



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Análisis de los polifenoles presentes en el vegetal crucífero de
Brassica oleracea var. *sabellica* (kale) y su predicción de actividad
biológica”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN DISEÑO MOLECULAR Y NANOQUÍMICA

PRESENTA:

Carlos Axel Espíndola Gorostieta

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Mayra Yaneth Antúnez Mojica

CUERNAVACA, MORELOS

Septiembre, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C. **ESPINDOLA GOROSTIETA CARLOS AXEL** con número de matrícula **20164002913** cuyo título es:

“Análisis de los polifenoles presentes en el vegetal crucífero de *Brassica oleracea var. sabellica* (kale) y su predicción de actividad biológica”

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 13 de septiembre del 2021

Atentamente
Por una universidad culta

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

DRA. LAURA PATRICIA ÁLVAREZ BERBER
DRA. CERCIS MORERA BOADO
DRA. MAYRA YANETH ANTÚNEZ MOJICA
DRA. ANGÉLICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA
DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ

PRESIDENTE
SECRETARIO
VOCAL
PRIMER SUPLENTE
SEGUNDO SUPLENTE

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

CERCIS MORERA BOADO | Fecha:2021-09-13 13:21:26 | Firmante

LneLd6XswK3VaQkGY5/UcJ5BGxBDezl+fdhg7L+IcLLEQx93EwerMyMSIAIRSKSCRKvUuRP1JAFLPfmvrXjuAuZ7Ec99aEbDM0bhySC3dKRdtBwqUeyr7WVbt/XEHw28iqnwFrAdYcZ2z5B06wHablj8Oq7rUVXS1rG2733E1PoqGmgV06GvBtV9jsnsfwT7cRdnpA/LdxVtMqox7nidE+rT4pr5YV//qzD5qmJs+cF1b5/qz2v4qELsIQ2g0wGQDxoCfmgFmMdfc8sGmT5AFCdSwUTESDKXH7+c+mYMGy+3IUuTCM1pn55SKAZrZyNjQmega6g30VfX+cIAEq34GCw==

ANGELICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA | Fecha:2021-09-13 14:21:40 | Firmante

xF10Anl8CCgY8EONMmIxy78hn2OZRsxNvgHQAHC9DeLWMKnbVv237HMjomVhUjVW8iYKp91/vhmBQo7I7bRwQe61VjWyGy4VD1kFxAiCak3Yk6KRQ72U50EH53TOoxHVjMDbUz8w8r6/5TWiRICEHlHNj+D5SEEW8gmHzLe8zeJl3Xm8XsaRD5PKN1BvQxYc/wlXW04Y5DsljuhKcjd9PAUlnLH0nhAeoDK5O75FW4gtucnDH3CPEyIUbKjyV3HmoiWTzZoa5sZ/RcU09EptRO6Sya6SmUuilsRa6oCwxHxmKXlONJ2c3SwXx7mNPfDdsuZCrGD+Pmdw0AkFhT4Ww==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2021-09-13 14:28:51 | Firmante

loWgJEeRgiXh0cOUIDIzW96ZKQDRgJcBzycDh5pTTmbOAShe+jkkUMjrmblvEnxy4xkRsbU75LqDA16hC0QIVlg7HAU8B0beX4KC4ZgRvzVrTzlw6kyliiK5a9o2wvH7dL2FMPzsCABDYXad+EiilHaMiAzWFzBJB5PpKJspvtHspvNKhr81XH0WVJeaYJarjZATwYcPjtP5tQBmLd3LZdlvztWVWnqCRSpO1WxP08YvxlegsvdLlu4Lux+cWK7Z0QUphFei7kmckxhoW14VGITVX21mLCTz3ccPHGFmbcXAYVDrW6rBaa7Zg1RuN4YCGMOQ0f2LUqW2wp5GxJ69tzg==

MAYRA YANETH ANTUNEZ MOJICA | Fecha:2021-09-13 14:30:53 | Firmante

wvR5By/TNy1YhodkpdRjxhuzDyL60SasFPafvOwjKBuBuna3OAFt4hltfU6JlI8OqXrwoDqaRLQ2r27yBGQxCo0/kLWM8aX1Dh7JPnjllBtGDFzKtu+K5S+uHYTDJNnY2X9W0o9F3RObz7R6dS/rUxZZIRKK374PBYaoo9od1coRfLeXqGNs7cr8wjh2P3K8tYbNlk/EhleNda/CW/ecAo5aKmW14urCQ3Dc4c6v8L/FIA16yiW+Dwh52h8U+OuKRHfe0HvE9kEfq5hOMdJmkhMzduTQ89nvkqZ2oI9l3qUigKlf7urDU5hhFLMO+5ywfGLsw2pRbZ0k77KI9aNcBw==

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2021-09-13 15:47:33 | Firmante

OCepKMj1E8bMuRf+4f5E37UdhQBHmpUlojJLDeUqZ38B3f45f1h4zvPbJStoZrxke2PdJyxpdbHmt+86yv+xBTRccE+n8y09SVIh9pA6hHITdjsYdgc947W5EEEx7JrQvbij17RPLpD CFZfz8791RL4DsN095lI83RMWxfm8+E2nG18NNBDna4qRWevOoITivNwsjVetBWrwgQgvm95grLufYlQrjnHSYTz3T9EeyLEIB/5rvnu5F1owa30PWLb1q808rmu29miLJRRx3g+m9Uz9Dkc8BVHRqJA2LgQZJNmwxPO3YKOERiKRia7AFghwOWTt34Xn5SgzXXcgs2ow==

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



MRv1f7

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vlbvhpBygWsSMllb65zDEjJTO2NMm56>

Agradecimientos

Pertenecer a esta máxima casa de estudios desde el nivel medio superior hasta la fecha me hace sentir un gran orgullo y agradecimiento a mi alma mater, la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, esta institución me ha brindado ese peldaño que todo mundo ansia escalar para poder inmiscuirse en un mundo grande y sin precedentes.

El Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) también tiene mi reconocimiento y agradecimiento, ya que en este centro es donde mi formación se moldeó y cobró sentido.

A mi tutor, consejero y guía el Dr. Hugo Tlahuext, quien a lo largo de nueve semestres me orientó y ayudó a resolver mis dudas que se generaban cada vez que me adentraba al multiverso de la química, pero sobre todo me guió en este largo camino, por ello también expreso mi agradecimiento.

De manera especial y sincera, mis agradecimientos van hacia la Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica por aceptarme para la realización de esta tesis de licenciatura bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo ha sido un aporte invaluable tanto en el desarrollo de esta tesis como en mi formación como futuro investigador. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido pieza fundamental del buen trabajo que hemos realizado, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. De igual forma debo agradecer por haberme brindado siempre los medios suficientes para llevar en marcha las actividades propuestas durante el desarrollo de este proyecto.

Mi gratificación a la Dra. Lura Alvarez Berber quien me guió y me presentó el basto mundo de los productos naturales en la materia del mismo nombre y que en ellos aún se encuentran respuestas por descubrir.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la M. en C. Araceli Guerrero Alonso por haberme brindado su amistad desde mi arribo al laboratorio y hacer que el tiempo pasara rápido cuando se trataba de cuidar a nuestras bendiciones (extractos) destacando, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia en sus explicaciones sobre temas relacionados al proyecto.



A los integrantes del Laboratorio 321 del CIQ al momento de la realización del proyecto, Dr. Israel Hurtado, Dra. Maritza Maldonado, M. en C. Ninfa Nolasco, M. en C. Isis Ventura, M. en C. Araceli Guerrero, Lic. América Montiel, Lic. Enrique Linares, gracias por todo.

Mis padres Mtra, Ma. del Carmen Gorostieta Rodríguez y M. en. C. José Luis Espíndola García son el pilar maestro de todo lo que soy, gracias por la dedicación y la paciencia con la que cada día se preocupaban por mi avance y desarrollo de esta tesis antes y durante la pandemia. Gracias por ser los principales promotores de mis metas, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias a mi madre por acompañarme cada larga y agotadora noche de estudio; gracias a mi padre por siempre desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada una de tus palabras.

De igual forma, mis hermanos Mtra. Edmee Espíndola e Ing. Dennis Espíndola debo darles las gracias por brindarme esa motivación para continuar en este camino.

También debo de externar mis agradecimientos a aquellos maestros que me dieron cátedra a lo largo de toda mi formación educativa, en especial a la Mtra. Diana Ramírez, Mtra. Ariadna Axomulco, Mtra. Verónica Sánchez, Dra. Telma Pariente.

A los carbacholitos a.k.a tiecesitos (Alexa Arroyo Colín, Carelly Janeth Barron Pérez, Edson Díaz González, Manuel Alfonso Méndez Martínez, Israel Domínguez Valle, Kevin Gonzales Rincón, Javier Ulises Sánchez Morales, Carlos Iván Ortega Espinosa), Atzimba Mabel Salgado Torres y Evelyn Mendoza Pérez, también tienen mi gratitud, cada minuto de convivencia que tuvimos fueron y serán los más gratos que recordaremos, pero sobre todo debo destacar la unidad y apoyo que había y hay entre nosotros en los momentos donde a la agenda no le cabía ni una actividad más.

Mi gratitud también va dirigida a mis amigos y colegas Maximiliano Rojas Taboada y Carlos Ivan Ortega Espinosa, con quienes he caminado a lo largo de mi vida universitaria y he aprendido de ambas cosas invaluable tanto a nivel personal como académico.

Gracias a todos aquellos que han estado involucrados tanto directa como indirectamente en la realización de ésta tesis, de mi formación universitaria y personal.

¡Porque ser venado, es un orgullo!



Lugar de realización de tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

La realización de la presente tesis se llevó a cabo en las siguientes instancias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos:

- Centro de Investigaciones Químicas.
 - Laboratorio 321
 - Bajo la dirección de la Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica
 - LANEM



Además, se contó con la colaboración en las siguientes instituciones:



- Universidad Autónoma Chapingo
 - Campo Agrícola Experimental
 - Dr. Efraín Contreras Magaña†
 - Siembra y cultivo del material vegetal kale

- Universidad Autónoma del Estado de Morelos
 - Facultad de Farmacia
 - Dra. Leticia González Maya



- Ensayos de citotoxicidad en tres líneas celulares (HeLa, Hep3B y PC3).



Listado de presentaciones en congresos del trabajo

- ❖ Universidad Autónoma del Estado de Morelos
 - 25° Aniversario Centro de Investigaciones Químicas
 - Modalidad: Cartel virtual; Categoría: Productos Naturales
 - Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), chemistry and pharmaceutical perspectives.

- ❖ Asociación Mexicana de Productos Naturales (AMIPRONAT)
 - Universidad Autónoma de Zacatecas
 - Modalidad: Cartel virtual (QB023).
 - Col rizada o kale, hontanar de compuestos fenólicos y su predicción de actividad biológica.

Espíndola, C. A., Guerrero Alonso, A., & Antúnez Mojica, M. (2021). Col rizada o kale, hontanar de compuestos fenólicos y su predicción de actividad biológica. *Revista Mexicana de Investigación en Productos Naturales*, 1(1), 186. <https://www.amipronat.org.mx>



Resumen

La inclusión de vegetales en la dieta cotidiana ha ido diversificándose a lo largo del tiempo, algunas veces se ven reflejadas como un hito tal es el caso del alimento funcional Kale o Col rizada (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). Este vegetal tiene beneficios a la salud del ser humano por el alto contenido nutricional que este posee como minerales, vitaminas, ácidos grasos, carbohidratos prebióticos y metabolitos secundarios (compuestos organosulfurados, carotenos y polifenoles).

El presente trabajo tiene como fin la identificación y cuantificación de los polifenoles presentes en el extracto metanólico obtenido a partir del vegetal kale y predicción de su actividad biológica *in silico* a partir de los polifenoles encontrados.

Se llevó a cabo el cultivo del material vegetal kale en condiciones de invernadero en la Universidad Autónoma de Chapingo. Posteriormente, se realizó la maceración del kale seco, seguido de un fraccionamiento grueso por bipartición con hexano, diclorometano y agua. Estas tres fracciones se sometieron a una cuantificación de polifenoles totales a través del método de Folin Ciocalteu, siendo la fase orgánica (DCM) el de mayor contenido de fenoles con 5.78 mg EAG/g.

Por otro lado, se determinó la citotoxicidad del extracto metanólico empleando una prueba *in vitro* con el método de tinción MTS a una concentración de 100 µg / mL en las líneas celulares de Hep3B (Hígado), PC3 (Próstata) y HeLa (Cervicouterino), a esta concentración no hubo una actividad relevante de inhibición en ninguna de las tres líneas celulares.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis quimiinformático de los polifenoles con mayor índice de reporte en la literatura del vegetal de interés. Para este análisis *in silico*, se usaron cuatro programas de acceso libre como lo son Molinspiration, SwissADME, preADMET y passONLINE. Dando como resultado, el 58.3% de los compuestos estudiados tiene una probabilidad de poseer actividad anticancerígena, quimiopreventivo, antioxidante y eliminador de radicales libres.

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que la alta concentración de polifenoles encontrados en el kale sugieren estar relacionados con la actividad antioxidante (eliminador de radicales libres), quimiopreventivo y anticancerígeno *in silico*.



Abreviaturas

μ

μg Microgramo

A

Å² Armstrong Cuadrado

A.E.H. Aceptores de Enlaces de Hidrógeno

ác Ácido

ADME Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción.

ADN Ácido Desoxirribonucleico

ARN Ácido Ribonucleico

AcOEt Acetato de Etilo

B

B. *Brassica*

but Butanol

C

°C Celsius

Ca Calcio

CO₂ Dióxido de carbono

CCF Cromatografía de Capa Fina

CI₅₀ Concentración Inhibitoria media

CoA Coenzima A

clogP Coeficiente de Bipartición

D

D.E.H. Donadores de Enlace de Hidrógeno

DCM Diclorometano

DMFO Difluorometilornitina



DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio de cultivo)

DMSO Dimetilsulfóxido

E

EAG Equivalente de Ácido Gálico

Eq Equivalente

EtOH Etanol

F

ft pies (unidad métrica).

G

g Gramo

H

h Hora

H₂O Agua

HeLa Línea celular de cáncer de mama humano

Hep3B Línea celular de cáncer de hígado humano

Hex Hexano

Hfer Hidroxiferuloil

HPLC High-Performance Liquid Chromatography /Cromatografía líquida de alta eficacia

I

in Pulgadas

K

K Potasio

Ka Kaempferol

Kg Kilogramo

L

L Litro



M

MeOH	Metanol
Mg	Magnesio
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar

N

N	Nitrógeno
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
nm	Nanometro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
No. A.	Número de átomos

P

P	Fósforo
PC-3	Línea celular de cáncer de próstata humano
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso Molecular
prop	Propanol

R

ROS	Reactive Oxidative Species/Especies Reactivas de Oxígeno
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (medio celular).

S

S	Azufre
SD	Sample Data
Sin	Sinapoil
SMILES	Simplified Molecular Input Line Entry Specification
Soph	Sophoroside/ soforósido



SR-21 Standar Reference 21
ssp. Indica "varias especies".

T

TPSA Topological Polar Surface Area/ Área Polar Superficial Total

U

USDA U.S. Department of Agriculture/Departamento de Agricultura de los E.U.
UV/vis Ultra violeta/visible

V

var. Variedad
v/v Volumen/volumen



Índice

Votos de aprobatorios	2
Agradecimientos	4
Lugar de realización de tesis	6
Listado de presentaciones en congresos del trabajo	7
Resumen	8
Abreviaturas	9
Índice	13
Índice de figuras	15
Índice de tablas	17
1. Introducción	18
2. Antecedentes	19
2.1 Cáncer: quimiopreención y quimioterapia	19
2.2 Nutraceuticos y su importancia	24
2.2.1 Glucosinolatos	26
2.2.2 Polifenoles	28
2.2.2.1 Polifenoles: Actividad Antioxidante	35
2.2.2.2 Detección de Polifenoles: Método de Folin-Ciocalteu	37
2.3 Generalidades de la familia Brassicaceae (brasicaceas o crucíferas)	38
2.4 Generalidades del género <i>Brassica</i>	39
2.5 Generalidades de la especie <i>Brassica oleracea</i> (vegetales crucíferos)	39
2.6 <i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i> (kale)	40
2.6.1 Variedades comerciales de kale	41
2.6.2 Condiciones de cultivo de kale	42
2.6.3 Contenido nutricional	43
2.6.4 Estudios químicos y farmacológicos de col rizada	44
2.7 Quimioinformática	53
3. Justificación	55
4. Objetivo general	56
4.1. Objetivos particulares	56
5. Materiales y Métodos	57
5.1 Obtención del material vegetal	57
5.2 Preparación material vegetal	57
5.3 Obtención del extracto	59



5.4 Bipartición del extracto.....	59
5.5 Fraccionamiento primario del extracto hexánico.....	60
5.6 Prueba de citotoxicidad.....	61
5.7 Prueba de detección de Polifenoles: Método de Folin-Ciocalteu.....	61
5.7.1 Preparación de soluciones.....	61
5.7.2 Desarrollo del método de Folin-Ciocalteu.....	62
6.8 Quimioinformática.....	62
6.8.1 Molinspiration.....	63
6.8.2 PreADMET.....	64
6.8.3 PassOnline.....	64
6.8.4 SwissADME.....	65
7. Resultados y discusión.....	66
7.1 Preparación material vegetal.....	67
7.2 Rendimiento del extracto y fracciones del vegetal kale.....	67
7.3 Prueba de citotoxicidad del extracto.....	68
7.4 Fraccionamiento primario de la fase hexánica.....	68
7.5 Detección de Polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu.....	69
7.5.1 Resultados de curva de calibración de ácido gálico.....	69
7.5.2 Resultado de polifenoles totales de las fracciones del extracto metanólico.....	70
7.6 Quimioinformática.....	74
7.6.1 Propiedades moleculares vía MIPC, SwissADME y preADMET.....	75
7.6.1.1 Propiedades moleculares: ácidos cinámicos.....	76
7.6.1.2 Propiedades moleculares: ácidos benzoicos.....	77
7.6.1.2 Propiedades moleculares: flavonoides.....	78
7.6.2 Actividad biológica <i>in silico</i> PASSonline.....	80
8. Conclusiones.....	84
9. Perspectivas.....	85
10. Bibliografía.....	86



Índice de figuras

Figura 1. Metabolitos frecuentemente encontrados en vegetales crucíferos. a) Ác. fenólicos, b) flavonoides c) Glucosinolatos.	18
Figura 2. Pasos de la carcinogénesis, adaptado y modificado de (Kotecha et al., 2016)	20
Figura 3. Aspectos que debe cumplir un buen quimiopreventivo.....	21
Figura 4. Clasificación esquemática detallada de nutraceuticos sobre la base de tres aspectos generales: función, componente bioactivo y fuente de alimento, tomado y modificado de (Sharma et al., 2016).	24
Figura 5. Estructura base de glucosinolato y derivados.....	27
Figura 6. Productos de degradación del glucosinolato.	27
Figura 7. Clasificación de polifenoles basadas en el número de anillos de fenol y sus elementos estructurales, modificado y adapto de (Belščak-Cvitanović et al., 2018).	29
Figura 8. Estructura base de diferentes flavonoides.....	30
Figura 9. Biosíntesis de flavonoides vía ruta de shikímiko, tomado y modificado de (Dewick, 2009).....	32
Figura 10. Estructura básica de derivados del ácido benzoico y cinámico.	33
Figura 11. Biosíntesis inicial de ácido gálico, tomado y modificado de (Dewick, 2009).	33
Figura 12. Biosíntesis de derivados de ácido benzoico y ácido cinámico, vía ruta de shikímiko, tomado y modificado de (Dewick, 2009).	34
Figura 13. Roles del estrés oxidativo sobre el daño epigenético y la carcinogénesis, tomado de (Kumar, 2018).	36
Figura 14. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu.	37
Figura 15. Clasificación general de la familia Cruciferae, (Walley & Buchanan-Wollaston, 2011).....	38
Figura 16. Derivados de la planta silvestre Brassica oleracea, (Fuente: Business Insider).	39
Figura 17. (a) cultivo de kale en condición de invernadero; (b) Colecta del material vegetal; (c) Hoja de kale cultivada.....	57
Figura 18. (a) Kale fresco recolectado; (b) Lavado de la hoja de kale; (c) Secado de hoja a temperatura ambiente; (d) Hojas de kale seca; (e) Hoja de Kale seca triturada.	58
Figura 19. a) Maceración metanólica hoja de kale amarilla; (b) Maceración metanólica hoja de kale morada y hoja de kale verde.....	58
Figura 20. Extracto metanólico de Kale.....	59
Figura 21. Esquema metodológico de la bipartición del extracto metanólico de kale seco.	59
Figura 22. (a) Fase superior: Hexano, Fase inferior; Hidroalcohólica; (b) Fase superior: Acuoso, Fase inferior; Orgánico.	60
Figura 23. Columna No. 1 Extrácto héxanico.	60
Figura 24. Caratula del software Molinspiration.	63
Figura 25. Caratula del software PreADMET.....	64
Figura 26. Caratula del software PASSonline.	65
Figura 27. Caratula del software SwissADME.	65
Figura 28. Diagrama general de la metodología.	66



Figura 29. Placas de cromatografía de capa fina de la maceración de hoja de kale morada (M), hoja de kale verde (V) y hoja de kale amarilla (A), en tres diferentes sistemas de polaridad creciente: sistema 7:3 (Hex: AcOEt), sistema 95:5 (DCM: MeOH), sistema 3:1: 1 but: prop: aa: H ₂ O.	67
Figura 30. Placas de CCF (reveladas en uv) de las fracciones de la columna No. 1 en sistemas de polaridad diferentes, se han marcado las reuniones de acuerdo con la similitud aparente observada.	68
Figura 31. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.....	69
Figura 32. Absorbancia de curva de calibración para el ensayo de Folin-Ciocalteu con ácido gálico como patrón.	70
Figura 33. Muestras de la fracción hexánica (A10), fracción orgánica (A11) y fracción acuosa (A12) tras la reacción con el reactivo de folin-ciocalteu en microplaca de 96 pozos.	70
Figura 34. Polifenoles totales fracciones hexánica, orgánica y acuosa de kale seco.	71
Figura 35. Polifenoles totales Extracto Metanólico reportados en la literatura.	72
Figura 36. Polifenoles totales acorde a diferentes tipos de tratamiento al vegetal.	72
Figura 37. Comparación de las propiedades moleculares de ácidos cinámicos de Brassica oleracea mediante software quimioinformático	76
Figura 38. Comparación de las propiedades moleculares de ácidos benzoicos de Brassica oleracea mediante software quimioinformático	77
Figura 39. Comparación de las propiedades moleculares de compuestos fenólicos de Brassica oleracea mediante software quimioinformático	78
Figura 40. Comparación de las propiedades moleculares del kaempferol y derivados glucosilados mediante software quimioinformático	79
Figura 41. Gráfico comparativo de los compuestos fenólicos con probabilidad mayor a 70 (Pa>70).....	82



Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplos de quimiopreventivos naturales y su mecanismo (tabla adaptada y modificada de Mehta, 2014).	22
Tabla 2. Tipos de fármacos usados en quimioterapia.	23
Tabla 3. Fuentes y beneficios para la salud de los fitoquímicos utilizados como nutraceuticos (Tomado y modificado de (Rajasekaran, 2017).	25
Tabla 4. Nombre común y químico de algunos principales glucosinolatos presentes en las verduras Brassicaceae, (Ishida et al., 2014).	26
Tabla 5. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	35
Tabla 6. Nomenclatura de cultivos <i>Brassica oleracea</i> L. de acuerdo a GRIN, tomado de (Maggioni, 2015).	40
Tabla 7. Variedades comerciales de kale.	41
Tabla 8. Condiciones de cultivo kale.	42
Tabla 9. Contenido nutricional del kale (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i>) según la USDA SR-21	43
Tabla 10. Metabolitos secundarios de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i>	44
Tabla 11. Sistemas de elución usados en el fraccionamiento de la fase de hexano.	60
Tabla 12. Rendimientos de kale.	67
Tabla 13. Resultados de la viabilidad celular en líneas cancerosas de hepático, próstata y cervicouterino.	68
Tabla 14. Resultados de polifenoles totales de las fracciones de kale.	71
Tabla 15. Contenido de polifenoles totales reportados para Kale en la literatura.	73
Tabla 16. Códigos Smiles generados de chemdraw de los compuestos polifenólicos reportados en kale	74
Tabla 17. Comparación de las propiedades moleculares de compuestos polifenólicos de <i>Brassica oleracea</i> mediante software quimioinformático, molinspiration (amarillo), SwissADME (verde), PreADMET (azul).	75
Tabla 18. Probabilidades observadas de toxicidad frente a clogP/TPSA, tomado de (Edwards & Price, 2010)	76
Tabla 19. Predicción de actividad biológica en PASSonline de los 12 compuestos fenólicos	81



1.Introducción

Los vegetales crucíferos de *Brassica oleracea* agrupan especies que forman parte de la dieta humana con una producción mundial estimada de 70 millones de toneladas (Hahn et al., 2016), dentro de estas verduras se incluye al brócoli, repollo, col rizada, coles de Bruselas y coliflor. Además de su uso culinario, se han realizado diferentes estudios encontrando en esta familia una fuente de compuestos que pueden contribuir de manera positiva a la salud humana que va de la actividad anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria, hasta cardioprotectora asociada con el consumo de vegetales crucíferos.

Esta familia es una fuente importante de metabolitos secundarios como los compuestos que contienen azufre conocidos como glucosinolatos (Hahn et al., 2016) y sus productos de hidrólisis isotiocianatos; también es rica en polifenoles como ácidos fenólicos y flavonoides (quercetina y kaempferol) (Avato & Argentieri, 2015), figura 1. La evidencia generada por estudios clínicos, estudios *in vivo* e *in vitro* muestra que las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los polifenoles pueden potencialmente prevenir o servir como tratamiento contra muchas enfermedades no transmisibles, (Cory et al., 2018).

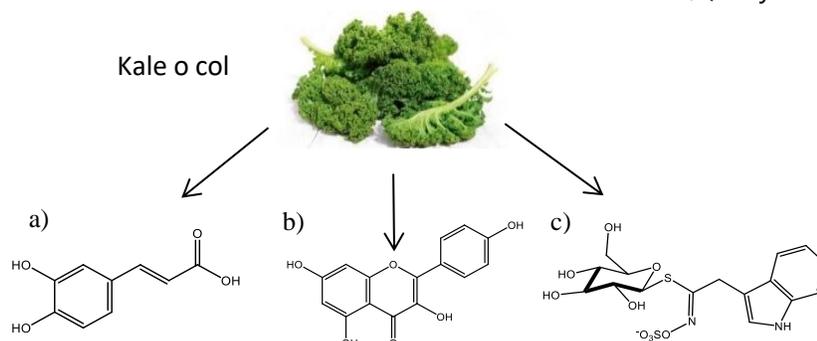


Figura 1. Metabolitos frecuentemente encontrados en vegetales crucíferos. a) Ác. fenólicos, b) flavonoides c) Glucosinolatos.

La kale o col rizada (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) es miembro importante de las crucíferas, en contenido nutricional es rico en vitaminas y minerales como magnesio, calcio y ácido fólico, además de metabolitos secundarios como los antes mencionados (ác. fenólicos, flavonoides y glucosinolatos) por lo que es conocido por su capacidad para reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer.

Por todo lo anterior descrito, la presente tesis está dirigida al estudio de kale hacia una investigación química de polifenoles totales y un estudio quimiinformático de los fenoles reportados en literatura para el kale y así poder llevarlos a estudios pertinentes que demuestren su actividad biológica antes mencionada (antioxidante y anticancerígena).



