



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Estudio químico, quimioinformático y actividad citotóxica de
los vegetales crucíferos *Brassica oleracea* L. var. *italica* (brócoli)
y var. *sabellica* (kale)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Araceli Guerrero Alonso

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica

Cuernavaca Morelos, 2023

JURADO

Jurado	Nombre del investigador	Adscripción
PRESIDENTE	Dra. Laura Patricia Alvarez Berber	CIQ-UAEM
SECRETARIO	Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez	CIQ- UAEM
VOCAL	Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz	FQ-UAQ
VOCAL	Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez	CIBIs-IMSS
VOCAL	Dra. Leticia González Maya	FF-UAEM
SUPLENTE	Dr. Rodrigo Said Razo Hernández	CIDC- UAEM
SUPLENTE	Dra. María Crystal Columba Palomares	FF-UAEM





Este trabajo fue realizado en el laboratorio 321 de Química de Productos Naturales, del Centro de Investigaciones Químicas, IICBA de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) bajo la dirección de la Dra. Mayra Yaneth Antunez Mojica, con en el proyecto No. **534** del programa de Investigadores e Investigadoras por México del CONAYT.



El cultivo de los vegetales se realizó en la Unidad Académica de Fitotecnia de la Universidad Autónoma de Chapingo bajo la colaboración del Dr. Efraín Contreras Magaña (kale) y el Ing. Raúl Jacinto Mata (brócoli).



La evaluación biológica se llevó a cabo en el Laboratorio 7 de la Facultad de Farmacia de la UAEM bajo la colaboración de la Dra. Leticia González Maya.



El estudio quimioinformático se llevó a cabo en colaboración con el Dr. José Luis Medina Franco de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.



Este proyecto fue realizado gracias al apoyo otorgado por CONACYT a través de la beca Nacional con No. de registro **731739**. Y al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM) con No. de proyecto **321131**.

Derivado de este trabajo, se generó la siguiente publicación:

Guerrero-Alonso Araceli, Antunez-Mojica Mayra and Medina-Franco José L. **2021**. Chemoinformatic Analysis of Isothiocyanates: Their Impact in Nature and Medicine. *Mol Inform*; 40:11, 2100172.

Parte de los resultados de este trabajo, fueron presentados en los siguientes foros nacionales e internacionales:

2020 Evento local, 25º Aniversario CIQ.

Poster: Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), chemistry and pharmaceutical perspectives.

2021 16ª Reunión internacional de investigación en Productos Naturales.

Poster: Cultivo, evaluación citotóxica y análisis químico de los vegetales de *Brassica oleracea* L. var. *itálica* y *sabellica*.

2021 ACS Fall 2021 for the American Chemical Society.

Presentación oral: "Isothiocyanates: A Recent Chemoinformatic Study".

2022 17ª Reunión internacional de investigación en Productos Naturales.

Poster: "Estudio quimioinformático de los metabolitos secundarios presentes en vegetales de *Brassica oleracea* L. brócoli y kale"

Premio: 2do Lugar concurso de carteles.

2022 Evento local, día del Químico (CIQ).

Poster: "Compuestos cianoindólicos presentes en *Brassica oleracea* L. var. *itálica* con actividad citotóxica"

Premio: 3er Lugar concurso de carteles.

2023 18ª Reunión internacional de investigación en Productos Naturales.

Poster: Compuestos presentes en vegetales de *Brassica oleracea* L. con actividad citotóxica sobre cáncer cervicouterino

DEDICADO A:

La alegría y fortaleza de mi corazón

María Guadalupe Alonso Olivar

y

La alegría y la tristeza de mi corazón

Bernardino Guerrero Zavala



DEDICADO A LA MEMORIA DE:

Joaquina Olivar López

David Rivas Alonso

Clemente Barrera Olivar

Ma. Teresa Alonso Olivar

Dr. Ismael León Rivera

Dr. Efraín Contreras Magaña



Agradecimientos

Le doy gracias a **Dios** por el don de la vida, por la familia, los amigos, profesores y oportunidades que me ha regalado en estos 30 años.

A mis padres (María Guadalupe y Bernardino†), por convertir mis logros y educación en parte de sus sueños, por tomar con alegría y amor el cansancio, los desvelos y las preocupaciones que implica ser padre, por ser incondicionales y por enseñarme que la vida son metas, y nunca hay que dejar de tenerlas.

A mis hermanas (Eli y Lu), porque han sido mi soporte, mi guía, mi ejemplo y mi compañía, porque celebran y a veces también, lloran conmigo.

A mis sobrinos (Aylin, Victoria y Erick), por ser las gotitas de alegría de mi corazón.

A la Mtra. Silvia Marquina, por recibirme aquel 2014 y enseñarme un mundo que no conocía y que logró apasionarme, gracias por su apoyo y su cariño, por las enseñanzas y consejos. Ha sido una parte fundamental en este camino.

A la Dra. Laura Alvarez, por abrirme las puertas de su laboratorio para la maestría y en el doctorado seguir apoyándome, pero, sobre todo, gracias por hacernos sentir familia.

A la Dra. Lety Maya, por recibirme en el L-7 de la Facultad de Farmacia y apoyarme con las evaluaciones biológicas para que este trabajo pudiera culminarse con éxito.

A la Dra. Ma. Luisa Garduño, le agradezco el acompañamiento durante estos 6 años en el comité tutorial, su guía y aliento frente a cada obstáculo y reto que se presentaba en mi camino.

Al Dr. Ismael León†, por su acompañamiento durante los 6 años del posgrado, dentro y fuera del comité tutorial, fue un enorme placer conocerlo, y aunque hoy ya no está, sé que supo lo agradecida que estoy y el respeto y cariño que siento por él.

Al Dr. José Luis Medina, por su colaboración, guía y enseñanza para desarrollar la parte informática, gracias por creer en nuestra idea para publicar y apoyarnos en el desarrollo del artículo.

Al los Drs. Jacinto Mata y Efraín Magaña† (Universidad Autónoma de Chapingo), por su entusiasta colaboración al proporcionarme el brócoli y el kale para este trabajo.

Al comité revisor de tesis (Dra. Sandra Mendoza, Dra. Crystal Columba, Dr. Alejandro Zamilpa, Dr. Rodrigo Razo) por sus oportunas observaciones que enriquecieron este proyecto.

A mis crías (Ame, Enrique, Monse, Deliz, Carlos), porque sin ustedes esta tesis no existiría, gracias por permitirme enseñarles, y aprender de ustedes, gracias por el apoyo, y sobre todo por el cariño y amistad que me regalaron, estoy orgullosa de ustedes.

A mis amigos del 321 (Mariana, Juan Pablo, Ninfa, Fidel, Israel H., Yazmín, Isis, Maritza, Toño, Manuel, Nancy, Israel D.), por las horas interminables en el lab, por las risas, los consejos, las pláticas, los debates y las sugerencias. Porque conocer a cada uno de ustedes ha sido un deleite.

A mis amigos del CIQ, por compartir el día a día, por las pláticas que liberaban tensión y la frase motivacional de saber que no estábamos solos en esto: “yo estoy igual”.

A mis amigos de la vida, porque a pesar de la distancia y los diferentes caminos que hemos tomado, sé que somos y estamos, porque a pesar de que las reuniones, llamadas y mensajes cada vez son más esporádicos, siempre están para mí.

A Samir, por acompañarme en los momentos buenos y malos, por ser incondicional, por siempre apoyarme y alentarme en cada momento.

A los técnicos del LANEM (Mary, Vicky, Raúl, Cristina, Blanca), por el apoyo para la realización de los experimentos requeridos.

Al pueblo de México, porque con su trabajo y esfuerzo, contribuyen a que jóvenes como yo, podamos estudiar un posgrado y así el país pueda avanzar y crecer en la ciencia.

Finalmente, con mucho cariño, quiero agradecer a mi directora de tesis, **la Dra. Mayra Antunez**, por el voto de confianza para desarrollar este trabajo, por hacerlo nuestro y por siempre estar dispuesta a apostar aún más a pesar de los obstáculos, sin duda esto es el resultado de la perseverancia, el buen equipo y la amistad que compartimos. Gracias por eso, por el apoyo, el acompañamiento y tu increíble calidad humana.

Índice

Índice de gráficos	XIII
Índice de figuras	XIV
Índice de esquemas	XVI
Índice de tablas	XVII
Índice de anexos capítulo II	XIX
Índice de anexos capítulo III	XXI
Lista de abreviaturas	XXII
Resumen	XXVII
Summary	XXIX
CAPÍTULO I	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes	4
1.2.1 Alimentos funcionales	4
1.2.2 Nutraceuticos	5
1.2.3 Superalimentos	6
1.2.4 La dieta como concepto terapéutico	7
1.2.5 El cáncer en la actualidad	10
1.2.6 La quimioterapia como tratamiento contra el cáncer	13
1.2.7 Familia Brassicaceae: vegetales crucíferos	14
1.2.7.1 Género <i>Brassica</i> : <i>Brassica oleracea</i> L.	14
1.2.8 <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> : Brócoli	17
1.2.8.1 Estudios fitoquímicos	20
1.2.8.2 Estudios farmacológicos (citotóxicos)	23
1.2.9 <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>sabellica</i> : Kale	25
1.2.9.1 Estudios fitoquímicos	26
1.2.9.2 Estudios farmacológicos (citotóxicos)	29
1.2.10 Compuestos organosulfurados	29
1.2.10.1 Glucosinolatos	31
1.2.10.2 Isotiocianatos	33
1.2.10.3 Fitoalexinas	36
1.2.11 Compuestos fenólicos	38

1.2.12 Quimioinformática	40
1.2.12.1 Recursos informáticos	41
1.3 Justificación	44
1.4 Hipótesis	45
1.5 Objetivo general	46
1.6 Objetivos específicos	46
1.7 Referencias	47
CAPÍTULO II	60
Estudio químico-farmacológico	60
2.1 Metodología	60
2.1.1 Establecimiento de los cultivos de las variedades de <i>Brassica oleracea</i> L.	61
2.1.1.1 Cultivo de brócoli	61
2.1.1.2 Cultivo de kale	62
2.1.2 Consideraciones generales de estudio fitoquímico	63
2.1.3 Estudio fitoquímico	64
2.1.3.1 Obtención del bagazo de brócoli y kale	64
2.1.3.2 Obtención de los extractos	64
2.1.3.3 Fraccionamiento grueso de los extractos	65
2.1.3.4 Determinación de la composición química mediante CG-EM	66
2.1.3.5 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en BB-01-M	67
2.1.3.6 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en BH-02-M	68
2.1.3.7 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en KH-02-M	71
2.1.4 Ensayo de citotoxicidad	74
2.1.4.1 Ensayo de citotoxicidad de extractos	74
2.1.4.2 Ensayo de citotoxicidad de compuestos puros	75
2.2 Resultados y discusión	77
2.2.1 Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos	77
2.2.2 Caracterización química	79
2.2.2.1 Compuestos de baja polaridad	80
2.2.2.2 Elucidación estructural de caulilexina C	84
2.2.2.3 Elucidación estructural de indol-3-acetonitrilo	87

2.2.2.4 Elucidación estructural de sinapato de metilo _____	92
2.2.2.5 Elucidación estructural de β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido _____	96
2.2.2.6 Elucidación estructural del compuesto 14 _____	97
2.2.3 Actividad citotóxica de compuestos puros _____	98
2.3 Conclusión _____	105
2.4 Anexos capítulo II _____	106
2.5 Referencias _____	140
CAPÍTULO III _____	144
Análisis quimioinformático _____	144
3.1 Metodología _____	144
3.1.1 Análisis <i>in silico</i> de compuestos de tipo isotiocianato, glucosinolato y fenólico _____	145
3.1.1.1 Recolección de datos _____	145
3.1.1.2 Identificación de la fuente alimentaria reportadas en FooDB _____	147
3.1.1.3 Determinación de propiedades moleculares _____	147
3.1.1.4 Análisis por criterios de Lipinsky, Ghose y Oprea de las propiedades moleculares _	147
3.1.1.5 Predicción de actividad biológica, potencial mutagénico y tumorogénico _____	148
3.2 Resultados y discusión _____	150
3.2.1 Análisis <i>in silico</i> de compuestos de tipo isotiocianato _____	150
3.2.2 Fuente alimentaria de isotiocianatos informada en FooDB _____	151
3.2.3 Clasificación estructural _____	153
3.2.4 Propiedades fisicoquímicas _____	154
3.2.5 Cálculo de potencial mutagénico y tumorogénico _____	157
3.2.6 Perfil de dianas epigenéticas _____	158
3.2.7 Objetivos biomoleculares de los isotiocianatos _____	158
3.2.8 Perfil de dianas moleculares y predicción del tipo de actividad de los isotiocianatos _	161
3.2.9 Isotiocianatos prometedores resultado del análisis de actividad biológica _____	164
3.2.10 Análisis <i>in silico</i> de compuestos de tipo glucosinolato y fenólico _____	166
3.2.11. Vegetales de <i>Brassica oleracea</i> L. como fuente de glucosinolatos y compuestos fenólicos _____	166
3.2.12 Propiedades fisicoquímicas _____	168
3.2.13 Potencial mutagénico y Tumorogénico _____	173
3.2.14 Objetivos biomoleculares de los glucosinolatos y compuestos fenólicos _____	173

3.3 Conclusión	179
3.4 Anexos capítulo III	181
3.5 Referencias	186
CAPÍTULO IV	192
4.1 Conclusiones generales	192
4.2 Perspectivas	193

Índice de gráficos

Gráfico 1.1 Incidencia de cáncer en el Mundo (OMS,2022). _____	11
Gráfico 1.2 Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro en México (INEGI, 2022). _____	12
Gráfico 3.1 Principal fuente alimenticia de isotiocianatos reportada en FooDB. _____	151
Gráfico 3.2 Potencial mutagénico y tumorigénico de los 154 isotiocianatos. _____	157
Gráfico 3.3 Vegetales crucíferos con mayor cantidad de glucosinolatos y polifenoles. _	167
Gráfico 3.4 Análisis drug-like de acuerdo con los criterios de Lipinsky. _____	172
Gráfico 3.5 Análisis drug-like de acuerdo con los criterios de Ghose y Oprea. _____	172
Gráfico 3.6 Potencial mutagénico y tumorigénico de glucosinolatos y compuestos fenólicos. _____	173

Índice de figuras

Figura 1.1 Alimentos funcionales (Fundación vivo sano, 2019). _____	5
Figura 1.2 El sulforafano presente en brócoli, como nutracéutico (GreenDay). _____	6
Figura 1.3 Ejemplos de compuestos presentes en vegetales con actividad antioxidante (Cartea et al. 2011; Podsdek 2007). _____	8
Figura 1.4 Verduras crucíferas (<i>Brassica oleracea</i> L.) que se domesticaron desde la misma planta silvestre (ChileBio 2019). _____	15
Figura 1.5 <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> : brócoli (CONSUMER 2019). _____	18
Figura 1.6 Producción de Brócoli a Nivel Nacional en México. _____	20
Figura 1.7 <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>sabellica</i> : kale. _____	25
Figura 1.8 Compuestos sulfurados del metabolismo primario y secundario (Blažević et al., 2020). _____	30
Figura 1.9 Estructura general de los glucosinolatos. _____	31
Figura 1.10 Ejemplo de glucosinolatos de acuerdo con la clasificación A) alifático B) indólico. _____	32
Figura 1.11 Hidrólisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa y sus diferentes productos de hidrólisis (Rask et al. 2000). _____	33
Figura 1.12 Isotiocianatos reportados en vegetales crucíferos (Kala et al., 2018). _____	34
Figura 1.13 Fitoalexinas aisladas de productos naturales. _____	37
Figura 2.1 Cultivo en campo abierto de brócoli, y dimensiones de las plantas cosechadas. _____	61
Figura 2.2 Plántulas de Kale y plantas adultas para cosecha. _____	63
Figura 2.3 Señales de protones aromáticos del anillo aromático 1,2-disustituido del compuesto 10. _____	84
Figura 2.4 Correlaciones homonucleares H-H, COSY de compuesto 10. _____	86
Figura 2.5 Posible glucosinolato precursor de caulilexina C. _____	87
Figura 2.6 Señales de protones aromáticos del anillo aromático 1,2-disustituido del compuesto 11. _____	88
Figura 2.7 A) espectros de ^1H , ^{13}C del compuesto 10 (Caulilexina C). B) espectros de ^1H , ^{13}C del compuesto 11 (indol-3-acetonitrilo); (^{13}C , 150 MHz; ^1H . 600 MHz). _____	90
Figura 2.8 Correlaciones homonucleares H-H, COSY de compuesto 11. _____	91
Figura 2.9 Posible glucosinolato precursor de indol-3-acetonitrilo. _____	92

Figura 2.10 Señales de los protones vinílicos del compuesto 12. _____	93
Figura 2.11 Correlaciones heteronucleares C-H, HMBC de compuesto 12. _____	95
Figura 2.12 Señales de los protones aromáticos del compuesto 14. _____	98
Figura 2.13 1-metoxi-1H-indol-3-acetonitrilo (10) (caulilexina C), indol-3-acetonitrilo (11), 3-(tiazol-2-il)indol (3TI) (camalexina), 3-indolcarbinol (13C), 3-isothiocyanato-4-methoxy-1H-indole (3IMI) (rapalexina A), 3-isothiocyanato-4-methoxy-1H-indol-5-ol (3IMIO) (rapalexina B). _____	102
Figura 2.14 Estructura de sinapato de metilo (12) y su análogo el ácido sinápico. _____	102
Figura 3.1 Isotiocianatos únicos y compartidos extraídos de cuatro bases de datos: COCONUT (CNT), FooDB (FDB), Protein Data Bank (PDB), y DrugBank (DB). _____	150
Figura 3.2 A) Estructuras de isotiocianatos reportados en vegetales crucíferos de Brassica oleracea L. por FooDB. B) Esquema ilustración de los vegetales de la planta silvestre. _____	152
Figura 3.3 A) Proporción de isotiocianatos identificados según su estructura química. B) Isotiocianatos representativos de cada grupo estructural. I) acíclico, II) cíclico, III) policíclico, IV) aromático, VI) poliaromático, V) indólico, VI) glicosilado. _____	153
Figura 3.4 Distribución de los ocho descriptores químicos de relevancia farmacéutica calculados de los 154 compuestos. _____	156
Figura 3.5 Reactividad de MIF con A) SFN (sulforafano) y B) FEITC (fenetil isotiocianato) unidos covalentemente con N-terminal de prolina. _____	160
Figura 3.6 Predicción de dianas moleculares y actividad biológica de los isotiocianatos analizado. _____	163
Figura 3.7 Isotiocianatos prometedores del análisis de actividad farmacológica. _____	164
Figura 3.9 Distribución de los ocho descriptores químicos de relevancia farmacéutica calculados de los compuestos fenólicos. _____	170
Figura 3.10 Predicción de dianas moleculares y actividades biológicas. _____	177

Índice de esquemas

Esquema 2.1 Metodología general del estudio químico-farmacológico. _____	60
Esquema 2.2 Extracción para la obtención de la fracción de hexano, metanol, y acuosa. _____	65
Esquema 2.3 Ensayo de citotoxicidad con MTS. _____	75
Esquema 2.4 Ensayo de citotoxicidad con rojo neutro. _____	76
Esquema 3. 1 Metodología general del estudio quimioinformático. _____	144

Índice de tablas

Tabla 1.1 Variedades de la especie <i>Brassica oleracea</i> L. (USDA 2019).	16
Tabla 1.2 Variedades de brócoli más cultivadas en México (Díaz 2001; Zamora 2016; Seminis 2012).	19
Tabla 1.3 Contenido metabólico de <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> .	21
Tabla 1.4 Líneas celulares sobre las cuales se ha probado la actividad de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> (brócoli).	24
Tabla 1.5 Variedades de kale.	26
Tabla 1.6 Contenido metabólico de <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>sabellica</i> .	27
Tabla 1.7 Reportes farmacológicos del Kale.	29
Tabla 1.8 Efecto citotóxico de Isotiocianatos en líneas celulares de cáncer.	35
Tabla 1.9 Clasificación de compuestos fenólicos (Shahidi F, Ambigaipalan P. 2015).	39
Tabla 2.2 Extractos obtenidos.	65
Tabla 2.3 Rendimiento del fraccionamiento grueso de BB-01, BB-02 KB-01 Y KH-02.	66
Tabla 2.4 Fraccionamiento cromatográfico de BB-01-M.	67
Tabla 2.5 Fraccionamiento cromatográfico de BH-02-M.	69
Tabla 2.6 Fraccionamiento cromatográfico de BH-02-M-3.	69
Tabla 2.7 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M.	71
Tabla 2.8 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M-4.	72
Tabla 2.9 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M-4-1.	72
Tabla 2.10 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M-4-1-5.	73
Tabla 2.1 Especificaciones de las líneas celulares.	74
Tabla 2.11 Ensayo de viabilidad celular de <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> (brócoli) en 3 líneas celulares de cánceres humanos.	78
Tabla 2.12 Ensayo de viabilidad celular de <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>sabellica</i> (kale) en 3 líneas celulares de cánceres humanos.	79
Tabla 2.13 CI_{50} de 10 , 11 y 12 de <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i> .	99
Tabla 3.1 Número de isotiocianatos reportados en 4 bases de datos.	150
Tabla 3.2 Alimentos asociados a los isotiocianatos según FooDB.	152
Tabla 3.3 Isotiocianatos con el mayor número de dianas moleculares y potenciales bioactivos reportados.	165
Tabla 3.4 Número de compuestos reportados en 4 bases de datos.	166

