSMnzxoZ9ynzYXCvI3NtZZ6J+Ksk7Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/quX9TbGiw260W0Skws59aQlGyExAmoO>

IEOpNSZt



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023