2. Antecedentes

2.1 Cáncer: quimioprevención y quimioterapia

Las células normales crecen y se dividen de forma controlada para producir más células que se necesitan para mantener el cuerpo sano, cuando las células envejecen o se dañan, mueren y son reemplazadas por células nuevas. Sin embargo, en el cáncer, este proceso ordenado se descontrola, en lugar de morir, las células cancerosas continúan creciendo y formando células anormales nuevas, por otra parte, se caracterizan por poder dividirse sin detenerse y se extienden a los tejidos circundantes, conocido como metástasis, (Mitra et al., 2018).

Cáncer es el nombre que se le da a una colección de enfermedades relacionadas entre sí; los principales grupos de cáncer se clasifican en, (Aldred, 2009):

- Carcinomas, son tumores sólidos generalmente de células epiteliales, piel, células que recubren los órganos internos como pulmón e intestino y tejido glandular como mama y próstata. Se sabe que representa aproximadamente el 90% de todos los cánceres humanos.
- Sarcomas, son tumores derivados del tejido conectivo, por ejemplo, tumores primarios óseos.
- Leucemia y linfomas, se les conoce como tumores líquidos o también llamados cánceres de sangre, pueden afectar la médula ósea, células sanguíneas y el sistema linfático. Estadísticamente representa un 8% de todos los cánceres humanos.

A nivel mundial la cifra de nuevos casos de cáncer reportados en el año 2018 de acuerdo con los datos de la Agencia internacional de investigación sobre el cáncer asciende a 18,078, 957 de personas afectadas, siendo el cáncer de pulmón, mama y próstata los de mayor incidencia y con aproximadamente nueve millones de muertes.

Al origen de esta enfermedad se le conoce como carcinogénesis, este es un proceso largo que consta de tres etapas, iniciación, promoción y progresión, (Figura 2); que transforma las células normales en células malignas. Cada una de estas fases sucesivas de carcinogénesis aumenta la probabilidad de morbilidad y mortalidad relacionadas con el cáncer.



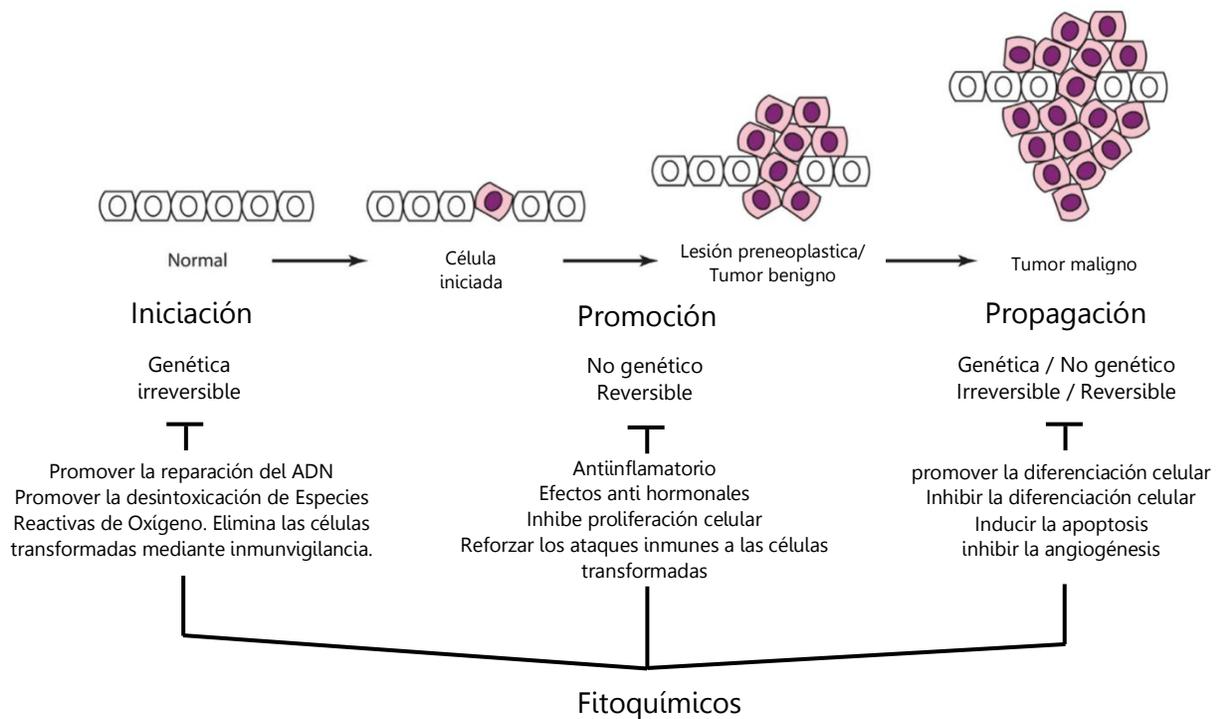


Figura 2. Pasos de la carcinogénesis, adaptado y modificado de (Kotecha et al., 2016)

El aumento de la incidencia mundial de cáncer en los últimos años ha dado lugar a campañas centradas específicamente en la prevención de enfermedades, como lo es la quimioprevención (Kotecha et al., 2016). El término quimioprevención del cáncer fue dado por el Dr. Michael B. Sporn en 1976 para describir el uso de compuestos naturales o sintéticos para derogar, reprimir o frustrar el crecimiento del cáncer a malignidad (Rashid, 2017). Más tarde, Lee W.Wattenberg lo definió como la administración de uno o varios compuestos químicos para prevenir el cáncer y lo llamó quimioprofilaxis, (Rashid, 2017).

De acuerdo con la clasificación convencional propuesta originalmente por Lee Wattenberg, los agentes quimiopreventivos se subdividen en dos categorías principales:

- Agentes bloqueantes, evitan que los carcinógenos lleguen a los sitios objetivo, experimenten activación metabólica o interactúen posteriormente con macromoléculas celulares cruciales (por ejemplo, ADN, ARN y proteínas).
- Los agentes supresores, inhiben la transformación maligna de las células iniciadas, tanto en la etapa de promoción como en la de progresión.



Por otro lado, de acuerdo con Rashid y colaboradores 2017, los siguientes puntos son factores que tendría que poseer un buen quimiopreventivo (figura 3):

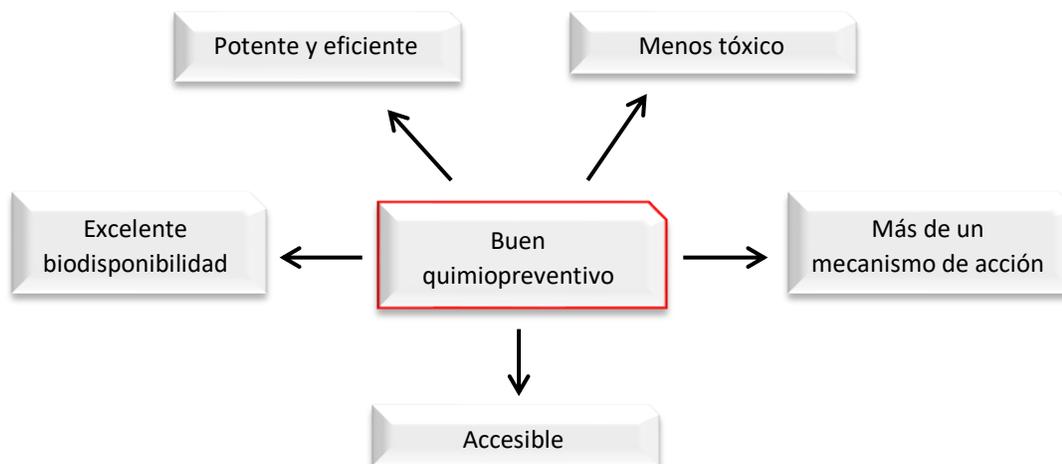


Figura 3. Aspectos que debe cumplir un buen quimiopreventivo.

Los estudios epidemiológicos y la exposición a largo plazo de compuestos dietéticos a humanos que muestran falta de toxicidad los convierten en compuestos ideales para su uso. Estos agentes dietéticos pueden retardar o prevenir el proceso de carcinogénesis mediante múltiples mecanismos, a saber:

- Desintoxicación mejorada de los intermediarios cancerígenos mediante la inducción del metabolismo de fármacos de fase II.
- Supresión de la función de las monooxigenasas dependientes del citocromo P450, lo que reduce la activación carcinogénica.
- Perturbaciones en eventos del ciclo celular.
- Promoción de la apoptosis de forma selectiva en células cancerosas o precancerosas.
- Supresión de angiogénesis y metástasis.

En particular, los agentes de origen natural provenientes de la dieta han sido la base de la terapia contra el cáncer y el potencial para descubrir compuestos endémicos que pueden exhibir potentes propiedades anticancerígenas, lo que ha impulsado la investigación de nuevos agentes con especial énfasis de aquellos que median la apoptosis ya que pueden tener un efecto importante en la carcinogénesis, ya que éste mecanismo ofrece un método fisiológico para eliminar las células anormales, (tabla 1).



Tabla 1. Ejemplos de quimiopreventivos naturales y su mecanismo (tabla adaptada y modificada de Mehta, 2014).

Actividad biológica	Agentes quimiopreventivos
Efectos antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> • Vitamina C • Carotenoides • Flavonoides • Antocianinas • Compuestos fenólicos • Polifenolesina • ácidos grasos conjugados
Inducción enzimática de fase I	<ul style="list-style-type: none"> • Indol-3 carbinol
Inducción enzimática de fase II	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides • Antocianinas • Compuestos fenólicos • Polifenoles,
Efectos inmunomoduladores	<ul style="list-style-type: none"> • Carotenoides • Flavonoides
Modulación de la hormona	<ul style="list-style-type: none"> • Genisteína
Efecto antimicrobiano	<ul style="list-style-type: none"> • Sulforafano • Isotiocianatos
Inducción de apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> • Isotiocianatos • Flavonoides
Anti-angiogénesis	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides
Asociación molecular con carcinógenos	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides • Antocianinas • Compuestos fenólicos • Polifenoles • Antocianina
Modificación en cascada del ácido araquidónico	<ul style="list-style-type: none"> • Flavonoides • Resveratrol
Inhibición del metabolismo de las poliaminas	<ul style="list-style-type: none"> • Compuestos orgánicos de azufre, compuestos de organoselenio, DFMO
Aumento de la comunicación intercelular	<ul style="list-style-type: none"> • Carotenoides

La intervención mediante quimiopreención durante el cáncer es prometedora, pero cuando no se encuentra en estado maligno, (Rashid, 2017), en éste caso, entra en juego la quimioterapia, la cual es una técnica terapéutica que emplea medicamentos para el tratamiento de cualquier enfermedad.

Por lo general, el término quimioterapia se ha utilizado para referirse al tratamiento del cáncer con el uso de fármacos. Los medicamentos que se usan en la quimioterapia interfieren con la capacidad de una célula cancerosa para dividirse y reproducirse, desencadenando la apoptosis, o el "suicidio" de las células cancerosas.

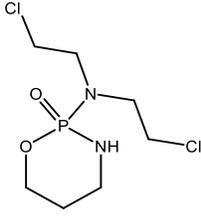
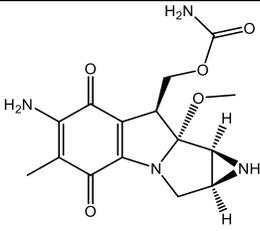
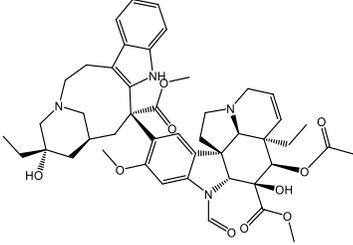
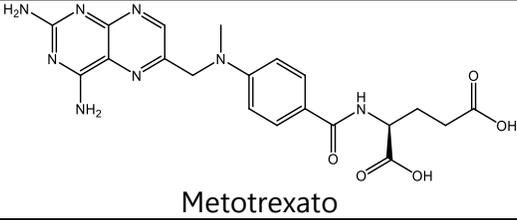
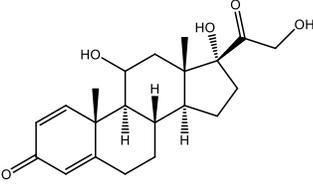


La mayoría de los medicamentos contra el cáncer se derivan de fuentes naturales como plantas y bacterias, otros se derivan de procesos sintéticos o semisintéticos, categorizados en:

- Fármacos que afectan las vías químicas y celulares específicas.
- Fármacos que actúan sobre alguna fase celular específica.

A continuación, en la tabla 2, se muestran la clasificación de los fármacos usados en quimioterapia dividido en: agentes alquilantes, antibióticos citotóxicos, alcaloides vegetales, antimetabolitos y hormonas, (Aldred, 2009).

Tabla 2. Tipos de fármacos usados en quimioterapia.

Tipo quimioterapia	Descripción	Ejemplo de fármaco
Agentes alquilantes	+ Se unen a grupos alquilo de bases de ADN: el ADN se fragmenta por enzimas de reparación que intentan reemplazar las unidades anormales. +Causando mal emparejamiento de los nucleótidos, lo que conduce a mutaciones. +Formación de puentes cruzados para que el ADN no pueda descomprimir.	 <p>ciclofosfamida</p>
Antibióticos citotóxicos	+Apriete entre los pares de bases, creando problemas con la síntesis de ADN y ARN. + Inhibe la enzima que "desanuda" el ADN para que pueda descomprimir y formar ARN. + Funcionan en todas las fases del ciclo.	 <p>Mitomicina C</p>
Alcaloides vegetales	+ Inhibidores mitóticos. + Estos funcionan en la fase M del ciclo celular	 <p>Vincristina</p>
Antimetabolitos	+ Compite con los componentes esenciales de los procesos metabólicos e inhibe esos procesos. + Interferir con el crecimiento de ADN y ARN. + Fase específica: trabajo en la fase S. + Se usa para tratar leucemias y tumores de mama, ovario y tracto gastrointestinal.	 <p>Metotrexato</p>
Hormonas	+ Alterar la acción o producción de hormonas femeninas o masculinas. + Se puede usar para retrasar el crecimiento de los cánceres de seno, próstata y endometrio. + No trabaja de la misma forma que los fármacos de quimioterapia estándar.	 <p>Prednisolona</p>



2.2 Nutracéuticos y su importancia

El término nutracéutico fue acuñado en 1989 por Stephen De Felice, fundador y presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina, lo definió como un "alimento o partes de un alimento que proporcionan beneficios médicos o de salud, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades ", (Kumar, 2018).

Por lo tanto, dicho término se emplea para describir un grupo de alimentos que son más que alimentos, pero menos que productos farmacéuticos que van a proporcionar beneficios adicionales para la salud, junto con el valor nutricional básico que se encuentra en los alimentos, además son metabolitos secundarios de las plantas que se generan a través de diversas vías biológicas en los procesos del metabolismo secundario.

Debido a las amplias funciones de los nutracéuticos, se ha diseñado una clasificación sistemática según su función, fuente y componentes bioactivos de acuerdo al libro (Ganapathy & Bhunia, 2015), (figura 4).

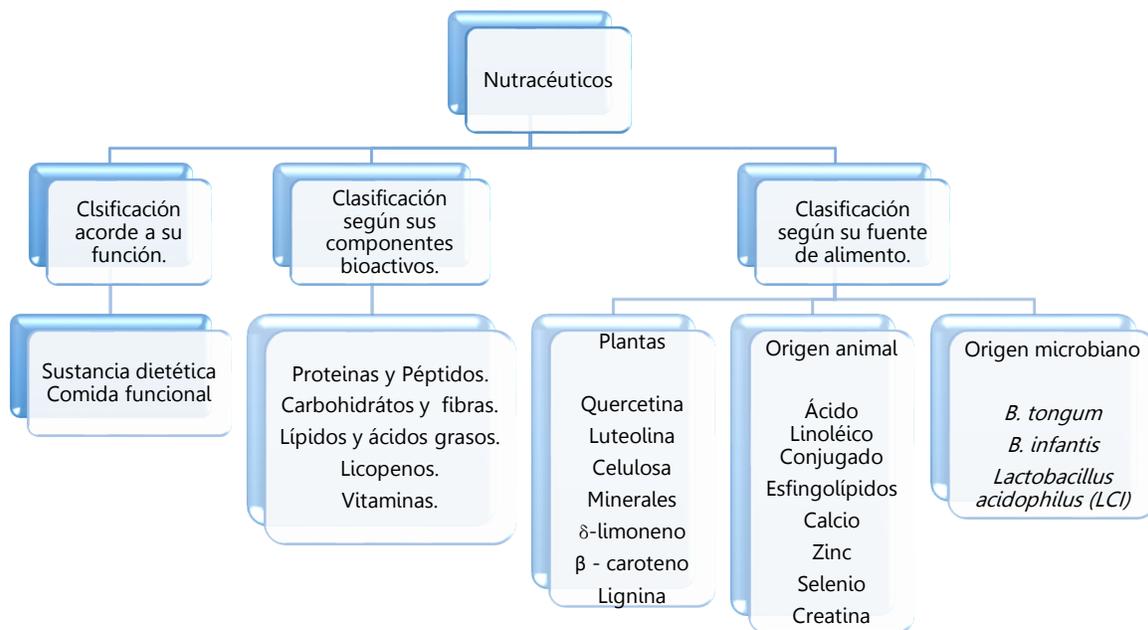


Figura 4. Clasificación esquemática detallada de nutracéuticos sobre la base de tres aspectos generales: función, componente bioactivo y fuente de alimento, tomado y modificado de (Sharma et al., 2016).



Los productos naturales bioactivos, es decir, los nutraceuticos son la fuente principal de nuevos medicamentos, alimentos funcionales y aditivos alimentarios. Estos se pueden agrupar en las siguientes tres amplias categorías, (Ganapathy & Bhunia, 2015):

- Nutriente: sustancias con funciones nutricionales establecidas, como vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos.
- Hierbas: también llamados productos botánicos, como concentrados y extractos que gracias a la acumulación de conocimiento de tales plantas durante cientos de años puede ayudar a encontrar medios efectivos para garantizar una atención médica adecuada.
- Suplementos dietéticos: compuestos derivados de otras fuentes (por ejemplo, piruvato, sulfato de condroitina) que proporcionar nutrientes que de otro modo no se consumirían en cantidades suficientes.

En la actualidad, el uso de fitoquímicos está aumentando debido a su importancia nutricional y médica respaldada por datos científicos. Los fitoquímicos son componentes no nutritivos en la dieta a base de plantas ("fito" proviene de la palabra griega que significa planta), (Surh, 2003). Los fitoquímicos juegan un papel importante en la salud humana como antioxidantes y ayudan a prevenir diversas enfermedades como el cáncer (Fig. 4), las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y los trastornos inflamatorios. Los principales fitoquímicos comúnmente utilizados como nutraceuticos, son los glucosinolatos, carotenoides, compuestos fenólicos y compuestos orgánicos de azufre, tabla 3.

Tabla 3. Fuentes y beneficios para la salud de los fitoquímicos utilizados como nutraceuticos (Tomado y modificado de (Rajasekaran, 2017).

categoria	Fitoquímicos	Origen	Beneficios de la salud
Carotenoides	Luteína	Espinaca, pimiento rojo, mango, melocotón, kale.	Protección contra el cáncer de colon
Compuestos orgánicos de azufre	Sulforafano, glucosinolatos	Verduras crucíferas, brócoli, repollo, coliflor, rábano	Reducir el riesgo de próstata y colon cáncer
Fenólicos	Antocianinas	Baya, uva, maíz, mora, naranja, verduras crucíferas	Antioxidante, antiinflamatorio
	Rutina	Espárragos, trigo sarraceno, frutas cítricas	Fortalecen las paredes capilares
	Quercetina	Té, cebolla, uva, trigo sarraceno	Antioxidante, vasodilatador



2.2.1 Glucosinolatos

Las especies de la genero *Brassica* suelen producir entre 30 y 40 glucosinolatos diferentes (Bischoff, 2016), sus concentraciones de glucosinato dentro de las plantas dependen de la especie y variedad y están influenciadas por las condiciones ambientales bajo las cuales la planta está creciendo.

Los glucosinolatos (tioglucosidos) son un grupo de metabolitos secundarios de plantas crucíferas que consisten en un residuo de β -D-glucopiranososa unido a un éster de hidroxiiminosulfato por puente de azufre, más un grupo R. El grupo R deriva de uno de los ocho aminoácidos y puede ser alifático (alanina, leucina, isoleucina, metionina o valina), aromático (fenilalanina o tirosina) o indol (triptófano) (Bischoff, 2016). A continuación, en la tabla 4, se muestra algunos glucosinolatos encontrados en vegetales Brassicaceae.

Tabla 4. Nombre común y químico de algunos principales glucosinolatos presentes en las verduras Brassicaceae, (Ishida et al., 2014).

Nombre común	Nombre cadena lateral R
Glucosinato alifático	
Glucoiberberina	3-Metiltiopropil
Glucoiberina	3-metilsulfinilpropil
Sinigrina	2-propeno
Glucoerucina	4-metiltiobutil
Dehidroerucina	4-Metiltio-3-butenil
Glucorafanina	4-metilsulfinilbutilo
Gluconapina	3-butenil
Progoitrina	2-hidroxi-3-butenilo
Glucoberteroína	5-metiltiopentilo
Glucoalyssin	5-Methilsulfinilpentilo
Glucobrassicinapina	4-Pentenilo
Gluconapoleiferina	2-hidroxi-4-pentenilo
Glucosinato aromático	
Gluconasturtiina	2 Feniletilo
Glucotropeolina	Bencil
Glucosinato de indol	
Glucobrasicina	3-indolil metil
4-hidroxiglucobrasicina	4-hidroxi-3-indolimetilo
4-metoxiglucobrasicina	4-metoxi-3-indolimetil
Neoglucobrasicina	N-metoxi-3-indolimetil



Este tipo de metabolitos se ven sometidos a la degradación por una enzima perteneciente a la familia de glucósido hidrolasa y es la única que cataliza la hidrólisis de su enlace tioglucosídico. El sistema glucosinato-mirosinasa genera tioglucosa, sulfato e intermedio inestable que se reorganiza espontáneamente en varios productos de degradación dependiendo del perfil de glucosinato (Figura 5).

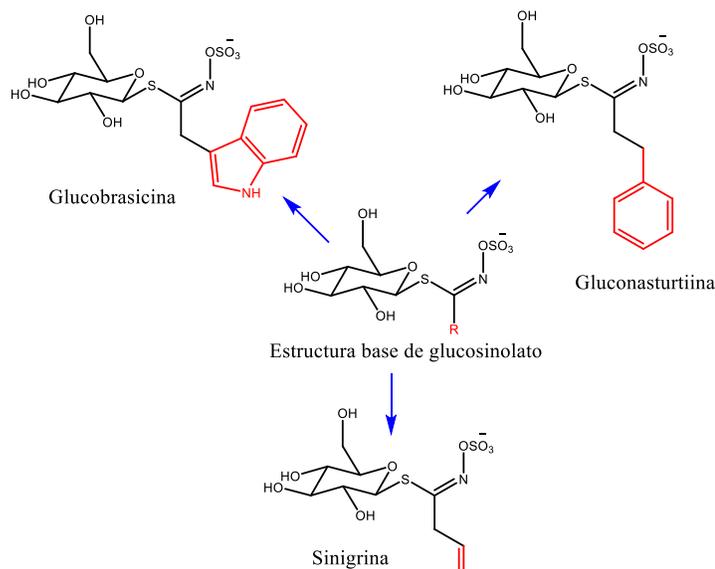


Figura 5. Estructura base de glucosinato y derivados.

La composición final de la mezcla de productos depende del pH, la disponibilidad de iones ferrosos, (Possenti et al., 2016), y la presencia de proteínas especificadoras se generará una mezcla de varios productos de degradación estructuralmente diversos, (Wittstock et al., 2016), figura 6.

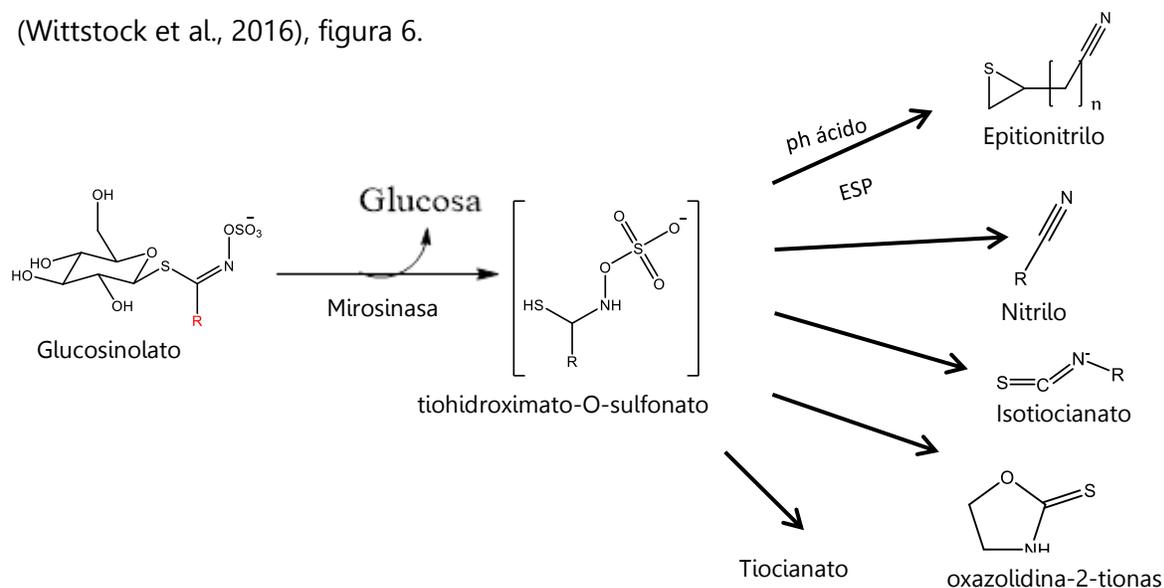


Figura 6. Productos de degradación del glucosinato.



2.2.2 Polifenoles

El principal motivo del interés de científicos y consumidores por los polifenoles es el reconocimiento de sus propiedades antioxidantes, su gran abundancia en nuestra dieta y su probable papel en la prevención de diversas enfermedades asociadas con estrés oxidativo, como cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Scalbert et al., 2005).

Sobre la base de la definición reciente proporcionada por Stéphane Quideau (Universidad de Burdeos, Francia),(Estrela et al., 2017), define a los polifenoles de la siguiente manera: "El término" polifenol "debe usarse para definir metabolitos secundarios de plantas derivados exclusivamente del fenilpropanoide derivado del shikimato y / o la(s) vía(s) de policétidos, con más de un anillo fenólico y estar desprovisto de cualquier grupo funcional a base de nitrógeno en su expresión estructural más básica".

Ahora bien, los polifenoles son un grupo de compuestos naturales con características estructurales fenólicas. El monómero básico en los polifenoles es el anillo fenólico y generalmente estos se clasifican como ácidos fenólicos y alcoholes fenólicos, dependiendo de la fuerza del anillo fenólico, los polifenoles pueden clasificarse en muchas clases como fenoles simples, benzoquinonas, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, cumarinas e isocumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, ligninas, neolignos pero las clases principales son los ácidos fenólicos, flavonoides, estiblinas, alcoholes fenólicos y lignanos, figura 7, (Abbas et al., 2017).