Tabla 3.5 Vegetales cruciferos reportados en FooDB como fuente de glucosinolatos y polifenoles. _____ 167

Índice de anexos capítulo II

Espectro 1: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de caulilexina C (10).	107
Espectro 2: RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de caulilexina C (10).	108
Espectro 3: RMN HSQC (600 MHz, CDCl ₃) de caulilexina C (10).	109
Espectro 4: de RMN 2D, COSY (600 MHz, CDCl ₃) de caulilexina C (10).	110
Espectro 5: RMN 2D, HMBC (600 MHz, CDCl ₃) de caulilexina C (10).	111
Espectro 6: IR de caulilexina C (10).	112
Espectro 7: Masas (IQ) de caulilexina C (10).	113
Espectro 8: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de indol-3-acetonitrilo (11).	114
Espectro 9: RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de indol-3-acetonitrilo (11).	115
Espectro 10: RMN HSQC (600 MHz, CDCl ₃) de indol-3-acetonitrilo (11).	116
Espectro 11: RMN 2D, COSY (600 MHz, CDCl ₃) de indol-3-acetonitrilo (11).	117
Espectro 12: RMN 2D, HMBC (600 MHz, CDCl ₃) indol-3-acetonitrilo (11).	118
Espectro 13: IR de indol-3-acetonitrilo (11).	119
Espectro 14: Masas (IQ) de indol-3-acetonitrilo (11).	120
Cromatograma 1: (CG-EM) de indol-3-acetonitrilo.	121
Espectro 15: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de sinapato de metilo (12).	122
Espectro 16: RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de sinapato de metilo (12).	123
Espectro 17: RMN HSQC (600 MHz, CDCl ₃) de sinapato de metilo (12).	124
Espectro 18: RMN 2D, COSY (600 MHz, CDCl ₃) de sinapato de metilo (13).	125
Espectro 19: RMN HMBC (600 MHz, CDCl ₃) de sinapato de metilo (12).	126
Espectro 20: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de β-sitosterol-3-O-β-D-glucósido (13).	127
Espectro 21: RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de β-sitosterol-3-O-β-D-glucósido (13).	128
Espectro 22: RMN ¹ H (600 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.	129
Espectro 23: RMN ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.	130
Espectro 24: RMN HSQC (600 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.	131
Espectro 25: COSY (600 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.	132

Espectro 26: HMBC (600 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol. _____	133
Espectro 27: IR del compuesto 14. _____	134
Cromatograma 2: (CG-EM) del compuesto 14. _____	135
Cromatograma 3: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción BB-01-H de Brassica oleracea L. var. <i>itálica</i> . _____	136
Cromatograma 4: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción BH-02-H de Brassica oleracea L. var. <i>itálica</i> . _____	137
Cromatograma 5: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción KB-01-H de Brassica oleracea L. var. <i>sabellica</i> . _____	138
Cromatograma 6: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción KH-02-H de Brassica oleracea L. var. <i>sabellica</i> . _____	139

Índice de anexos capítulo III

- Anexo 1:** Interacciones moleculares entre dihidroorotato deshidrogenasa e isotiocianato de 4-nitrofenilo. Estructura co-cristalizada 4EF9 base de datos PDB. _____ 182
- Anexo 2:** Interacciones moleculares entre glutatión transferasa Omega 3S e isotiocianato de fenetilo. Estructura co-cristalizada 6HPE base de datos PDB. _____ 183
- Anexo 3:** Interacciones moleculares entre lisozima C e isotiocianato de fluoresceína. Estructura co-cristalizada 6FVE base de datos PDB. _____ 184
- Anexo 4:** Interacciones moleculares entre quitinasa A y 2-(imidazolin-2-il)-5-isotiocianatobenzofurano. Estructura co-cristalizada 3ARZ base de datos PDB. _____ 185

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grado centígrado
#A	Átomos pesados
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
3D	Tercera dimensión
3IMI	Rapalexina A
3IMIO	Rapalexina B
3TI	Camalexina
Å	Angstroms
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A2b	Receptor de adenosina
AcOEt	Acetato de etilo
ADCY10	Adenilil ciclasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AITC	Alil isotiocianato
APH	Aceptores de enlaces de hidrógeno
AS	Ácido sinápico
ASP	Área de superficie polar
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Serina-proteína quinasa
<i>B. rapa</i>	<i>Brassica rapa</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BB-01	Extracto de bagazo de brócoli
BB-01-A	Fracción acuosa de bagazo de brócoli
BB-01-EM	Fracción soluble en metanol primaria de bagazo de brócoli
BB-01-H	Fracción de hexano de bagazo de brócoli
BB-01-M	Fracción de metanólica de bagazo de brócoli
BHE	Barrera hematoencefálica
BH-02	Extracto de hoja de brócoli
BH-02-A	Fracción acuosa de hoja de brócoli
BH-02-EM	Fracción soluble en metanol primaria de hoja de brócoli
BH-02-H	Fracción de hexano de hoja de brócoli
BH-02-M	Fracción de metanólica de hoja de brócoli

BITC	Bencil isotiocianato
brs	Singulete ancho
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CaMKIIβ	Proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina
CB2	Receptor carabinoide tipo 2
CCF	Cromatografía en capa fina
CD₃OD	Metanol deuterado
CD74	Cadena invariable asociada a antígenos
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CE₅₀	Concentración efectiva media
CF	Compuesto fenólico
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CH₂Cl₂	Diclorometano
chiA	Quitinasa A
CHRM1	Receptor de acetilcolina muscarínico M1
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
CIQ	Centro de Investigaciones Químicas
clogP	Coefficiente de partición octanol / agua
cm⁻¹	Centímetro inverso
CNT	Collection of Open Natural Products,
CO₂	Dióxido de carbono
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CXCR2	Receptor beta de interleucina 8
CXCR4	Receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4
CYP1A	Citocromo P450 1 ^a
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
d	Doblete
D4	Receptor de dopamina D4
Da	Daltons
DB	<i>DrugBank</i>
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHODH	Dihidroorotato deshidrogenasa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

DPH	Donadores de enlaces de hidrógeno
dt	Doble de triple
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E. MeOH	Extracto metanólicos
EM	Espectrometría de Masas
EP3R	Receptor de prostanooides tipo E 3
EP4R	Receptor de prostanooides tipo E 4
ER	Enlaces rotables
FDB	FooDB
FEITC	Fenetil isotiocianato
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FX	Factor de coagulación X
g	Gramo
GSL	Glucosinolato
GST	Glutación S transferasa
GST3S	Glutación transferasa omega 3S
GSTA1	Glutación S- transferasa A1
h	Hora
H ₂ O	Agua
HIF1A	Factor 1-alfa inducible por hipoxia
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMOX1	Gen HMOX1
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertzios
I3C	3-indolcarbinol
IBV	Iberverina
IE	Impacto electrónico
Inh	Inhibición
IQ	Ionización Química
IR	Infrarrojo
ITC	Isotiocianato
ITGA4:	Integrina alfa-4
J	Constante de acoplamiento
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KB-01	Extracto de bagazo de kale
KB-01-A	Fracción acuosa de bagazo de kale
KB-01-EM	Fracción soluble en metanol primaria de bagazo de kale
KB-01-H	Fracción de hexano de bagazo de kale
KB-01-M	Fracción de metanolica de bagazo de kale

Kg	Kilogramo
KH-02	Extracto de hoja fresca de kale
KH-02-A	Fracción acuosa de hoja de kale
KH-02-EM	Fracción soluble en metanol primaria de hoja de kale
KH-02-H	Fracción de hexano de hoja de kale
KH-02-M	Fracción de metanolica de hoja de kale
L	Litro
LYZ	Liozima C
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertzios
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	<i>Mass spectroscopy</i>
ND	No determinado
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
nM	Nanomolar
nm	Nanometro
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>P. notatum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDB	Protein Data Bank
PDE5A	Fosfodiesterasa 5 ^a
PGE2	Prostaglandina E2
PIK3R1	Gen PIK3R1
pknβ	Serina / treonina-proteína quinasa β
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
RM	Refractividad molar
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
ROS1	Protooncogen tirosina-proteína quinasa ROS
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Singulete
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>

SARS-CoV-2

Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo

SFN

Sulforafano

SMILE

Simplified Molecular-Input Line-Entry System

TP53

Proteína supresora de tumores

TR

Tiempo de retención

TRPA1

Canal iónico anquirina 1 del receptor potencial transitorio

UAEM

Universidad Autónoma del Estado de Morelos

UFO

receptor de tirosina-proteína quinasa

uv

Ultravioleta

Var.

Variedad

Viab

Viabilidad

λ

Longitud de onda

μg

Microgramo

μl

Microlitro

μM

Micromolar

Resumen

Actualmente, la dieta está cobrando relevancia dentro de las terapias contra el cáncer. A través de alimentos funcionales y nutraceuticos, se busca el acompañamiento de los tratamientos oncológicos a fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes con cáncer. Dentro de los alimentos funcionales de interés se encuentran los vegetales brócoli y kale de *Brassica oleracea* L. (var. *italica*, var. *sabellica*) a los cuales se les han atribuido actividades anticancerígenas y quimiopreventivas.

En este proyecto a partir de kale (var. *sabellica*), pella y hoja de desecho de brócoli (var. *italica*), se obtuvieron cuatro extractos metanólicos a los cuales se les realizó un estudio citotóxico ([C] = 100 µg / mL) sobre tres líneas de canceres humanos (próstata PC-3, hígado Hep3B y cervicouterino HeLa). Los resultados de % de inhibición mostraron selectividad citotóxica por parte del extracto metanólico de bagazo de pella de brócoli (51.5 ± 3.4 %) de hoja de brócoli (47.0 ± 2.4 %) y hoja de kale (50.5 ± 3.4 %), sobre la línea celular de cáncer cervicouterino. Con base en estos resultados, se llevó a cabo el estudio fitoquímico de estos extractos, obteniéndose a partir del brócoli dos fitoalexinas, la caulilexina C (**10**) y el indol-3-acetonitrilo (**11**), además del compuesto fenólico sinapato de metilo (**12**) y β-sitosterol-3-O-β-D-glucósido (**13**). Por otro lado, este último compuesto también se obtuvo en kale además de un mercaptofenol.

A las fitoalexinas **10**, **11** y al compuesto **12** se les determinó su citotoxicidad por el método de rojo neutro sobre la línea celular HeLa presentando valores de CI₅₀ de 125.97 ± 2.44, 215.71 ± 1.68 y 178.27 ± 2.23 µM, respectivamente.

Aunado a esto, se realizó un estudio quimioinformático de los compuestos de tipo isotiocianato (154 ITC), glucosinolato (11 GSL) y fenólico (6 CF), los cuales son representativos de los vegetales crucíferos. A través de un análisis *drug-like*, se observó que el 50% de los compuestos fenólicos (CF) que corresponden a ác. fenólicos, así como el 11 % de los ITCs pueden ser candidatos a fármacos por

absorción por vía oral. Los flavonoides y el 48 % de los ITCs pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

Además, se encontraron nueve compuestos de tipo isotiocianato (bencil isotiocianato, alil isotiocianato, fenetil isotiocianato, fenil isotiocianato, 4-isotiocianatobut-1-eno, 5-isotiocianatopent-1-eno, 7-isotiocianatohept-1-eno, iberina y etil isotiocianato) y seis compuestos fenólicos (kaempferol, quercetina, catequina, ác. ferúlico, ác. sinápico, ác. cafeico) con actividades como agonistas de la apoptosis, quimioprotectores, protectores mucomembranosos y con actividad sobre dianas moleculares relacionadas con enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, la inflamación, problemas cardiovasculares y el cáncer.

En este trabajo se contribuye al estudio fitoquímico y citotóxico de kale y de brócoli; así como al estudio quimioinformático de los vegetales crucíferos de *Brassica oleracea* L. De este modo, se enriquece su reconocimiento como alimentos funcionales del alto impacto en la dieta y salud humana.

Summary

Currently, diet is gaining relevance within cancer therapies. The accompaniment of oncological treatments is sought through functional and nutraceutical foods to improve the quality of life of cancer patients. Among the functional foods of interest are found broccoli and kale vegetables of *Brassica oleracea* L. (var. *italica*, var. *sabellica*) to which anticancer and chemopreventive activities have been attributed.

In this project, from kale (var. *sabellica*), broccoli (var. *italica*) pellet, and waste leaf, four methanolic extracts were obtained, to which a cytotoxic study was carried out ([C]= 100 µg / mL) on three lines of human cancers (PC-3 prostate, Hep3B liver and HeLa cervical). The inhibition proliferation (%) results showed cytotoxic selectivity by the methanolic extract of broccoli pellet bagasse (% inh= 51.5 ± 3.4), broccoli leaf (% inh= 47.0 ± 2.4), and kale leaf (% inh= 50.5 ± 3.4), on the cervical cancer cell line. Based on these results, the phytochemical study was subjected, from broccoli caulilexin C (**10**), 3-indoleacetonitrile (**11**), methyl synapate (**12**), and β-sitosterol-3-O-β-D-glucoside (**13**) were obtained. Additionally, compound **13** and a mercaptophenol were obtained from kale.

The cytotoxicity of caulilexin C (**10**) 3-indoleacetonitrile (**11**) and methyl synapate (**12**) was determined by the neutral red method on the HeLa cell line, presenting IC₅₀ values of 125.97 ± 2.44, 215.71 ± 1.68 y 178.27 ± 2.23 µM, respectively.

In addition to this, a chemoinformatic study of isothiocyanate (154 ITC), glucosinolate (11 GSL), and phenolic (6 CF)-type compounds, which are representative of cruciferous vegetables, was carried out. A drug-like analysis showed that 50 % of phenolic compounds and 11 % of ITCs might be drug candidates by oral absorption. The other 50 % CF and 48 % ITCs can cross the blood brain barrier (BBB).

Additionally, apoptosis agonist, chemoprotectors, mucomembranous protectors activities were found for nine isothiocyanate-type compounds (benzyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate, phenethyl isothiocyanate, phenyl isothiocyanate, 4-isothiocyanatobut-1-ene, 5-isothiocyanatopent-1-ene, 7-isothiocyanatohept-1-ene,

iberine and ethyl isothiocyanate) and for six phenolic compounds (kaempferol, quercetin, catechin, ferulic acid, sinapic acid, caffeic acid). Also, it showed activity on molecular targets related to chronic-degenerative diseases such as diabetes, inflammation, cardiovascular problems, and cancer.

This work contributes to the phytochemical and cytotoxic study of kale and broccoli pellet and residual leaf, as well as the chemoinformatic study of the cruciferous vegetables of *Brassica oleracea* L. Thus, their recognition as functional foods with a high impact on the diet and human health is enriched.

CAPÍTULO I

"Deje que los alimentos sean su medicina y que la medicina sea su alimento".

<Hipócrates>

1.1 Introducción

El consumo de una dieta rica en verduras y frutas tiene implicaciones positivas para la salud humana (**Cartea et al., 2011**). Actualmente, se acuñan términos como alimentos funcionales y nutraceuticos, los cuales realzan la importancia benéfica de ciertos alimentos sobre otros, tanto en nutrientes (fibra, minerales etc.) como en fitonutrientes (metabolitos secundarios).

En específico los alimentos de origen vegetal contienen cantidades significativas de compuestos bioactivos, que proporcionan beneficios para la salud más allá de la nutrición básica. Dentro de los vegetales de importancia, se encuentran los pertenecientes a la familia Brassicaceae, esta familia consta de 372 géneros (**Tamokou et al., 2017**) entre ellos *Brassica*, que incluye algunos cultivos y especies de gran interés económico, agrícola y nutricional a nivel mundial, como lo es *Brassica oleracea* L. (**Baenas et al., 2012**); los cuales son conocidos como verduras crucíferas así como una fuente importante de antioxidantes naturales debido a los altos niveles de fitonutrientes como carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico y compuestos fenólicos que ayudan a proteger el cuerpo humano contra el daño de las especies reactivas de oxígeno (**Jahangir et al., 2009**). Estos últimos se han asociado con las características de sabor y color de las frutas y verduras (**Podsdek et al., 2007**) y se han relacionado con la reducción del riesgo de enfermedades crónicas como las cardiovasculares y cáncer (**Cartea, 2011, Pérez-Balibrea, 2011**).

Además de los compuestos antes mencionados, *Brassica oleracea* L. es rico en fibra, azúcares solubles, minerales, y compuestos organosulfurados como los glucosinolatos (tioglucósido-*N*-hidroxisulfatos), los cuales son los precursores de

compuestos como los isotiocianatos y fitoalexinas indólicas (**Klein y Sttely, 2017; Adarsh et al., 2009**), y están presentes en un gran número de especies comestibles principalmente de la familia Brassicaceae; estos junto con sus derivados son conocidos desde hace tiempo por sus propiedades fungicidas, bactericidas, nematocidas, alopáticas, (**Chew, 1988**) y recientemente ha crecido el interés por su investigación debido a sus atributos quimio-protectores del cáncer (**Fahey, 2001**).

En este contexto, “cáncer” es un término genérico que se designa a un amplio grupo de enfermedades en las que algunas células del cuerpo se multiplican sin control y se diseminan a otras partes del cuerpo, proceso que se denomina “metástasis” (**OMS, 2018**). Actualmente, es la principal causa de muerte en el mundo (**OMS, 2022**), y la cuarta causa de mortalidad en México, con 90 525 casos, siendo la defunción en mujeres el 51.6 % de los casos (**INEGI, 2022**).

Debido a lo antes mencionado, sigue siendo de importancia la investigación relacionada con la búsqueda de nuevos compuestos que tengan la capacidad de combatir el cáncer (**Schlaepfer y Mendoza, 2010**). En esta búsqueda los productos naturales han jugado un papel importante (**Cragg et al., 1997, 2005, Newman et al., 2012**) ya sea a partir de plantas medicinales o a partir de alimentos (incluyendo vegetales), estos últimos han participado de manera activa en la prevención del cáncer, así como del acompañamiento a los pacientes en tratamiento oncológico.

En específico, *Brassica oleracea* var *itálica*, conocida como brócoli, ha sido estudiado debido a su alta concentración de glucosinolatos e isotiocianatos, principalmente el sulforafano, demostrando actividades citotóxicas (**Clarke, et al., 2008**). En México es el crucífero con mayor importancia económica, posicionando a nuestro país en el 4to lugar en exportación (**Cisneros y Rocha, 2019**). Por otro lado, *Brassica oleracea* var *sabellica*, conocido como kale o col rizada, se ha considerado un superalimento debido a su alto contenido de vitaminas, minerales y fitonutrientes (**Hahn et al., 2016**), su reconocimiento nutricional ha provocado un creciente interés científico, sin embargo, actualmente es poco conocida en nuestro país, pero se espera que poco a poco cobre relevancia en la dieta mexicana.

Por lo tanto, en la presente tesis se ha realizado un estudio químico y citotóxico de los vegetales brócoli y kale, pertenecientes a *Brassica oleracea* L. Así como un estudio quimioinformático de los metabolitos secundarios reportados para estos vegetales. Todo esto con el fin de contribuir con su estudio y validar su consumo como alimentos funcionales y/o nutraceúticos.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Alimentos funcionales

Un alimento funcional, es aquel que su uso específico es para la salud, además, en apariencia física es igual al alimento convencional, (por ejemplo la leche o vegetales como zanahoria y remolacha) (**Figura 1.1**), es consumido como parte de la dieta diaria pero capaz de producir efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, así como en la reducción de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas (**Ferrari y Torres 2003**).

Un alimento funcional, puede ser natural, aquel al que se le ha añadido un componente o se le ha quitado mediante medios tecnológicos o biológicos. Además, puede tratarse de un alimento en el que se ha modificado la naturaleza de uno o más de sus componentes, o en el que se ha modificado su biodisponibilidad de uno o más de los componentes o cualquier combinación de estas posibilidades (**Montero y Luengo, 2007**).