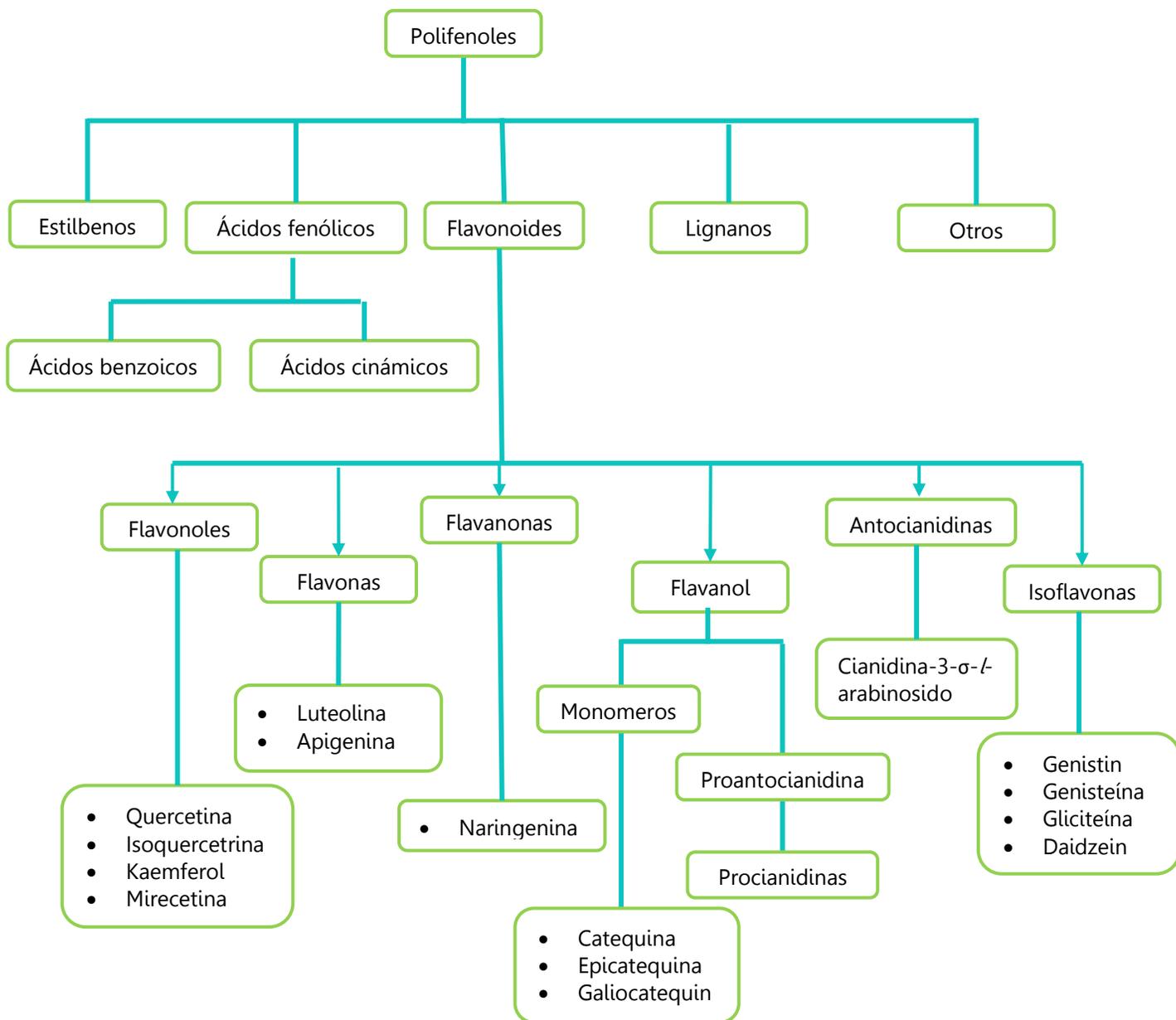


Figura 7. Clasificación de polifenoles basadas en el número de anillos de fenol y sus elementos estructurales, modificado y adaptado de (Belščak-Cvitanović et al., 2018).



Se han identificado más de 12000 estructuras fenólicas, de las cuales más de 8000 son flavonoides, que comparten una estructura común: dos anillos de fenilo unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado (Estrela et al., 2017)

El término flavonoide generalmente indica un compuesto fenólico que tiene una estructura química de fenilbenzopirano con un esqueleto carbónico de C₆-C₃-C₆ unido a un anillo de cromano, se puede subdividir en diferentes subgrupos dependiendo del carbono del anillo C al que está unido el anillo B y del grado de insaturación y oxidación del anillo C, (Panche et al., 2016), figura 8.

Por lo que, aquellos en los que el anillo B está vinculado en la posición 2 se pueden subdividir en varios subgrupos sobre la base de las características estructurales del anillo C siendo estas flavanonas, flavonas, flavanonas, flavanoles, flavonoles, isoflavonas, y antocianidinas, (Abbas et al., 2017; Jahangir et al., 2009; Mageney et al., 2017).

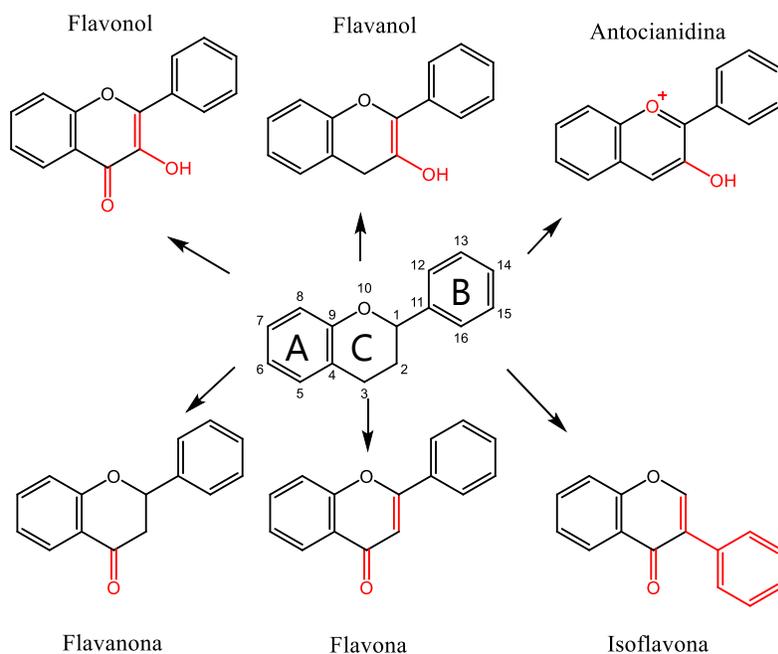


Figura 8. Estructura base de diferentes flavonoides.



De acuerdo con Panche, se enlista las características estructurales de los tipos de flavonoides antes mencionados:

- **Flavanonas** (dihidroflavonas), tienen el anillo C saturado; por lo tanto, a diferencia de las flavonas, el doble enlace entre las posiciones 2 y 3 está saturado y esta es la única diferencia estructural entre los dos subgrupos de flavonoides.
- **Flavonoles**, tienen un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C, que también puede estar glicosilado. Al igual que las flavonas, los flavonoles también son muy diversos en patrones de metilación e hidroxilación.
- **Flavonas**, tienen un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 y una cetona en la posición 4 del anillo C. La mayoría de las flavonas de verduras y frutas tienen un grupo hidroxilo en la posición 5 del anillo A, mientras que la hidroxilación en otras posiciones, en su mayor parte en la posición 7 del anillo A o 3 'y 4' del anillo B, puede variar según la clasificación taxonómica de la verdura o fruta en particular.
- **Isoflavonas**, está vinculado el anillo B en la posición 3 del anillo C .
- **Flavanonoles** (dihidroflavonoles/ catequinas/ flavan-3-oles), son los 3-hidroxi derivados de las flavanonas. Son un subgrupo altamente diversificado y multisustituido. el grupo hidroxilo siempre está unido a la posición 3 del anillo C. A diferencia de muchos flavonoides, no existe un doble enlace entre las posiciones 2 y 3.

En la figura 9 se describe la biosíntesis de flavonoides la cual se lleva a cabo a partir de la ruta del ácido shikímico, comenzando por la extensión de cadena del 4-hidroxicinamoil-CoA a través de tres unidades de malonil-CoA (provenientes de la ruta de acetato), y por medio de condensaciones aldólicas y de Claisen, así como enolizaciones llevando a la formación de los diferentes tipos de flavonoides (Isoflavonoides, flavonas, dihidroflavonoles, flavonoles, antocianidinas y catequinas).



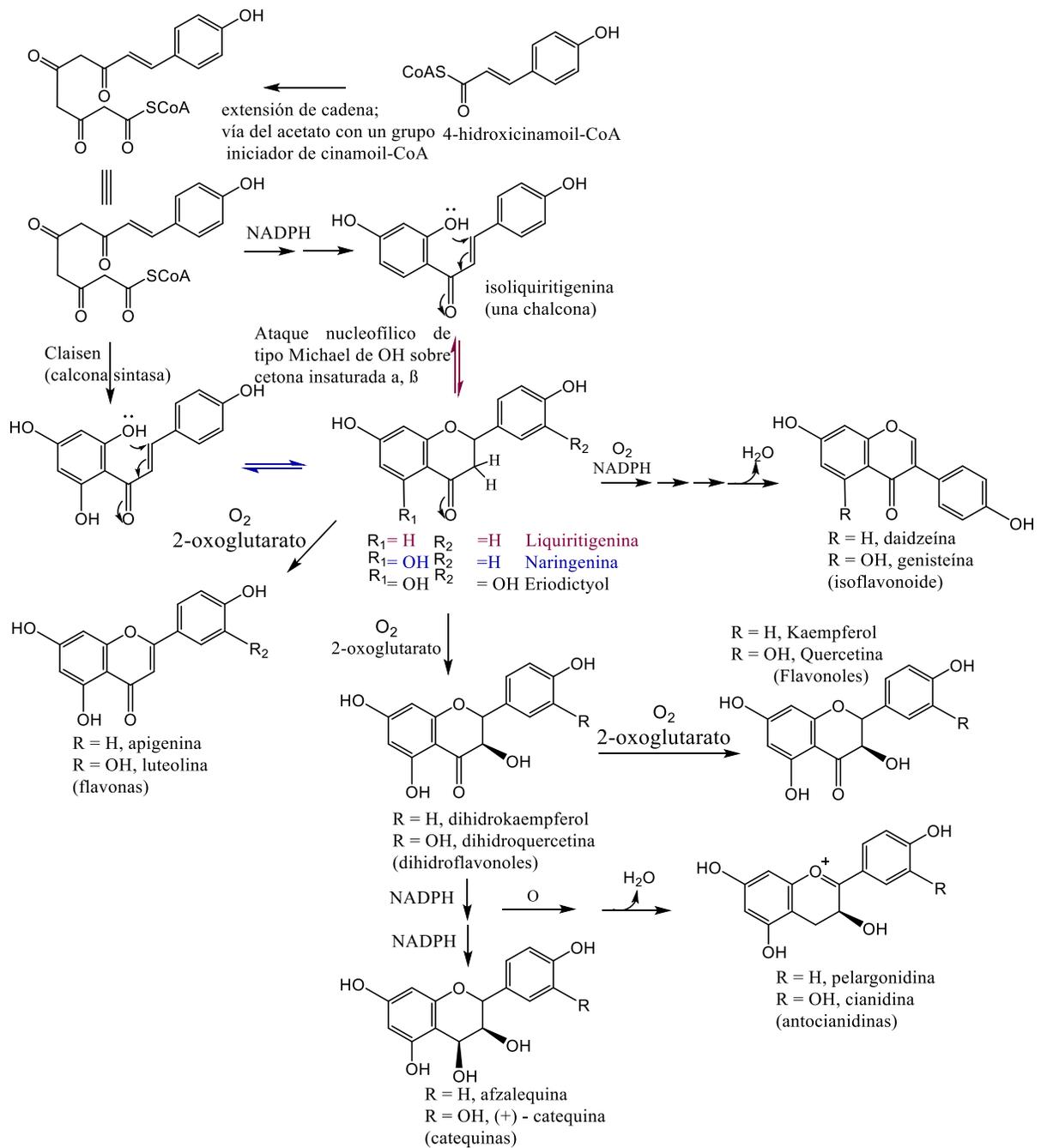


Figura 9. Biosíntesis de flavonoides vía ruta de shikímico, tomado y modificado de (Dewick, 2009).

Por otro lado, encontramos los ácidos fenólicos los cuales tienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, los ácidos cinámico y benzoico son las dos clases de este tipo de compuestos fenólicos. Los derivados de éstos tienen cadenas principales de C₁-C₆ y C₃-C₆. El ácido cinámico es la primera molécula en la vía fenilpropanoide y es la fuente de la mayoría de los derivados del ácido hidroxicinámico como los ácidos cumárico, cafeico,



ferúlico y sinápico normalmente presentes en el material vegetal en forma de éster o glucósido (Desjardins, 2008), figura 10.

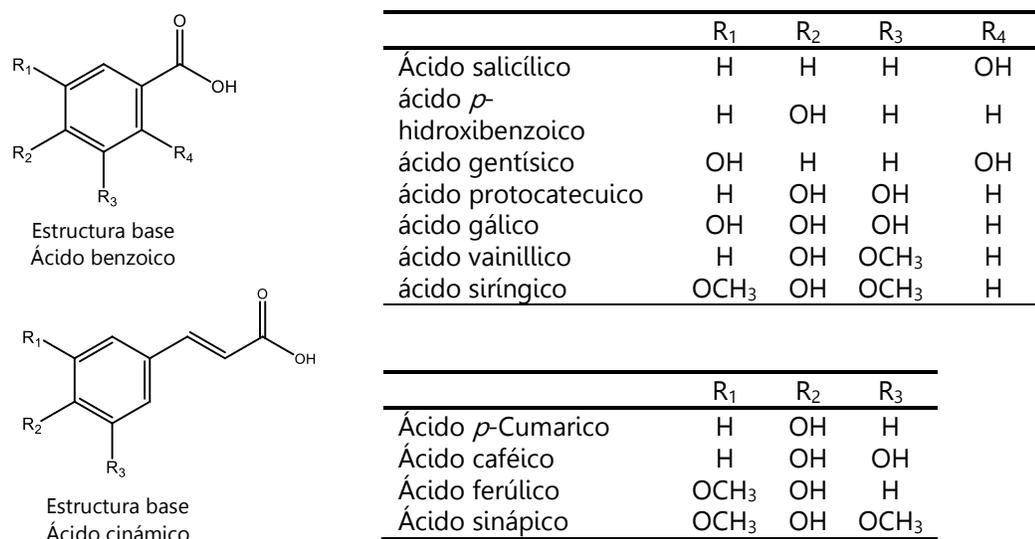


Figura 10. Estructura básica de derivados del ácido benzoico y cinámico.

En la figura 12, se describe la biosíntesis de derivados de ácido benzoico, la cual se lleva a cabo a partir de la ruta del ácido shikímico, dónde este mismo actúa como precursor de biosíntesis junto con la coenzima NADPH y reacciones de oxidación. En su contraparte, en la figura 11 se describe la biosíntesis de derivados de ácido cinámico y ácido benzoico, la cual se lleva a cabo a partir de la ruta del ácido shikímico. Donde *L*-fenilalanina y *L*-tirosina, actúan como bloques de construcción C₆C₃ y a través de una serie de reacciones catalizadas por enzimas liasa y enzimas hidrolasa dan origen a una serie de diferentes ácidos cinámicos que son también precursores de ácidos benzoicos.

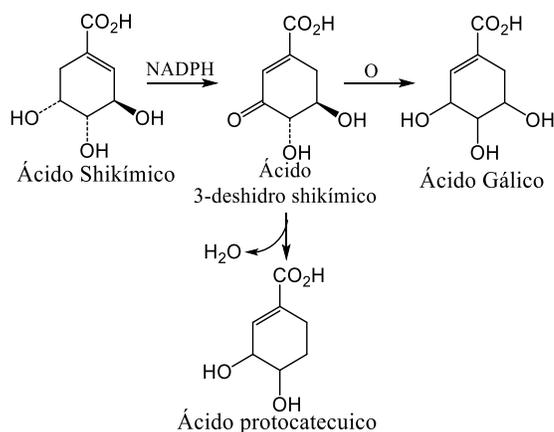


Figura 11. Biosíntesis inicial de ácido gálico, tomado y modificado de (Dewick, 2009).



2.2.2.1 Polifenoles: Actividad Antioxidante

El intenso interés en trasladar la protección mostrada en las plantas a los humanos, de manera específica, ha sido objeto de una amplia investigación durante las últimas décadas. Mostrando que los polifenoles naturales basado en un fuerte apoyo experimental, pueden ser beneficiosos en la prevención y el tratamiento del cáncer a través de mecanismos celulares por los cuales pueden afectar la carcinogénesis, la proliferación y muerte de las células tumorales, la inflamación, la angiogénesis, la diseminación, y la resistencia a los fármacos y la radiación, (Estrela et. al. 2017)

Como se menciona en la tabla 1 de la sección cáncer: quimioprevención y quimioterapia, los polifenoles se caracterizan por poseer actividad antioxidante. Éste término es cada día más importante en la sociedad moderna, ya que se está asociando a toda una serie de beneficios para la salud humana,(San Miguel-Chávez, 2017), dicha actividad de los compuestos está relacionado con su capacidad para eliminar una amplia gama de especies reactivas de oxígeno (ROS), en la tabla 5 se enlistan algunas ejemplos de ROS.

Tabla 5. Especies reactivas del oxígeno (ROS)

Radicales		
	Superóxido O_2^-	Radical alcoxilo: RO.
	Hidroxilo: OH	Radical peroxilo: ROO
No radicales		
	Peróxido de hidrógeno: H_2O_2	oxígeno singulete: 1O_2

El término ROS se usa típicamente para referirse a moléculas que contienen oxígeno altamente reactivas, como los radicales libres. Las especies de oxígeno reactivas pueden provenir de las mitocondrias, el metabolismo del citocromo P450, los peroxisomas y la activación de células inflamatorias. O por un origen externo que involucran carcinógenos no genotóxicos, diversos xenobióticos, ultrasonido y radiación de microondas. (Hussain et al., 2016).

La actividad antioxidante se desenvuelve de maravilla a niveles adecuados de ROS, sin embargo, cuando estos niveles sobrepasan la capacidad de procesamiento desencadena un estrés oxidativo (Figura 13), el cual da pie a alteraciones celulares en proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que pueden derivar incluso en inflamación o carcinogénesis. Cabe



señalar que el estrés oxidativo está asociado con las tres etapas de la carcinogénesis: inicio, promoción y progresión.

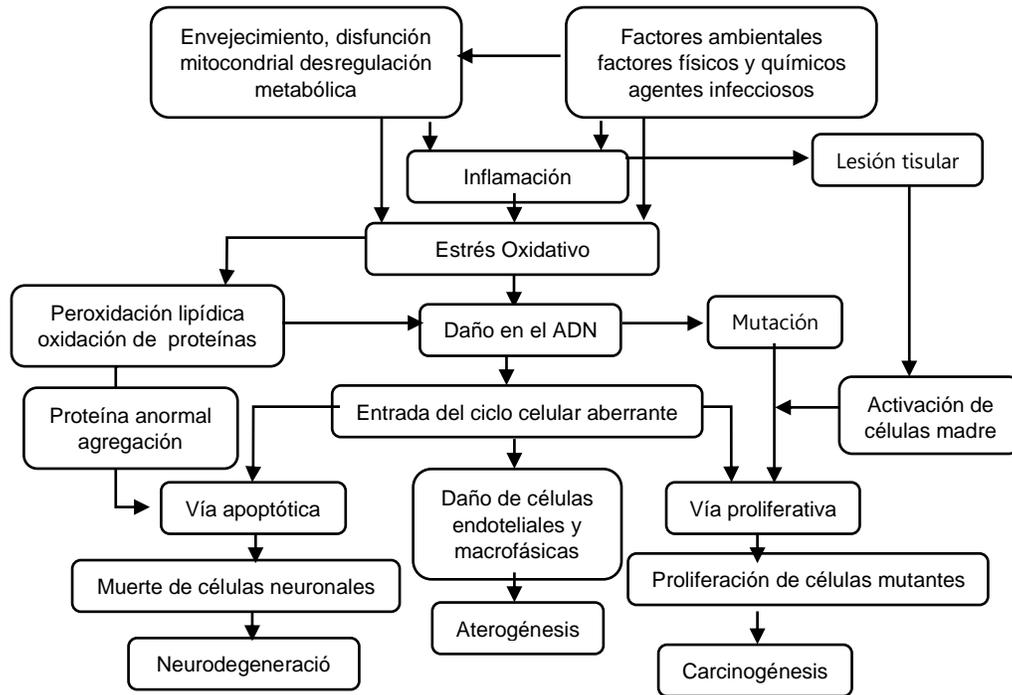


Figura 13. Roles del estrés oxidativo sobre el daño epigenético y la carcinogénesis, tomado de (Kumar, 2018).

Por lo tanto, los mecanismos implicados en dicha actividad de estos compuestos incluyen:

- La supresión de la formación de ROS mediante la inhibición de las enzimas implicadas en su producción.
- La eliminación de ROS o la regulación positiva o la protección de las defensas antioxidantes.
- La reducción en la actividad catalítica de las enzimas involucradas en la generación de ROS.
- Los potenciales redox más bajos de los polifenoles son termodinámicamente capaces de reducir los radicales libres altamente oxidantes debido a su capacidad para quelar iones metálicos (hierro, cobre, etc.) y radicales libres.

La actividad antioxidante depende de la estructura de sus grupos funcionales, el número de grupos hidroxilo influye en gran medida en varios mecanismos de actividad antioxidante.



2.2.2.2 Detección de Polifenoles: Método de Folin-Ciocalteu

En 1927, el grupo de Otto Folin y Vintila Ciocalteu, propuso el uso del reactivo Folin-Ciocalteu en condiciones alcalinas para determinar tirosina y triptófano, (Lamuela-Raventós, 2017). Posteriormente la aplicación de este reactivo constituyó un método de cuantificación de polifenoles con mayor sensibilidad y reproducibilidad.

El reactivo de Folin-Ciocalteu consiste en una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), (Muñoz-Bernal et al., 2017), la reacción se puede llevar a cabo en condiciones básicas donde los polifenoles disponibles reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, bajo esas condiciones, la disociación de un protón fenólico conduce a la formación de un ion fenolato, que es capaz de reducir el reactivo Folin-Ciocalte, (Sánchez-Rangel et al., 2013). donde tras la oxidación de los fenoles, la reacción forma un cromóforo azul constituido por un complejo fosfotúngstico-fosfomolibdeno que tiene una absorbancia máxima en la región de 765 nm, y se puede cuantificar mediante espectrofotometría UV/Vis y es proporcional a la cantidad total de compuestos fenólicos originalmente presentes; esta cantidad generalmente se expresa como equivalentes de ácido gálico o catequina.

En la figura 14 se ilustra la reacción del Folin-Ciocalteu con un compuesto fenólico.

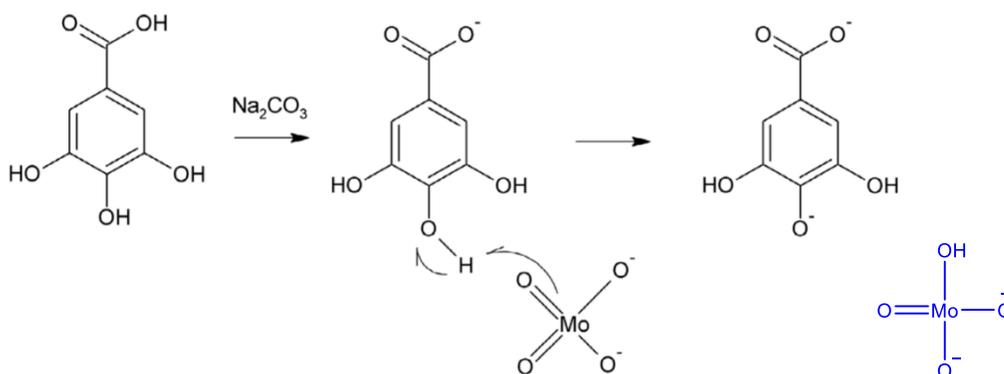


Figura 14. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin-Ciocalteu.



2.3 Generalidades de la familia Brassicaceae (brassicaceas o crucíferas)

La familia Brassicaceae (Cruciferae) comprende una gran cantidad de especies relevantes que se han consumido tradicionalmente en la dieta humana como vegetales frescos y conservados, aceites vegetales y condimentos, desde la antigüedad hasta la actualidad.

Representan un grupo monofilético distribuido por todo el mundo, contiene aproximadamente 338 géneros y 3709 especies (Al-Shehbaz et al., 2006), que van desde las plantas comestibles como lo son el brócoli, col de Bruselas, repollo, coliflor, col rizada, hasta cultivos oleaginosos y plantas ornamentales (figura 15).

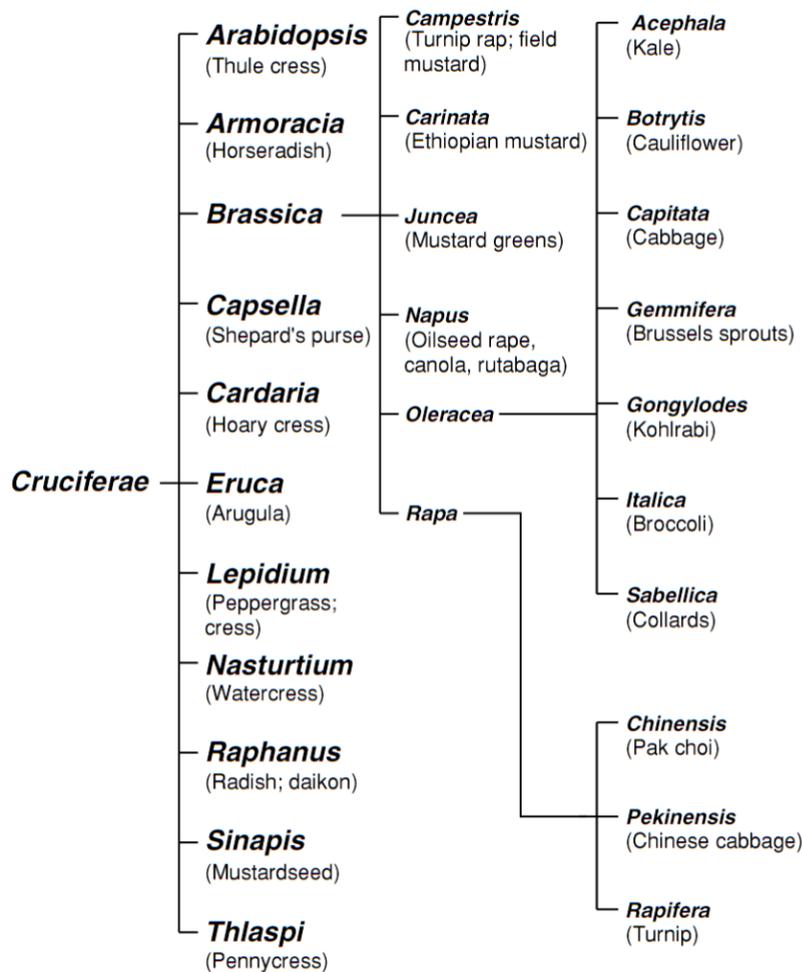


Figura 15. Clasificación general de la familia Cruciferae, (Walley & Buchanan-Wollaston, 2011).



2.4 Generalidades del género *Brassica*

Brassica es el género más representativo de la familia Brassicaceae, es nativo en la naturaleza de Europa occidental, las regiones mediterráneas y templadas de Asia y muchas especies silvestres crecen como malezas, especialmente en América del Norte, América del Sur y Australia, (Ansari et al., 2017).