Son, por lo tanto:

“Alimentos naturales o procesados, los cuales aparte de su contenido nutritivo, contienen ingredientes que desempeñan una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo humano favoreciendo la capacidad física y mental”.

Referente a los alimentos funcionales, es importante tener claros algunos aspectos:

A) Los alimentos funcionales no curan ni previenen por si solos enfermedades, y tampoco son indispensables en la dieta.

B) Un alimento se puede considerar funcional si se demuestra que además de tener un efecto nutricional o adecuado, afecta de forma beneficiosa o una o varias funciones del organismo de modo que contribuya a mejorar la salud y el bienestar o reducir el riesgo de padecer enfermedades.

C) Los alimentos funcionales deben demostrar sus efectos en las cantidades que se consideran normales para su consumo en la dieta (**Palou et al., 2003, NIH 2017b**).



Figura 1.1 Alimentos funcionales (Fundación vivo sano, 2019).

1.2.2 Nutracéuticos

El término «nutracéutico» es definido por algunos autores como un juego de palabras que deriva de «nutrición». y «farmacéutico», y otros autores lo acuñen a «terapéutico»; pero, en cualquier caso, la idea es que el nombre englobe el concepto de la curación a través de la nutrición (**kalra, 2003**). La palabra «nutracéutico» fue acuñada en Cranfor; Nueva Jersey por el Dr. Stephen DeFelice; presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina (FIM); en el año 1989. El Dr. DeFelice lo define como «un alimento o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades». (**SENM, 2019**).

Se consideran nutraceuticos a aquellos suplementos dietéticos presentados en una matriz no alimenticia de una sustancia natural bioactiva concentrada, que está presente usualmente en alimentos y que tomada en dosis superiores a la existente en esos alimentos (**Figura 1.2**), presumiblemente tiene efectos favorables sobre la salud, mayores a los que podría tener el alimento normal (**Kalra, 2003**).

Sin embargo, no hay que olvidar que los nutracéuticos se diferencian de los medicamentos en que estos últimos no tienen necesariamente un origen biológico natural; y se diferencian de los extractos e infusiones de hierbas y similares, por la concentración de sus componentes y en que estos últimos no tienen por qué tener una acción terapéutica (**Pérez, 2006**).

Por ejemplo, actualmente a través de empresas como GreenDay y Swanson se encuentra de manera comercial suplementos alimenticios que contienen sulforafano, un isotiocianato presente en las especies hortícolas del género *Brassica*. El sulforafano cuenta con una estructura molecular pequeña y lipofílica, lo cual le confiere una ventaja y mayor biodisponibilidad y es considerado un agente antioxidante indirecto destinado a enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo, como lo es la diabetes, el cáncer e inflamatorias (**Clarke et al., 2008**).



Figura 1.2 El sulforafano presente en brócoli, como nutracéutico (GreenDay).

1.2.3 Superalimentos

En 2004, el Dr. Steven Pratt, autor de *Superfoods Rx: Fourteen Foods That Will Change Your Life*, acuñó el término “superalimento” y a partir de este libro comenzó a cambiar la perspectiva de la importancia de los alimentos que consumimos. Actualmente, no hay una definición oficial para la palabra “superalimento”, es un término utilizado principalmente para mercadotecnia de cierto tipo de alimentos, pero el Diccionario Oxford lo describe como un “alimento rico en nutrientes que se

considera especialmente benéfico para la salud y el bienestar” (Pratt, 2004; Andrade, 2022).

Los superalimentos no están limitados a las frutas o vegetales, sino que también involucran porciones de proteína, opciones de lácteos y ciertos granos.

Por lo tanto, los superalimentos son productos que poseen cantidades por arriba del promedio de nutrientes, es decir, utilizando cantidades muy pequeñas al día, podemos aportar a nuestro organismo grandes cantidades de nutrientes, como fibra, vitaminas, minerales, antioxidantes, grasas saludables etc.; Además estos superalimentos, frutas, vegetales y grasas saludables, también pueden integrarse fácilmente a una alimentación balanceada (Torres, 2016).

1.2.4 La dieta como concepto terapéutico

Hoy en día la conciencia del autocuidado ha llevado a que el concepto de nutrición sea parte fundamental del estilo de vida con la finalidad de mejorar la salud, prevenir y tratar enfermedades. (Rojas *et al.*, 2015) Se sugiere que una dieta rica en frutas y verduras brinda efectos positivos en la salud humana, ya que estos al contener compuestos bioactivos, proporcionan beneficios de salud más allá de la nutrición básica (Herrera, *et al.*, 2014). Varios estudios epidemiológicos han indicado que una alta ingesta de productos vegetales se asocia con un riesgo reducido de varias enfermedades, estos efectos benéficos se han atribuido en parte a los compuestos que poseen actividad antioxidante como las vitaminas C y E, así como los carotenoides (ej. β -caroteno) y los compuestos fenólicos como los flavonoides (ej. kaempferol) (Figura 1.3) (Cartea *et al.*, 2011; Podsedek 2007).

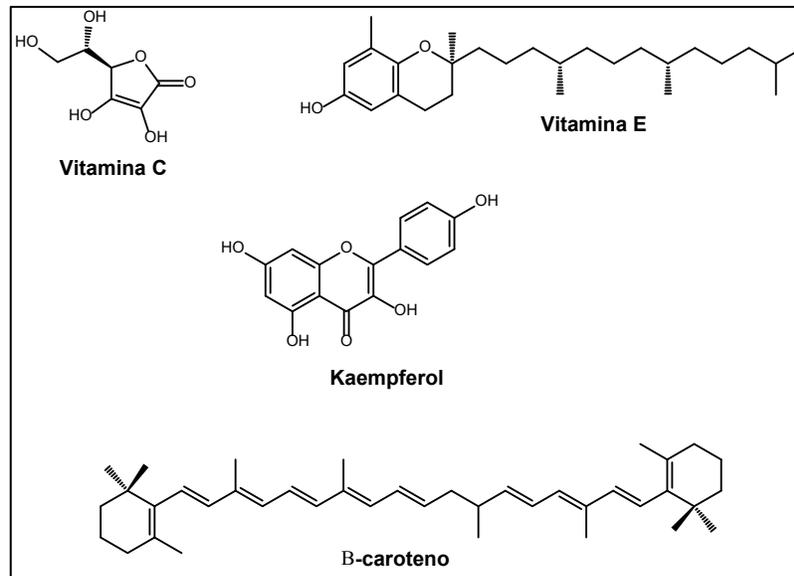


Figura 1.3 Ejemplos de compuestos presentes en vegetales con actividad antioxidante (Cartea et al. 2011; Podsdek 2007).

Los antioxidantes presentes en los vegetales contribuyen tanto a la primera como a la segunda línea de defensa contra el estrés oxidativo protegen las células contra este daño y, por lo tanto, pueden prevenir enfermedades crónicas, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (**Podsdek 2007**).

El hombre, desde su aparición en la Tierra, ha tenido como reto fundamental la obtención del alimento necesario para vivir. La principal función de la dieta es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades nutricionales de las personas (**Dalby, 2002**)

Las investigaciones en el campo de la epidemiología y de la dietética, permiten establecer ciertas relaciones entre los estilos de vida, los hábitos alimentarios y la incidencia de algunas enfermedades (**Jiménez et al., 2008**). A través de la identificación de compuestos biológicamente activos en los consumibles. (**Barbera-Mateos et al., 2007**), como resultado se han desarrollado nuevos alimentos que añaden o amplían los componentes beneficiosos de los alimentos tradicionales por las ventajas que suponen para la salud (**Jiménez et al., 2008**).

Las personas con enfermedades como el cáncer a menudo necesitan seguir una dieta diferente de lo que se considera saludable. Para la mayoría de las personas, una dieta saludable consiste en comer:

- Mucha fruta, verduras y cereales
- Poca cantidad de carne y productos lácteos
- Pequeñas cantidades de grasa, azúcar, alcohol y sal.

Los tratamientos del cáncer están diseñados para destruir las células cancerosas. Pero, estos tratamientos pueden también dañar las células sanas. El daño a las células sanas puede causar efectos sobre el gusto, el olfato, el apetito y la capacidad de comer suficiente o de absorber los nutrientes de los alimentos afectando así, la alimentación y nutrición, por lo que es necesario modificar la dieta y enriquecerla con agentes nutricionales que ayuden a mantener la energía para superar los efectos secundarios del tratamiento y así mantener la salud del paciente. **(NIH, 2018, Cáceres et al., 2016)**.

Las dificultades para realizar una dieta correcta y los problemas nutricionales son una complicación habitual de los pacientes con cáncer. A las alteraciones generales inducidas por la neoplasia se suman los efectos locales de la misma, especialmente en los tumores del tubo digestivo y los efectos secundarios de la cirugía, quimioterapia y radioterapia que, en muchas ocasiones dificultan o impiden la alimentación oral del paciente **(Martin, 2017)**. Por ello la valoración sistemática del estado nutricional del paciente y el control periódico del peso deberían ser una práctica regular en todos los pacientes con cáncer **(Aliaga et al., 2012)**.

A este respecto, la necesidad de atender a nuevas exigencias sociales (tipos de dietas) y de salud ha motivado la aparición de los alimentos funcionales y nutracéuticos, que, además de sus funciones nutritivas generales, presentan determinadas propiedades para el mantenimiento de la salud.

La filosofía de la alimentación para la buena salud es un concepto muy aceptado actualmente, en base a esta premisa la investigación en torno al desarrollo de alimentos alternativos a la comida que complementen, suplementen o sustituyan la

dieta tal cual es conocida es un proceso que se encuentra en desarrollo. Así, han surgido conceptos basados en los descubrimientos como los alimentos funcionales y los nutraceuticos (**Montero y Luengo, 2007**).

1.2.5 El cáncer en la actualidad

El término **cáncer** engloba a un grupo de más de 100 diferentes tipos de la enfermedad que tiene como característica principal el rápido y desordenado crecimiento de células anormales, actualmente es considerado la principal causa de muerte en el mundo; en 2015 se calcula que provocó 8.8 millones de defunciones, identificándose cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar (1.69 millones de muertes, 19 %), cáncer hepático (788 000 defunciones, 9 %), cáncer colorrectal (774 000 muertes, 9 %), cáncer gástrico (754 000 defunciones, 9 %) y de mama (571 000 muertes, 6 %) (**OMS 2018**).

En México durante el año 2017 se contabilizaron un total de 703,047 muertes, el 88.6% (622 647) de estas se debieron a enfermedades y problemas relacionados con la salud siendo las tres principales causas de muerte tanto para hombres como para mujeres enfermedades del corazón (141 619, 20.1%), diabetes mellitus (106,525, 15.2%) y tumores malignos (84,142, 12.0%). De estos últimos, 41,088 (48.83%) fueron casos en hombres y 43,053 (51.17%) en mujeres. Entre las defunciones provocadas por tumores malignos, las cuales totalizaron 84 142 casos, sobresalen los de órganos digestivos con 27,403 casos, seguidos de los de órganos genitourinarios con 19 408 casos y los de huesos, cartílagos articulares, tejido conjuntivo, piel y mama con 11,138 casos (**INEGI 2018**).

En el 2018 en una población de 130,759,070 habitantes, se reportaron 190,667 casos nuevos en nuestro país, siendo los canceres más recurrentes, el cáncer de mama con 27,283 casos, el cáncer de próstata con 25,049, el cáncer de colon con 14,900, el cáncer de tiroides con 12,112, y el cáncer cervicouterino con 7869 casos.

Además, se reportaron 83,476 muertes, es decir el 43.78% de las personas que padecieron cáncer murieron (**OMS 2020**).

En el 2020 los cánceres más comunes, por lo que se refiere a los nuevos casos, fueron de mama, de pulmón, colorrectal, de próstata, de piel (distinto del melanoma), y gástrico (**Gráfico 1.1**).

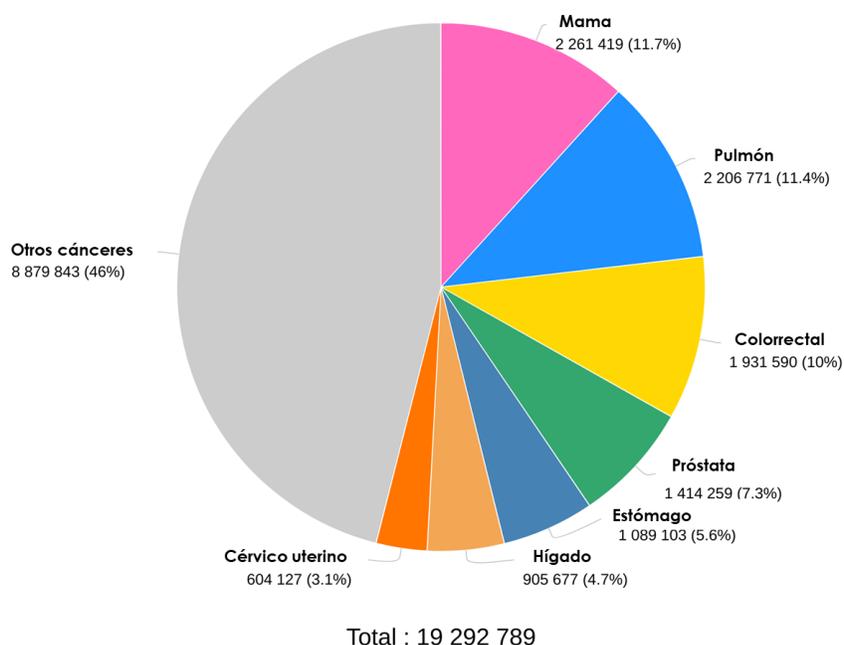


Gráfico 1.1 Incidencia de cáncer en el Mundo (OMS, 2022).

En 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones siendo los tipos de cáncer que causaron un mayor número de fallecimientos el de pulmón (1,8 millones de defunciones), colorrectal (916 000 defunciones), hepático (830 000 defunciones), gástrico (769 000 defunciones) y el de mama (685 000 defunciones) (**OMS, 2022**) aunque los tipos de cáncer más frecuentes varían en función del país, el de cuello uterino es el más habitual en 23 países (**OMS, 2022**).

En nuestro país en 2020 se registraron 1,086,743 defunciones, de las cuales 8% (90,603) se debieron a tumores malignos. La tasa de defunciones por tumores malignos aumentó en la última década, al pasar de 6.18 defunciones por cada 10

mil personas en 2010 a 7.17 por cada 10 mil en 2020 (Gráfico 1.2). En este mismo año, la Ciudad de México, Sonora, Chihuahua, Morelos, Veracruz y Colima fueron las entidades con tasas de 9.7 a 7.8 defunciones por cada 10 mil habitantes.

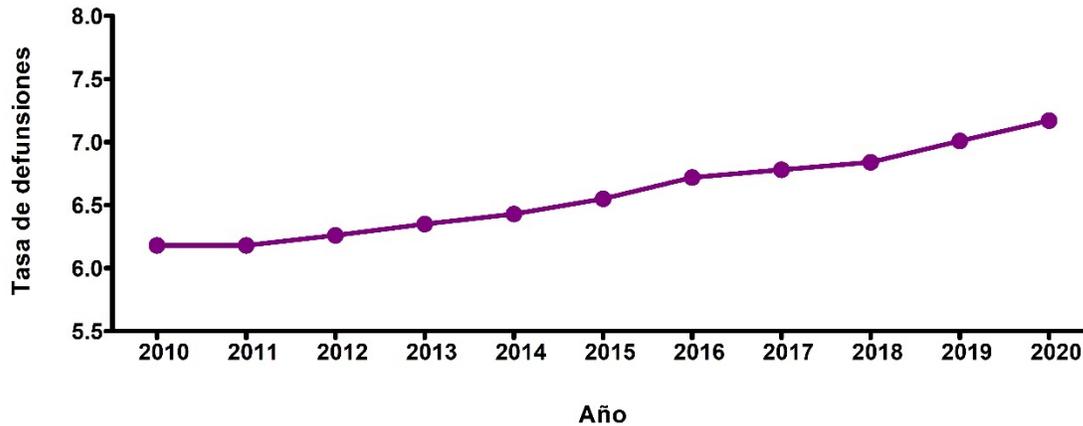


Gráfico 1.2 Tasa de defunciones por tumores malignos por año de registro en México (INEGI, 2022).

El cáncer cervicouterino (CaCu) es un tipo de cáncer que consiste en la formación de tumores malignos en la parte inferior del útero y se puede diagnosticar mediante la prueba de Papanicolau, actualmente se puede prevenir mediante la vacuna contra el virus del papiloma humano (VPH) (IMSS, 2022). Es de las principales causas de muerte en mujeres jóvenes, para 2019, la tasa de mortalidad del CaCu en mujeres de 25 años y más fue de 10.410 defunciones por cada 100 mil mujeres del grupo de edad. Entre los principales tumores malignos por los que fallecen las mujeres de 25 años y más, el CaCu se encuentra en segundo lugar, con 13.2% de las muertes por tumores malignos. Por grupo de edad, la tasa de mortalidad del cáncer cervicouterino pasa de 10.7 muertes por cada 100 mil mujeres de 40 a 49 años, a 18.0 en mujeres de 50 a 59 años y 33.8 en mujeres de 60 años y más. En el caso de los municipios indígenas (40% y más de población en hogares indígenas) la mortalidad entre las mujeres mayores de 30 años en el año 2017 fue de 16.3% por cáncer de mama (CaMa) y 9.6% por cáncer cervical (CaCu) de las muertes por tumores malignos (INMUJERES, 2021).

1.2.6 La quimioterapia como tratamiento contra el cáncer

El diagnóstico correcto del cáncer es esencial para poder prescribir un tratamiento adecuado y eficaz, ya que cada tipo de cáncer requiere un protocolo específico que puede abarcar una o más modalidades, **(OMS 2018)** actualmente se hace uso principalmente de la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, sin embargo, también existen otros tratamientos como inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal, trasplante de células madre y medicina de precisión. La elección del tratamiento dependerá principalmente del tipo de cáncer y de lo avanzado que esté **(NIH, 2017a)**.

La quimioterapia surge como un hallazgo accidental durante la Segunda Guerra Mundial. Los farmacólogos Louis S. Goodman y Alfred Gilman aislaron extractos del gas mostaza y encontraron que éstos brindaban un beneficio temporal a pacientes con linfoma de Hodgkin y leucemia, de esta manera, una exposición casual a este agente químico marcó el inicio de una nueva era en la lucha contra el cáncer, el de la quimioterapia antineoplásica **(Arias 2017; Ortiz-Hidalgo 2013)**.

Actualmente la quimioterapia es un tipo de tratamiento contra el cáncer que usa medicamentos (fármacos) para destruir las células cancerosas. Ésta, detiene o retarda el crecimiento de las células cancerosas. Pero también puede provocar efectos secundarios al afectar a las células sanas que crecen y se dividen rápidamente, por ejemplo: las células de las partes húmedas dentro de la boca, las células de los intestinos y las células que hacen crecer el pelo.

Este tratamiento se puede usar para: reducir el tamaño de un tumor antes de la cirugía o la radioterapia (quimioterapia neoadyuvante) destruir células cancerosas que podrían quedar después de la cirugía o la radioterapia (quimioterapia adyuvante); destruir células cancerosas que han regresado (cáncer recurrente) y para destruir las células cancerosas que se han extendido a otras partes del cuerpo (cáncer metastásico) **(NIH 2007)**.

1.2.7 Familia Brassicaceae: vegetales crucíferos

La familia Brassicaceae (también llamada Cruciferae) se compone de 372 géneros (*Brassica*, *Lepidium*, *Sinapsis* etc.) y alrededor de 4060 especies (**Tamokou et al., 2017**); incluyendo algunos cultivos de gran importancia económica y agrónoma como: *Brassica napus* L., *Brassica rapa* L., *Brassica oleracea* L., *Sinapis alba*, y *Crambe abyssinica* y *Brassica oleracea* L. Además de más de 120 especies de arvenses, (maleza o hierba de campo) como *Lepidium virginicum* L., *Sinapsis arvensis*, *Raphanus sativus*, *Raphanus raphanistrum* entre otras. (**Jahangir et al., 2009**; **Onyilagha et al., 2003**) Su distribución se concentra principalmente en regiones templadas de los hemisferios norte y Sur, la mayor concentración aparece en la Región Mediterránea y Asia (**Vargas-Rincón et al., 2016**).

Dentro de las especies de gran importancia hortícola del género *Brassica*, se encuentran los coloquialmente conocidos como vegetales crucíferos, estos, son conocidos principalmente, como una buena fuente de antioxidantes naturales debido a los altos niveles de carotenoides, tocoferoles y ácido ascórbico; en estos vegetales la mayor parte del efecto antioxidante está relacionado con la presencia de compuestos fenólicos, que se han asociado con las características de sabor y color en ellas (**Jahangir et al., 2009**, **Podsedek et al., 2007**). Dentro de este género podemos encontrar a la especie *Brassica oleracea* L. principal productora de vegetales de hortaliza a nivel mundial (**Baenas et al., 2012**).

Las verduras crucíferas contienen compuestos químicos conocidos como glucosinolatos, los cuales se degradan en varios derivados químicos que actualmente están siendo estudiados por sus posibles efectos anticancerosos (**Adarsh et al., 2009**). los cuales se describirán en la sección [1.2.10](#).

1.2.7.1 Género *Brassica*: *Brassica oleracea* L.

El género *Brassica* (del latín <co/>) comprende alrededor de 35 especies de distribución sobre todo el mediterráneo, con un máximo de diversidad en la parte suroeste de esta región (**E. Britanica, 2015**).

Los cultivos de *Brassica* se han relacionado con la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Los alimentos de *Brassica* son muy nutritivos y proporcionan nutrientes y fitoquímicos que promueven la salud, como vitaminas, carotenoides, fibra, azúcares solubles, minerales, glucosinolatos y compuestos fenólicos (Cartea et al., 2011; Higdon et al., 2007).

Este género es destacable por incluir muchas e importantes especies cultivadas en horticultura; podemos encontrar una amplia gama de vegetales en los que diversas partes son comestibles, incluyendo la raíz (colinabo, rábano, nabo), tallos (colirrábano), hojas (repollo, col de Bruselas), flores (coliflor, brócoli), y semillas (mostaza, colza) (Figura 1.4). En conjunto, las *Brassicas* entregan hojas, flores y vegetales de raíz que se comen frescos, cocidos y procesados (Lozano et al., 2007). Entre los cultivos hortícolas del género *Brassica* podemos encontrar a los pertenecientes a la especie *Brassica oleracea* L. (Drewnowski et al., 2000).

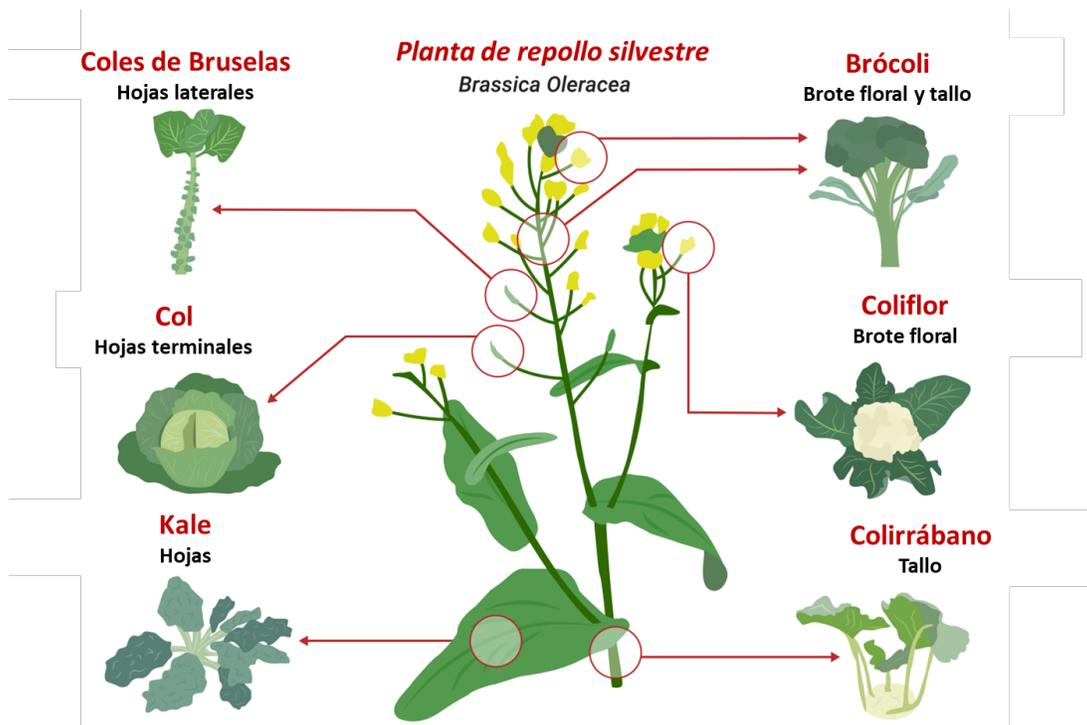


Figura 1.4 Verduras crucíferas (*Brassica oleracea* L.) que se domesticaron desde la misma planta silvestre (ChileBio 2019).

La especie *Brassica oleracea* L. es de carácter bianual, y se encuentra clasificada en 13 grupos de cultivo o variedades (Figura 1.4, Tabla 1.1) de los cuales *botrytis* (coliflor), *capitata* (col), *gemmifera* (col de Bruselas), *Itálica* (brócoli) y *sabellica* o *acephala* (kale) son los cultivos hortícolas a nivel mundial económicamente representativos (USDA 2019).

Tabla 1.1 Variedades de la especie *Brassica oleracea* L. (USDA 2019).

<i>Brassica oleracea</i> L.			
Variedad	Nombre común	variedad	Nombre común
<i>alboglabra</i>	Kai-lan	<i>medullosa</i>	Col de meollo
<i>botrytis</i>	Coliflor y Romanescu	<i>palmifolia</i>	Col de Jersey
<i>capitata</i>	Col	<i>ramosa</i>	Col de mil cabezas
<i>costata</i>	Col tronchuda	<i>sabauda</i>	Col de Saboya
<i>gemmifera</i>	Col de Bruselas	<i>sabellica</i>	Kale
<i>gongylodes</i>	Colirrabano	<i>viridis</i>	Col forrajera
<i>italica</i>	Brócoli		

Por otro lado, los fitoquímicos, especialmente los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas desempeñan un papel clave en la nutrición humana, la salud, el bienestar y la prevención de enfermedades (Hashem et al., 2012). Los científicos han estudiado muchos alimentos y componentes dietéticos con el fin de encontrar posibles asociaciones con el aumento o disminución del riesgo de cáncer, así como otras enfermedades (NIH, 2012).

El papel protector potencial de las verduras crucíferas de *Brassica oleracea* L. y los componentes activos presentes en estas verduras, como los isotiocianatos (Hayes et al., 2008) y el indol-3-carbinol, ha sido ampliamente estudiado en modelos experimentales de carcinogénesis *in vitro* e *in vivo*. Los resultados han demostrado consistentemente que los agentes quimiopreventivos derivados de esta clase de vegetales de la familia Cruciferae influyen en la carcinogénesis durante las fases de iniciación y promoción del desarrollo del cáncer (Murillo y Mehta, 2001).

Por su alto potencial nutricional, el principal uso de los vegetales de *Brassica oleracea* L. (brócoli, kale, col, coliflor, col de Bruselas etc.) es sin duda como un alimento de excelencia. Estos vegetales crucíferos de hortaliza son llamados “superfoods”, la población mundial crece rápidamente y la gente demanda alimentos

que sean sanos y nutritivos (**Agronegocios 2011**). Se ha descubierto que la especie *Brassica oleracea* L. es altamente vitamínica (vitaminas A, C y K), además de rica en potasio y fibra. Su consumo frecuente ha sido recomendado ya que pudiera reducir los riesgos de diabetes y anemia por su contenido de hierro, así como algunos tipos de cánceres como colon, mama y próstata (**Hecht, 2000; McCullough et al., 2003**) ya que los vegetales de esta contienen, fitocompuestos como los glucosinolatos y sus derivados isotiocianatos, los cuales son reconocidos por sus propiedades que ayudan a combatir a las células cancerígenas (**Zamora, 2016**). y que además los convierten en un alimento antioxidante que ayuda a retrasar el envejecimiento (**Giovannucci et al., 2003**)

1.2.8 *Brassica oleracea* L. var *italica*: Brócoli

La variedad *italica* Plenck de *Brassica oleracea* L. (**Figura 1.5**) mejor conocida como brócoli, brécol o bróculi, es originaria del Mediterráneo oriental, fueron conocidas en el Próximo Oriente como coles de Chipre o de Siria, la expansión a Europa se dio durante el siglo XVI. Inicialmente se cultivó en la Comunidad Valenciana y Cataluña, posteriormente el cultivo se extendió a otras regiones españolas como Murcia, Andalucía, en fases más tardías es posible encontrarlo en regiones como Extremadura, Rioja, Navarra, Aragón, Castilla La Mancha (**Maroto, 2002**).

El brócoli es una planta bianual que se desarrolla fundamentalmente durante las estaciones de invierno y primavera.; tiene un color verde azulado, con hojas rizadas y festoneadas que llegan a presentar hendiduras en su base. El tallo, único, finalizado por la pella principal que es una masa de botones florales de los cuales la mayor parte pueden desarrollarse totalmente (**Baixauli et al., 2017**). Además, posee un sabor característico debido, como en el caso de todas las crucíferas a la presencia de glucosinolatos y derivados, concretamente, a la del isotiocianato de alilo, butilo y la vinil-tio-oxazolina (**Maroto, 2002**).

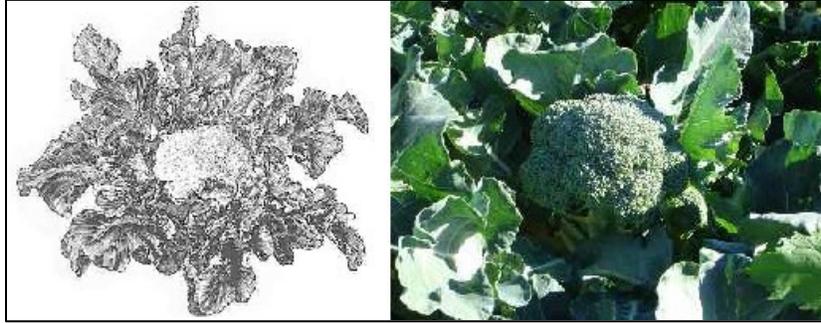


Figura 1.5 Brassica oleracea L. var. italica: brócoli (CONSUMER 2019).

A partir de esta variedad (*italica*), existen diferentes tipos de brócoli, que se diferencian por lo apretado o suelto del brote, teniendo en cuenta el ciclo de formación de la planta, desde la siembra hasta su madurez, también, estas variedades se dividen en tempranas, medias o tardías (**Agronegocios 2011**).

En México las variedades más cultivadas de brócoli son las que se muestran a continuación en la **Tabla 1.2**.

A nivel mundial México ocupa uno de los primeros lugares como exportador de brócoli, ya que tan sólo en 2010 se registró una exportación total de 149.6 millones de dólares, teniendo como principales competidores a Guatemala y Ecuador (**Agronegocios, 2011**). Asimismo, es importante mencionar que entre el 70 y 80 por ciento del brócoli que se exporta es congelado y el resto fresco (**Hidroponia, 2016**).

Tabla 1.2 Variedades de brócoli más cultivadas en México (Díaz 2001; Zamora 2016; Seminis 2012).

Variedad	Características
Heritage 	Brócoli híbrido adaptable a la temporada de transición calor-frío, con planta vigorosa y cabezas atractivas de grano denso verde oscuro.
Ironman 	Brócoli híbrido con planta vigorosa, produce cabezas domadas, firmes y tolerantes a Tallo Hueco y Ojo de Gato, tiene una estructura semirecta, con hojas delgadas se adapta a la temporada de transición frío- calor.
Tláloc 	Se adapta a la temporada de transición calor húmedo (lluvias) a frío. Produce cabezas domadas, uniformes y de grano mediano a chico.
Triathlon 	Es un nuevo Brócoli de Sakata con clase propia. Triathlon produce cabezas densas y pesadas, en forma de domo y uniformes. No produce coloración morada en invierno.
Arcadia 	Brócoli robusto y vigoroso de madurez media tardía, con cabezas abovedadas, pesadas, muy firmes, de color verde oscuro y con un aspecto único "esmerilado". Tolerante al estrés por frío.
Expo 	De maduración tardía con domo firme y uniforme, las cabezas son pesadas desarrollando granos medianos. Se desempeña bien durante todo el otoño e invierno en el centro de México.

La producción de brócoli se puede realizar en toda la República Mexicana, sin embargo las áreas altamente productivas son la zona centro y zona oriente-centro (Figura 1.6), donde principales estados productores son: Guanajuato, el cual abarca el 90 por ciento de las hectáreas destinadas para su cultivo, motivo por el que destaca como principal productor de esta hortaliza con una producción de 186,093 Ton, seguido de Sonora con 18,375 t, Michoacán con 17,164 Ton, Jalisco con 15,152 Ton y Puebla con 11,862 Ton en el 2018 (SAGARPA, 2018).

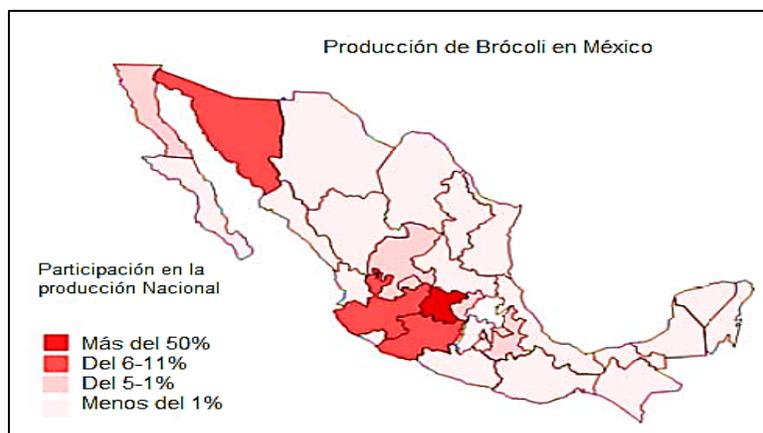


Figura 1.6 Producción de Brócoli a Nivel Nacional en México.

1.2.8.1 Estudios fitoquímicos

Los estudios fitoquímicos de *Brassica oleracea* var. *italica* indican que esta planta sintetiza metabolitos secundarios de tipo fenólico, así como sus derivados glucosilados, también se han reportado compuestos de tipo glucosinolato y sus derivados hidrolizados de tipo isotiocianato. En la [Tabla 1.3](#) se presenta el contenido metabólico de esta variedad.

Tabla 1.3 Contenido metabólico de Brassica oleracea L. var. italica.

Brassica oleracea var. italica	
Polifenoles y derivados glucosilados	<ul style="list-style-type: none"> • Quercetina • Catequina • Isoquercitrina • Kaempferol • Ác. Ferúlico • Ác. sinapico • Ác. cafeico • 3-O-soporósido de Quercetina • 3-O-soporósido de Kaempferol • 3-O-glucósido de Quercetina • 3-O-glucósido de Kaempferol • Diglucósido de Kaempferol • 3-O-soporósido-7-O-glucósido de kaempferol • 1,2-disinapicogentiobiosa • 1-sinapoil-2-feruloilgentiobiosa • 1,2-diferuloilgentiobiosa • 1,2,20 -trisinapoil gentiobiosa • 1,2-disinapoil-2-feruloilgentiobiosa • sinapoil-2,20 -diferuloilgentiobiosa • 3-O-diGlucosido-5-O-glucosido de Cianidina • 3-O-(Acil)diglucosido-5-O-glucosido de Cianidina • 3-O-(Acil1)(Acil2)diGlucosido-5-O-glucosido de Cianidina • 3-O-(Acil1)(Acil2)diGlucosido-5-O-(Malonil)glucósido de Cianidina
	Referencia
	De Nicola et al., 2013; Fiol et al.,2012; Olsen et al.,2010; Cartea et al. 2011; Heimler et al. 2006; Moreno et al. 2010; Price et al. 1998; Vallejo, et al., 2004

Glucosinolatos	<p>Glucobrasicina Glucobrasicinsulfonato Glucoiberina Progoitrina Glucorafanina Sinigrina Glucoalisina Glucosinalbina Gluconapina Glucoiberiverina 4-hidroxiglucobrasicina Glucoerucina Glucoberteroina Gluconasturtina 4-metoxiglucobrasicina Neoglucobrasicina 3-metilsulfinilpropilo glucosinolato 4-metilsulfinilbutil glucosinolato</p>	Referencia	<p>Baenas, et al., 2012; Crozier et al. 2007; Dalotto, 2018; Guriya, et al., 2015; Rutnakornpituk et al. 2018</p>
Isotiocianatos	<p>Sulforafano Isotiocianato de bencilo Isotiocianato de alilo Isotiocianato de fenitilo Isotiocianato de glucoerucina Isotiocianato de β-feniletilo</p>	Referencia	<p>Clarke, et al., 2008; Erlacher et al. 2013; Eunyoung y Gun-Hee 2008; Kntayya et al. 2018; Li et al. 2010; Li et al. 2016; Miao et al. 2017; Yeh y Yen 2005; Zhang, et al., 2003</p>

1.2.8.2 Estudios farmacológicos (citotóxicos)

Estudios recientes han demostrado que entre los 128 medicamentos contra el cáncer comercializados entre 1981 y 2010, aproximadamente 12 son productos naturales, y 21 se derivan de estos (**Newman, D. J. y Cragg, 2012**).

Las plantas pertenecientes a la familia de *Brassicas* son conocidas en todo el mundo por su rica composición bioactiva, que posee efectos principalmente como antioxidante y anticancerígena. Esta composición se encuentra resaltada por la presencia de glucosinolatos que se degradan enzimáticamente por la acción de la enzima mirosinasa a isotiocianatos, los cuales están señalados como los responsables de darle a estas plantas una pronunciada actividad quimiopreventiva (**Bachiega et al., 2016**).

Como ya se ha mencionado, los vegetales pertenecientes a *Brassica oleracea* como el brócoli, son conocidos y reconocidos por su actividad antioxidante, así como quimiopreventiva, y como su consumo cotidiano tiene efectos sobre el desarrollo del cáncer como lo menciona McCann en su reporte sobre seguimiento del consumo de brócoli por mujeres prenopausicas en 2004, en dónde se asocia el consumo de este con la disminución de casos de cáncer de mama prenopausico, ya que se observó que en la población de mujeres que incluían en su dieta al brócoli los casos de cáncer de mama era menor que en la población que no incluía a este vegetal en su alimentación diaria (**McCann et al., 2004**).

En la **Tabla 1.4** se presentan las líneas celulares cancerosas sobre las cuales se ha evaluado la actividad bioactiva de *Brassica oleracea* var. *italica*

Tabla 1.4 Líneas celulares sobre las cuales se ha probado la actividad de *Brassica oleracea* var. *italica* (brócoli).

<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>			
Interés	Línea celular	[C] efectiva, IC₅₀, GI₅₀	Referencia
Brotes (extracto)	Células de cáncer de riñón 786-0	GI ₅₀ 123.6 µg/mL	(Bachiega et al. 2016)
	Células de cáncer de mama MCF-7	GI ₅₀ 96.7 µg/mL	(Bachiega et al. 2016)
	Cáncer de colon SW480	[C]ef. 2.5mg/mL %inh= 80%	(Paško et al. 2018)
Semillas (extracto)	Cáncer de próstata PC-3	IC ₅₀ 38.45 µg/mL	(Chaudhary et al. 2014)
	Células de cáncer de riñón 786-0	GI ₅₀ 12.0 µg/mL	(Bachiega et al. 2016)
Semillas enriquecidas con Selenio (extracto)	Cáncer de riñón 786-0	GI ₅₀ 20.7 µg/mL	(Bachiega et al. 2016)
	Células de glioblastoma U251	GI ₅₀ 28.5 µg/mL	(Bachiega et al. 2016)
Semillas con 3,5 y 7 días de germinación (extracto)	Cáncer de próstata PC-3	IC ₅₀ 73.7 µg/mL; IC ₅₀ 84.56 µg/mL; IC ₅₀ 67.17 µg/mL	(Chaudhary et al. 2014)
Floración (extracto)	Cáncer de próstata PC-3	IC ₅₀ 25.94 µg/mL	(Chaudhary et al. 2014)
	Cáncer de colon HCT116	IC ₅₀ 3.88 µg/mL	(Motawea et al. 2011)
	Cáncer de hígado HepG2	[C]ef. 2.5mg/mL %inh= 80%	(Paško et al. 2018)
Forraje (extracto)	Cáncer de próstata PC-3	IC ₅₀ 143.29 µg/mL	(Chaudhary et al. 2014)

[C] ef: concentración efectiva IC₅₀: concentración de inhibición de proliferación en un 50% GI₅₀: concentración de inhibición de crecimiento en un 50%

1.2.9 *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*: Kale

Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), es comúnmente cultivada en Europa Central y del Norte, así como en América del Norte, y pertenece a la familia Brassicaceae y es una de las formas más antiguas de la familia de la col, ya que se cree que la col rizada se ha utilizado como cultivo alimentario desde los principios del año 2000 a. C. Los viajeros y migrantes a lo largo de los años han inducido este vegetal a diferentes partes del mundo (Neugart *et al.*, 2012).