Además, es importante por cultivos agrícolas y hortícolas e incluye una serie de malezas, tanto de taxones silvestres como escapadas del cultivo. Cuenta con más de 30 especies silvestres e híbridos más numerosos cultivares e híbridos de origen cultivado. La mayoría son plantas estacionales (anuales o bienales), pero algunas son arbustos pequeños. Existen varias especies de este género, por ejemplo : *Brassica carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. rapa* dentro de la que destaca *B. oleracea*, (Ansari et al., 2017).

2.5 Generalidades de la especie *Brassica oleracea* (vegetales crucíferos)

El nombre de los vegetales crucíferos o *Brassica oleracea* fue publicado por primera vez por Linneo en su Species Plantarum (1753). El cual identificó las formas cultivadas como la misma especie que los kales salvajes (Maggioni, 2015), (figura 16), por ejemplo a partir de la flor de la planta silvestre se obtiene el brócoli y a partir de las hojas se obtiene la col riza. Los cultivos más importantes del grupo *Brassica oleracea* se enumeran en la tabla 6, de acuerdo con la nomenclatura GRIN.

Estos vegetales son importantes porque son una rica fuente de compuestos que contienen azufre llamados glucosinolatos (*N*-hidroxisulfatos de β -tioglucósido) que imparten el aroma y el sabor picante característicos de esta especie.

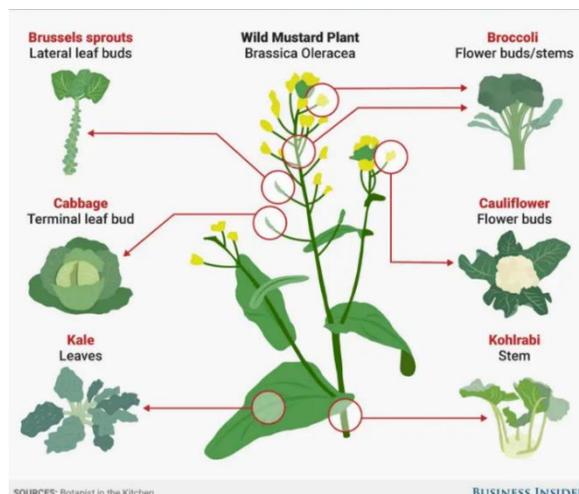


Figura 16. Derivados de la planta silvestre *Brassica oleracea*, (Fuente: Business Insider).



Tabla 6. Nomenclatura de cultivos *Brassica oleracea* L. de acuerdo a GRIN, tomado de (Maggioni, 2015).

<i>B. oleracea</i> L.	Sinonimo común	Nombre común
var. <i>alboglabra</i> (L.H. Bailey) Musil	<i>Bassica alboglabra</i> L. Bailey	Kale china, kailan
var. <i>botrytis</i> L.		Coliflor
var. <i>capitata</i> L.		Col roja/blanca/shetland
var. <i>costata</i> DC.		kale Portuguesa
var. <i>gemmifera</i> DC.		Brussels sprouts
var. <i>gongylodes</i> L.	<i>Brassica caulorapa</i> (DC.)	Kohlrabi
var. <i>italica</i> Plenck		Broccoli
var. <i>medullosa</i> Thell		Marrow- stem kale
var. <i>palmifolia</i> DC.		Palm kale; jersey kale
var. <i>ramosa</i> DC.	Subsp. <i>Fruticosa</i> Metzg.	Thousand-head kale; Branching bush kale
var. <i>sabauda</i> L.		Savoy cabbage
var. <i>sabellica</i> L.		Kale rizada
var. <i>viridis</i> L.	var. <i>acephala</i> DC.	Kale, Collard

2.6 *Brassica oleracea* var. *sabellica* (kale)

Dentro de las especies de *Brassica oleracea* se encuentra la variedad *sabellica* comúnmente llamada kale o col rizada, esta es un vegetal de hoja verde oscuro que forma parte de la familia del repollo. Se supone principalmente que se originó a partir de repollo silvestre que se encuentra en los acantilados y las costas rocosas a lo largo del Atlántico. Por lo general, la col rizada se caracteriza por altos niveles de diversos nutrientes y otros metabolitos constitucionales como glucosinolatos, flavonoides y carotenoides.

Por otro lado, la taxonomía correspondiente al kale se describe a continuación, de acuerdo con los Datos del Inventaire National du Patrimoine Naturel:

- Dominio: Biota
- Reinado: Plantae Haeckel, 1866
- Sub-reinado: Viridiaeplantae
- Infra-reinado: Streptophyta John, Williamson y Guiry, 2011
- Clase: Equisetopsida C. Agardh, 1825
- Clade: Tracheophyte Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998
- Clade: espermatofita
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht., 1967
- Superorden: Rosanae Takht., 1967
- Orden: Brassicales Bromhead, 1838
- Familia: Brassicaceae Burnett, 1835.
- Género: *Brassica* L., 1753
- Especie: *Brassica oleracea* L., 1753
- Subespecie: *Brassica oleracea* subsp. *Fruticosa* Metzg., 1833
- Variedad: *Brassica oleracea* var. *sabellica* (L.) Lambinon, 2004



2.6.1 Variedades comerciales de kale

Existen diversas variedades comerciales de la col rizada, dentro de las más comunes son el kale rizado y el redbor. En la tabla 7 se describe de manera más específica las variedades comerciales. En esta tesis se utilizará la variedad comercial "kale rizado".

Tabla 7. Variedades comerciales de kale.

Tipos	Origen	Características	Ilustración
Kale rizado	Mediterráneo	Agrio Color Verde tallo grueso, rizos bien pronunciados.	
Lacinato kale	Italia	Grandes hojas de color azul verdoso de aprox. 2-3 in de ancho.	
Kale ruso rojo	Siberia	Tallos de color púrpura rojizo y hojas verdes planas que se parecen más a las hojas de roble o una rúcula hinchada.	
Redbor kale	-	Hojas rojas y rizadas, con tonos que van del rojo a púrpura intenso con toques de verde.	
Kale chino	China	Hojas grandes, planas y brillantes y tallos gruesos.	
Kale ornamental	Japón	Hojas grandes, onduladas, gruesas y de colores algo extravagantes.	



2.6.2 Condiciones de cultivo de kale

El kale es un vegetal bianual con características importantes de cultivo que se describen en la tabla 8 (The spruce):

Tabla 8. Condiciones de cultivo kale.

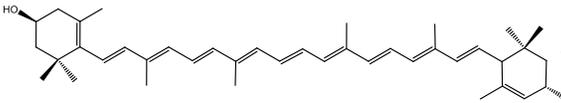
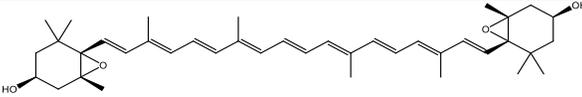
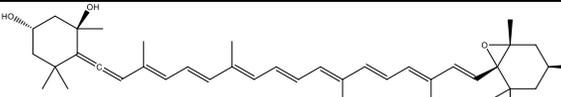
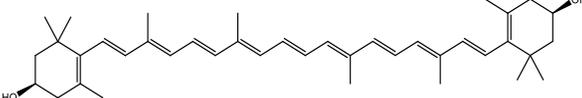
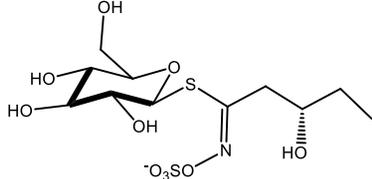
Luz	Puede manejar el sol completo hasta la sombra parcial. La exposición al sol es solo un factor en el crecimiento de plantas saludables de col rizada. Pueden manejar más sol si se les da mucha agua para enfriar el suelo. Se requerirá sombra parcial si el clima es cálido y seco.
Suelo	Suelo rico en materia orgánica con un pH ligeramente ácido. Lo estás cultivando para las hojas, por lo que el alto contenido de nitrógeno proporcionado por la materia orgánica es crucial.
Agua	Junto con las temperaturas frescas, el suelo húmedo ayuda a mantener las hojas de col rizadas dulces y crujientes, en lugar de duras y amargas. El acolchado debajo de las plantas mantendrá el suelo fresco y húmedo, como le gusta a la col rizada.
Temperatura y humedad	Temperatura óptima del suelo es de 14 a 18 °C. Todas las variedades prefieren temperaturas frescas y se endulzarán con un toque de escarcha. El clima cálido hace que la col rizada sea amarga. Durará durante el invierno en la mayoría de las zonas, con la protección adecuada, pero colapsará si se expone a fuertes heladas o nieve.
Fertilizante	Al plantar, use 0.5 tazas de fertilizante por cada 10 ft de hilera. Mezclar en la parte superior de 3 a 4 in de tierra. Use compost o alimento con algún tipo de fertilizante con alto contenido de nitrógeno.
Plantado	<ul style="list-style-type: none">▪ Se puede sembrar directamente en el jardín o comenzar en el interior y establecerse como trasplantes. Comience las plantas en el interior unas seis semanas antes de la última fecha de helada esperada. Las semillas de col rizada germinan rápidamente en suelos cálidos y deben crecer dentro de cinco a ocho días.▪ Cubra las semillas con aproximadamente 1/2 in de tierra y no permita que las semillas se sequen antes de germinar. Las plantas crecerán más lentamente en exteriores que en interiores bajo luces.▪ Trasplante las plántulas después del peligro de heladas. Coloque las plantas con aproximadamente 16 in de espacio entre las plantas. Esto les da espacio para extenderse y aún permite la circulación de aire.▪ Puede dirigir la semilla en climas fríos tan pronto como se pueda trabajar el suelo y la temperatura del suelo sea de al menos 7 °C. La col rizada madura rápidamente, en aproximadamente dos meses o menos.▪ En climas cálidos, se puede sembrar directamente a fines del verano / principios del otoño, así como en la primavera. Una cosecha de col rizada en invierno en climas más cálidos puede ser mucho más dulce que una cosecha de verano.

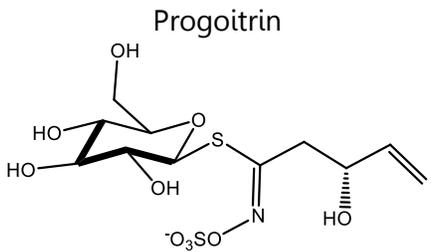
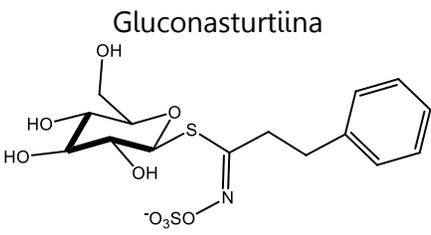
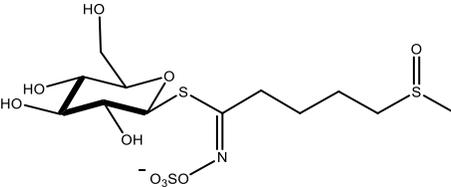
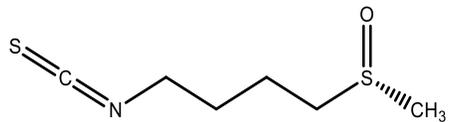
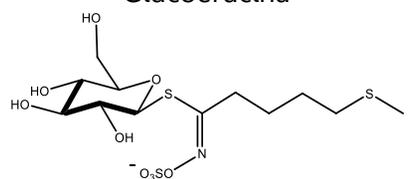


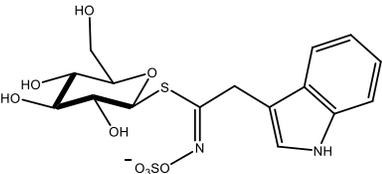
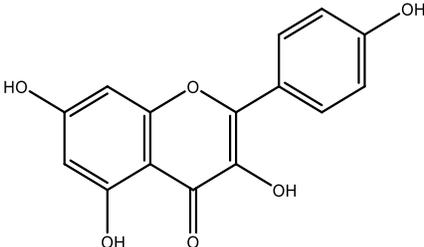
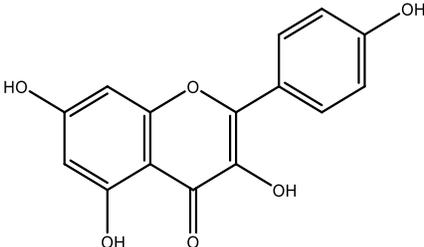
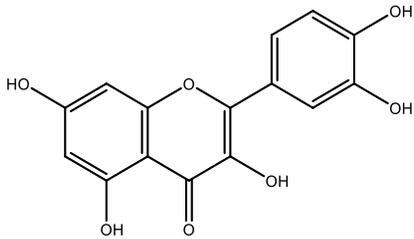
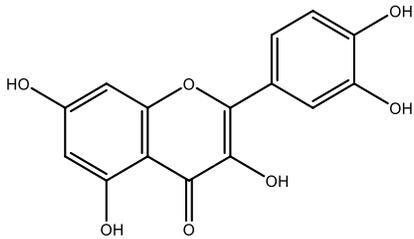
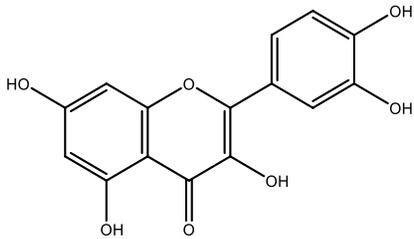
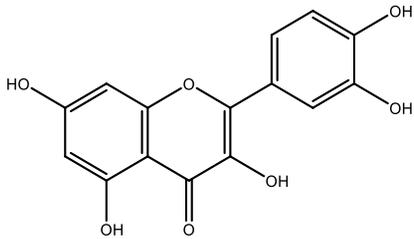
2.6.4 Estudios químicos y farmacológicos de col rizada

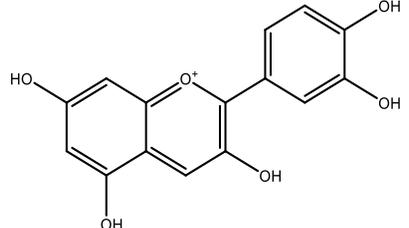
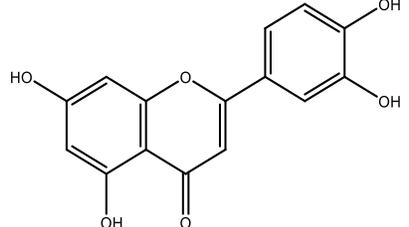
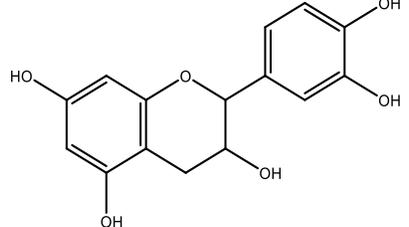
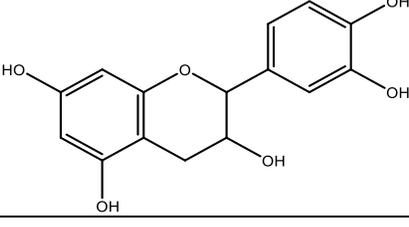
En la siguiente tabla a partir de la literatura se han encontrado algunos metabolitos secundarios presentes en *Brassica oleracea* var. *sabellica* y sus actividades farmacológicas, dentro de las que destaca la actividad antioxidante y quimiopreventiva.

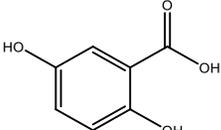
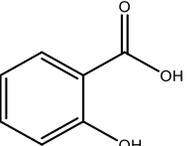
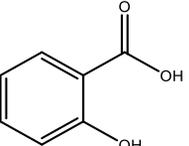
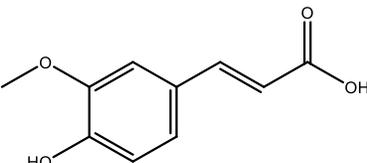
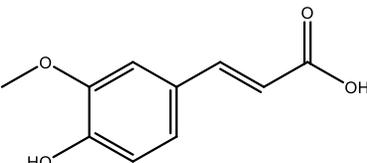
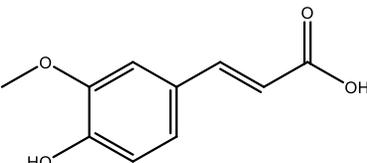
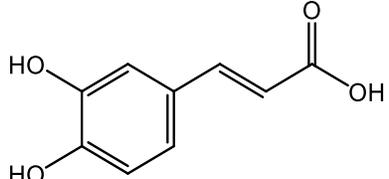
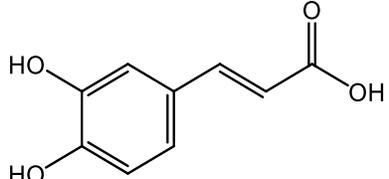
Tabla 10. Metabolitos secundarios de *Brassica oleracea* var. *sabellica*.

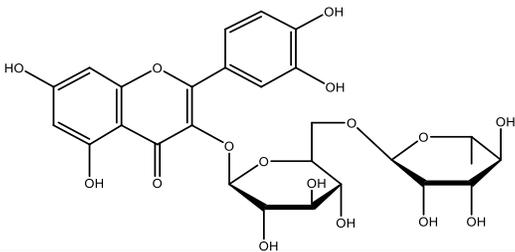
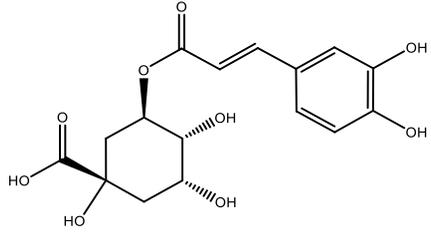
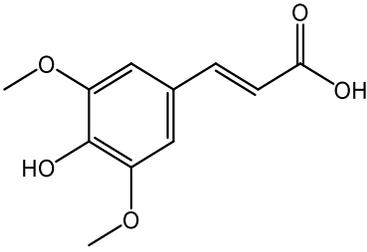
Variedad de vegetal	tratamiento del vegetal	compuestos reportados	Actividad biológica	Referencia
Winterbor kale	Liofilizado		Antiinflamatorio	(Lefsrud et al., 2006)
Kale	Congelacion N ₂ y almacenado a 80 ° C.	Luteina	Antioxidante	(Kaulmann et al., 2014)
Kale	los extractos se sometieron a saponificación;		Antioxidante	(Humphries & Khachik, 2003)
Kale	Congelacion N ₂ y almacenado a 80 ° C.		Antioxidante	(Kaulmann et al., 2014)
Kale	Congelacion N ₂ y almacenado a 80 ° C.		Antioxidante	(Kaulmann et al., 2014)
Kale	Los extractos se sometieron a saponificación.		Antioxidante	(Humphries & Khachik, 2003)
25 variedades de kale ²	Desactivación térmica de mirosinasa como extractos metanólicos acuosos.		ND	(Hahn et al., 2016)

25 variedades de kale ²	Desactivación térmica de mirosinasa como extractos metanólicos acuosos.	 <p>Progoitrin</p>	ND	(Hahn et al., 2016)
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i>	Congelacion N _l muestras se hirvieron en 70% (v / v) de metanol		ND	(Jeon et al., 2018)
Dwarf Blue Curled Vates (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>)	Congelacion N _l se almacenaron a -22 °C antes de la liofilización.		ND	(Ku et al., 2014)
25 variedades de kale ²	Desactivación térmica de mirosinasa como extractos metanólicos acuosos.	 <p>Gluconasturtiina</p>	ND	(Hahn et al., 2016)
Dwarf Blue Curled Vates (<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i>)	Congelacion N _l se almacenaron a -22 °C antes de la liofilización.		ND	(Ku et al., 2014)
Tuscan kale	Se congelaron por completo, se liofilizaron y se molieron hasta obtener un polvo fino.	 <p>Glucorafanina</p>	ND	De Nicola et. al. 2013
berza silvestre (<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>)	Blanqueamiento	 <p>Sulforafano</p>	Agente quimiopreventivo	(Radošević et al., 2017)
Tuscan kale	se congelaron por completo, se liofilizaron y se molieron hasta obtener un polvo fino.	 <p>Glucoerucina</p>	ND	De Nicola et. al. 2013

<p>Kale rizada (<i>B. oleracea</i> L. ssp. <i>oleracea</i> convar. <i>acephala</i> (DC.) alef. var. <i>sabellica</i> L., 'Reflex')</p>	<p>Congelacion N_l extracto metanólico.</p>	<p>Glucobrasicina</p> 	<p>Agente quimiopreventivo</p>	<p>(Olsen et al., 2009)</p>
<p>Kale rizado (<i>B. oleracea</i> L. ssp. <i>oleracea</i> convar. <i>acephala</i> (DC.) alef. var. <i>sabellica</i> L., 'Reflex')</p>	<p>Congelacion N_l extracto metanólico.</p>	<p>Kaempferol</p> 	<p>Agente quimiopreventivo</p>	<p>(Olsen et al., 2009)</p>
<p>kale rizado (<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>)</p>	<p>Congelacion N_l extracción con acetona,</p>		<p>ND</p>	<p>(Zhang et al., 2003)</p>
<p>(<i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i>)</p>	<p>Congelacion N_l muestras se hirvieron en 70% (v / v) de metanol</p>	<p>Quercetina</p> 	<p>ND</p>	<p>(Jeon et al., 2018)</p>
<p>Kale rizado (<i>B. oleracea</i> L. var. <i>sabellica</i>)</p>	<p>Congelacion N_l liofilizado y extracción con 50 ml 700 g / L de metanol.</p>		<p>Actividad antioxidante</p>	<p>(Biegańska- Marecik et al., 2017)</p>
<p>8 cultivos de kale¹</p>	<p>Congelado (-40 °C), liofilizado y molido. Se hidrolizó al 50%</p>		<p>ND</p>	<p>(Neugart et al., 2012)</p>
<p>8 cultivos de kale¹</p>	<p>MeOH:H₂O</p>		<p>ND</p>	<p>(Schmidt et al., 2010)</p>

<p>Kale rizada (<i>B. oleracea</i> L. ssp. <i>oleracea</i> convar. <i>acephala</i> (DC.) alef. var. <i>sabellica</i> L., 'Reflex')</p>	<p>Congelacion N₁ extracto metanólico.</p>	<p>Cianidina</p> 	<p>Agente quimiopreventivo</p>	<p>(Olsen et al., 2009)</p>
<p>Torza riccia</p>	<p>Extracto etanólico</p>	<p>Luteolina</p> 	<p>Antioxidante</p>	<p>(Fратиanni et al., 2014)</p>
<p>Cavolo Nero</p>	<p>Congelacion N₁, extracción soxholet MeOH: H₂O (60:40)</p>	<p>Epicatequina</p> 	<p>quimiopreventivo</p>	<p>(Mollica et al., 2018)</p>
<p>Torza riccia</p>	<p>Extracto etanólico</p>	<p>Catequina</p> 	<p>Antioxidante</p>	<p>(Fратиanni et al., 2014)</p>

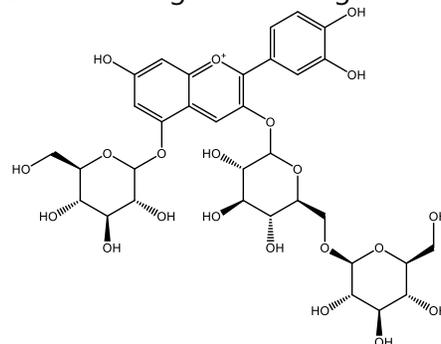
Kale rizado	Kale fermentado	<p>Ácido gentísico</p> 	Antitumoral	(Michalak et al., 2020)
kale rizado (<i>B. oleracea</i> L. var. <i>sabellica</i>)	Kale fermentado	<p>ácidos salicílicos</p> 	Antitumoral	(Michalak et al., 2020)
kale (<i>B. oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i> DC.)	Congelación N ₂ Extracción Soxhlet con n-hexano y éter de petróleo.		Antibacterial	(Ayaz et al., 2008)
Kale (<i>B. oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i> DC.)	Congelación N ₂ Extracción Soxhlet con n-hexano y éter de petróleo.	<p>Ácido ferúlico</p> 	Antibacterial	(Ayaz et al., 2008)
Torza riccia	Extracto metanólico		Antioxidante	(Fратиanni et al., 2014)
Col rizada verde 'manchoo collard' y col rizada roja 'jeok seol'.	Congelación N ₂ muestras se hirieron en 70% (v / v) de metanol		ND	(Jeon et al., 2018)
25 variedades de kale ²	Desactivación térmica de mirosinasa como extractos metanólicos acuosos.		ND	(Hahn et al., 2016)
Kale toscana (<i>B. oleracea</i> (L.) ssp <i>acephala</i> (DC) var. <i>sabellica</i> L. cv. 0D74)	Se congelaron por completo, se liofilizaron y se molieron hasta obtener un polvo fino.	<p>Ácido caféico</p> 	Antioxidante	(De Nicola et al., 2013)
Kale (<i>B. oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i> DC.)	Congelación N ₂ Extracción Soxhlet con n-hexano y éter de petróleo.		Antibacterial	(Ayaz et al., 2008)
Torza riccia	Extracto metanólico		Antioxidante	(Fратиanni et al., 2014)

Torza riccia	Extracto etanólico	<p>Rutina</p> 	Antioxidante	(Fратиanni et al., 2014)
Cavolo Nero	Congelación N ₂ , extracción soxholet MeOH: H ₂ O (60:40)	<p>Ácido clorogénico</p> 	quimiopreventivo	(Mollica et al., 2018)
Torza riccia	Extracto metanólico		Antioxidante	(Fратиanni et al., 2014)
Kale	Congelación N ₂ y almacenado a 80 °C.		ND	(Kaulmann et al., 2014)
Kale rizado (<i>B. oleracea L. var. sabellica L.</i>)	Congelación N ₂ liofilizado y extracción con 50 ml 700 g / L de metanol.	<p>Ácido sinápico</p> 	ND	(Biegańska-Marecik et al., 2017)

Cultivares verdes y rojos de la col rizada (*B. oleracea* ssp. *oleracea* convar. *acephala* (DC.), Alef. var. *sabellica* L., 'Reflex' y 'Redbor')

Se blanquearon, se almacenaron en congelación y se trataron térmicamente utilizando la tecnología de hervir en bolsa.

Cianidin-3-diglucósido-5-glucósido



Antioxidante

(Olsen et al., 2012)

(*B. oleracea* var. *acephala*)

Congelación N_l muestras se hirvieron en 70% (v / v) de metanol

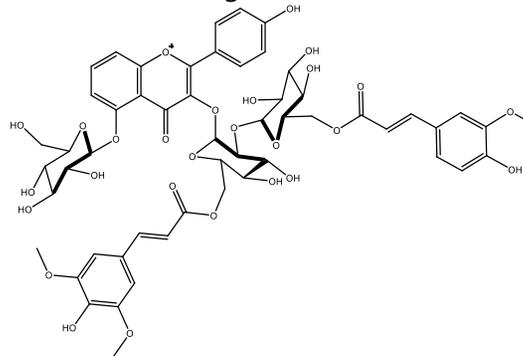
ND

(Jeon et al., 2018)

Kale rizado (*B. oleracea* L. convar. *acephala* (DC.) Alef. var. *sabellica* L. 'Redbor')

Extracto metanólico

Cianidina -3- sinapoil-feruloil-diglucosido-5-glucósido



ND

(Olsen et al., 2010)

(*Brassica oleracea* var. *acephala*)

Congelación N_l muestras se hirvieron en 70% (v / v) de metanol

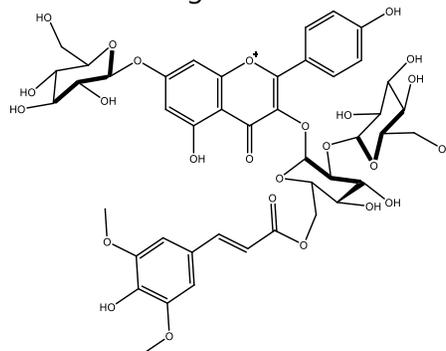
ND

(Jeon et al., 2018)

Los cultivares verdes y rojos de la col rizada (*B. oleracea* ssp. *oleracea* convar. *acephala* (DC.), Alef. var. *sabellica* L., 'Reflex' y 'Redbor')

Se blanquearon, se almacenaron en congelación y se trataron térmicamente utilizando la tecnología de hervir en bolsa.

Quercetin-3-O- sinapoyl-sophoroside-7-O-glucoside



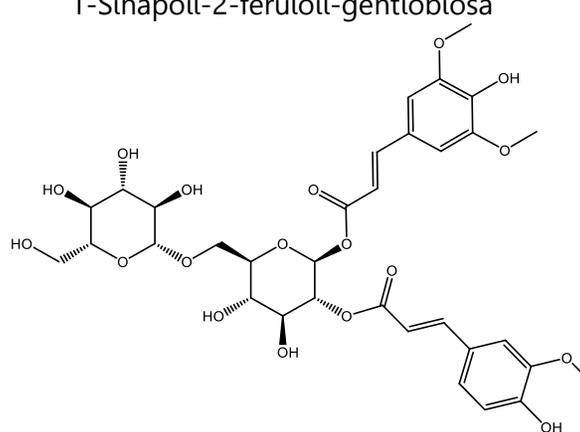
Antioxidante

(Olsen et al., 2012)

Kale 'Arsis'

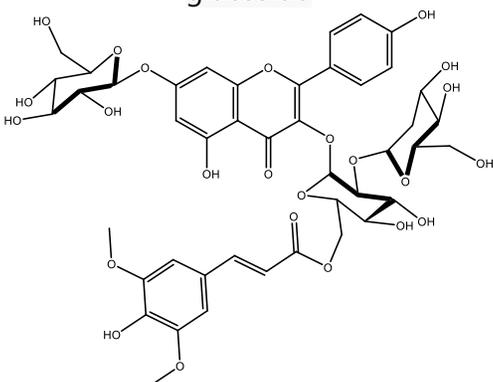
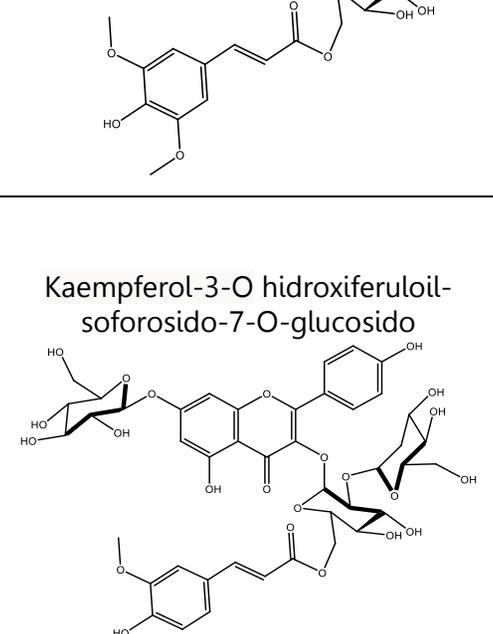
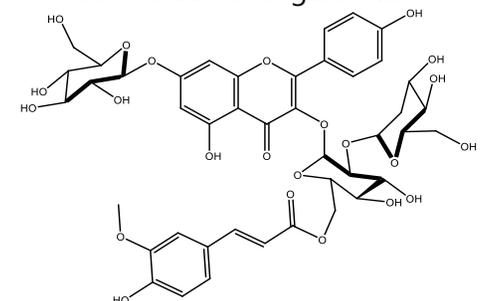
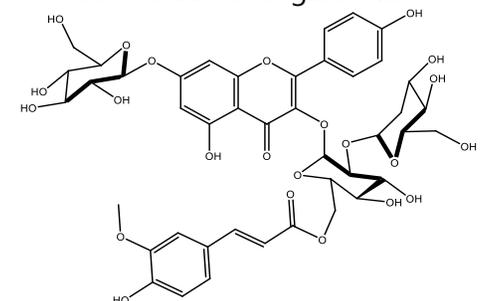
Congelado (-40 °C), liofilizado y molido. Se hidrolizó al 70% MeOH:H₂O en sonicador.

1-Sinapoil-2-feruloil-gentiobiosa



Antioxidante

(Fiol et al., 2012)

Kale 'Arsis'	Congelado (-40 °C), liofilizado y molido. Se hidrolizó al 70% MeOH:H ₂ O en sonicador.	<p>Kaempferol-3-O-sinapoil-soforosido-7-O-glucosido</p> 	Antioxidante	(Fiol et al., 2012)
8 cultivos de kale ¹	Congelado (-40 °C), liofilizado y molido. Se hidrolizó al 50% MeOH:H ₂ O		ND	(Neugart et al., 2012)
Kale 'Arsis'	Congelado (-40 °C), liofilizado y molido. Se hidrolizó al 70% MeOH:H ₂ O en sonicador.	<p>Kaempferol-3-O hidroxiferuloil-soforosido-7-O-glucosido</p> 	Antioxidante	(Fiol et al., 2012)
8 cultivos de kale ¹	Congelado (-40 °C), liofilizado y molido. Se hidrolizó al 50% MeOH:H ₂ O		ND	(Neugart et al., 2012)

¹ 1. Winterbor, 2. Redbor, 3. Winnetou, 4. Arsis, 5. Altmärker Braunkohl, 6. Halbhoher grüner krauser, 7. Lerchenzunge, 8. Frostara

² 1. Lerchenzungen, 2. Vitessa, 3. Lage Fijngekrulde, 4. Niedriger Grüner Krauser, 5. Reflex F1, 6. Redbor F1, 7. Frostara, 8. Winnetou F1, 9. Black Tucany, 10. Palmizio Senza Testa, 11. Negro Romano, 12. Georgia Southern, 13. Morris Heading, 14. champion, 15. vates, 16. Buss Bunde, 17. Niedriger von Rosenweide, 18. Rote Palme, 19. Rote Palme Holterfehn, 20. Schatteburg, 21. Jellen, 22. Neuefehn Hainwatjes, 23. Lammertsfehn, 24. Diepholzer Dickstrunk, 25. Vitessa.

2.7 Quimioinformática

La quimioinformática es una ciencia que asocia la química y la informática, ésta interfiere en la utilización de bases de datos químicos para la gestión, visualización y análisis sistémico de información química, (Saldívar-González & Medina-Franco, 2019).

En 1998 el término quimioinformática fue utilizado y definido por primera vez por el Dr. Frank K. Brown en los Informes Anuales de Química Medicinal. en su artículo "Quimioinformática: qué es y cómo impacta el descubrimiento de medicamentos", (Xu & Hagler, 2002) como "La combinación de recursos de información para transformar los datos en información y la información en conocimiento, con el propósito de tomar mejores decisiones con mayor rapidez en el campo de identificación y optimización de prospectos de medicamentos.(Leach & Gillet, 2007; Umashankar & Gurunathan, 2011; Willett, 2011).

Actualmente, los fármacos aprobados entre 1981 y 2019, el 3.8% corresponde a productos naturales inalterados y el 18,9% son derivados de productos naturales, (Medina-Franco & Saldívar-González, 2020). Entonces, esta área puede contribuir de manera sustancial, al descubrimiento de fármacos basados en productos naturales y apoyar a los experimentación a lo largo de las fases de descubrimiento de compuestos líderes, (Chen & Kirchmair, 2020).

La quimioinformática ha jugado un rol clave en la caracterización de productos naturales mediante sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, (Chen & Kirchmair, 2020) y para que se dé a cabo esta contribución, el uso de recursos informáticos es esencial llegando a encontrar licencias de software de paga o de acceso libre como:

- Molinspiration, (<https://www.molinspiration.com>) es un proveedor de software de informática química en línea de carácter gratuito fundada en 1986 por la Universidad de Bratislava. Dicho programa posee una amplia gama de herramientas de software quimioinformática que apoyan la manipulación y el procesamiento de moléculas, funcionando con la notación SMILES para permitir conversiones de SDFfile y generar representaciones de moléculas y fragmentos, (ProgrammableWeb, 2019). El servicio puede analizar los resultados en función de fragmentos moleculares y predecir la actividad biológica de los compuestos representados en base al cálculo de diversas



propiedades moleculares necesarias en QSAR, el modelado molecular y el diseño de fármacos.

- PreADMET, es un software en web, (<https://preadmet.bmdrc.kr/>), para predecir datos ADME y construir bibliotecas similares a fármacos utilizando el método silico. Cálculo del descriptor molecular, predicción de la semejanza de las drogas, predicción ADME, predicción de toxicidad.
- PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances), (<http://www.pharmaexpert.ru/>), es un software quimioinformático el cual ha sido diseñado como una herramienta para la evaluación del potencial biológico de una molécula en función de sus fórmulas estructurales presentadas en formato MOLfile o SDfile. Las estimaciones de los perfiles de actividad biológica son apoyadas por los valores de actividad probable (Pa) e inactividad probable (Pi), siendo estos valores de probabilidad, que varían de 0,000 a 1,000.
- SwissDrugDesign es una herramienta desarrollada por el SIB Molecular Modeling Group tiene como objetivo proporcionar el primer entorno de diseño de fármacos in silico basado en la web, completo y de libre acceso.
 - SwissADME, (<http://www.swissadme.ch>), es una herramienta que brinda acceso gratuito a un conjunto de modelos predictivos para propiedades fisicoquímicas, farmacocinética, la naturaleza similar a la de un fármaco y la compatibilidad de la química medicinal de una o varias moléculas pequeñas.



3. Justificación

Los vegetales crucíferos (*Brassica oleracea*) son consumidos universalmente siendo muy recomendada su inclusión como parte de la dieta diaria debido a su importante fuente de macronutrientes como vitaminas, minerales; además de fitoquímicos de tipo organosulfurados y compuestos fenólicos. Aunado a esto, se les relaciona con enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) para tratar diversas enfermedades como el cáncer, además de sus propiedades antioxidantes.

Las características particulares de los polifenoles le confieren actividades tanto antioxidantes como antiinflamatorias, neutralizando los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) lo que puede preceder o acompañar al desarrollo del cáncer.

Por lo anterior expuesto, el presente estudio se dirigió al vegetal crucífero kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) cultivado en México hacia el estudio químico de los compuestos fenólicos y su predicción de actividad farmacológica con el uso de herramientas computacionales de quimioinformática con el fin de sustentar el uso como quimiopreventivo y antioxidante de la especie vegetal.



4. Objetivo general

Identificar y cuantificar los polifenoles presentes en el extracto metanólico obtenido a partir del vegetal kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) y predecir su actividad biológica *in silico*.

4.1. Objetivos particulares

1. Obtener el extracto metanólico del vegetal kale seco (*Brassica oleracea* L. var. *sabellica*).
2. Evaluar la actividad anti proliferativa del extracto en las líneas de cáncer cervicouterino (HeLa), próstata (PC-3) y hepático (Hep3B).
3. Obtener las fracciones de hexano, diclorometano y acuosa, mediante extracción líquido-líquido a partir del extracto metanólico.
4. Determinar el contenido de polifenoles totales del extracto y de las fases antes mencionadas por el método de Folin-Ciocalteu.
5. Analizar los polifenoles reportados en la literatura para el kale y calcular sus propiedades moleculares (clogP, TPSA, no. A, no. AEH y DEH, PM), así como también predecir su actividad biológica mediante el uso de PassOnline, SwissADME, molinspiration, preADMET.



5. Materiales y Métodos

5.1 Obtención del material vegetal

La producción de las plantas de kale *Brassica oleracea* var. *sabellica* (semillas Hydro enviroment) se realizó bajo condiciones de invernadero en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo. Se establecieron mediante siembra directa en charolas de poliestireno de 200 cavidades el día 3 de agosto de 2019; como sustrato se usó una mezcla de peat moss con perlita (75:25 v/v respectivamente); una vez germinadas fueron regadas con una solución nutritiva con las siguientes concentraciones de elementos minerales en mg/L: N=60, P=25, K=80, Ca=90, Mg= 20 y S=60. El día 5 de septiembre las plantas fueron trasplantadas a bolsas de polietileno negro de 18 L de capacidad, rellenas con arena de tezontle con partículas menores a 4 mm de diámetro; en la etapa de producción de la planta se regaron con una solución nutritiva con las siguientes concentraciones de elementos minerales en mg/L: N=120, P=50, K=160, Ca=180, Mg= 40 y S=120, la cosecha fue realizada el 28 de octubre del 2019, ver figura 17.



Figura 17. (a) cultivo de kale en condición de invernadero; (b) Colecta del material vegetal; (c) Hoja de kale cultivada.

5.2 Preparación material vegetal

Las hojas de kale recién cosechadas (7.5 kg) se lavaron por duplicado para eliminar el polvo y se dejaron escurrir en un colador para eliminar el exceso de agua. Finalmente se dejaron secar sobre periódico a temperatura ambiente y bajo la sombra por 31 días. Durante ese tiempo se voltearon las hojas de kale 2 veces al día. A los 3 días, algunas hojas empezaron a cambiar de color verde a amarillo y morado, mientras que otras empezaron a presentar manchas a lo largo de la orilla del nervio. Por último, en noviembre 27, 2019 se terminó de secar las hojas; teniendo un peso neto de 978 g de material vegetal seco, ver figura 18.





Figura 18. (a) Kale fresco recolectado; (b) Lavado de la hoja de kale; (c) Secado de hoja a temperatura ambiente; (d) Hojas de kale seca; (e) Hoja de Kale seca triturada.

Debido a que el material vegetal ya seco de kale presentó tres tipos de coloraciones (verde, amarillo y morado), se decidió llevar a cabo una prueba de maceración con MeOH de los tres tipos de colores, con el fin de verificar por CCF si se presentaban diferencias entre ellos (figura 19).

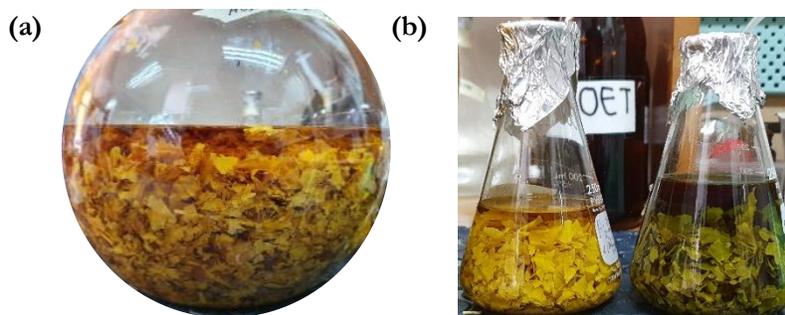


Figura 19. a) Maceración metanólica hoja de kale amarilla; (b) Maceración metanólica hoja de kale morada y hoja de kale verde.



5.3 Obtención del extracto

A partir de 7.1 kg de hoja fresca, se obtuvieron 800 g de kale seco. Este se maceró con MeOH por 72 h por triplicado. Posteriormente, se filtraron y concentraron en un evaporador rotatorio a una temperatura de entre 40°C – 50°C, el crudo del extracto se dejó secar a temperatura ambiente obteniéndose 335 g de extracto MeOH color verde intenso con apariencia viscosa (figura 20).



Figura 20. Extracto metanólico de Kale.

5.4 Bipartición del extracto

Posteriormente para facilitar la purificación de los metabolitos secundarios se prosiguió a una bipartición del extracto, el procedimiento general se muestra en la figura 21.

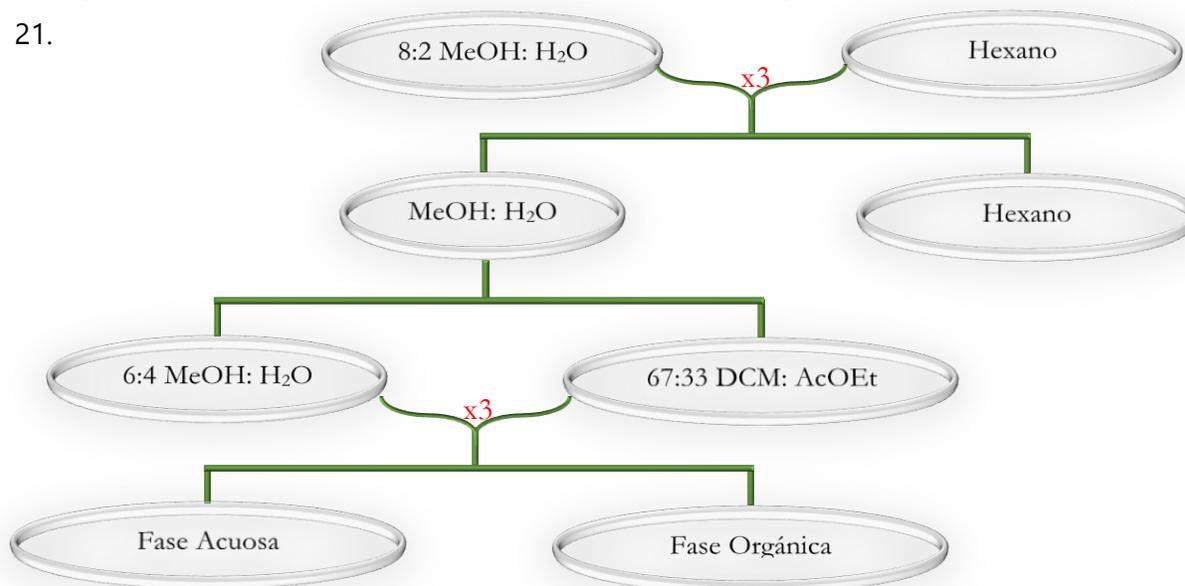


Figura 21. Esquema metodológico de la bipartición del extracto metanólico de kale seco.



La metodología se llevó a cabo en fracciones de extracto (80 g), este se disolvió con 200 mL del sistema hidroalcohólico (8:2 MeOH: H₂O), posterior a esto se vertió la mezcla al embudo y se extrajo con 100 mL de hexano, esto por triplicado.

La fase hidroalcohólica se llevó ahora a una concentración 6:4 (MeOH: H₂O), y se extrajo con 200 mL de un sistema 67:33 DCM: AcOEt por triplicado, figura 22.

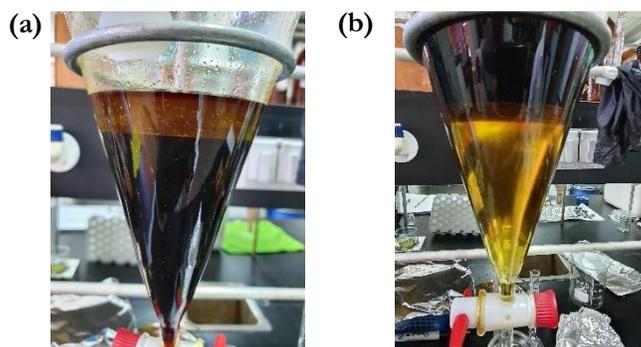


Figura 22. (a) Fase superior: Hexano, Fase inferior; Hidroalcohólica; (b) Fase superior: Acuoso, Fase inferior; Orgánico.

Finalmente, las fracciones hexánica y orgánica, se concentraron en un evaporador rotatorio a una temperatura de entre 45°C – 55°C, y la fracción acuosa se dejó secar a temperatura ambiente y con corriente de aire directa para facilitar su secado.

5.5 Fraccionamiento primario del extracto hexánico

De la fracción hexánica obtenida a partir de la bipartición (8.0 g) se ha montado en una columna de 19.5 cm · 5.5 cm con 225.9 g de sílice 63-200 malla, (figura 23). Se obtuvieron 48 reuniones de 200 mL cada uno, ver tabla 11.

Tabla 11. Sistemas de elución usados en el fraccionamiento de la fase de hexano.

Sistema Hex: AcOEt	Fracción
100% Hexano	1 – 12
90:10	13 – 23
70:30	24 – 28
50:50	29 – 33
100% AcOEt	34 – 38
Sistema MeOH: AcOEt	
50:50	39 – 43
100% MeOH	44 – 48



Figura 23. Columna No. 1 Extracto héxanico.



5.6 Prueba de citotoxicidad

El extracto de *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*, se sometió a ensayos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer humano PC3 (próstata), Hep3B (hepatocelular) y HeLa (cervical), obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.). Se llevó a cabo en colaboración con la Dra. Leticia González Maya de la Facultad de Farmacia-UAEM.

Las células PC3 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), Mientras que las células Hep3B y HeLa en medio DMEM (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB, Invitrogen) y con glutamina 2 mM, todos los cultivos se incubaron a 37 ° C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Se cultivaron 3,000 células por pozo en una placa de 96 pozos para iniciar la evaluación citotóxica, el ensayo se realizó por triplicado en experimentos independientes y a la concentración única de 100 µg / mL utilizando DMSO para solubilizar la muestra (5 mg / 100 µL) y medio de cultivo estéril para llevar a dicha concentración. Como control positivo se utilizó Taxol a la CI₅₀ a 72 h específica para cada línea celular (HeLa CI₅₀ 5.6 nm, Hep3B CI₅₀ 38.6 nm, PC3 CI₅₀ 12 nm). Una vez realizado el tratamiento, se incubó a 37 ° C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 48 h (PC3 y Hep3B) y 72 h (HeLa).

El número de células viables en la proliferación se determinó utilizando el kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. La viabilidad celular se determinó por absorbancia a 450 nm usando un lector de ELISA automatizado (GolMax).

5.7 Prueba de detección de Polifenoles: Método de Folin-Ciocalteu

5.7.1 Preparación de soluciones

El reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N (CAS 10377-48-7) de Sigma- Aldrich se preparó diluyendo en una relación 1:2 con agua. Se preparó con 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu con 5 mL de agua destilada, se almacenó en un frasco ámbar y en un ambiente libre de luz. Posterior se preparó una solución de carbonato de sodio al 7.5% a partir de 1.5 g de Na₂CO₃ y se adicionó 20 mL de agua destilada.



Por otro lado, la solución stock de ácido gálico (CAS 149-91-7) de Sigma-Aldrich se preparó a una concentración final de 1 mg/mL, se pesaron 5 mg del ácido y se diluyó y aforó con MeOH grado HPLC en un matraz aforado de 5 mL, esta solución se empleó para la curva de calibración de este método.

Finalmente, las muestras de kale se prepararon a una concentración de 1 mg/mL, las fases de hexano y orgánica se disolvieron en MeOH y la fase acuosa en H₂O destilada.

5.7.2 Desarrollo del método de Folin-Ciocalteu

La metodología que se siguió fue con base a lo previamente descrito por (Jurado et al., 2016). De las muestras de kale previamente preparadas se colocaron 300 µL de cada fracción en 3 viales ámbar, a continuación, se adicionó 450 µL de la solución Folin-Ciocalteu (diluida previamente 1:2 con agua), posterior a esto, se dejó reposar durante 5 minutos. Transcurrido lo anterior se vertieron 450 µL de Na₂CO₃ 7.5 % y adicionalmente se colocaron 1.8 mL de agua destilada, por último, se agitaron las soluciones de las fracciones para almacenarlas en un ambiente sin luz por 30 minutos.

Transcurrido ese tiempo se colocaron 200 µL de solución de cada muestra en una placa de 96 pozo para dar proseguir con la lectura de las absorbancias a 760 nm usando un lector Thermo Scientific™ fotómetro de microplacas Multiskan™ GO.

6.8 Quimioinformática

Para el estudio quimioinformático, a través de una revisión bibliográfica se tomaron los compuestos fenólicos más reportados para el kale: ácido ferúlico ((Ayaz et al., 2008; Biegańska-Marecik et al., 2017; Cartea et al., 2011; Fratianni et al., 2014; Jeon et al., 2018; Kaulmann et al., 2014; Lin & Harnly, 2009; Olsen et al., 2009), ácido clorogénico (Biegańska-Marecik et al., 2017; Fratianni et al., 2014; Jeon et al., 2018; Kaulmann et al., 2014; Mollica et al., 2018), Kaempferol (Biegańska-Marecik et al., 2017; Neugart et al., 2012; Olsen et al., 2010; Schmidt et al., 2010; Zhang et al., 2003), ácido cafeico (Ayaz et al., 2008; Biegańska-Marecik et al., 2017; Lin & Harnly, 2009; Nazzaro et al., 2014; Olsen et al., 2009), quercetina (Biegańska-Marecik et al., 2017; Jeon et al., 2018; Neugart et al., 2012; Schmidt et al., 2010), K-3-O-sinapoyl-sophoroside-7-O-glucosido (Cartea et al., 2011; Fiol et al., 2012; Neugart et al., 2012), ácido gálico (Ayaz et al., 2008; Nazzaro et al., 2014), ácido vainílico (Ayaz et al., 2008; Mollica et al., 2018), ácido p- cumárico (Lin & Harnly, 2009; Mollica et al., 2018). Los

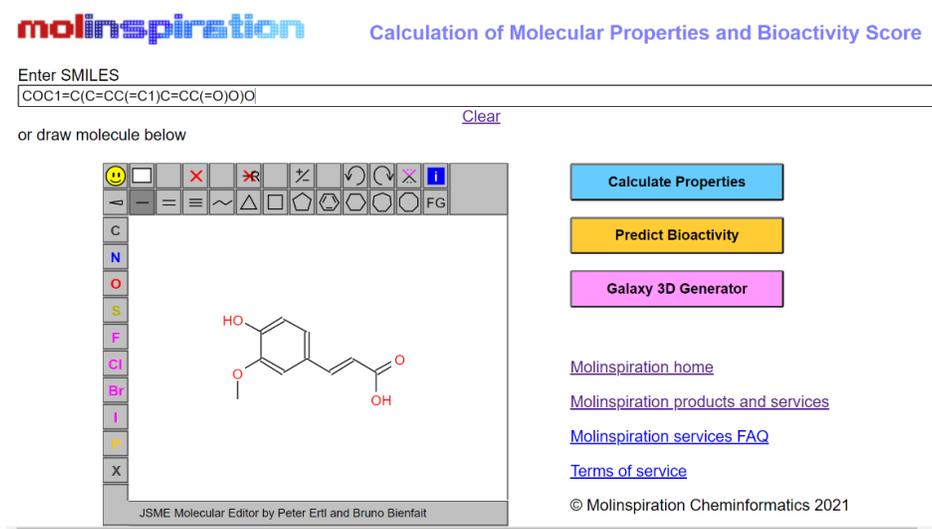


cuales se estudiaron mediante herramientas de software quimioinformático como SwissADME, molinspiration, PreADMET y Pass Online los cuales son de libre acceso.

Primeramente, a través del programa chemdraw se realizaron las estructuras de estos metabolitos secundarios para obtener su código smiles y así poder introducirlo en SwissADME, molinspiration y Pass online, en el caso de PreADMET se obtuvo el código MOL.

6.8.1 Molinspiration

Se seleccionó la herramienta de " *Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score* ". Debido a que se cuenta con los códigos smiles de las moléculas de interés, se introdujeron en la casilla correspondiente, posteriormente se seleccionó " *Calculate properties* ", figura 24. Da inicio al procesamiento del código y la predicción de sus propiedades. Finalmente se recopiló la información de miLogP (Coeficiente de Partición), TPSA (Área Polar Superficial), natoms (Número de Átomos), MW (Peso Molecular), nON (Aceptor Enlace de Hidrógeno), nOHNH (Donador de Enlace de Hidrógeno).