La col rizada (kale) es un vegetal de hojas verde oscuro (a veces con púrpura) que están insertas en un tallo único que va creciendo hacia arriba, y se van cosechando las hojas más antiguas (Figura 1.7). Este tallo puede llegar a ser muy largo, de hasta 2 m, y se cosechan las hojas a lo largo de muchos meses. Es una verdura que se caracteriza por ser fácil de cultivar, resistente a temperaturas bajas y producir por un periodo largo de tiempo (Onegreenplanet, 2016).

Bajo la denominación de kale se agrupan un interesante grupo de berzas o coles rizadas que permiten diversificar la producción, cada uno tiene formas, colores y tamaños de hoja diferentes, que pueden ser más lisas, más redondeadas, más curvadas, más rizadas o más partidas (Tabla 1.5) (Reynoso, 2019,)

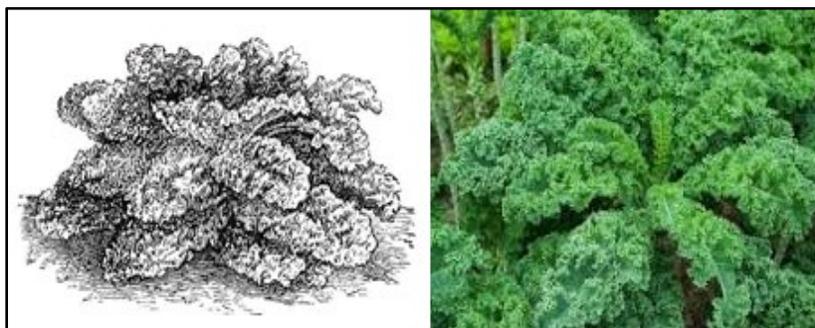


Figura 1.7 *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*: kale.

Tabla 1.5 Variedades de kale.

Variedad		Características
Kale ruso rojo		Hojas planas y largas irregulares. Su color es rojo con las nervaduras color rojizo- morado. Su sabor es poco picante pero considerado de los kales más dulces.
Kale toscano		Color verdoso azulado. Hojas largas y estrechas. Al cocinarse no pierde su firmeza. Su sabor es un poco menos amargo que las otras variedades.
Kale redbor		Su color es rojo/morado oscuro. Las hojas son rizadas. Utilizada para cocinar y decorar en el jardín y arreglos florales.
Kale rizado		Color verde oscuro y bordes rizados, su sabor es un poco picante y amargo. Es mejor consumir hojas jóvenes, con sabor menos amargo.
Berza verde (lisa o rizada)		Color verde opaco o brillante, depende de la variedad. Hojas redondas y anchas, puede ser lisa o rizada.

(Reynoso 2019, Salcedo, 2021, CONDELMED, 2019)

1.2.9.1 Estudios fitoquímicos

A diferencia del brócoli, el kale ha sido poco explorado en cuanto a su contenido metabólico, sin embargo, los reportes que se han realizado señalan que contiene principalmente polifenoles, polifenoles glucosilados y compuestos organosulfurados de tipo glucosinolato. A continuación, en la tabla siguiente, se enlistan los metabolitos secundarios reportados para *Brassica oleracea* L. var. *sabellica* (Tabla 1.6).

Tabla 1.6 Contenido metabólico de Brassica oleracea L. var. sabellica.

Brassica oleracea var. sabellica			
Polifenoles	<ul style="list-style-type: none"> • Kaempferol • Cianidiana • Quercetina • Catequina • Luteolina • Epicatequina • Ác. ferúlico • Ác. sinápico • Ác. cafeico • Ác. gentísico • Ác. salicílicos 	Referencia	(Olsen et al., 2009; Zhang et al., 2003; Jeon et al., 2018; Biegańska-Marecik et al., 2017; Neugart et al., 2012; Schmidt et al., 2010; Fratianni et al., 2014; Mollica et al., 2018; Michalak et al., 2020; Ayaz et al., 2008; Hahn et al., 2016)
Flavonoides glucosilados	<ul style="list-style-type: none"> • 3-[2-sinapoilglucopiranosil (1,2) glucopiranosido]-7-[glucopiranosil (1,4) glucopiranosido de Kaempferol • Tetraglucosido de Kaempferol • Sinapoil tetraglucosido de Kaempferol • 3-[-2-feruloilglucopiranosil (1,2) glucopiranosido]-7-[glucopiranosil (1, 4) glucopiranosido] de Kaempferol • Cumaroil tetraglucosido de Kaempferol • 3-O-soporósido-7-O-glucósido de kaempferol • 1,2-disinapoilgentiobiosa • 1-sinapoil-2-feruloilgentiobiosa • 3-O-soporotriosa-7-O-glucosa de Kaempferol • 3-O- (metoxicafeilo/cafeilo)- soporosa -7-O-glucosa de Kaempferol • 3-O- soporósido -7-O-glucosido de Kaempferol • 3-O- soporotriosa -7-O- soporósido de Kaempferol • 3-O- soporósido -7-O- soporósido de Kaempferol 	Referencia	(Neugart et al.,2012; Cartea et al. 2011; Heimler et al. 2006; Moreno et al. 2010; Price et al. 1998; Vallejo, et al., 2004; Olsen et al.,2010)

	<ul style="list-style-type: none"> • 3-O-tetraglucosa-7-O- saporosa de Kaempferol • 3-O-(sinapoil/cafeilo)- saporosa -7-O-glucosa de Kaempferol • 3-O- (feruloil/cafeilo)- saporosa -7-O-glucosa de Kaempferol • 3-O- saporotriosa de Kaempferol • 3-O-(sinapoil)- saporosa de Kaempferol • 3-O-(feruloil)- saporotriosa de Kaempferol • 3-O-(feruloil)- saporosa de Kaempferol • 3-O- saporosa de Kaempferol 		
Glucosinolatos	<ul style="list-style-type: none"> • Glucobrasicina • Glucobrasicinsulfonato • Glucoiberina • Progoitrina • Glucorafanina • Sinigrina • Glucoalisisina • Glucosinalbina • Gluconapina • Glucoiberiverina • 4-hidroxiglucobrasicina • Glucoerucina • Glucoberteroina • Gluconasturtina • 4-metoxiglucobrasicina • Neoglucobrasicina • 3-metilsulfinilpropilo glucosinolato • 4-metilsulfinilbutil glucosinolato 	Referencia	(Baenas, et. al., 2012; Crozier et al. 2007; Guriya, et al., 2015; Rutnakornpituk et al., 2018)

1.2.9.2 Estudios farmacológicos

El kale al igual que otros miembros del género *Brassica* ha sido ampliamente considerado como potencialmente preventivos del cáncer (Tabla 1.7). Ya que sus estudios fitoquímicos han mostrado un perfil metabólico conformado principalmente por compuestos de tipo glucosinolato e isotiocianato similar al de los demás vegetales crucíferos.

Se ha encontrado que varios isotiocianatos presentes en vegetales crucíferos como el kale, exhiben efectos anticancerígenos contra diferentes tipos de cáncer, como el osteosarcoma, glioblastoma, cáncer de mama, próstata, hígado, pulmón y colon (Kim *et al.*, 2009; Talalay y Fahey, 2001; Chang, 2019; Jakubikova, 2005).

Tabla 1.7 Reportes farmacológicos del Kale.

<i>Brassica oleracea</i> var. <i>sabellica</i>		
Actividad	[C] efectiva	Referencia
Antioxidante	No reportado	Sikora <i>et al.</i> , 2008; Giorgetti 2018, Ziets 2010
	0,1 mM	Kasprzak, 2018
	33.22 μ M Trolox/g	Sikora <i>et al.</i> , 2012
	2.34 - 5.1 mmol de Fe/100 g	Olsen 2009
Caco-2	10-150 mg de EAG/L	Olsen 2012; Clarke 2016
HT-29		
HCT 116		

1.2.10 Compuestos organosulfurados

Los productos naturales que contienen azufre se producen en prácticamente todos los organismos vivos. El azufre es un compuesto esencial en el metabolismo primario y para la biosíntesis de varios metabolitos secundarios, como fitoalexinas, glucosinolatos y aliinas. Ejemplos representativos de compuestos de este tipo incluyen el aminoácido cisteína y el cofactor enzimático biotina, ácido lipoico, y tiamina. el antibiótico isopenicilina N, el aceite de mostaza sinigrina, y α -tertienilo, que está aislado de las caléndulas (Figura 1.8). Estos compuestos metabólicos juegan un papel vital en la fisiología y protección de las plantas contra varios estreses ambientales (Blažević *et al.*, 2020).

Como su nombre lo indica, los compuestos organosulfurados son compuestos orgánicos que contienen átomos de azufre enlazados a átomos de carbono y se pueden encontrar en algunos alimentos hortícolas por ejemplo del género *Allium*, incluyendo ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium cepa* L.) (Melino et al., 2011) y también en los vegetales crucíferos como el brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck) y el kale o col crespa o rizada (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), entre otros. Además, estos compuestos organosulfurados son los responsables del olor y gusto característicos de estas hortalizas y suelen actuar como mecanismo de defensa ante depredadores (Begoña de Ancos et al., 2016). Se ha reportado que varios COS de origen natural son los responsables de muchas propiedades nutricionales, medicinales y terapéuticas y se han reconocido por sus efectos quimiopreventivos, contra el cáncer de estómago, colorrectal y de seno (Park y Pezzuto 2002; Bianchini y Vainio, 2001).

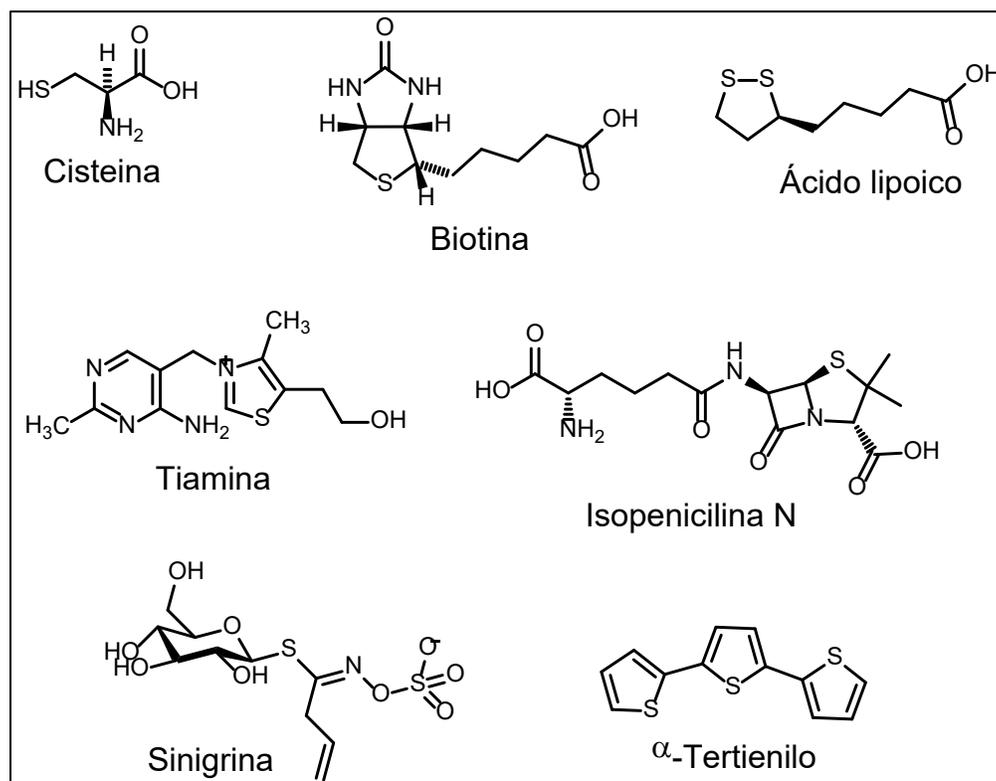


Figura 1.8 Compuestos sulfurados del metabolismo primario y secundario (Blažević et al., 2020).

1.2.10.1 Glucosinolatos

Los glucosinolatos son los principales metabolitos secundarios en muchas especies de vegetales crucíferos y son considerados pesticidas naturales al ser tóxicos para los insectos. Las verduras crucíferas contienen glucosinolatos estables en las cantidades de 1.5 a 2 $\mu\text{g} / \text{g}$ (**Saban, 2018**). Estos compuestos organosulfurados son aniones orgánicos solubles en agua, que incluyen hasta el momento aproximadamente 120 compuestos, su estructura química corresponde a ésteres β -tioglucósidos N-hidroxisulfato o ésteres (Z)-N-hidroximinosulfato o S-glucopiranosil tihidroximatos. Poseen un átomo de azufre unido a una β -D-glucopiranososa y una cadena lateral (R) sobre el carbono α del grupo imino tal como se observa en la **Figura 1.9** (**Fahey et al., 2001; Chise et al., 2006; Suzuki et al., 2006**).

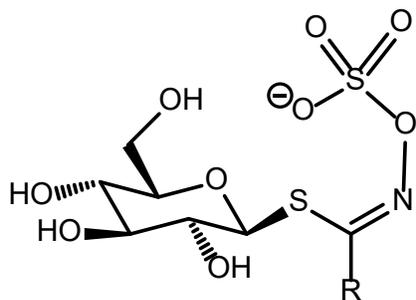


Figura 1.9 Estructura general de los glucosinolatos.

La cadena lateral los clasifica en glucosinolatos alifáticos, indólicos y aromáticos dependiendo de su precursor biosintético, según sea metionina, fenilalanina o triptófano, respectivamente (**Brown y Morra 1995; Hahn et al., 2016**) (**Figura 1.10**).

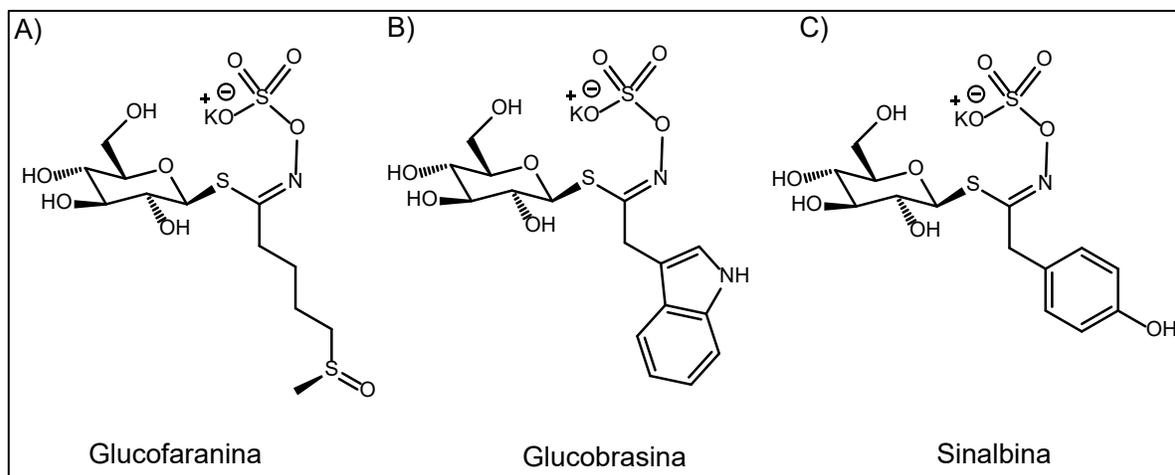


Figura 1.10 Ejemplo de glucosinolatos de acuerdo con la clasificación A) alifático B) indólico.

Los efectos biológicos no suelen ser atribuidos a los glucosinolatos directamente, sino más bien a productos tales como cianuros orgánicos isotiocianatos, oxazolidintionas, y tiocianatos y epitionitros que se liberan tras la degradación enzimática por mirosinasa (una β -D-tioglicosidasa,) en presencia de agua o no enzimática, dependiente de la temperatura y pH (**Vig et al., 2009**). Tal como se observa en la **Figura 1.11**, en el primer paso de la degradación la enzima escinde el glucosinolato para dar un tihidroximato-O-sulfonato el cual es inestable y una β -D-glucosa. A través de un reordenamiento Lossen en presencia de la proteína modificadora del epitioespecificador (ESM) y pH = 7 el aglucón se transforma en el derivado isotiocianato. Algunos glucosinolatos forman isotiocianatos inestables que por medio de una ciclación dan lugar a las oxazolidintionas o a alcoholes a través de la formación de un carbocación por la pérdida del grupo tiocianato. La degradación a nitrilos se lleva a cabo a pH = 4 en presencia de 3 tipos de proteínas, que son: las formadoras de tiocianato (TFP), las epitioespecificadoras (ESP) y las especificadoras de nitrilo (NSP). A partir de las agluconas de algunos glucosinolatos alifáticos insaturados la proteína ESP en combinación con la TFP, promueve la formación de epitionitros. Por otro lado, las proteínas TFP también promueven la formación de tiocianatos a partir de glucosinolatos como el de bencilo o el de 4-metilsulfanilbutilo. (**Hanschen et al., 2014**).

Algunos ejemplos de productos de hidrólisis de los glucosinolatos incluyen al indol-3-carbinol y al di-indolilmetano, los cuales poseen propiedades como antifúngicos antibacterianos y anticancerígenos y actúan por diversos mecanismos para prevenir el cáncer. Otro ejemplo es el sulforafano, el cual aumenta la actividad de las enzimas de fase II, donde el indol-3-carbinol aumenta las isoenzimas de fase I y detiene las células cancerosas en la fase G1 del ciclo celular. El di-indolilmetano inhibe la invasión de células cancerosas y neorigénesis tumoral (**Moon y Talreja 2016**).

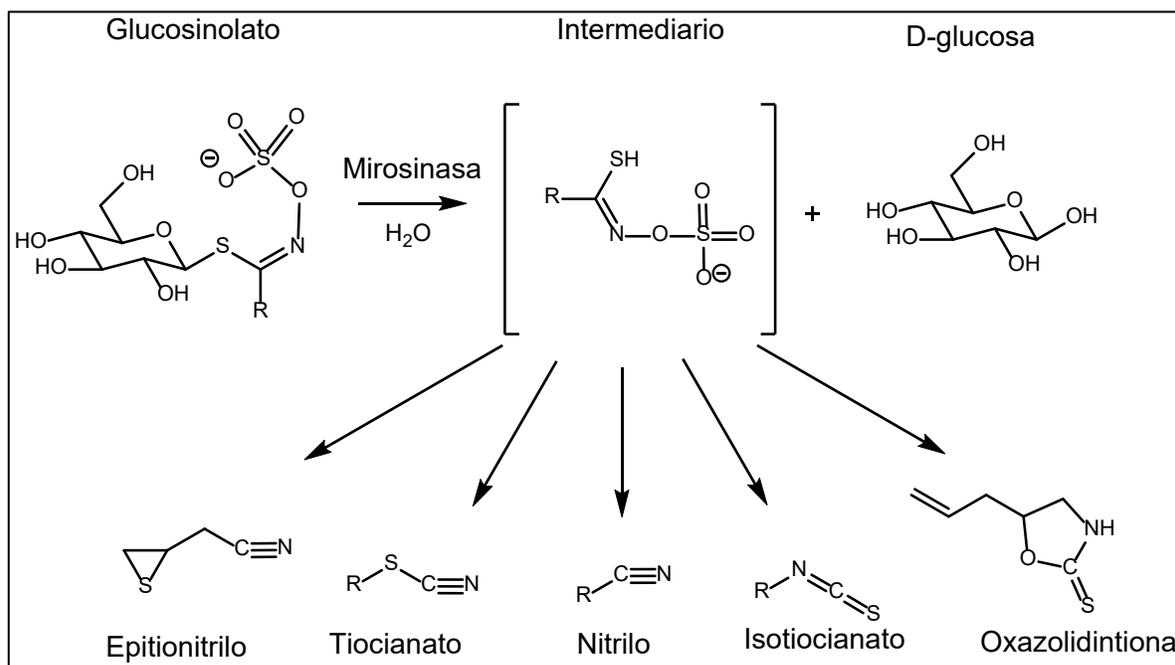


Figura 1.11 Hidrólisis de glucosinolatos por la enzima mirosinasa y sus diferentes productos de hidrólisis (Rask et al. 2000).