The screenshot shows the Molinspiration web interface. At the top, the logo "molinspiration" is displayed in red and blue, followed by the title "Calculation of Molecular Properties and Bioactivity Score". Below the title, there is a text input field labeled "Enter SMILES" containing the string COC1=C(C(=CC(=C1)C=CC(=O)O)O. To the right of the input field is a "Clear" link. Below the input field, it says "or draw molecule below". A chemical structure editor is shown with a toolbar containing various icons for drawing and editing. The main canvas displays a chemical structure of a substituted benzene ring with a hydroxyl group, a methoxy group, and a propenoic acid side chain. To the right of the editor are three buttons: "Calculate Properties" (blue), "Predict Bioactivity" (yellow), and "Galaxy 3D Generator" (pink). Below the buttons are several links: "Molinspiration home", "Molinspiration products and services", "Molinspiration services FAQ", and "Terms of service". At the bottom right, the copyright notice "© Molinspiration Cheminformatics 2021" is visible.

Figura 24. Caratula del software Molinspiration.



6.8.2 PreADMET

Se seleccionó la herramienta de "ADME prediction" y se introdujeron cada uno de los códigos mol en el área correspondiente, posteriormente se seleccionó "Submit". Se desplegó una serie de resultados, se empleó la información de SKlogP_value donde el LogP es calculado por "SK atomic types", figura 25.

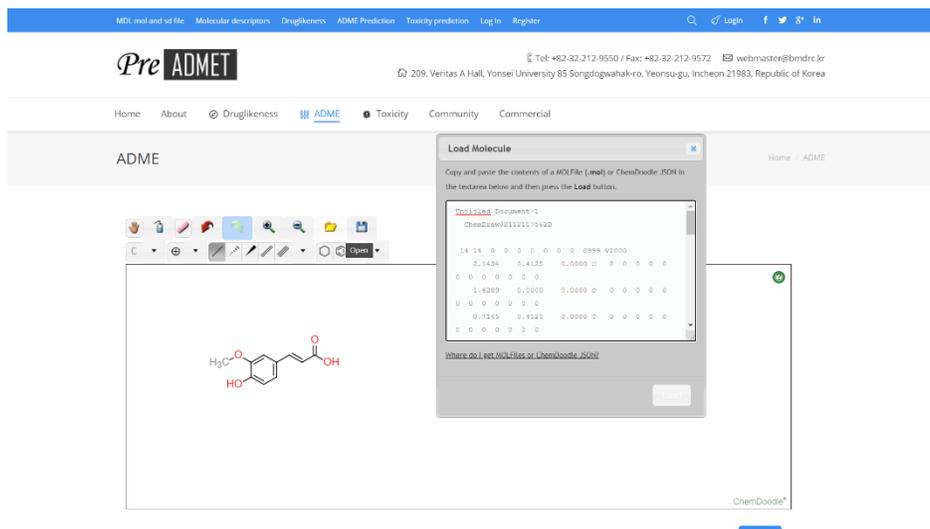


Figura 25. Caratula del software PreADMET.

6.8.3 PassOnline

Se seleccionó "Go for prediction", se inició sesión para poder hacer uso del software. Después se eligió la opción "Predict New Compound" y en seguida "Smiles", en el recuadro con la leyenda "Insert your SMILES here" se colocó cada uno de los códigos; finalmente se seleccionó "Get prediction", lo que dio inicio al procesamiento del código y la predicción de su probabilidad de actividad biológica. Se seleccionaron las actividades antioxidante, quimiopreventivo, eliminador de radicales libres y anticancerígeno con sus respectivos porcentajes de probabilidad de ser activos, figura 26.



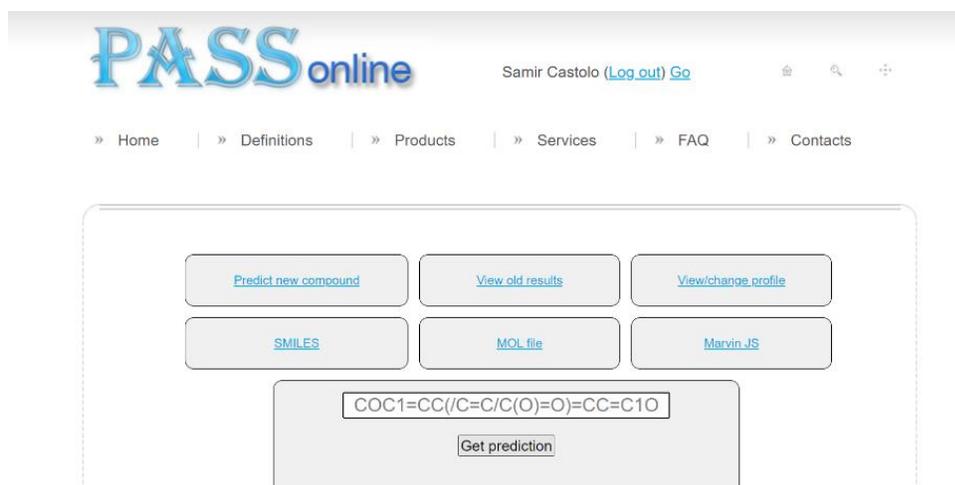


Figura 26. Caratula del software PASSonline.

6.8.4 SwissADME

En el recuadro con la leyenda "Enter a list of SMILES here" se colocó cada uno de los códigos, se seleccionó "run!"; lo que dio inicio al procesamiento del código y al cálculo de sus propiedades. Se despliega una serie de apartados como Physicochemical Properties, Lipophilicity, Water Solubility, Pharmacokinetics, Druglikeness y Medicinal Chemistry, se usó se empleó la información de Log $P_{o/w}$ (MLOGP) localizada en Lipophilicity y TPSA (Topological Polar Surface Area) de la sección Physicochemical Properties, figura 27.

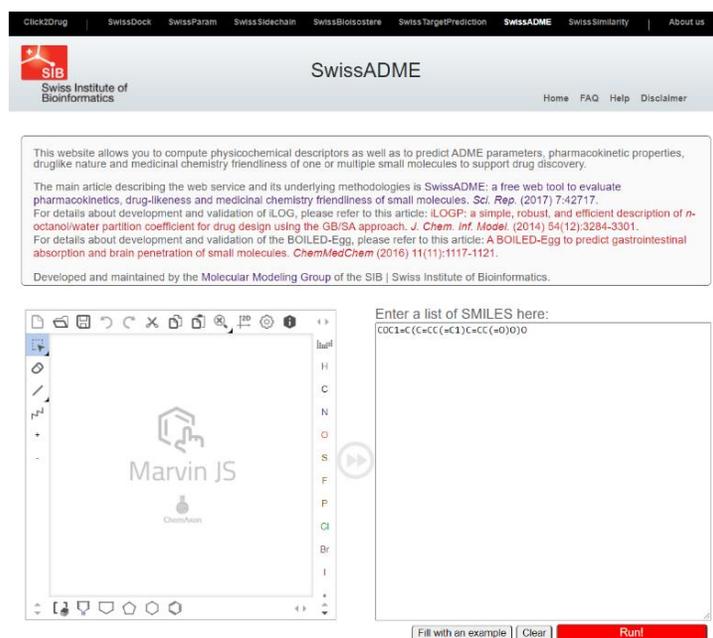


Figura 27. Caratula del software SwissADME.



7. Resultados y discusión

Los resultados presentados en ésta sección han derivado del cultivo y cosecha del vegetal kale a condiciones de invernadero, la maceración metanólica del kale seco, su evaluación de citotoxicidad mediante la prueba de MTS, la bipartición del extracto MeOH (Hexano, AcOEt: DCM, acuoso) junto con el fraccionamiento primario de la fase hexánica con sus pruebas en cromatografía en capa fina (CCF) y la prueba de Folin–Ciocalteu para la determinación de polifenoles totales de las fases resultantes de la bipartición y la aplicación de recursos quimioinformáticos para la predicción de actividad biológica de once compuestos fenólicos más reportados en la literatura para el vegetal de interés, ver figura 28.

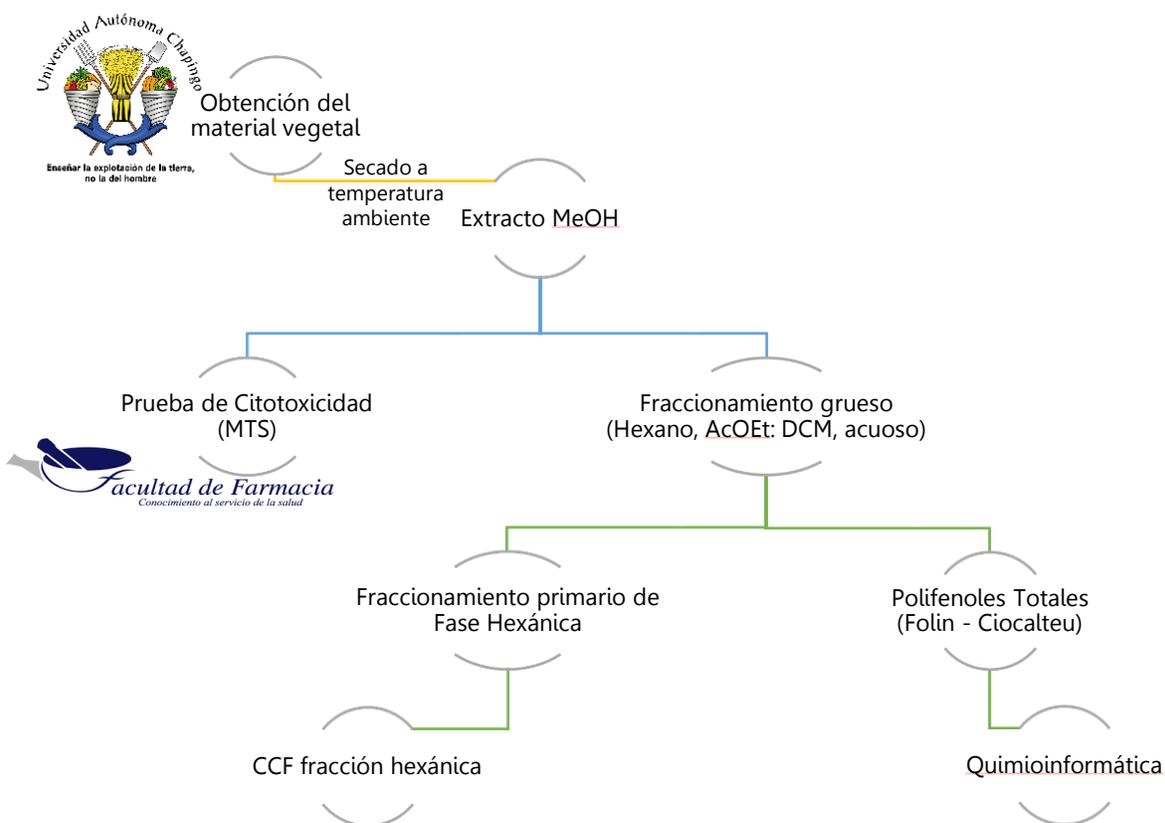


Figura 28. Diagrama general de la metodología.



7.1 Preparación material vegetal

Como se mencionó en la sección 6.2, debido a que las hojas de kale secas presentaron diferente coloración (verde, café y morada), se hicieron pruebas en CCF a diferentes sistemas, figura 29. Los resultados nos indicaron que aparentemente no hay diferencia entre los tres tipos de extractos, por lo que se decidió en reunir los tres extractos

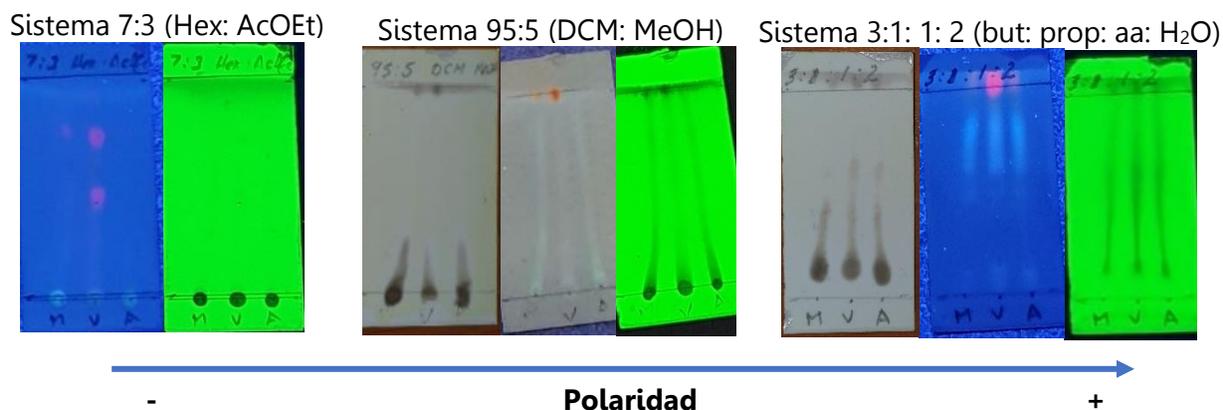


Figura 29. Placas de cromatografía de capa fina de la maceración de hoja de kale morada (M), hoja de kale verde (V) y hoja de kale amarilla (A), en tres diferentes sistemas de polaridad creciente: sistema 7:3 (Hex: AcOEt), sistema 95:5 (DCM: MeOH), sistema 3:1: 1: 2 (but: prop: aa: H₂O).

7.2 Rendimiento del extracto y fracciones del vegetal kale

En la siguiente tabla, se describen los porcentajes de rendimientos del extracto metanólico de kale (40.8 % respecto al material seco). Posteriormente se llevó a cabo una bipartición del extracto como se indicó en la sección de materiales y método, en la Fig. 11. Los rendimientos obtenidos de la bipartición fueron fase de hexano (1.02 %), fase orgánica (0.51 %) y el de mayor rendimiento la fase acuosa (32.59 %) como se muestran en la misma tabla 12.

Tabla 12. Rendimientos de kale.

	Material vegetal		Extracto MeOH	Fracción (fase)		
	fresco	seco		Hexano	Orgánica	Acuosa
	7062.6 g	822.0 g	335.4 g	8.4 g	4.2 g	267.9 g
% respecto a Material Fresco	-	11.3 %	4.7 %	0.118 %	0.059 %	3.79 %
% respecto a Material Seco	-	-	40.8 %	1.02 %	0.51 %	32.59 %



7.3 Prueba de citotoxicidad del extracto

El ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico del kale se llevó a cabo mediante el método de MTS a una sola concentración de 100 µg / mL en DMSO en las líneas celulares Hep3b (Hígado), PC3 (Próstata) y HeLa (Cervicouterino). Los resultados de este ensayo, tabla 13, indicaron que el extracto no mostró actividad antiproliferativa en ninguna de las líneas celulares, la más sensible fue en PC3. Por lo que se recomienda llevar este ensayo a otras concentraciones o determinar su Cl_{50} .

Tabla 13. Resultados de la viabilidad celular en líneas cancerosas de hepático, próstata y cervicouterino.

Línea celular	% Viabilidad ±	% Inhibición
Hep3b	100.53 ± 3.85	- 0.53
PC3	98.08 ± 2.56	1.92
Hela	109.57 ± 7.00	- 9.57

*Método MTS, resultados por triplicado a 100 µg / mL en DMSO, control positivo Taxol (HeLa Cl_{50} 5.6 nm, Hep3B Cl_{50} 38.6 nm, PC3 Cl_{50} 12 nm).

7.4 Fraccionamiento primario de la fase hexánica

Como parte del procedimiento, se fraccionó la fase hexánica (8.4 g) por medio de cromatografía en columna (sección 5.3). El aspecto de las fracciones iba desde un amarillo anaranjado hasta un verde oscuro, en cuanto a consistencia algunas fracciones fueron aceitosas, otras líquidas y una viscosa (Frac. 2). Se realizó pruebas en CCF para averiguar si cada fracción presentaba similitudes aparentes posterior a la variabilidad de polaridad del sistema que se usó y así poder reunir fracciones con contenido similar, figura 30.

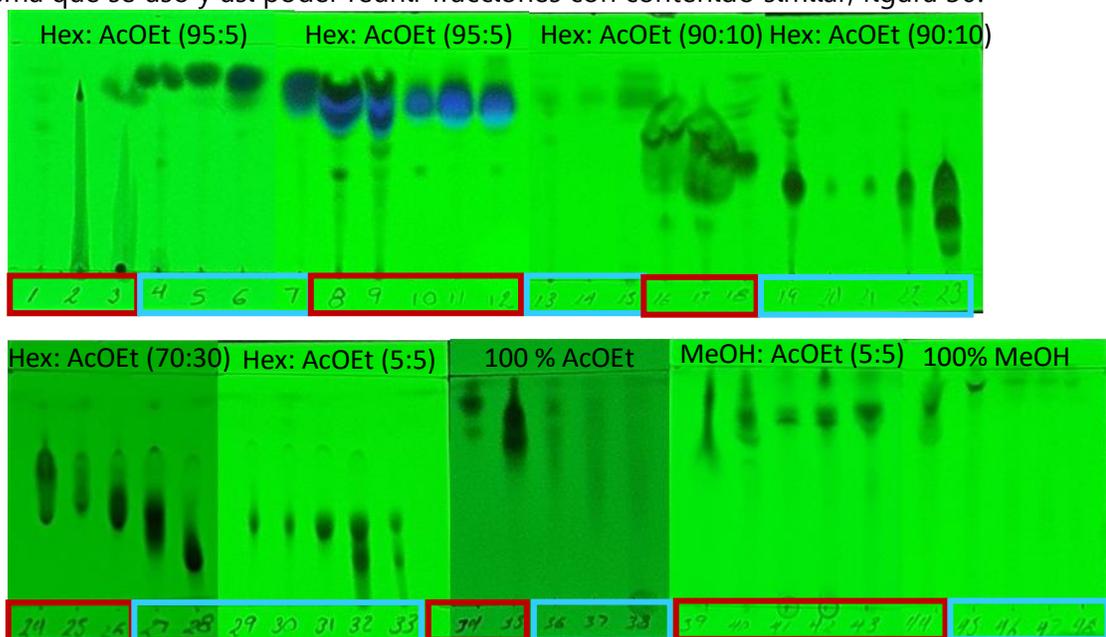


Figura 30. Placas de CCF (reveladas en uv) de las fracciones de la columna No. 1 en sistemas de polaridad diferentes, se han marcado las reuniones de acuerdo con la similitud aparente observada.



De acuerdo con las características observadas en CCF de cada fracción se pueden agrupar en 12 reuniones. Así mismo, se evidenció la presencia de al menos 5 compuestos que revelan en UV de grupos cromóforos, dichas características pueden indicar la presencia de compuestos fenólicos. Queda como perspectiva la purificación de las reuniones.

7.5 Detección de Polifenoles totales: Método de Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton) para las muestras del extracto de kale, fase hexánica, fase orgánica y fase acuosa. De manera general este método colorimétrico se basa en una reacción oxidoreducción como se muestra en la figura 31.

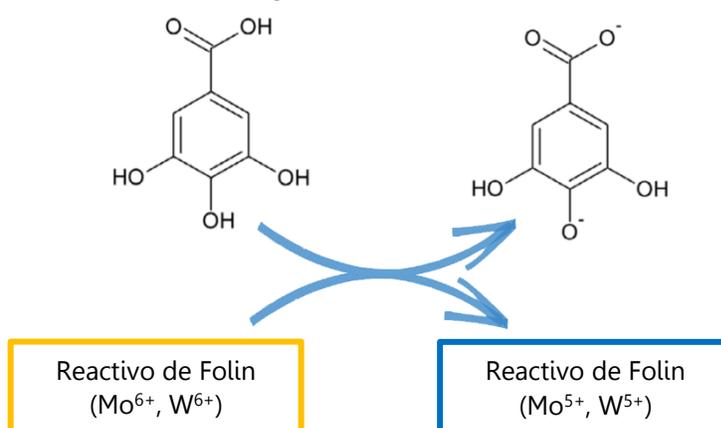


Figura 31. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

7.5.1 Resultados de curva de calibración de ácido gálico

Primeramente, se llevó a cabo una curva de calibración de ácido gálico a concentraciones de 100, 75, 50, 25, 10 y 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$, en la figura 32 se observan las absorbancias para la curva de calibración obtenidas de la lectura del espectrofotómetro a 760 nm y la curva de calibración, a partir de ella se obtuvo la ecuación de la recta $y = 0.0041x + 0.0423$ con una $R^2 = 0.9965$, la cual contribuyó a obtener los datos necesarios para la concentración de ácido gálico en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada una de las fases.



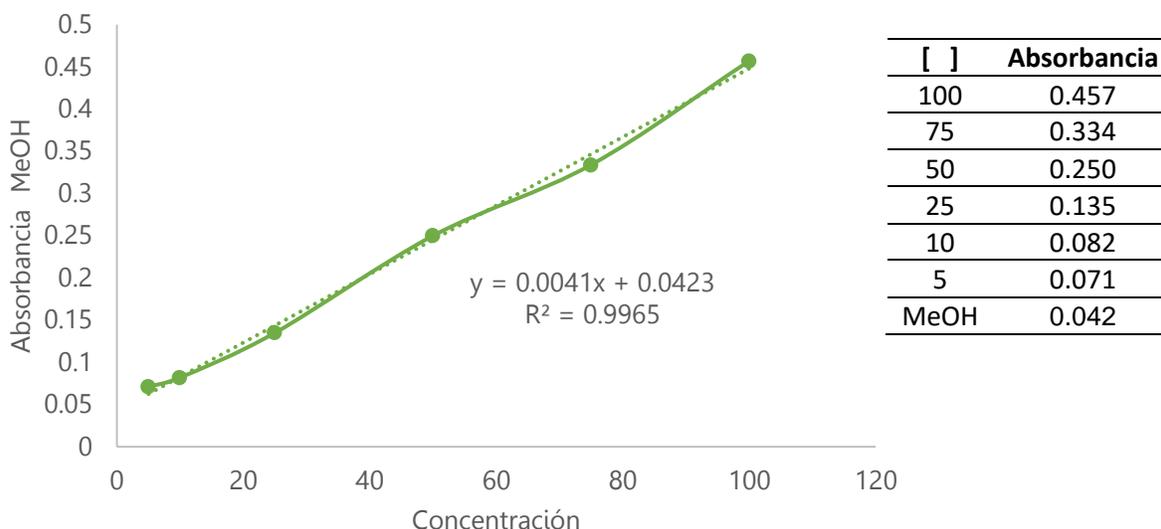


Figura 32. Absorbancia de curva de calibración para el ensayo de Folin-Ciocalteu con ácido gálico como patrón.

7.5.2 Resultado de polifenoles totales de las fracciones del extracto metanólico

Una vez obtenida la curva de calibración se determinó el contenido total de polifenoles de la fase hexánica, orgánica y acuosa del extracto metanólico de kale descrito en la sección 5.4, a una concentración de 1 mg/mL. En primera instancia se pudo observar una ligera tinción azul en los pozos A 10-12 (figura 33), señal que hay presencia de polifenoles.

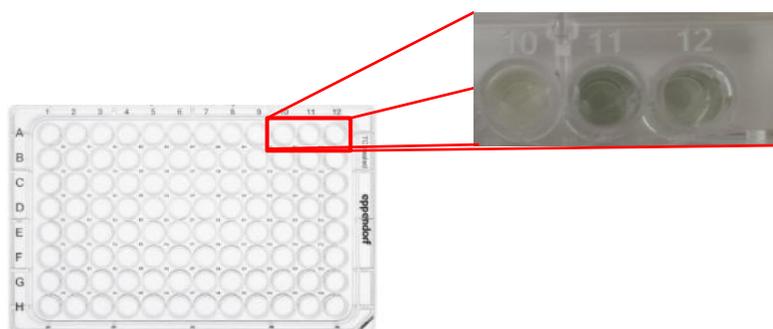


Figura 33. Muestras de la fracción hexánica (A10), fracción orgánica (A11) y fracción acuosa (A12) tras la reacción con el reactivo de folin-ciocalteu en microplaca de 96 pozos.

En la tabla 14 se muestran las equivalencias entre la absorbancia promedio de las muestras y la concentración del ácido gálico, así como el contenido total de fenoles. Donde podemos observar que la fase hexánica contiene 2.64 mg Eq. Ác. Gálico, la fase orgánica 5.78 mg Eq. Ác. Gálico/g y la fase acuosa orgánica 3.77 mg Eq. Ác. Gálico/g. Siendo la fase orgánica la de mayor concentración en contraste a la fase hexánica, figura 34.



Tabla 14. Resultados de polifenoles totales de las fracciones de kale.

kale	Absorbancia	Concentración de Ác. Gálico		Fenoles totales
		µg/mL	mg/mL	mg Eq. Ác. Gálico/g (mg EAG/g)
fase hexánica	0.151 ± 0.006	26.43	0.026	2.64
fase orgánica	0.279 ± 0.021	57.81	0.058	5.78
fase acuosa	0.197 ± 0.005	37.73	0.038	3.77

*la concentración de las muestras fue de 1mg/mL

*Los experimentos se realizaron por triplicado

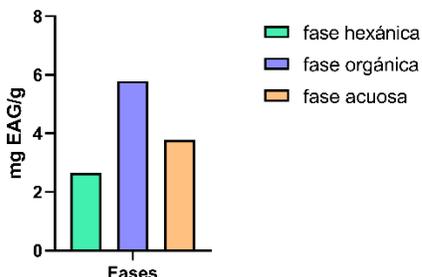


Figura 34. Polifenoles totales fracciones hexánica, orgánica y acuosa de kale seco.

De acuerdo con la tesis de licenciatura de América Montiel, (Montiel et. al., 2020) muestra que el extracto metanólico del kale seco contiene una cantidad considerable de polifenoles (13.64 mg EAG/g) totales, así como el kale fresco (12.16 mg EAG/g), bagazo de kale (81.12 mg EAG/g y el jugo de kale (10.68 mg EAG/g). Dichos resultados motivaron a llevar a cabo de análisis de polifenoles totales en las fases antes

mencionadas. Remarcando que éste tipo de compuestos poseen una relevancia importante de acuerdo a diversos estudios biológicos que muestran propiedades antioxidantes y antiinflamatorias derivando así en posibles efectos preventivos y/o terapéuticos para enfermedades como el cáncer, (Pandey & Rizvi, 2009).

Al hacer un análisis con lo ya reportado en la literatura para el contenido de polifenoles totales en el kale, se encontró de manera general desde 1.45 a 13.65 mg EAG/g para kale, lo cual entra del rango de lo encontrado en cada fracción de nuestro estudio (tabla 15).

Centrando nuestra atención a los resultados expuestos por (Sikora & Bodziarczyk, 2012), (Castillo et. al. 2020) y (Becerra-Moreno et al., 2014) los cuales se han hecho en tratamiento similar al presente proyecto (extracto metanólico). Los resultados expuestos por Sikora (5.75 mg EAG/g) y Becerra-Moreno (0.42 y 0.62 mg EAG/g) apreciamos que el contenido de polifenoles varia un 92%, sin embargo, cuando se contraponen con los resultados presentados por Montiel (13. 65 mg EAG/g) vemos que hay una considerable diferencia de contenido polifenólico, esto lo podemos atribuir al tratamiento que se le dio al vegetal previo a su maceración, donde si consideramos la sumatoria de nuestros resultados de las tres fases usadas para la prueba de Folin-Ciocalteu tenemos un total de 12.19 mg EAG/g, el



cual a groso modo es similar a lo reportado por Montiel en su tesis para el extracto metanólico de kale seco (13.64 mg EAG/g), figura 35.

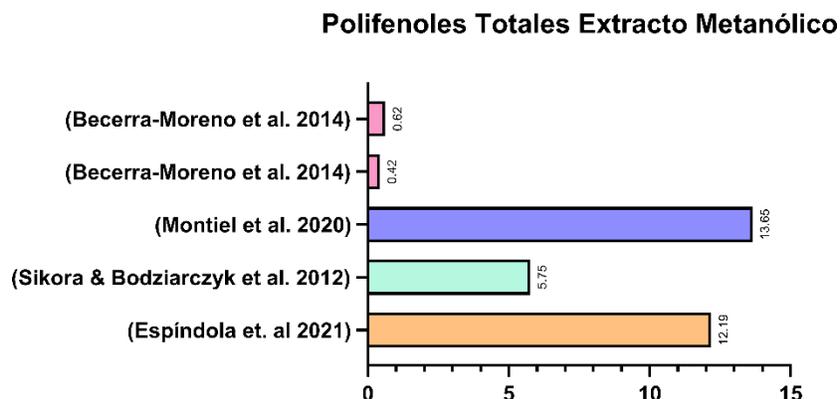
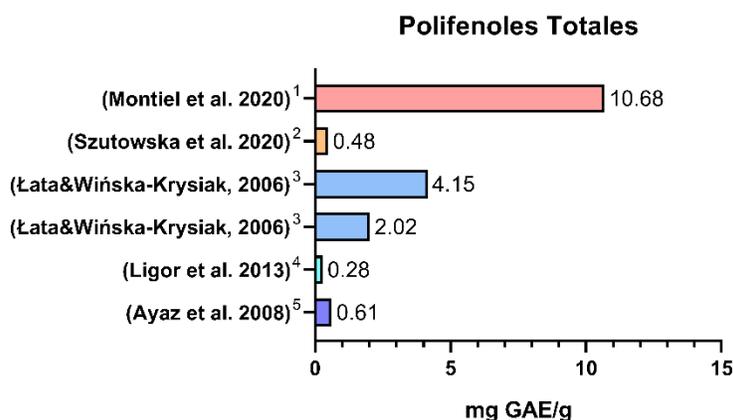


Figura 35. Polifenoles totales Extracto Metanólico reportados en la literatura.

Haciendo un contraste con los resultados de los autores Castillo, Szutowska, Łata & Wińska-Krysiak, Ligor y Ayaz, figura 36, han empleado tratamientos diferentes donde el contenido polifenólico total lo posee el extracto de jugo de Montiel con 10.68 mg GAE/g y la menor concentración la tiene la muestra de Ligor con 0.28 mg GAE/g. Podemos observar que el contenido de polifenoles puede verse influido por las condiciones del tratamiento que se le dé al material vegetal.



1. Jugo, 2. Fermentación 3. Congelación en N₂, extracción en una mezcla de MeOH, ác. fórmico y H₂O (10: 1.5: 48.5)
3. Extracción con CO₂, 4. Congelación en N₂ y por extracción Soxhlet

Figura 36. Polifenoles totales acorde a diferentes tipos de tratamiento al vegetal.



Tabla 15. Contenido de polifenoles totales reportados para Kale en la literatura.

Nombre	Tratamiento del vegetal	Fenoles totales		Referencia	
		Unidades reportadas	$\frac{mg\ GAE}{g}$		
Khanyari Hakh		$206 \frac{mg}{100\ g}$	2.06	(Murtaza et al., 2005)	
G M Dari	Extracto etanólico	$145 \frac{mg}{100\ g}$	1.45		
Kawdari		$179 \frac{mg}{100\ g}$	1.79		
Redbor kale	Extracto EtOH:H ₂ O (80:20) a reflujo	$414 \frac{mg}{100\ g}$	4.14	(Korus, 2011)	
Winterbor kale		$315 \frac{mg}{100\ g}$	3.15		
Kale	Extracción con CO ₂	$0.285 \pm 0.019 \frac{mg\ GAE}{g}$	0.28	(Ligor et al., 2013)	
Redbor F1	Congelación en N ₂ , extracción en una mezcla de MeOH, ác. fórmico y H ₂ O (10: 1.5: 48.5)	$4150 \frac{\mu g}{g}$	4.15	(Łata & Wińska-Krysiak, 2006)	
Winterbor F1 kale		$2021 \frac{\mu g}{g}$	2.02		
Winterbor kale	Extracto metanólico kale crudo	$574.95 \pm 90.35 \frac{mg}{100\ g}$	5.75	(Sikora & Bodziarczyk, 2012)	
Kale	Extracto metanólico kale seco	$13.65 \frac{mg\ GAE}{g}$	13.65	(Montiel et. al. 2020)	
Kale	Fresco	$12.16 \frac{mg\ GAE}{g}$	12.16		
Winterbor	Extracto metanólico	$610.3 \pm 18.4 \frac{mg}{kg}$	0.61	(Becerra-Moreno et al., 2014)	
Maribor	Extracto metanólico	$419.8 \pm 27.8 \frac{mg}{kg}$	0.42		
kale	Congelación en N ₂ y por extracción Soxhlet	1366 ng/g	0.14	(Ayaz et al., 2008)	
kale (semilla)		6057	0.61		
Kale rizada	Jugo	$48 \pm 1.2 \frac{mg\ GAE}{100\ mL}$	0.48	(Szutowska et al., 2020)	
	Fermentación	2	$101 \pm 1.8 \frac{mg\ GAE}{100\ mL}$		1.01
		8	$116 \pm 1.0 \frac{mg\ GAE}{100\ mL}$		1.16
	2da semana almacén	$105 \pm 1.9 \frac{mg\ GAE}{100\ mL}$	1.05		
Apulian kale	Extracto liofilizado en metanol: agua: ácido clorhídrico (70: 29,5: 0,5)	$3.7 \pm 0.2 \frac{mg\ GAE}{g}$	3.7	(Lotti et al., 2018)	
Col rizada	Extracto acuoso	$73 \frac{mg\ GAE}{L}$	-	(Reyes-Munguía et al., 2017)	
Kale	Kale cruda	$3.01 \frac{mg}{kg}$	0.003	(Yang et al., 2018)	

*Se hizo la conversión de la concentración de fenoles totales reportados en la literatura a mg Eq. Ác. Gálico/g

**Promedio



7.6 Quimioinformática

Debido a la presencia de polifenoles en 3 muestras de kale determinado por el método de Folin y lo visto en CCF. Se realizó una búsqueda bibliográfica de los compuestos fenólicos con mayor reporte para *Brassica oleracea var. sabellica* y se seleccionaron 12 compuestos fenólicos para llevar a cabo estudios de quimioinformática, descritos a continuación: ácido ferúlico (**A**), ácido clorogénico (**B**), kaempferol (**C**), ácido caféico (**D**), kaempferol-3-O-sinapoyl-soforosido-7-O-glucosido (**E**), quercetina (**F**), ácido gálico (**G**), ácido vainílico (**H**), ácido gálico (**I**), epicatequina (**J**), ácido *p*-cumárico (**K**), kaempferol-3-O-hidroxi-feruloil-soforosido-7-O-glucosido (**L**).

Primeramente, se obtuvieron los códigos Smiles mediante Chemdraw, descritos en la tabla 16.

Tabla 16. Códigos Smiles generados de chemdraw de los compuestos polifenólicos reportados en kale

	Código Smiles
A	<chem>COc1cc(C=CC(=O)O)ccc1O</chem>
B	<chem>O[C@H]1[C@@H](O)[C@H](OC/C=C/C2=CC(O)=C(O)C=C2=O)C[C@](O)(C(O)=O)C1</chem>
C	<chem>OC1=C(C2=CC=C(O)C=C2)OC3=C(C(O)=CC(O)=C3)C1=O</chem>
D	<chem>OC1=CC/C=C/C(O)=O=CC=C1O</chem>
E	<chem>O=C1C(O[C@H]2O[C@H](COC/C=C/C3=CC(OC)=C(O)C(OC)=C3=O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@@H]4O[C@@H](CO)[C@H](O)[C@@H](O)C4)=C(C5=CC=C(O)C=C5)OC6=C1C(O)=CC(O[C@@H]7O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]7O)=C6</chem>
F	<chem>OC1=C(C2=CC=C(O)C(O)=C2)OC3=C(C(O)=CC(O)=C3)C1=O</chem>
G	<chem>OC(=O)C1=CC(O)=C(O)C(O)=C1</chem>
H	<chem>COC1=CC(C(O)=O)=CC=C1O</chem>
I	<chem>OC1=CC=CC=C1C(O)=O</chem>
J	<chem>OC1[C@@H](C2=CC=C(O)C(O)=C2)OC3=C(C(O)=CC(O)=C3)C1</chem>
K	<chem>O=C(O)/C=C/C1=CC=C(O)C=C1</chem>
L	<chem>O=C1C(O[C@H]2O[C@H](COC/C=C/C3=CC(OC)=C(O)C(OC)=C3=O)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]2O)[C@@H]4O[C@@H](CO)[C@H](O)[C@@H](O)C4)=C(C5=CC=C(O)C=C5)OC6=C1C(O)=CC(O[C@@H]7O[C@H](CO)[C@@H](O)[C@H](O)[C@H]7O)=C6</chem>

A.- Ácido ferúlico, B.- Ácido clorogénico, C.- Kaempferol, D.- Ácido cafeico, E.- Ka-3-O-sin-soph-7-O-glc, F.- Quercetina, G.- Ácido gálico, H.- Ácido vainílico, I.- Ácido salicílico, J.- Epicatequina, K.- Ácido *p*-cumárico, L.- Ka-3-O-hfer-soph-7-O-glc



7.6.1 Propiedades moleculares vía MIPC, SwissADME y preADMET

Para predecir las propiedades moleculares y posible actividad biológica de los compuestos (A-L) se emplearon los softwares quimioinformáticos: SwissADME, molinspiration, PreADMET y Pass Online; estos hacen un procesamiento de datos que permite estudiar la relación entre la estructura química, las propiedades químicas y la actividad molecular.

Los 12 compuestos fenólicos se sometieron a un análisis en los programas MIPC (Molinspiration Property Calculator), SwissADME y PreADMET, calculando los valores de logP, número de átomos (No. A.), aceptor y donador de enlace de hidrógeno (A.E.H. y D.E.H), área polar superficial (TPSA) y peso molecular (PM); ver tabla 17.

Tabla 17. Comparación de las propiedades moleculares de compuestos polifenólicos de *Brassica oleracea* mediante software quimioinformático, molinspiration (amarillo), SwissADME (verde), PreADMET (azul).

	PM	Clog P			No. A	A.E.H.	D.E.H	PSA	
A	194.18	1.25	1.62	1.96	14	4	2	66.76	66.76
B	354.31	0.45	0.87	0.36	25	9	6	164.74	164.75
C	286.24	2.17	1.70	1.62	21	6	4	111.12	111.13
D	180.16	0.94	0.97	1.82	13	4	3	77.75	77.76
E	962.85	-0.47	-5.15	-1.51	68	24	12	97.98	373.11
F	302.24	1.68	-0.56	1.72	22	7	5	131.5	131.36
G	170.12	0.59	-0.16	1.38	12	5	4	97.98	97.99
H	168.15	1.19	0.74	1.51	12	4	2	66.76	66.76
I	138.12	1.87	0.99	1.51	10	3	2	57.53	57.53
J	290.27	1.37	0.24	1.84	21	6	5	110.37	110.38
K	164.16	1.43	1.28	1.72	12	3	2	57.53	57.53
L	948.83	-1.19	-1.84	-1.66	67	24	13	384.12	384.11

No. A.: Número de átomos, A.E.H.: Aceptor de Enlace de Hidrógeno, D.E.H.: Donador de Enlace de Hidrógeno, PSA: Área polar superficial. A.- Ácido ferúlico, B.- Ácido clorogénico, C.- Kaempferol, D.- Ácido cafeico, E.- Ka-3-O-sin-soph-7-O-glc, F.- Quercetina, G.- Ácido gálico, H.- Ácido vainillíco, I.- Ácido salicílico, J.- Epicatequina, K.- Ácido p-cumárico, L.- Ka-3-O-hfer-soph-7-O-glc



En dicha tabla se muestra el coeficiente de partición (clogP) que está relacionado con la hidrofobicidad (lipofilicidad), la cual es un aspecto relevante para el desarrollo de fármacos, debido a la relación directa que presenta con la habilidad para atravesar membranas biológicas, permitiendo así el acceso al sitio de acción al contribuir en la unión entre ligando y receptor y así generar un efecto biológico (terapéutico o tóxico), cabe señalar que para distinguir los valores de log P calculados de los experimentales, los primeros se denominan valores de clog P.



De acuerdo con la literatura, los valores de logP junto con TPSA en su conjunto muestran estar estrechamente ligados a la toxicidad de un compuesto como se muestra en la tabla 18.

Tabla 18. Probabilidades observadas de toxicidad frente a clogP/TPSA, tomado de (Edwards & Price, 2010)

Toxicidad	Muestra total		Fármaco libre	
	TPSA > 75	TPSA < 75	TPSA > 75	TPSA < 75
clog < 3	0.39	1.08	0.38	0.5
clog > 3	0,41	2.4	0.81	2.59

7.6.1.1 Propiedades moleculares: ácidos cinámicos.

En este análisis se contemplaron los ácidos cinámicos (**A, B, D, K**). En la figura 37, se muestra los derivados de ácido cinámico y sus propiedades de clogP, TPSA, A.E.H y D.E.H con rangos entre 0.45-1.60, 57.53-1.64 Å², 3-9 y 2-6, respectivamente.

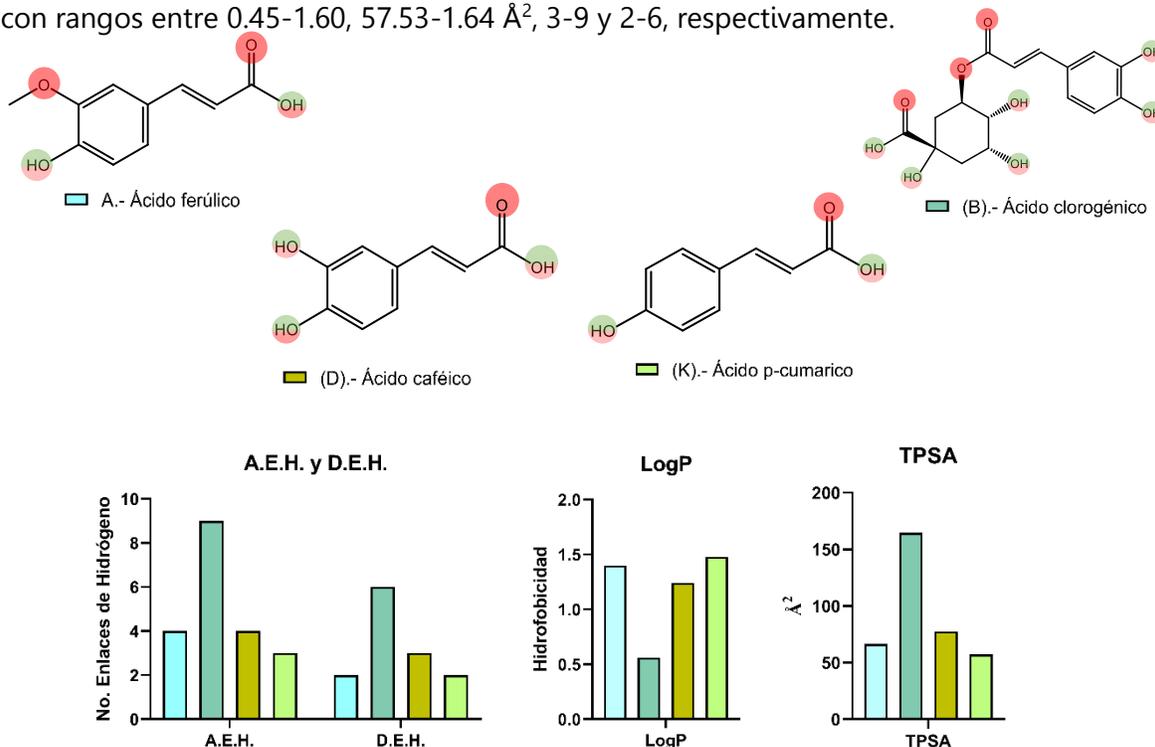


Figura 37. Comparación de las propiedades moleculares de ácidos cinámicos de *Brassica oleracea* mediante software quimioinformático



El ácido clorogénico (**B**) es el que mayor área polar superficial topológica posee (164.75 Å²) lo que implica una pobre absorción en las membranas, tomando en consideración que tiene un coeficiente de partición (logP) bajo y un TPSA alto, además tiene una poca probabilidad de ser tóxico; el parámetro TPSA es muy útil para la predicción de la absorción y se basa en la suma de las contribuciones de superficie tabuladas de fragmentos polares 2D, (Giulia & Giuseppe, 2016).

En el caso del ácido ferúlico (**A**), ácido caféico (**D**) y ácido *p*-cumárico (**K**) sus valores de TPSA, (66.76, 77.75, 57.53, respectivamente) les permite tener una buena absorción lo que implica una biodisponibilidad óptima en el cuerpo, sin embargo, en combinación con un logP bajo los hace propensos a ser tóxicos. En contraste de los datos TPSA de **A** y **D**, éste último posee un hidroxilo en vez del metoxilo y esto se ve reflejado en su diferencia de TPSA que es de 10 Å² por la contribución que éste aporta.

La probabilidad observada de toxicidad frente a clogP/TPSA para **B** y **D** es mínima al estar sus valores dentro de los parámetros para la concentración de Muestra total y fármaco libre, sin embargo, para **A** y **K** no presenta riesgo en concentración de fármaco libre pero si hay riesgo de ser tóxicos para muestra total.

7.6.1.2 Propiedades moleculares: ácidos benzoicos

Se analizaron las propiedades moleculares (cLogP, TPSA, A.E.H y D.E.H) de los compuestos fenólicos con esqueletos de ácido benzoico: ácido gálico (**G**), ácido vainillico (**H**) y ácido salicílico (**I**). En la figura 38, apreciamos que el área polar superficial topológica

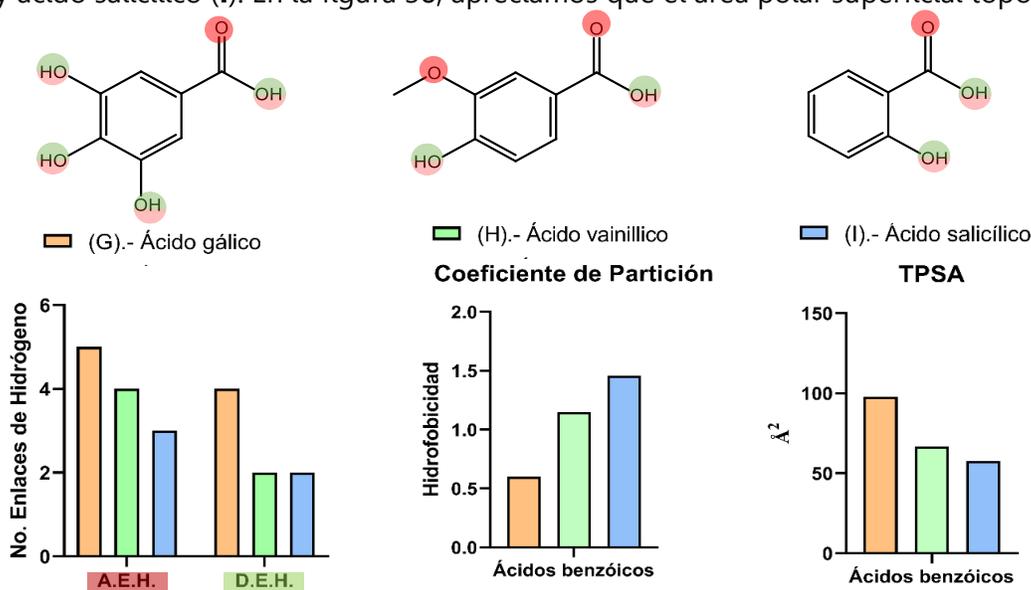


Figura 38. Comparación de las propiedades moleculares de ácidos benzoicos de *Brassica oleracea* mediante software quimioinformático



para **H** e **I** tienen poca diferencia de polaridad (66.8 \AA^2 y 57.5 \AA^2), sin embargo, se puede apreciar que entre los compuestos **G** y **H** a pesar de tener el mismo número de átomos el primero de ellos posee tres hidroxilo por lo que el área de superficie se ve beneficiada por el aporte del oxígeno e hidrógeno unidos a éste que en el **H** se reduce a un grupo metoxilo. En su contraparte, el valor de log P para **I** (1.46) y **H** (1.15) son ligeramente menos hidrofílicos que el compuesto **G** (0.60).

Los valores que poseen los compuestos **G**, **H** e **I** de TPSA son $\leq 140 \text{ \AA}^2$ por lo que su absorción oral será óptima. **G** al tener un valor de TPSA $> 75 \text{ \AA}^2$ y un logP < 3 no presenta una probabilidad de ser tóxico a concentraciones de 10 \mu M y 1 \mu M , al contrario que **H** e **I** donde sus valores de TPSA $< 75 \text{ \AA}^2$ y un logP < 3 a una concentración de 10 \mu M tienden a ser tóxicos.

7.6.1.2 Propiedades moleculares: flavonoides.

Se hizo el mismo análisis de propiedades moleculares como en secciones anteriores con los compuestos flavonoides: kaempferol (**C**), quercetina (**F**), epicatequina (**J**), (figura 39) y los flavonoides glucosilados: Kaempferol-3-O-sinapoyl-soforosido-7-O-glucosido (**E**) y

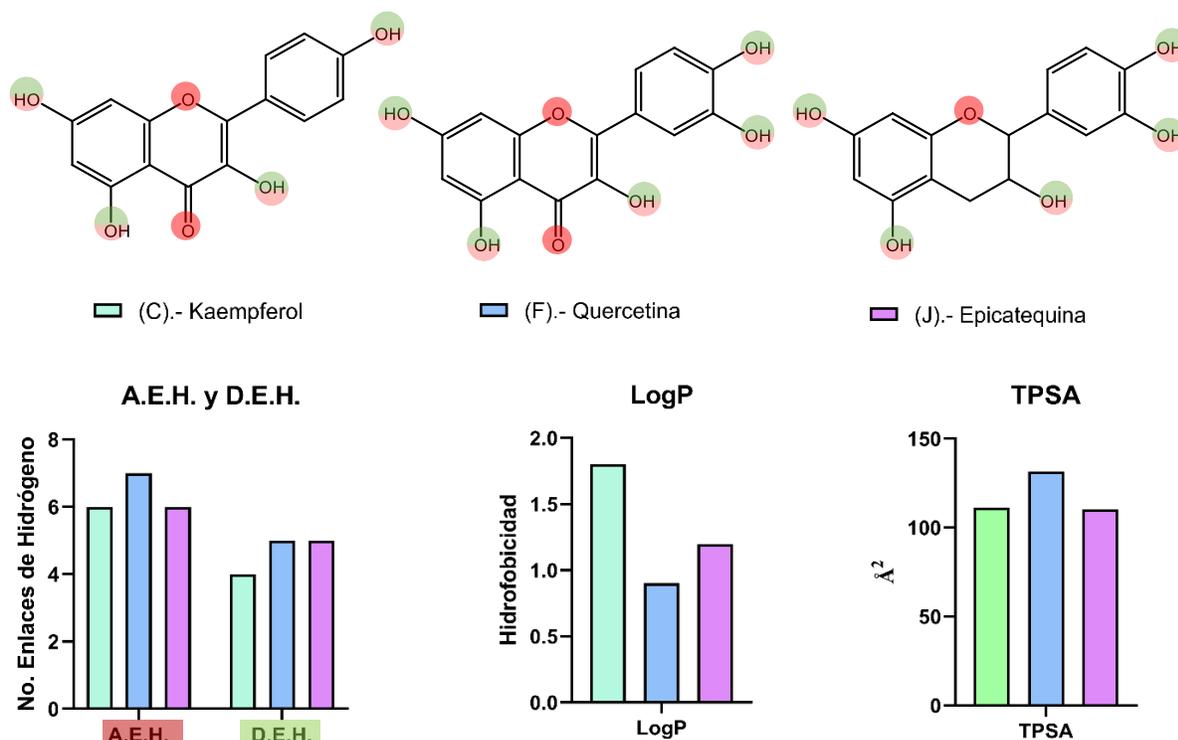


Figura 39. Comparación de las propiedades moleculares de compuestos fenólicos de *Brassica oleracea* mediante software quimioinformático



kaempferol-3-O-hidroxiferuloil-soforosido-7-O-glucosido (**L**), figura 40. El rango de TPSA para los flavonoides oscila en 110 Å² -131.4 Å², el coeficiente de partición en 0.95 – 1.83, para A.E.H. 6-7 y D.E.H. 4-5.

Los valores de TPSA de **C** y **F** son de 111.12 Å² y 131.4 Å², respectivamente, estos no difieren mucho ya que estructuralmente son idénticos destacando la diferencia en la presencia del grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo B de **F**, que da un valor agregado al TPSA. Para los

En su contraparte, los compuestos **C** y **J** tienen valores semejantes con 111.12 Å² y 110.37 Å² respectivamente, valores que les permite tener una absorción adecuada por el intestino delgado y, en consecuencia, tienen una biodisponibilidad buena.

El riesgo de toxicidad para los fenoles **C**, **F**, **J** es bajo a una concentración de 10 µM y 1 µM, ya que los valores obtenidos de los parámetros de TPSA y logP se encuentran dentro de los índices de referencia con un TPSA > 75 Å² y un logP < 3.

Los valores de logP para **F** y **J** son similares, por lo que su hidrofiliicidad teórica puede verse favorecida y reflejada en una comparación de las propiedades moleculares de compuestos fenólicos de *Brassica oleracea* mediante software quimioinformático.

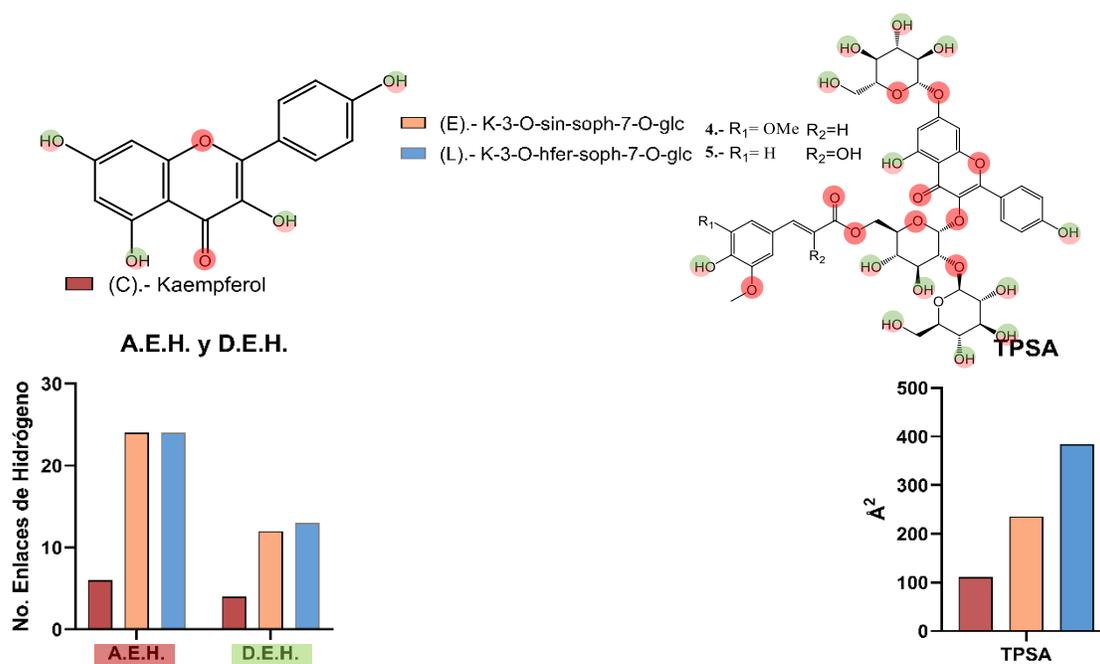


Figura 40. Comparación de las propiedades moleculares del kaempferol y derivados glucosilados mediante software quimioinformático



El valor de TPSA del compuesto **C** (111.12 Å²) es bajo, en comparación a la de sus homologos glucosilados **E** (235.5 Å²) y **L** (384.1 Å²), considerando esta elevación por el aporte polar de los grupos hidroxilo. En el caso del coeficiente de partición, los valores son negativos (**E**: -2.81; **L**: -1.56) de acuerdo a los programas empleados, lo que indicaría una alta hidrofobicidad a lado del compuesto no glucosilado **C** (1.83).