1.2.10.2 Isotiocianatos

Los isotiocianatos (ITC) son producto de degradación de los glucosinolatos siendo su estructura general $R-N=C=S$, donde R puede ser de tipo indólico, aromático o alifático, dependiendo del aminoácido precursor del cual provenga el glucosinolato (**Satyavan, 1989; Wu et al., 2009**). La familia Brassicaceae es conocida por su alto

contenido de ITC, se sabe que se encuentran presentes en verduras en crucíferas como el brócoli y kale (Figura 1.12) (Kala et al.,2018).

Se conoce que estos compuestos ayudan a disminuir el riesgo de enfermedades degenerativas asociadas con el consumo de verduras ya que se ha demostrado que muchas ITC previenen la carcinogénesis mediante la desintoxicación mejorada de carcinógenos reactivos a través de la inducción de enzimas de fase II como glutatión S-transferasas, NAD(P)H: quinona reductasa, hidrolasa de epóxido y UDP-glucuronosil-transferasas. Los ITC también bloquean activación del carcinógeno mediante la reducción de los niveles de expresión de las enzimas de la fase I y de estimular la apoptosis de las células dañadas (Zhang, 2004; Fahey et al., 2001)

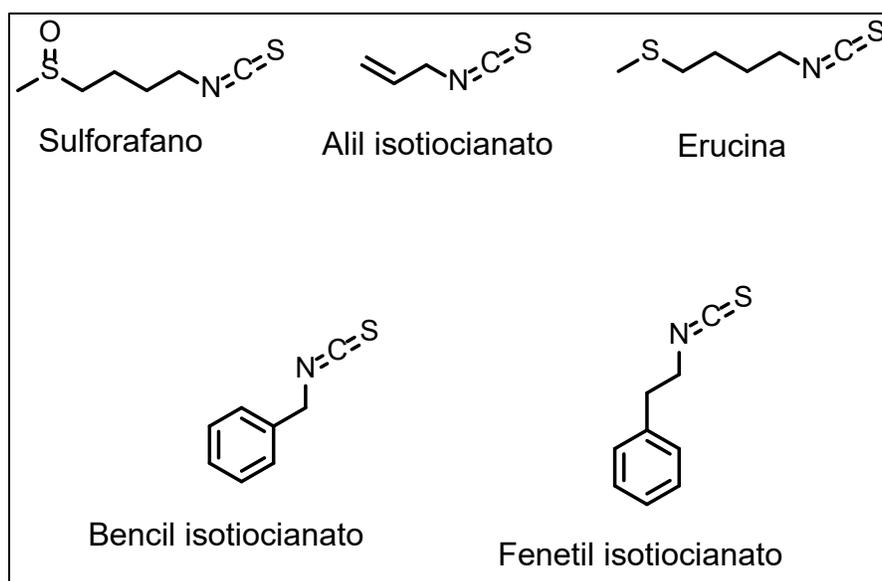


Figura 1.12 Isotiocianatos reportados en vegetales crucíferos (Kala et al.,2018).

En la siguiente tabla se muestran los estudios farmacológicos sobre líneas celulares de cánceres humanos reportados para isotiocianatos, algunos de ellos reportados en vegetales crucíferos de *Brassica oleracea* L. (Tabla 1.8)

Tabla 1.8 Efecto citotóxico de Isotiocianatos en líneas celulares de cáncer.

Isotiocianatos			
Interés	Línea celular	[C] efectiva, IC ₅₀ , GI ₅₀	Referencia
Sulforafano	Colon SW620 Caco-2 HCT116 HT-29	[C] ef. 20µM [C]ef. 20µM [C]ef. 15 µM [C]ef. 15 µM, IC ₅₀ : 35 µM, IC ₅₀ : 42.3 µM	Khoobchandani 2013, Zhang 2003, Sanoghong 2015, Suddek 2013, Yeh 2005, Maiyo 2016, Gowtham 2011, Lamy 2013, Efstathiou 2014, Perles 2011
	Mama MCF-7 SUM159	IC ₅₀ : 41.1 µM, IC ₅₀ : 16 µmol/L IC ₅₀ : ~10 µmol/L	
	Hígado HepG2	IC ₅₀ 150 µg/mL, IC ₅₀ 125 µg/mL, IC ₅₀ 6.13 µM, IC ₅₀ 12.8 µM, IC ₅₀ 65.20 µM, IC ₅₀ 79.65 µM, IC ₅₀ 192.71 µM, IC ₅₀ : 40 µM	
	Próstata DU145 LnCap	[C]ef. 10µM [C]ef. 10µM	
	Glioblastoma U251 U87	[C]ef. 40 µM, IC50: 28.91 µM [C]ef. 40 µM, IC50: 26.60 µM	
	Gástrico AGS MKN45	IC ₅₀ : 112 µg/mL IC ₅₀ : 125 µg/mL	
	Páncreas CMC	IC ₅₀ : 10-15 µM	
	Isotiocianato de bencilo	Hígado HepG2	
Isotiocianato de alilo	Hígado HepG2	IC ₅₀ : 11.20 µM	
Isotiocianato de fenitilo	Hígado HepG2	IC ₅₀ : 23.18 µM	
Isotiocianato de glucoerucina	Hígado HepG2	IC ₅₀ : 10 µM, IC ₅₀ 35.50 Mm	
Isotiocianato de beta feniletilo	Hígado HepG2	IC ₅₀ : 24.60 µM	

1.2.10.3 Fitoalexinas

Las fitoalexinas crucíferas son compuestos de tipo indol que fueron descritas por primera vez por Müller y Börger en 1940, en un estudio que realizaban sobre la interacción entre *Phytophthora infestans* y *Solanum tuberosum* (**García y Pérez, 2003; Pedras y Ahiahonu, 2005**). Muchos de estos compuestos son derivados de la ruta biosintética de los fenilpropanoides y estructuralmente son muy diversos, así como sus actividades biológicas (**Jahangir et al., 2009**). Tienen bajo peso molecular algunos actúan como compuestos antimicrobianos (**Pedras y Ahiahonu, 2005; Ahuja et al., 2012**) y se consideran parte del mecanismo de defensa de las plantas (**Ortuño et al., 2006**) así como elementos clave en el mecanismo de resistencia a infección (**Hammerschmidt, 1999**). Son sintetizadas por angiospermas y dicotiledóneas, en 16 familias, siendo las familias Brassicaceae, Leguminosae y Solanaceae, en las cuales se han identificado más fitoalexinas (**García y Pérez, 2003; Ahuja et al., 2012**).

Las fitoalexinas que pertenecen a la familia Brassicaceae, según **Takasugi et al.** (1986), tienen una estructura única, que está conformada por un anillo indol, que presenta sustituciones en el carbono 3, así como adiciones de átomos de azufre y nitrógeno (**Harbone, 1999; Pedras y Ahiahonu, 2005; Ahuja et al., 2012**). Además, algunas fitoalexinas pertenecientes a la familia presentan un grupo tiocarbamato (**Islam, 2008**) o ditiocarbamato, El primer reporte de una fitoalexina identificada en la familia Brassicaceae se hizo en 1986 (**Takasugi et al., 1986; Islam, 2008**), actualmente se tiene conocimiento de 44 tipos de fitoalexinas (**Ahuja et al., 2012**), dentro de las cuales se encuentran, la wasalexina A aislada de *Wasabia japonica* (**Pedras et al., 1999**), la caulilexina C, aislada de *B. oleracea* (**Pedras et al., 2006**), la brasilexina de *B. rapa*, la camalexina de *A. thaliana*, la ciclobrasinina, la metoxibrasinina, la espiobrasinina, el 3-indolecarbaldéhidido (**Takasugi et al., 1987; Pérez y Pérez, 2004**), el brasicanal A (**Pedras et al., 2005**) y brasitina que fue aislada de *Raphanus sativus* (**Monde et al., 1995**) (**Figura 1.13**).

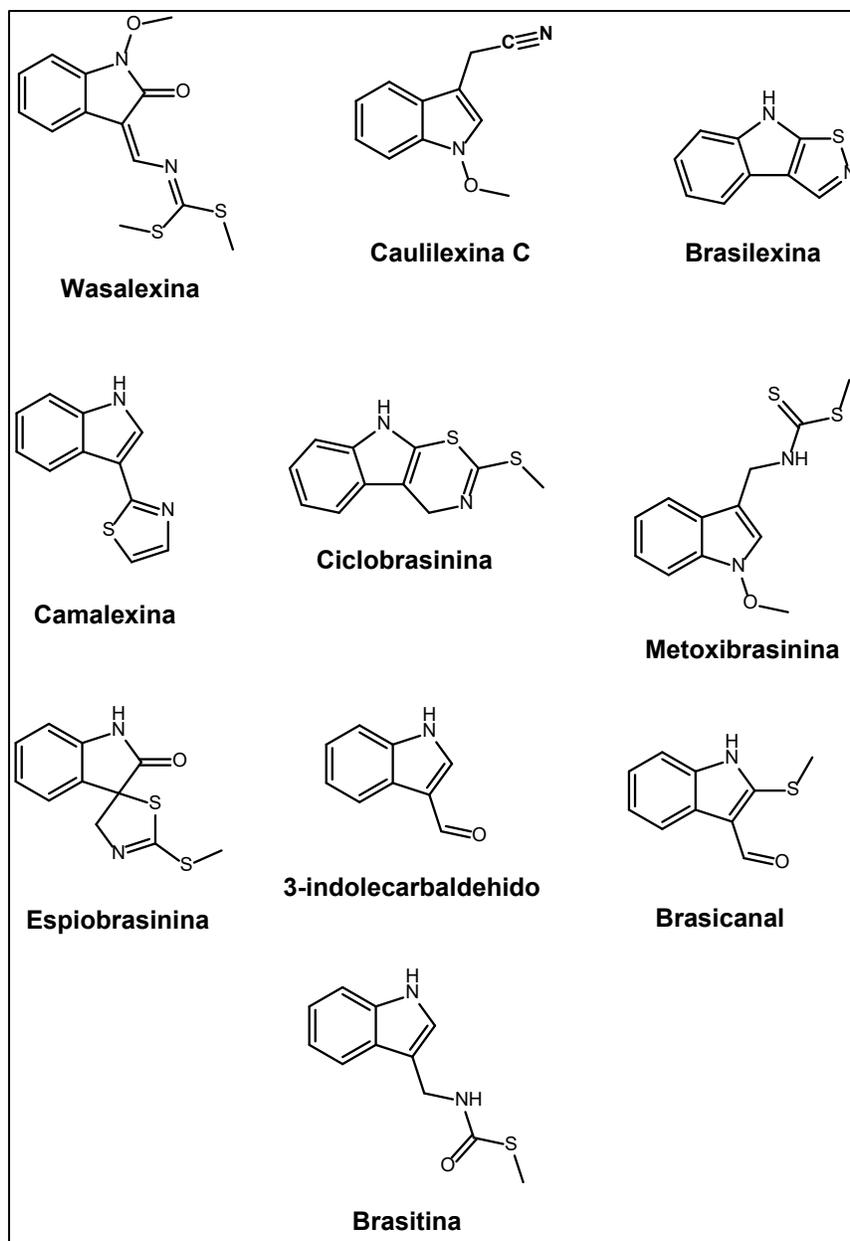


Figura 1.13 Fitoalexinas aisladas de productos naturales.

Las fitoalexinas han sido empleadas en formulaciones de agroquímicos sintéticos utilizados como fungicidas y herbicidas (**Pedras y Ahiahonu, 2005; Glawisching, 2007**). Se ha determinado que las fitoalexinas son tóxicas para una amplia gama de microorganismos fitopatógenos tales como hongos y bacterias, así como para herbívoros (**Marinelli et al., 1995**). Algunas de las especies que se reportan

susceptibles son *Puccinia coronata* (Ebel, 1986), *Penicillium digitatum* (Carbajo, 2004), *Phytophthora infestans* (Ahuja et al., 2012), *Botrytis cinerea* (Pedras y Ahiahonu, 2005).

1.2.11 Compuestos fenólicos

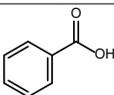
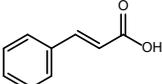
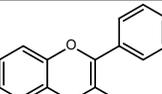
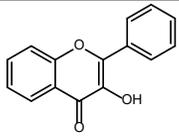
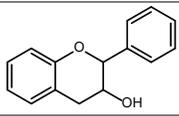
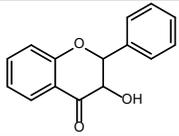
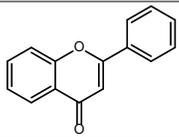
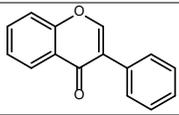
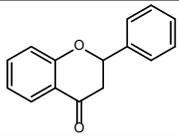
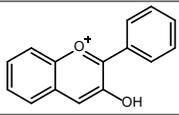
Los compuestos fenólicos o polifenoles (CP) son fitoquímicos naturales del metabolismo secundario de las plantas originados por la vía del ácido shikímico y de los fenilpropanoides. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en vegetales, frutas, cereales, leguminosas y bebidas. En las plantas cumplen funciones de protección contra los rayos UV, ataque de patógenos como bacterias, hongos y virus, así como daños físicos, químicos y mecánicos, además los CP son los responsables de los sabores astringentes y amargos de los alimentos (Scalbert et al., 2005).

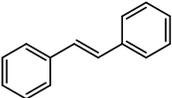
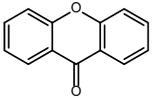
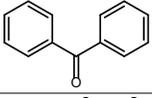
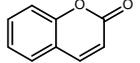
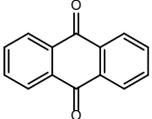
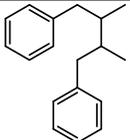
Los compuestos fenólicos contienen en su estructura al menos un anillo aromático fenol unido a uno o más grupos hidroxilos, además pueden estar asociados con hidratos de carbono y ácidos orgánicos, así como entre ellos mismos, en consecuencia, existen moléculas fenólicas simples hasta compuestos fenólicos altamente polimerizados. Naturalmente los encontramos conjugados con mono y polisacáridos unidos con uno o más polifenoles (Vuolo et al., 2018). Se han identificado más de 8000 compuestos fenólicos, se pueden clasificar en distintos grupos en función al número de anillos fenol que poseen y de los elementos estructurales que se unen entre sí, por lo tanto, dependiendo de su estructura se clasifican en fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanos y taninos (Tabla: 1.9).

Actualmente los compuestos fenólicos son un tema de gran interés debido a sus efectos potencialmente benéficos para la salud los cuales incluyen propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antitrombóticos, anticoagulantes, antialérgicos, antiaterogénicas y antiinflamatorias, además están involucrados en la prevención de enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares, diabetes,

obesidad, enfermedades neurodegenerativas entre otras (Ozda T *et al.*, 2016). La propiedad antioxidante que ejercen los polifenoles es mayor o similar a la que ejerce la vitamina E, y está relacionada con su capacidad de quelación de metales y captación de radicales libres, la cual es brindada por la presencia de grupos hidroxilos y a la presencia de los dobles enlaces en el anillo aromático (Tresserra-Rimbau *et al.*, 2018).

Tabla 1.9 Clasificación de compuestos fenólicos (Shahidi F, Ambigaipalan P. 2015).

Clasificación	Subclasificación	Estructura
Fenoles simples		
		
Ácidos fenólicos	Ácidos hidroxibenzóicos	
	Ácidos hidroxicinámicos	
Flavonoides	Flavonoles	
	Flavanoles	
	Dihidroflavonoles	
	Flavonas	
	Isoflavonas	
	Flavanonas	
	Antiocianinas	

Estilbenos	
Xanthonas	
Benzofenonas	
Cumarinas	
Quinonas	
Lignanós	
Taninos	Taninos hidrolizables Proantocianidinas

1.2.12 Quimioinformática

El desarrollo paralelo de la ciencia computacional y la tecnología informática ha permitido innumerables avances en muchos campos. La quimioinformática se ocupa de la aplicación de métodos computacionales para abordar problemas químicos, con especial énfasis en la manipulación de información química estructural; está estrechamente relacionada con la química computacional, la quimiometría e incluso con la bioinformática (**Medina-Franco et al., 2009, Leach y Gillet. 2007**); el término se introdujo a fines de la década de 1990 y las definiciones más aceptables son las siguientes:

- A) Quimioinformática:** es la combinación de recursos informáticos para transformar los datos en información y la información en conocimiento, con el propósito de tomar más rápidamente mejores decisiones en el campo de la identificación y optimización de medicamentos (**Brown 1998**).

B) Quimioinformática: es un término genérico que engloba el diseño, creación, organización, gestión, recuperación, análisis, difusión, visualización y uso de información química (**Paris 2000**).

La quimioinformática es uno de los mejores ejemplos sobre como los datos producen información que a su vez promueve el conocimiento, a través del cual es posible el proceso de investigación y desarrollo en la industria farmacéutica y afines. Estas nuevas tecnologías permiten un mejor uso de recursos y del tiempo invertido en el proceso de identificación, desarrollo y optimización de nuevos medicamentos al combinar de manera científica las herramientas informáticas y tecnológicas con la comprensión tridimensional y transformación de la química orgánica, aplicada a la investigación terapéutica principalmente (**Martinez-Mayorga y Medina-Franco. 2009, Peniche-Trujillo, 2011**).

1.2.12.1 Recursos informáticos

Uno de los logros más importantes de la quimioinformática es la construcción de bases de datos, que ha hecho posible almacenar y recuperar información química de múltiples compuestos (**Engel y Gasteige. 2018**), representados en 2D y 3D, a través de las cuales por similitudes estructurales se puede realizar el trabajo predictor para el comportamiento y potencial de nuevas moléculas, actualmente la investigación, no puede prescindir de utilizar estas herramientas, ya que nos ayudan a interpretar el comportamiento de las moléculas y sus diferentes potenciales, a través de las predicciones de sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

A través de la quimioinformática, las bases de datos también nos pueden apoyar en la búsqueda de nuevas rutas de síntesis, así como en las mejoras de estas, o el diseño de compuestos novedosos, con mayor potencial de aplicación. Además, actualmente algunas bases de datos proporcionan predicciones para la elucidación estructural, blancos moleculares terapéuticos y uniones proteína-ligando que nos ayudan a identificar puntos y mecanismos de acción, todo esto, revolucionando, principalmente la búsqueda, el diseño y el descubrimiento de nuevos compuestos

bioactivos (**Engel y Gasteige. 2018**). Un par de ejemplos de bases de datos químicas y farmacológicas son:

DrugBank (DB): es una base de datos en línea completa y de acceso gratuito que contiene información sobre medicamentos y objetivos de medicamentos. Como recurso bioinformático y quimioinformático, combina datos detallados de fármacos (es decir, químicos, farmacológicos y farmacéuticos) con información completa del objetivo del fármaco (es decir, secuencia, estructura y vía). Esta base de datos es ampliamente utilizada por la industria farmacéutica, los químicos medicinales, los farmacéuticos, los médicos, los estudiantes y el público en general. Debido a su amplio alcance, referencias completas y descripciones de datos detalladas, DrugBank está permitiendo avances importantes en la industria de la medicina basada en datos (**Wishart et al., 2018**) (<https://go.drugbank.com/>).

Protein Data Bank (PDB): se estableció como el primer recurso de datos digitales de acceso abierto en toda la biología y la medicina. En la actualidad, es un recurso mundial líder para datos experimentales que son fundamentales para el descubrimiento científico. A través de un portal de información de Internet y un archivo de datos descargables, el PDB proporciona acceso a datos de estructura 3D para grandes moléculas biológicas (proteínas, ADN y ARN). Estas son las moléculas de la vida que se encuentran en todos los organismos del planeta y conocer la estructura 3D de una macromolécula biológica es fundamental para comprender su papel en la salud y las enfermedades humanas y animales, su función en las plantas y la producción de alimentos y energía, y su importancia para otros temas relacionados con la prosperidad y la sostenibilidad global. La Visión de RCSB PDB es permitir el acceso abierto al conocimiento acumulado de la estructura, función y evolución 3D de macromoléculas biológicas, expandiendo las fronteras de la biología fundamental, la biomedicina y la biotecnología (**Berman et al., 2000**) (<https://www.rcsb.org/>).

Por otro lado, la quimioinformática ha madurado hasta convertirse en una disciplina científica propia y única, cuenta con muchas aplicaciones en todas las áreas de la

química y en campos relacionados, siendo uno de sus papeles más importantes, su participación en el diseño de compuestos químicos, algunos de ellos inspirados en productos naturales (**Medina-Franco et al., 2009**) Algunos ejemplos de bases de datos de productos naturales son:

Natural Products Online: es un proyecto de código abierto para el almacenamiento, búsqueda y análisis de productos naturales (PN). La versión actual alberga **COCONUT**, una colección de productos naturales abiertos y uno de los recursos más grandes y mejor equipados para PN disponibles de forma gratuita y sin ninguna restricción (**Bedane y Singh, 2015**) (<https://coconut.naturalproducts.net/search/structure>).

FoodB: es una base de datos pública de la química y biología de componentes alimentarios. También proporciona información sobre macronutrientes y micronutrientes, como los constituyentes que dan a los alimentos su sabor, color, gusto, textura, aroma, así como nomenclatura de compuestos, descripción, información estructural, clasificación química, datos fisicoquímicos y fuentes alimenticias (**FoodB, 2021**) (<https://foodb.ca/>).

1.3 Justificación

El cáncer es un problema de salud pública, es la principal causa de muerte en todo el mundo, en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad alrededor de 10 millones de defunciones siendo los cánceres causantes de mayor número de muertes el de pulmón, colorrectal, hepático, gástrico y de mama (**OMS, 2022**). Actualmente en México es la cuarta causa de muerte. Al ser un problema de salud pública que afecta de manera indistinta a la población se considera de vital importancia la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos y o coadyuvantes que ayuden a proporcionar una mejor calidad de vida al paciente oncológico.

Estudios recientes han proporcionado evidencia de que los llamados alimentos funcionales poseen beneficios nutricionales y en algunos casos contienen componentes bioactivos con propiedades antimutagénicas y anticancerígenas; por lo que la dieta se ha convertido en una alternativa en la búsqueda de nuevos agentes quimiopreventivos y/o paliativos.

Dentro de los alimentos funcionales, se encuentran los vegetales tales como los crucíferos de *Brassica oleracea* L. (brócoli, kale, etc.) que son reconocidos por su actividad antioxidante, quimiopreventiva y anticancerígena, atribuidas principalmente a la presencia de metabolitos secundarios de tipo glucosinolato, sus derivados (isotiocianatos) y compuestos fenólicos.

Por lo tanto, sobre las bases de las ideas anteriormente expuestas, en el presente trabajo se ha propuesto, a partir de extractos metanólicos de los vegetales crucíferos de *Brassica oleracea* L., brócoli y kale, encontrar metabolitos secundarios con actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer. Así mismo realizar un estudio quimioinformático que nos permita determinar los posibles blancos terapéuticos y el potencial farmacológico de los compuestos más representativos de los vegetales crucíferos.

1.4 Hipótesis

Los extractos metanólicos de las variedades *italica* (brócoli) y *sabellica* (kale) de *Brassica oleracea* L., contendrán metabolitos secundarios que presentarán actividad anticancerígena *in silico* e *in vitro*.

1.5 Objetivo general

Obtener metabolitos secundarios puros de tipo fenólico y/o derivados de compuestos organosulfurados a partir de los vegetales crucíferos, brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) y kale (*Brassica oleracea* L. var. *sabellica*) que presenten actividad citotóxica. Así como realizar un estudio quimioinformático de los metabolitos secundarios de mayor interés farmacológico en estas variedades vegetales.

1.6 Objetivos específicos

- Obtener los extractos metanólicos a partir del bagazo y material fresco de las variedades vegetales de *Brassica oleracea* L. (brócoli y kale).
- Evaluar la actividad citotóxica de los extractos sobre líneas celulares de cáncer de próstata (PC3), hígado (Hep3B) y cervicouterino (HeLa).
- Aislar y purificar los metabolitos presentes en los extractos activos utilizando técnicas convencionales de cromatografía.
- Caracterizar los compuestos puros mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Determinar la CI_{50} de los compuestos puros sobre las líneas celulares más activas.
- Realizar un estudio quimioinformático de metabolitos secundarios distintivos de *Brassica oleracea* L.
- Contribuir al enriquecimiento químico-farmacológico de brócoli y kale como alimentos funcionales.

1.7 Referencias

- Adarsh, P. V., Geetanjali, R., Tarunpreet, S. T., Saroj, A. 2009. Bio-protective effects of glucosinolates – A review, *LWT - Food Sci. Technol.*; 42,1561-1572.
- Agronegocios, Subsecretaria de Fomentos a los Agronegocios. 2011. "Monografía de Cultivos de Brócoli." *Monografía de cultivos*; 1-9.
- Ahuja, I., Kissen, R. y Bones, A. M. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends plant sci.*; 17, 73-90.
- Aliaga Verdugo, A., Pereira Cunill, J. L., Serrano Aguayo, P., Pachón Ibáñez, J., Parejo Campos, J. y García-Luna, P. P. 2012. Nutrición y cáncer. *Nutr Hosp.*; 5, 17-32.
- Alkhenizan, A. y Hafez, K. 2007. The role of vitamin E in the prevention of cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Saudi Med*; 27, 409-14.
- Andrade Y. 2022. Impulsa tu salud y nutrición con superalimentos. https://content.web-repository.com/s/94418785202229741/uploads/Images/Impulsa_tu_Salus_y_nutricion_con_super_Alimentos-7736128.pdf
- Arias, M. 2017. "Gas Mostaza: La Primera Quimioterapia de La Historia." *Historias de la medicina, divulgación de curiosidades*; <https://arqueologiadelamedicina.com/2017/03/09/gas-mostaza-la-primera-quimioterapia-de-la-historia/> (30 de enero de 2019).
- Atkinson, J., Manor, D. y Parker, R. 2013. Vitamin E. *Encyclopedia of Biological Chemistry. Academic Press*; 2nd, 545-550.
- Awad, A. B., Burr, A.T. y Fink, C. S. 2005. Effect of resveratrol and b-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 72, 219–226.
- Awad, A. B., Chinnam, M., Fink, C. S. y Bradford, P. G. 2007. b-Sitosterol activates Fas signaling in human breast cancer cells. *Phytomedicine*; 14, 747–754.
- Bachiega, P., Salgado, J. M., de Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Schwarz, K., Tezotto, T., Morzelle, M. C. 2016. "Antioxidant and Antiproliferative Activities in Different Maturation Stages of Broccoli (Brassica Oleracea Italica) Biofortified with Selenium." *Food Chem.*; 190, 771-76.
- Baenas, N., Moreno, D. A. y García-Viguera, C. 2012. "Selecting Sprouts of Brassicaceae for Optimum Phytochemical Composition. *J. Agric. Food Chem.*; 60, 11409-20.
- Baixauli, C., y Maroto, J. V. 2017. "Bróculis, Coliflores y Coles." *Cultivos hortícolas al aire libre*; 371-434.
- Barbera-Mateos, J. M., Aguilera, Garca, C., M., Esperanza, Díaz, L., Duarte de Prato, A., Gálvez Peralta, J., Gil, Hernaández, A., Gómez, S., González-Gross, M., Granado, Lorencio, F., Guarner, F., Marcos, A., Martínez, Augustin, O., Nova, E., Olmedilla, Alonso, B., Pujol-Amat, P., Ramos, E., Romeo, J., Miguel, Tobal, F., Ramón,

-
- Vidal, D., Warnberg, J., Zarzuelo, Zurita, A. 2007. Monografía: Alimentos funcionales, aproximación a una nueva alimentación. *Ed. Dirección Gral. De Salud Pública y Alimentación*; 13-75.
- Begoña de Ancos, Sánchez-Moreno, C. y Fernández-Jalao, I. 2016. Compuestos funcionales en productos de IV YV gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*; 17, 130-148.
- Bedane, K. G., G. Singh. 2015. Reactivity and diverse synthetic applications of acyl isothiocyanates. *Arkivoc*; 6, 206–245.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. y Bourne, P. E. 2000. *Nucleic Acids Res.*; 28, 235-242.
- Bianchini, F., y Vainio, H. 2001. Allium vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer? *Environ Health Perspect.*; 109, 893-902.
- Blanco-Vaca, F., Cedo, L. y Julve, J. 2018. Phytosterols in cancer: From molecular mechanisms to preventive and therapeutic potentials. *Curr. Med. Chem*; 25, 6735-6749.
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C.E., Burow, M., Rollin, P. y Agerbirk, N. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis, and metabolism in plants. *Phytochem.*; 169, 112100.
- Britannica, T. Editors of Encyclopaedia 2015. Brassicáceas. *Enciclopedia Britannica*; <https://www.britannica.com/plant/brassica> (30 de enero de 2019).
- Brown, F. K. 1998. Chemoinformatics: What is it and how does it impact drug discovery? *Ann. Rep. Med. Chem.*; 33, 375-384.
- Brown, P. D. y Matthew J. Morra. 1995. "Glucosinolate-Containing Plant Tissues as Bioherbicides." *J.Agric.Food Chem.*; 43, 3070-74.
- Bruno, R. y Mah, E. 2014. *Vitamin E. Reference Module in Biomedical Research*; 3rd, 1-10.
- Bogusz J., Zrubek K., Rembacz KP., Grudnik P., Golik P., Romanowska M., Wladyka B. y Dubin G. 2017. Structural analysis of PIM1 kinase complexes with ATP-competitive inhibitors. *Sci Rep.*; 7, 13399.
- Cáceres L., Haslen, N., Vinageras, E., Menéndez A. Y., y Barreto P. J. 2016. Intervención nutricional en el paciente con cáncer. *Revista Cubana de Medicina*; 55, 59-73.
- Carbajo M. S. 2004. Tesis Sistemas alternativos a los fungicidas químicos para el control de *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. en limón. *Universidad Nacional de Tucumán*.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P. y Velasco, P. 2011. "Phenolic Compounds in Brassica Vegetables." *Mol.*; 16, 251–80.
- Chandrasekaran, M., Kannathasan, K., Venkatesalu, V. 2008. Antimicrobial Activity of Fatty Acid Methyl Esters of Some Members of Chenopodiaceae. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci*; 63, 331–336.
- Chang, J., Wang, M., Jian, Y., Zhang, F., Zhu, J., Wang, Q., & Sun, B. 2019. Health-promoting phytochemicals and antioxidant capacity in different organs from six varieties of Chinese kale. *Sci. Rep.*; 9, 20344.

Chaudhary, A., Sharma, U., Vig, A. P., Singh, B. y Arora, S. 2014. "Free Radical Scavenging, Antiproliferative Activities and Profiling of Variations in the Level of Phytochemicals in Different Parts of Broccoli (*Brassica Oleracea Italica*).” *Food Chem.*; 148, 373-80.

ChileBio. 2019. "6 Verduras Populares Que Se Domesticaron Desde La Misma Planta Silvestre.” *Biotecnología para una agricultura sostenible*. https://twitter.com/ChileBio_AG (25 de febrero de 2019).

Chise, S., Ohnishi-Kameyama, M., Sasaki, K., Murata, T. y Yoshida, M. 2006. *J. Agric. Food Chem.*; 54, 9430-9436.

Chew, F. S. (1988). Biological effects of glucosinolates. In H. G. Cutler (Ed.), *Biologically active natural products: Potential use in agriculture*. *Am. Chem. Soc.*; 155-181.

Clarke, J. D., Roderick H. Dashwood, y Ho, E. 2008. "Multi-Targeted Prevention of Cancer by Sulforaphane.” *Cancer Lett.*; 269, 291–304.

Combs, G. F. y McClung, J. P. 2017. Chapter 8 - Vitamin E. *The Vitamins*. *Academic Press*; 5th, 207-242.

CONDELMED. El kale. *El huerto urbano*; <https://www.elhuertourbano.net/el-kale/> 16 de marzo de 2019.

Costa, J. P., Ferreira, P. B., De Sousa, D. P., Jordan, J. y Freitas, R. M. 2012. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neurosci Lett*; 523, 115-118.

Cragg G. M., Newman D. J., Snader K. M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*; 60, 52-60.

Cragg G. M., Newman D. J. 2005. Plants as source of anticancer agents. *J. Ethnopharmacol.*; 100, 72-79.

Crozier, A., Clifford, M. N., Hiroshi A., et al. 2007. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet Secondary Metabolites in Fruits, Vegetables, Beverages and Other Plant-Based Dietary Components. *Ed. Wiley-Blackwell.*; 384.

Dalby, A. 2002. *Food in the Ancient World: An A-Z*. *Ed. London: Routledge*; 258-265.

Davoodbasha, M., Edachery, B., Nooruddin, T., Lee, S. Y. y Kim, J. W. 2018. An evidence of C16 fatty acid methyl esters extracted from microalga for effective antimicrobial and antioxidant property. *Microb Pathog*; 115, 233-238.

Díaz, Jiménez, V. 2001. "Importancia Del Cultivo Del Brócoli (*Brassica Oleracea* var. *Italica*) En México.” *Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro*.

Dalotto-Moreno, T.. 2018. "Inmunoterapia En El Cáncer.” *IntraMed* 78, 336-48.

Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., García-Viguera, C. 2012. Analysis of the tumoral cytotoxicity of Green tea-infusions enriched with broccoli. *Food Chem.*; 132, 1197-1206.

Drewnowski, A., y Gomez-Carneros, C. 2000. "Bitter Taste, Phytonutrients, and the Consumer: A Review.” *Am J Clin Nutr.*; 72, 1424-35.

Ebel, J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Ann Rev Phytopathol.*; 24, 235-264.

-
- Engel, T. y Gasteiger, J. 2018. Applied Chemoinformatics Achievements and Future Opportunities. *Ed. John Wiley & Sons.*; 648.
- Erlacher, M. et al. 2013. "Preclinical Evaluation of 4-Methylthiobutyl Isothiocyanate on Liver Cancer and Cancer Stem Cells with Different P53 Status." *PLoS ONE.*; 8, 70846.
- Eunyoung-Hong, L., y Gun-Hee, K. 2008. "Anticancer and Antimicrobial Activities of β -Phenylethyl Isothiocyanate in Brassica Rapa L." *Food Sci. Technol. Res.*; 14, 377-382.
- Fahey, J. W., A. T. Zalcmann, y Talalay, P. 2001. "The Chemical Diversity and Distribution of Glucosinolates and Isothiocyanates among Plants." *Phytochem.*; 56, 5-51.
- Ferrari C. K., Torres E. A. 2003. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomed Pharmacother.*; 57, 251-60.
- Ferreira Montero, I. J. y Luengo Fernández, E. 2007. La dieta como concepto terapéutico. Conceptos de alimento funcional y de nutracéutico. Situación actual de los alimentos funcionales y nutracéuticos. Aspectos legales. En 'Alimentos funcionales y nutracéuticos'. Coord: Emilio Luengo Fernández. *Ed. Sociedad Médica de Cardiología. Madrid*; 1-12.
- Fulwah, Y. A., Fadilah, S. A., Amany, Z. M., Nida, N. F., Rihaf, A., Ebtessam, S. A. y Ibrahim. A. A. 2019. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of *Lepidium sativum* seed oil. *Saudi J Biol Sci*; 26,1089-1092
- Foley, D. J. y White, L. R. 2002. Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease: food for thought. *JAMA*; 287, 3261-3.
- FoodDB. Web site <http://www.foodb.ca>. Accessed: June 2021.
- García, R., Pérez, L. 2003. Phytoalexins: a plant defense mechanism. *Rev Chapingo Ser Cie.*; 9, 5-10.
- Giorgetti, L., Giorgi, G., Cherubini, E., Gervasi, P. G., Della Croce, C. M., Longo, V. y Bellani, L. 2017. Screening and identification of major phytochemical compounds in seeds, sprouts and leaves of Tuscan black kale *Brassica oleracea* (L.) ssp *acephala* (DC) var. *sabellica* L. *Nat Prod Res.*; 32, 1617-1626.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., Willett, W. C., 2003. A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 12, 1403-1409.
- Glawischmig, E. 2007. Molecules of interest camalexin. *Phytochem.*; 68, 401-407.
- Gowtham, K. S. 2011. Allyl isothiocyanate A Promising drug for Liver Cancer. *Ed: LAP Lambert Academic Publishing*; 176
- Gupta, B, Chiang, L, Chae, K, Lee DH. 2013. Phenethyl isothiocyanate inhibits hypoxia-induced accumulation of HIF-1 α and VEGF expression in human glioma cells. *Food Chem.*; 141, 1841-1846.
- Guriya, R., Moon, A y Talreja, K. 2015. "Phytochemical Profiling and Characterization of Bioactive Compounds Frombrassica Oleracea." *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*; 7, 2-9.
- Hahn, C., Müller, A., Kuhnert, N. y Albach, D. 2016. "Diversity of Kale (*Brassica Oleracea* Var. *Sabellica*):

-
- Glucosinolate Content and Phylogenetic Relationships." *J. Agric. Food Chem.*; 64, 3215-25.
- Hashem, F. A. Motawea, H., El-Shabrawy, A. E., Shaker, K., El-Sherbini, S. 2012. "Myrosinase Hydrolysates of Brassica Oleraceae L. Var. Italica Reduce the Risk of Colon Cancer." *Phytotherapy Research.*; 26, 743-47.
- Hanschen F.S., Lamy E., Schreiner M., Rohn S. 2014. Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods. *Angew Chem Int Ed Engl.*; 53, 11430-50.
- Hayes, J.D., Kelleher, M. O., Eggleston, I. M. 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr.*; 47, 73-88
- Hecht S. S. 2000. Inhibition of carcinogenesis by isothiocyanates. *Drug Metabolism Reviews*; 32, 395-411.
- Heimler, D., Vignolini, P, Giulia-Dini, M., Francesco-Vincieri, F. y Romani, A. 2006. "Antiradical Activity and Polyphenol Composition of Local Brassicaceae Edible Varieties." *Food Chem.*; 99, 464-69.
- Herrera, C. F., Betancur Ancona, D., y Segura Campos, M. R. 2014. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad: péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria.*; 29, 10-20.
- Hidroponía, Conoce. 2016. "¿Cuál es la importancia del brócoli en la agricultura?" *Hidroponia Grupo hydro environment*. <http://hidroponia.mx/cual-es-la-importancia-del-brocoli-en-la-agricultura/> (12 de marzo de 2019).
- Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E. Y Dashwood, R. H. 2007. "Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis." *Instituto Nacional del Cáncer.*; 55, 224-36.
- INEGI. 2018. "Características de Las Defusiones Registradas En México Durante 2017." *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*: 13. http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf (29 de enero de 2022).
- INEGI. 2022. Estadística de defunciones registradas de enero a junio de 2021." *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021.pdf> (8 de junio de 2022)
- INMUJERES. 2021. "Sistema de Indicadores de Género". Instituto Nacional de las Mujeres: http://estadistica.inmujeres.gob.mx/formas/tarjetas/cama_cacu.pdf
- Inoue, Y., Hada, T., Shiraiishi, A., Hirose, K., Hamashima, H., Kobayashi, S. 2005. Biphasic effects of geranylgeraniol, terpene, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*; 49, 1770-1774.
- Islam, M. S. 2008. Tesis: Biotransformation of the phytoalexins brassinin, brassilexin and camalexin by *Alternaria brassicicola*. M.Sc. *University of Saskatchewan*, Canada.
- Jahangir, M., Hye, K. K., Young H, C., y Verpoorte, R. 2009. "Compounds in Brassicaceae." *Compr. Rev. Food Sci.*, 8, 31-43.

Jakubíková, J., Sedlák, J., Mithen, R. y Bao, Y. 2005. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzymes and MRP2 transcription, G2/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.*; 69, 1543-1552.

Jiménez-Salas, Z., Alvidrez-Morales, A. y González-Martínez, B. E. 2008. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*. <https://cpb-us-w2.wpmucdn.com/blogs.udla.edu.ec/dist/b/160/files/2016/03/tendencias-en-alimentos-funcionales-23w5ckm.pdf>

Jones, P. J., AbuMweis, S. S. 2009. Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*; 12, 147–151.

Ju, J., Picinich, S. C., Yang, Z., Zhao Y., Suh, N., Kong, A. N., Yang, C. S. 2010. Cancer preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis*; 31, 533–42.

Kala, C., Ali, S., Ahmad, N., Jamal Gilani, S. y Ali Khan, N. 2018. Isothiocyanates: a review. *Research Journal of Pharmacognosy*; 5, 71-89.

Kalra, E. K. 2003. Nutraceutical-definition and introduction. *AAPS PharmSci*; 5, 25-9

Kasprzak, K., Oniszczyk, T., Wójtowicz, A., Waksmundzka-Hajnos, M., Olech, M., Nowak, R. y Oniszczyk, A. 2018. Phenolic Acid Content and Antioxidant Properties of Extruded Corn Snacks Enriched with Kale. *J. Anal. Methods Chem.*; 1-7.

Keroletswe, N., Majinda, R. R. T., Masesane, I. B. 2018. A New 3-Prenyl-2-flavene and Other Extractives from *Baphia massaiensis* and Their Antimicrobial Activities. *Natural Product Communications*; 13, 1-15.