La probabilidad de ser toxicos de acuerdo a la relación de TPSA y clogP muestra que tienen una tendencia a no presentar toxicidad al estar sus valores dentro los parametros TPSA > 75 Å² y un logP < 3.

7.6.2 Actividad biológica *in silico* PASSonline

Mediante el empleo del programa informático PASSonline, se sometieron a la estimación de perfil probable de actividad biológica los 12 compuestos fenólicos: Ácido ferúlico (**A**), Ácido clorogénico (**B**), Kaempferol (**C**), Ácido cafeico (**D**), Kaempferol-3-O-sinapoyl-soforosido-7-O-glucosido (**E**), Quercetina (**F**), Ácido gálico (**G**), Ácido vainillico (**H**), Ácido salicílico (**I**), Epicatequina (**J**), Ácido *p*-cumárico (**K**), Kaempferol-3-O-hidroxiferuloil-soforosido-7-O-glucosido (**L**); para la actividad anticancerígena, quimiopreventivo, antioxidante, eliminador de radicales.

En la tabla 19, se muestran las probabilidades tanto de poseer o no las actividades previamente mencionadas para los compuestos fenólicos empleados en este software.



Tabla 19. Predicción de actividad biológica en PASSonline de los 12 compuestos fenólicos

	Anticancerígeno		Antioxidante		Eliminador de radicales libres		Quimiopreventivo	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
A	0.616	0.012	0.540	0.005	0.731	0.004	0.644	0.008
B	0.846	0.004	0.785	0.004	0.856	0.002	0.833	0.003
C	0.715	0.008	0.856	0.003	0.771	0.003	0.669	0.008
D	0.571	0.014	0.603	0.005	0.647	0.005	0.551	0.012
E	0.973	0.001	0.756	0.004	0.981	0.001	0.990	0.001
F	0.757	0.007	0.872	0.003	0.811	0.003	0.717	0.006
G	0.395	0.031	0.520	0.006	0.570	0.007	0.406	0.022
H	0.413	0.029	0.374	0.014	0.643	0.005	0.460	0.017
I	0,358	0.039	0.318	0.020	0.504	0.010	0.360	0.028
J	0.795	0.005	0.810	0.003	0.842	0.002	0.788	0.004
k	0.559	0.015	0.553	0.005	0.627	0.005	0.516	0.014
L	0.997	0.000	0.850	0.003	0.996	0.000	0.996	0.000

A.- Ácido ferúlico, B.- Ácido clorogénico, C.- Kaempferol, D.- Ácido caféico, E.- Ka-3-O-sin-soph-7-O-glc, F.- Quercetina, G.- Ácido gálico, H.- Ácido vainílico, i.- Ácido salicílico, J.- Epicatequina k.- Ácido p-cumarico L.- Ka-3-O-hfer-soph-7-O-glc

La predicción en PASS ($P_a > 0.7$), los compuestos Ácido ferúlico (**A**), Kaempferol (**C**), K-3-O-sin-soph-7-O-glc (**E**), Quercetina (**F**), Kaempferol-3-O-hidroxi-feruloil-soforosido-7-O-glucosido (**L**) poseen actividad anticancerígena; Ácido clorogénico (**B**), Kaempferol (**C**), Kaempferol-3-O-sinapoil-soforosido-7-O-glucosido (**E**), Quercetina (**F**), Epicatequina (**J**) tienen probabilidad alta de poseer actividad antioxidante; Ácido ferúlico (**A**), Ácido clorogénico (**B**), Kaempferol (**C**), Kaempferol-3-O-sinapoil-soforosido-7-O-glucosido (**E**), Quercetina (**F**), Kaempferol-3-O-hidroxi-feruloil-soforosido-7-O-glucosido (**L**) tienen actividad de eliminador radicales libres; **B, E, F, J, L** tienen una probabilidad de poseer actividad quimiopreventiva, figura 41.

Las actividades predichas se ven confirmadas por los reportes previos en la literatura, por ejemplo, **B** posee actividad anticancerígena al regular ciertas vías de señalización, (Tan et al., 2019). A su vez, **C** ha mostrado actividad antitumoral (HepG2, CT26, B16F1), antioxidante y antiinflamatoria de acuerdo al estudio realizado por Jingqiu Wang y asociados, (Wang et al., 2018).



Finalmente para **F**, se determinó que posee una muy buena capacidad antioxidante y efectos biológicos que incluyen inhibición de la inflamación y ROS, (LaManna et al., 2011). Se ha reportado que la actividad del compuesto **A** se basa en la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno, pero también en la neutralización de radicales libres, de acuerdo a lo expuesto por Kamila Zduńska, (Zduńska et al., 2018).

La actividad de los compuestos **A, B, C, E, F, J, L** puede ser tanto antioxidante o eliminador de radicales libres; las podemos atribuir a sus características estructurales como el anillo aromático y el sistema altamente conjugado con múltiples grupos hidroxilo los cuales son buenos donantes de electrones o átomos de hidrógeno, neutralizando los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS).

La probabilidad para los compuestos **B, C, E, F, J, L** de poseer actividad anticancerígena se encuentra en el rango de 71% al 99%. La actividad quimiopreventiva para los compuestos **B, E, F, J, L** está en el rango de probabilidad de 71% al 99%. Para la actividad antioxidante la probabilidad de poseer dicha actividad se encuentra entre 75% y 87% para los compuestos **B, C, E, F, J, L** y la probabilidad para la actividad de eliminador de radicales libres para **A, B, C, E, F, J, L** está dentro de 73% al 99%.

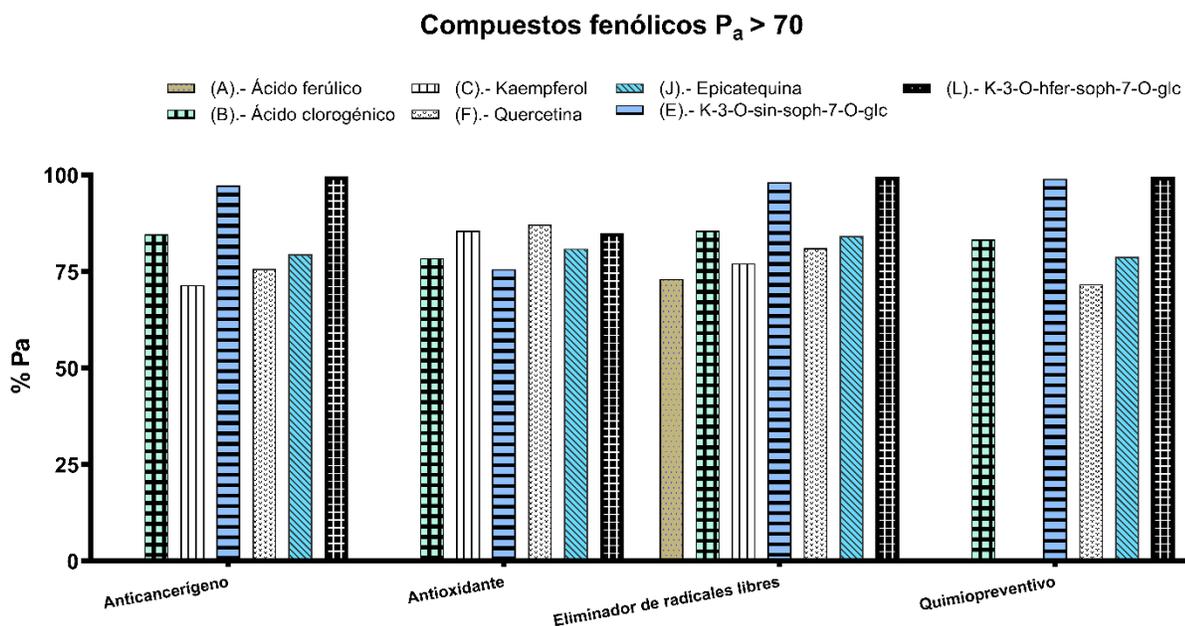


Figura 41. Gráfico comparativo de los compuestos fenólicos con probabilidad mayor a 70 ($P_a > 70$)



Es interesante ver que **C** no glucosilado muestra un 20% menos de probabilidad de actividad anticancerígena (0.71 de probabilidad); por lo contrario, los derivados de Kaempferol glucosilados muestran una Pa cercana a 1.

Las probabilidades de actividad de los compuestos **C** y **F** son cercanas entre ellas en cada sección, al hacer un contraste en los rubros de actividad antioxidante y eliminador de radicales libres vemos que experimentan una ligera caída que puede deberse a su capacidad de quelación para ésta última.

Por otro lado, con la actividad anticancerígena y quimiopreventiva tenemos la misma tendencia, un ligero decremento de la actividad de **F**, pero sorprende que **C** no aparezca en actividad quimiopreventiva, esto debido a que el valor se encuentra ligeramente por debajo del parámetro establecido con una probabilidad del 0.69.

Los resultados para el compuesto **A** fueron favorables para la actividad de eliminador de radicales libres quedando en probabilidad (0.71) de ser activo arriba de la actividad antioxidante y de acuerdo a la literatura es un eliminador de radicales libres, pero también un inhibidor de las enzimas que catalizan la generación de radicales libres y un potenciador de la actividad de la enzima eliminadora, (Zduńska et al., 2018).

Los compuestos **E** y **L** aparentemente sus diferencias de composición estructural no repercute en la probabilidad de ser activo en las actividades seleccionadas para este estudio, al contrario, parece que estas características particulares incrementen su probabilidad muy drásticamente.



8. Conclusiones

En la presente investigación se estudió el extracto metanólico del vegetal kale *Brassica oleracea* var. *sabellica* cultivado en el estado de México con un rendimiento del 40.8 % respecto al material seco. Dicho extracto se fraccionó en tres fases: hexano (1.02%), AcOEt/DCM (0.51 %) y agua (32.59 %).

La actividad antiproliferativa a 100 µg/mL del extracto metanólico de kale en tres líneas celulares HeLa (cervicouterino), PC-3 (próstata), Hep3B (hepático) dió como resultado que el porcentaje de inhibición fue cercano a cero, por lo que como perspectiva se tendría determinar su CI_{50} .

Se logró conocer el contenido de polifenoles totales de las tres fases del extracto metanólico de kale, teniendo como resultado una concentración de 2.64, 5.78, 3.77 mg Eq. Ác. Gálico/g para la fase de hexano, AcOEt/ DCM, acuoso, respectivamente. La fase orgánica fue la de mayor contenido polifenólico, lo cual concuerda con la polaridad conferida a los compuestos fenólicos y lo observado en CCF.

El estudio *in silico* primeramente permitió clasificar en derivados de ácido gálico (**G, H, I**), derivados de ácido cinámico (**A, B, D, K**) y flavonoides (**C, E, F, J, L**) a 12 compuestos reportados en la literatura para kale. Lo cual se propone a 6 compuestos con probabilidad de ser eliminadores de radicales libres (**A, B, C, E, F, J, L**), además de actividad anticancerígena (**B, C, E, F, J, L**) y antioxidante (**B, C, E, F, J, L**). Por otro lado, el análisis de propiedades moleculares (clogP, TPSA, ADH y DEH), nos permitieron determinar que en su gran mayoría los compuestos fenólicos no son tóxicos a excepción de **A, H, I**.

Finalmente, éste estudio químico y quimioinformático de polifenoles es el primero reportado para kale orgánico cultivado en México. El tratamiento empleado para el material vegetal (secado a temperatura ambiente) ha sido el de mayor contenido de polifenoles totales reportado hasta ahora en la literatura. Por lo que se recomienda continuar con el estudio del presente vegetal como un prometedor antioxidante.



9. Perspectivas

- Continuar con la purificación de la fase hexánica, AcOEt: DCM, acuoso.
- Determinar CI_{50} del extracto metanólico de kale seco.
- Determinar actividad antioxidante *in vitro* del extracto.



10. Bibliografía

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M. S., Ishtiaq, A., Hussain, S., & Suleria, H. A. R. (2017). Natural polyphenols: An overview. In *International Journal of Food Properties* (Vol. 20, Issue 8, pp. 1689–1699). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1220393>
- Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A., & Kellogg, E. A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2–4), 89–120. <https://doi.org/10.1007/s00606-006-0415-z>
- Aldred, E. M. (2009). *Pharmacology. A Handbook for Complementary Healthcare Professionals* (Vol. 148).
- Ansari, A. A., Gill, S. S., Gill, R., Lanza, G. R., & Newman, L. (2017). Phytoremediation: Management of environmental contaminants, volume 5. In *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 5*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-52381-1>
- Avato, P., & Argentieri, M. P. (2015). Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 1019–1033. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9414-4>
- Ayaz, F. A., Hayirlioglu-Ayaz, S., Alpay-Karaoglu, S., Grúz, J., Valentová, K., Ulrichová, J., & Strnad, M. (2008). Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.003>
- Becerra-Moreno, A., Alanís-Garza, P. A., Mora-Nieves, J. L., Mora-Mora, J. P., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2014). Kale: An excellent source of vitamin C, pro-vitamin A, lutein and glucosinolates. *CYTA - Journal of Food*, 12(3), 298–303. <https://doi.org/10.1080/19476337.2013.850743>
- Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., & Komes, D. (2018). Overview of polyphenols and their properties. In *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00001-4>
- Biegańska-Marecik, R., Radziejewska-Kubzdela, E., & Marecik, R. (2017). Characterization of phenolics, glucosinolates and antioxidant activity of beverages based on apple juice with addition of frozen and freeze-dried curly kale leaves (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* L.). *Food Chemistry*, 230, 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.047>
- Bischoff, K. L. (2016). Glucosinolates. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00040-1>
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16(1), 251–280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>



- Chen, Y., & Kirchmair, J. (2020). Cheminformatics in Natural Product-based Drug Discovery. *Molecular Informatics*, 39(12), 1–16. <https://doi.org/10.1002/minf.202000171>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 5, Issue September, pp. 1–9). <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- De Nicola, G. R., Bagatta, M., Pagnotta, E., Angelino, D., Gennari, L., Ninfali, P., Rollin, P., & Iori, R. (2013). Comparison of bioactive phytochemical content and release of isothiocyanates in selected brassica sprouts. *Food Chemistry*, 141(1), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.102>
- Desjardins, Y. (2008). Physiological and ecological functions and biosynthesis of health-promoting compounds in fruit and vegetables. In *Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845694289.3.201>
- 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)
- Estrela, J. M., Mena, S., Obrador, E., Benlloch, M., Castellano, G., Salvador, R., & Dellinger, R. W. (2017). Polyphenolic Phytochemicals in Cancer Prevention and Therapy: Bioavailability versus Bioefficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(23), 9413–9436. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01026>
- Fiol, M., Adermann, S., Neugart, S., Rohn, S., Mügge, C., Schreiner, M., Krumbein, A., & Kroh, L. W. (2012). Highly glycosylated and acylated flavonols isolated from kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) - Structure-antioxidant activity relationship. *Food Research International*, 47(1), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.01.014>
- Fратиanni, F., Cardinale, F., Cozzolino, A., Granese, T., Pepe, S., Riccardi, R., Spigno, P., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2014). Polyphenol Composition and Antioxidant Activity of Two Autochthonous Brassicaceae of the Campania Region, Southern Italy. *Food and Nutrition Sciences*, 05(01), 66–70. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.51009>
- Ganapathy, M., & Bhunia, S. (2015). Nutraceuticals: The New Generation Therapeutics. *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2379-1764.1000179>
- Giulia, C., & Giuseppe, E. (2016). Molecular descriptors for polarity: the need of going beyond polar surface area. *Future Medicinal Chemistry*, 8(17).



- Hahn, C., Müller, A., Kuhnert, N., & Albach, D. (2016). Diversity of Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*): Glucosinolate Content and Phylogenetic Relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(16), 3215–3225. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01000>
- Humphries, J. M., & Khachik, F. (2003). Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(5), 1322–1327. <https://doi.org/10.1021/jf026073e>
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C. B., & Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, *64*(1), 48–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>
- Jahangir, M., Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2009). Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *8*(Ferguson 1999), 31–43.
- Jeon, J., Kim, J. K., Kim, H. R., Kim, Y. J., Park, Y. J., Kim, S. J., Kim, C., & Park, S. U. (2018). Transcriptome analysis and metabolic profiling of green and red kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) seedlings. *Food Chemistry*, *241*(July 2016), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.067>
- Jurado, B., Aparcana, I., Villarreal, L., Ramos, E., Calixto, M., Hurtado, P., & Acosta, K. (2016). Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, *82*(3), 272–279. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2016000300003&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v82n3/a03v82n3.pdf
- Kaulmann, A., Jonville, M. C., Schneider, Y. J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2014). Carotenoids, polyphenols and micronutrient profiles of Brassica oleraceae and plum varieties and their contribution to measures of total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *155*, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.070>
- Korus, A. (2011). Level of vitamin C, polyphenols, and antioxidant and enzymatic activity in three varieties of kale (*Brassica oleracea* l. var. *Acephala*) at different stages of Maturity. *International Journal of Food Properties*, *14*(5), 1069–1080. <https://doi.org/10.1080/10942910903580926>
- Kotecha, R., Takami, A., & Espinoza, J. L. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: A review of the clinical evidence. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 32, pp. 52517–52529). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9593>



- Ku, K. M., Jeffery, E. H., & Juvik, J. A. (2014). Exogenous methyl jasmonate treatment increases glucosinolate biosynthesis and quinone reductase activity in kale leaf tissue. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103407>
- Kumar, P. (2018). Role of food and nutrition in cancer. In *The Role of Functional Food Security in Global Health* (pp. 193–203). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00012-8>
- LaManna, J., Puchowicz, M., Xu, K., Harrison, D., & Bruley, D. (2011). *Oxygen Transport to Tissue XXXII. 701*, XXX, 374. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7756-4>
- 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>
- Łata, B., & Wińska-Krysiak, M. (2006). Skład chemiczny jarmużu uprawianego na dwóch typach gleby. *Acta Agrophysica*, 7(3), 663–670.
- Leach, A. R., & Gillet, V. J. (2007). An introduction to chemoinformatics. In *An Introduction To Chemoinformatics*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6291-9>
- Lefsrud, M. G., Kopsell, D. A., Kopsell, D. E., & Randle, W. M. (2006). Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1764–1771. <https://doi.org/10.1021/jf052478y>
- Ligor, M., Trziszka, T., & Buszewski, B. (2013). Study of Antioxidant Activity of Biologically Active Compounds Isolated from Green Vegetables by Coupled Analytical Techniques. *Food Analytical Methods*, 6(2), 630–636. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9367-9>
- Lin, L. Z., & Harnly, J. M. (2009). Identification of the phenolic components of collard greens, kale, and chinese Broccoli. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7401–7408. <https://doi.org/10.1021/jf901121v>
- Lotti, C., Iovieno, P., Centomani, I., Marcotrigiano, A. R., Fanelli, V., Mimiola, G., Summo, C., Pavan, S., & Ricciardi, L. (2018). Genetic, bio-agronomic, and nutritional characterization of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) diversity in Apulia, Southern Italy. *Diversity*, 10(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/d10020025>
- Mageney, V., Neugart, S., & Albach, D. C. (2017). A guide to the variability of flavonoids in Brassica oleracea. *Molecules*, 22(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules22020252>
- Maggioni, L. (2015). Domestication of *Brassica oleracea* L. In *Faculty of Landscape Architecture, Horticulture and Crop Production Science*.



- Medina-Franco, J. L., & Saldívar-González, F. I. (2020). Cheminformatics to characterize pharmacologically active natural products. *Biomolecules*, *10*(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom10111566>
- Mehta, R. G. (2014). Current paradigms of cancer chemoprevention. *Turkish Journal of Biology*, *38*(6), 839–847. <https://doi.org/10.3906/biy-1405-42>
- Michalak, M., Szwajgier, D., Paduch, R., Kukula-Koch, W., Waśko, A., & Polak-Berecka, M. (2020). Fermented curly kale as a new source of gentisic and salicylic acids with antitumor potential. *Journal of Functional Foods*, *67*(February). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103866>
- Mitra, S., Ganguli, S., & Chakrabarti, J. (2018). Introduction. In *Cancer and Noncoding RNAs*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811022-5.00001-2>
- Mollica, A., Stefanucci, A., Zengin, G., Locatelli, M., Macedonio, G., Orlando, G., Ferrante, C., Menghini, L., Recinella, L., Leone, S., Chiavaroli, A., Leporini, L., Di Nisio, C., Brunetti, L., Tayrab, E., Ali, I., Musa, T. H., Musa, H. H., & Ahmed, A. A. (2018). Polyphenolic composition, enzyme inhibitory effects ex-vivo and in-vivo studies on two Brassicaceae of north-central Italy. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *107*(February), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.169>
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales. *Tip*, *20*(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Murtaza, I., Beigh, G. M., Shah, T. A., Hussain, A., Khan, A. A., & Kaur, C. (2005). Antioxidant activity and total phenolic content of kale genotypes grown in kashmir valley. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *14*(2), 215–217. <https://doi.org/10.1007/BF03263250>
- Nazzaro, F., Cardinale, F., Cozzolino, A., Granese, T., & Fratianni, F. (2014). Polyphenol Composition and Antioxidant Activity of Different Potentially Functional Kale-Based Snacks. *Food and Nutrition Sciences*, *05*(12), 1145–1152. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.512124>
- Neugart, S., Kläring, H. P., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L. W., & Krumbein, A. (2012). The effect of temperature and radiation on flavonol aglycones and flavonol glycosides of kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chemistry*, *133*(4), 1456–1465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.034>
- Olsen, H., Aaby, K., & Borge, G. I. A. (2009). Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(7), 2816–2825. <https://doi.org/10.1021/jf803693t>



- Olsen, H., Aaby, K., & Borge, G. I. A. (2010). Characterization, quantification, and yearly variation of the naturally occurring polyphenols in a common red variety of curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica* cv. 'Redbor'). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(21), 11346–11354. <https://doi.org/10.1021/jf102131g>
- Olsen, H., Grimmer, S., Aaby, K., Saha, S., & Borge, G. I. A. (2012). Antiproliferative effects of fresh and thermal processed green and red cultivars of curly kale (*Brassica oleracea* L. convar. *acephala* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(30), 7375–7383. <https://doi.org/10.1021/jf300875f>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. In *Journal of Nutritional Science* (Vol. 5, pp. 1–15). <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(5), 270–278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>
- Possenti, M., Baima, S., Raffo, A., Durazzo, A., Giusti, A. M., & Natella, F. (2016). Glucosinolates. In *Glucosinolates* (Issue June). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26479-0>
- Radošević, K., Srček, V. G., Bubalo, M. C., Rimac Brnčić, S., Takács, K., & Redovniković, I. R. (2017). Assessment of glucosinolates, antioxidative and antiproliferative activity of broccoli and collard extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *61*, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.02.001>
- Rajasekaran, A. (2017). Nutraceuticals. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 1–8, 107–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12287-5>
- Rashid, S. (2017). 9. Apoptosis 10. Chemoprevention. In *Cancer and Chemoprevention: An Overview*.
- Reyes-Munguía, A., Rosas-Trejo, L., Campos-Montiel, R., Quintero-Lara, A., & Carrillo-Inungaray, M. L. (2017). Propiedades antioxidantes del extracto acuoso de *Brassica oleracea* var. *sabellica*. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, *3*(8), 30–34.
- Saldívar-González, F. I., & Medina-Franco, J. L. (2019). Chemoinformatics approaches to assess chemical diversity and complexity of small molecules. *Small Molecule Drug Discovery: Methods, Molecules and Applications*, 83–102. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818349-6.00003-0>
- San Miguel-Chávez, R. (2017). Phenolic Antioxidant Capacity: A Review of the State of the Art. *Phenolic Compounds - Biological Activity*. <https://doi.org/10.5772/66897>
- 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>



- Schmidt, S., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L. W., & Krumbein, A. (2010). Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chemistry*, *119*(4), 1293–1299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.004>
- Sharma, M., Dwivedi, P., Singh Rawat, A. K., & Dwivedi, A. K. (2016). Nutrition nutraceuticals: a proactive approach for healthcare. In *Nutraceuticals*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804305-9.00003-8>
- Sikora, E., & Bodziarczyk, I. (2012). (*Brassica Oleracea* L . Var . *Acephala*) Raw and Cooked. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, *11*(3), 239–248.
- Surh, Y. J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, *3*(10), 768–780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>
- Szutowska, J., Rybicka, I., Pawlak-Lemańska, K., & Gwiazdowska, D. (2020). Spontaneously fermented curly kale juice: Microbiological quality, nutritional composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Journal of Food Science*, *85*(4), 1248–1255. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15080>
- Tan, S., Dong, X., Liu, D., Hao, S., & He, F. (2019). Anti-tumor activity of chlorogenic acid by regulating the mTORC2 signaling pathway and disrupting F-actin organization. *Int J Clin Exp Med*, *12*(5), 4818–4828. www.ijcem.com/
- Umashankar, V., & Gurunathan, S. (2011). *Chemoinformatics and its Applications. Figure 1*. <https://doi.org/10.1002/9780470744307.gat222>
- Walley, P. G., & Buchanan-Wollaston, V. (2011). Brassicas. *Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetables*, 74–89. <https://doi.org/10.1201/b22001-29>
- Wang, J., Fang, X., Ge, L., Cao, F., Zhao, L., Wang, Z., & Xiao, W. (2018). Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLoS ONE*, *13*(5), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197563>
- Willett, P. (2011). Chemoinformatics: A history. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, *1*(1), 46–56. <https://doi.org/10.1002/wcms.1>
- Wittstock, U., Kurzbach, E., Herfurth, A. M., & Stauber, E. J. (2016). Glucosinolate Breakdown. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.06.006>
- Xu, J., & Hagler, A. (2002). Chemoinformatics and drug discovery. *Molecules*, *7*(8), 566–600. <https://doi.org/10.3390/70800566>



- Yang, I., Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. (2018). In vitro digestion with bile acids enhances the bioaccessibility of kale polyphenols. *Food and Function*, 9(2), 1235–1244.
<https://doi.org/10.1039/c7fo01749a>
- Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., & Rotsztein, H. (2018). Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6), 332–336.
<https://doi.org/10.1159/000491755>
- Zhang, J., Satterfield, M. B., Brodbelt, J. S., Britz, S. J., Clevidence, B., & Novotny, J. A. (2003). Structural Characterization and Detection of Kale Flavonoids by Electrospray Ionization Mass Spectrometry was found to reduce the flavonols to ~ 60 % of the levels. *Metabolism Clinical And Experimental*, 52(12), 1640–1647.