Khoobchandani, M., Bansal, P., Medhe, S., Ganesh, N. y Srivastava, M. M. 2012. Antioxidant and Antimutagenic Activities of Isothiocyanates Rich Seed Oil of *Eruca sativa* Plant. *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives*. Ed. Springer, Berlín, Heidelberg; 47-51.

Khurana, N., Talwar, S., Chandra, P.K., Sharma, P., Abdel-Mageed, A.B., Mondal, D. y Sikka, S.C. 2016. Sulforaphane increases the efficacy of anti-androgens by rapidly decreasing androgen receptor levels in prostate cancer cells. *Int. J. Oncol*; 49, 1609-1619.

Klein, A. P, Sattely, E. S. 2017. Biosynthesis of cabbage phytoalexins from indole glucosinolate. *Proc Natl Acad Sci.*; 114, 1910-1915.

Kntayya, S. B., Ibrahim M. D, Mohd Ain, N., Iori R., Ioannides, C. y Abdull Razis, A. F. 2018. "Induction of Apoptosis and Cytotoxicity by Isothiocyanate Sulforaphene in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells." *Nutrients*; 10, 1-15.

Koleff, P., Ocegueda, S. y Moreno, E. 2005. "Plantas Utilizadas En La Medicina Tradicional y Su Identificación Científica." *CONABIO*; 62, 12-15.

Krishnamoorthy, K., Subramaniam, P. 2014. Phytochemical Profiling of Leaf, Stem, and Tuber Parts of *Solenanthe amplexicaulis* (Lam.) Gandhi Using GC-MS. *Int Sch Res Notices*; 14, 5674-09.

Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares. 2017. "Brassicaceae Burnett | Cruciferae Juss. (Nom. Alt.)." *Laboratorio de Sistemática de Plantas vasculares: Depto. de ecología & ciencias ambientales*.

https://thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/brassicaceae.html.

Lamy, E., Scholtes, C., Herz, C. y Mersch-Sundermann, V. 2011. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of isothiocyanates. *Drug Metab Rev.*; 43, 387-407.

Lamy, E., Oey, D., Eißmann, F., Herz, C., Münstedt, K., Tinneberg, H.-R. y Mersch-Sundermann, V. 2013. Erucin and Benzyl Isothiocyanate Suppress Growth of Late-Stage Primary Human Ovarian Carcinoma Cells and Telomerase Activity *In Vitro*. *Fitoter. Res.*; 27, 1036-1041.

Leach, A. R. y Willet, V. J. 2003. "An Introduction to Chemoinformatics". Kluwer Academic Publishers, Ed. *Springer Dordrecht*, The Netherlands; 255.

Lee, L.T., Huang, Y.T., Hwang, J.J., et al. 2002 Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.*; 22,1615-27.

Lee, W., Woo, E. R., Lee, D. G. 2016. Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Free Radic Res*; 50, 1309-1318.

Li, Y., Zhang, T., Korkaya, H., Liu, S., Lee, H. F., Newman, B., Yu, Y., Clouthier, S. G., Schwartz, S. J. y Wicha, M. S., Sun. 2010. "Sulforaphane, a Dietary Component of Broccoli/Broccoli Sprouts, Inhibits Breast Cancer Stem Cells." *Clin. Cancer Res.*; 16, 2580-90.

Li, Z. S., Liu, Y. M., Fang, Z., Yang, L. M., Zhuang, M., Zhang, Y., y Lv, H. 2016. "Development and Identification of Anti-Cancer Component of Sulforaphane in Developmental Stages of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *Italica* L.)." *J. Food Nutr. Res.*; 4, 490-97.

Lozano, M., Ayuso Yuste, M. C., Bernalte García, M. J., García Pomar, M. I., Hernández García, M- T., Vidal Aragón de Olives, M. C., González García, J. A., García, J. y García, R. M. 2007. "Las Brassicas, Del Cultivo Tradicional Hacia Los Nuevos Retos." *Vida Rural*; 44-47.

Maiyo, F. C., Moodley, R. y Singh, M. 2016. Cytotoxicity, Antioxidant and Apoptosis Studies of Quercetin-3-O Glucoside and 4-(β -D-Glucopyranosyl-1-4- α -L-Rhamnopyranosyloxy)-Benzyl Isothiocyanate from *Moringa oleifera*. *Anticancer Agents Med Chem.*; 16, 648-56.

Marinelli, F. U. y Zanelli, R. 1995. Toxicity of 6-methoxymellein and 6-hydroxymellein to the producing carrot cells. *Phytochem* 42, 641-643.

Maroto Borrego, J. V. 2002. Horticultura Herbácea Especial. 198 3rd ed. ed. *MUNDI-PRENSA*. Madrid.

Martín Peña, G. 2017. Soporte Nutricional en el Paciente Oncológico: Cáncer y dieta. *Sociedad Española de Oncología Médica*; Cap.9 pp. 1-17

https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/infopublico/publicaciones/soporteNutricional/pdf/cap_09.pdf

f

Martínez-Mayorga, K. y Medina-Franco, J. L. 2009. Chemoinformatics Applications in Food Chemistry. *Adv. Food Nutr. Res.*; Editado por: Steve Taylor. Prensa Académica.

-
- Mayr, G. W., Windhorst, S. y Hillemeier, K. 2005. Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1,4,5- trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J Biol Chem.*; 280, 13229-40.
- McCann, S. E., Ambrosone, C. B., Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., Zhang, Y., & Shields, P. G. 2004. Breast Cancer Risk in Premenopausal Women Is Inversely Associated with Consumption of Broccoli, a Source of Isothiocyanates, but Is Not Modified by GST Genotype. *J. Nutr.*; 134, 1134-1138.
- McCullough, M. L., Robertson, A. S., Chao, A., Jacobs, E. J., Stampfer, M. J., Jacobs, D. R., Diver W. R., Calle, E. E. y Thun, M. J. 2003. A prospective study of whole grains, fruits, vegetables and colon cancer risk. *Cancer Causes Control*; 14, 959-970.
- Medina-Franco, J.; Martínez-Mayorga, K.; Bender, A.; Scior, T. Scaffold. 2009. Diversity Analysis of Compound Data Sets Using an Entropy-Based Measure. *QSAR Comb. Sci.*; 28, 1551-1560.
- Melino, S., Sabelli, R. y Paci, M. 2011. Allyl sulfur compounds and cellular detoxification system: effects and perspectives in cancer therapy. *Amino Acids*; 41, 103–112.
- Miao, Z., Fei Y., Yahao R. y Jun, Y. 2017. "D,L-Sulforaphane Induces ROS-Dependent Apoptosis in Human Gliomablastoma Cells by Inactivating STAT3 Signaling Pathway." *Int. J. Mol. Sc.*;18, 72-9.
- Monde, K., Takasugi, M. y Shirata, A. 1995. Three sulfur containing stress metabolites from Japanese radish. *Phytochem.*; 39, 581-2586.
- Moon, A., y Talreja, K. 2016. "EFFECT OF NUTRIENTS ON LIVER MARKER ENZYMES OF WISTAR RATS." *Int. J. Pharm. Sci. Res.*; 7, 2236-41.
- Moon, D., Lee, K., Choi, Y. H., Kim, G. 2007. b-Sitosterol-inducedapoptosis is mediated by the activation of ERK and the downregulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells. *Int Immunopharmacol*; 7, 1044–1053.
- Moreau, R. A. Whitaker, B. D., Hicks, K. B. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res*; 41, 457–500.
- Moreno, D. A., Pérez-Balibrea, S., Ferreres, F., Gil-Izquierdo, Á. y García-Viguera, C. 2010. "Acylated Anthocyanins in Broccoli Sprouts." *Food Chem.*; 123, 358-63.
- Moriarty, R. M., Naithani, R. y Surve, B. 2007. Organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Mini Rev Med Chem.*; 8, 827-38.
- Motawea, H., Elshabrawy, A., Shaker, K. y Elsherbini, S. 2011. "Myrosinase Hydrolysates of Brassica Oleraceae L. Var. Italica Plenck." *Planta Med.*; 77, 743-47.
- Murillo, G. y Mehta, R. G.2001. Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutr Cancer.*; 41, 17-28.
- Negishi, M., Pedersen, L. G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y. y Pedersen, L. C. 2001. Structure and Function of Sulfotransferases. *Arco. Biochem. Biophys.*; 390, 149-57.
- Neugart, S., Kläring, H., Zietz, M., Schreiner, M., Rohn, S., Kroh, L. W., y Krumbein, A., 2012. The effect of temperature and radiation on flavonol aglycones and flavonol glycosides of kale (*Brassica oleracea* var. sabellica). *Food Chem.*; 133, 1456-1465.

Newman , D. J. y Cragg, G. M. 2012. "Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010." *J. Nat. Prod.*; 75, 311-35

NIH. 2007. La Quimioterapia y Usted. *National Cancer Institute*; <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/quimioterapia-y-usted.pdf>. (27 de enero de 2019)

NIH. 2012. Dieta. *National Cancer Institute*; <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/dieta>. (21 de mayo de 2022).

NIH. 2017. Tipos de tratamientos contra el cáncer. *National Cancer Institute*; <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> (27 de enero de 2019)

NIH. 2018. Consejos de alimentación: Antes, durante y después del tratamiento del cáncer. *National Cancer Institute*; <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/sobrellevar/consejos-de-alimentacion.pdf> (25 de abril de 2020)

Olofsson, P., Hultqvist, M., Hellgren, L. I., Holmdahl, R. 2014. Phytol: A chlorophyll component with anti-inflammatory and metabolic properties. *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products*. Ed. *Springer Nature* Switzerland AG; 345–359.

Olsen, H., Aaby, K. y 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. *J Agric Food Chem.*; 57, 2816-2825.

Olsen, H., Grimmer, S., Aaby, K., Saha, S. y 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*). *J. Agric. Food Chem.*; 60, 7375-7383.

OMS, 2018. "Cáncer." *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer> (22 de junio de 2022)

OMS. 2020 The Global Cancer Observatory. México. *Int Agency Res Cancer*. 929, 29-30. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>. (05 de mayo de 2022).

OMS. 2022. Cáncer, datos y cifras. *Organización Mundial de la Salud*. <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer> (28 de junio de 2022).

Onyilagha, J., Bala, A., Hallett, R., Gruber, M., Soroka, J. y Westcott N. 2003. "Leaf Flavonoids of the Cruciferous Species, *Camelina Sativa*, *Crambe* Spp., *Thlaspi Arvense* and Several Other Genera of the Family *Brassicaceae*." *Biochem. Syst. Ecol.*; 31, 1309-22.

Ortiz-Hidalgo, C. 2013. "Historia y Filosofía Notas Sobre La Historia de La Leucemia." *Patología Revista latinoamericana* 5151, 58-69. <http://www.medigraphic.com/pdfs/patrevlat/rlp-2013/rlp1311.pdf>. (30 de enero de 2019).

Ortuño, A., Báidez, A., Gómez, P., Arcas, M. C., Porrás, I., García-Lidón, A. y Del Río J. A. 2006. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.*; 98, 351-358.

-
- Ozidal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F. y Capanoglu E. 2016. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*; 8, 1–36.
- Palou, A., Serra, F. y Pico, C. 2003. General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *Eur J Clin Nutr*; 57, 12-7.
- Paris, G. 2000. "Balancing the Needs of the Recruiters and the Aims of the Educators". <http://www.warr.com>.
- Park, E. J. y Pezzuto, J. M. 2002. Botanicals in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Rev.*; 21, 231-55.
- Park, C., Moon, D., Rhu, C., Choi, B. T., Lee, W. H., Kim, G., Choi, Y. H. 2007. b-Sitosterol induces anti-proliferation and apoptosis in human leukemic U937 cells through activation of caspase-3 and induction of Bax/Bcl-2 ratio. *Biol Pharm Bull*; 30, 1317–1323.
- Paško, P., Tyszka-Czochara, M., Galanty, A., Gdula-Argasińska, J., Żmudzki, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P. y Gorinstein S. 2018. "Comparative Study of Predominant Phytochemical Compounds and Proapoptotic Potential of Broccoli Sprouts and Florets." *Plant Foods Hum Nutr.*; 73, 95-100.
- Pedras, M. S. C. y Ahiahonu, P. W. K. 2005. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochem.*; 66, 391-411.
- Pedras, M. S. C., Sarwar, M. G., Suchy, M. y Adio, A. M. 2006. The phytoalexins from caulilower, caulilexins A, B and C: Isolation, structure determination, syntheses and antifungal activity. *Phytochem.*; 67, 1503-1509.
- Pedras, M. S. C., Sorensen, J. L., Okanga, F. I. y Zaharia, I. L. 1999. Wasalexins A and B, new phytoalexins from wasabi: isolation, synthesis and antifungal activity. *Bioorg Med Chem Lett.*; 9, 3015-3020.
- Pejin, B., Kojic, V., Bogdanovic, G. 2014. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. *Nat Prod Res*; 28, 2053-2056.
- Pérez Leonard, H. 2006. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, *ICIDCA.*; 40, 20-28.
- Pérez, R. M. y Pérez, R. 2004. *Raphanus sativus* (Radish): Their chemistry and biology. *Sci. World J.*; 4, 811-837.
- Pérez-Balibrea, S.; Moreno, D. A.; García-Viguera, C. 2011. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars. *Food Chem.*, 125, 348-354.
- Podsedek, Anna. 2007. "Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity of Brassica Vegetables: A Review." *LWT - Food Sci. Technol.*, 40, 1-11.
- Pratt, S. G.; Matthews, K. 2004. SuperFoods Rx: catorce alimentos que cambiaran tu vida. Ed. *Harper Collins.*, 416.
- Price, K. R., Colquhoun, I. J., Barnes, K. A. y Rhodes, M. J.C. 1998. "Composition and Content of Flavonol Glycosides in Green Beans and Their Fate during Processing." *J. Agric. Food Chem.*; 46, 4898-4903.
- Reynoso Verónica. Guía práctica para cultivar kale en casa. Vía orgánica. <https://viaorganica.org/kale-cultiva-una-fuente-de-hierro-en-casa/> 15 de marzo de 20019.

-
- Rojas, S., Lopera, J. S., Uribe, A., Correa, S., Perilla, N. y Marín, J. S. 2015. Consumo de nutraceuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. *Rev. Biosalud*; 14, 91-115.
- Rutnakornpituk, B., Chatchai B., Waraporn S., y Pimtawan S. 2018. "Study in Total Phenolic Contents , Antioxidant Activity and Analysis of Glucosinolate Compounds in Cruciferous Vegetables". *Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST)*.; 26, 27-37.
- Rozner, S., Gardi, N. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids Surf. A*; 282, 435-456.
- Saban G. M. 2018. The benefits of brassica vegetables on human health. *J Hum Heal Res*; 1, 104.
- Santas, J., Codony, R., Rafecas, M. 2013. Phytosterols: beneficial effects. *Natural Products*; Ramawat, K. G., Mérillon, J. M., Eds. *Springer*: Berlin, Heidelberg, 3437-3464.
- Silva, R. O., Sousa, F. B., Damasceno S. R., Carvalho N, S., Silva, V. G., Oliveira F. R., Sousa, D. P., Aragão, K. S., Barbosa, A. L., Freitas, R. M., Medeiros, J. V. 2014. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol*; 28, 455-464.
- SAGARPA. 2018. "Resumen Nacional Intención de Siembra 2018. CULTIVO. SAGARPA, SIAP.
- Salcedo A. 2021. 6 tipos y variedades de kale más famosas. Siembra100. <https://www.sembrar100.com/coles/kale-col-rizada/variedades/> 09 de agosto de 2021)
- Sasaki, K. y Takahashi T. 2002. A flavonoid from Brassica rapa flower as UV-absorbing nectar guide. *Phytochem.*; 61, 339-43.
- Satyavan, S. 1989. Sulphur reports: isothiocyanates in heterocyclic synthesis. Alexander S, Ed. *Harwood: Academic Publishers GmbH United Kingdom*; 8, 327-454
- Scalbert, A., Johnson, I. T. y Saltmarsh, M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.*; 81, 215-217.
- Schlaepfer, L. y Mendoza-Espinoza, J. A. 2010. "Medicinal Plants as Potential Agents against Cancer, Relevance for Mexico." *Rev Mex Cienc Farm.*, 41, 18-27.
- Seminis. 2012. "Brócoli." *Seminis*. <http://www.seminis.mx/products/results/crops/brócoli/markets/all/regions/all> (22 de marzo de 2019).
- SENM. Definición.Sociedad Española de Nutraceutica Médica. <http://www.nutraceuticamedica.org/definicion.htm> (15 de febrero de 2019)
- Sheldon, H., Zemskova, M., Zhang, C., Tabrizad, M., Bremer, R., Neidigh, J. W., Lilly, M. B. 2007. Caracterización de un potente y selectivo inhibidor de molécula pequeña de la quinasa PIM1. *Mol Cancer Ther.*; 6, 163-172.
- Sikora, E., Cieslik, E., Leszczynka, T., Filipiak-Florkiewicz, A. y Pisulewski, P. M. 2008. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chem.*; 107, 55-59.

-
- Sikora, E. y Bodziarczyk, I. 2012. Composition and antioxidant activity of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) raw and cooked. *Acta Sci Pol Technol Aliment.*; 11, 239-248
- Takasugi, M., Katsui, N. y Shirata A. 1986. Isolation of three novel sulfur-containing phytoalexins from the Chinese cabbage *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Cruciferae). *J Chem Soc.*; 14, 1077-1078.
- Takasugi, M., Monde, K., Katsui, N. y Shirata, A. 1987. Spirobrassinin, a novel sulfur-containing phytoalexin from the daikon *Rhaphanus sativus* L. var. *hortensis* (Cruciferae). *Chem Lett.*; 16,1631-1632.
- Talalay, P., Fahey, J. W. 2001. Los fitoquímicos de la planta crucífera protegen contra el cáncer al modular el metabolismo del carcinógeno. *J Nutr.*; 131, 3027-33.
- Tamokou, J. D. D., Mbaveng, A. T., y Kuete, V. 2017. Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*; 8, 207–237.
- Torres M. 2016. Alimentación. Superalimentos: energía natural. *BIOECO ACTUAL*. https://www.bioecoactual.com/wp-content/uploads/PDF2016/bioecoactual_septiembre_16_cas.pdf Superalimentos: %20energ%C3%ADa%20natural
- Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventos, R. M. y Moreno, J. J. 2018. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol.*;156, 186-95
- Trujillo, A.G. 2011. La quimioinformática, una herramienta eficiente para desarrollar los medicamentos del futuro. Teoría y praxis investigativa. *Fundación Universitaria del Área Andina*; 6.
- USDA. 2022. "Taxon: Brassica Oleracea L. Var. Oleracea." *U.S. National Plant Germplasm System*. Red de Información de Recursos de Germoplasma (Taxonomía GRIN). Laboratorio Nacional de Recursos de Germoplasma, Beltsville, Maryland. <https://npgstest2.agron.iastate.edu/gringlobal/taxon/taxonomydetail?id=44623> (25 de junio de 2022).
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A. y Ferreres, F. 2004. "Characterisation of Flavonols in Broccoli (*Brassica Oleracea* L. Var. *Italica*) by Liquid Chromatography-UV Diode-Array Detection-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry." *J. Chromatogr. A.*; 1054, 181-93.
- Vargas-Rincón, C., Sánchez-León, G. y Jiménez-Morales, Pedro. 2016. "La Producción de Metabolitos Secundarios En La Familia Brassicaceae." *Revista Facultad de Ciencias Básicas*; 9, 282.
- Vig, A. P., Geetanjali R., Tarunpreet S. T. y Saroj A.. 2009. "Bio-Protective Effects of Glucosinolates - A Review." *LWT - Food Sci. Technol.*; 42, 1561-72
- Vuolo, M. M., Lima, V. S. y Maróstica Junior, M. R. 2019. Compuestos fenólicos. Compuestos bioactivos, *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*; 9, 33-50.
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C. y Wilson, M. 2018. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018 *Nucleic Acids Res.*; 46, 1074-1082.
- Woyengo, T. A., Ramprasath, V. R., Jones, P. J. H. 2009. Anticancer effects of phytosterols. *Eur. J. Clin. Nutr.*; 63, 813–820.

Yeh, C. T. y Yen, G. C. 2005. Effect of sulforaphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Carcinogenesis*; 26, 2138-2148.

Zamora, E. 2016. Universidad de Sonora División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Agricultura y Ganadería Cultivo de Brócoli. <http://www.dagus.uson.mx/Zamora/BROCOLI-DAG-HORT-010.pdf>.

Zhang, Y., Tang, L. y Gonzalez, V. 2003. Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol Cancer Ther.*; 2, 1045-52.

Zhang Y. 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res.*; 555, 173-190.

Zhang, Y., Tang, L. y Gonzalez, V. 2003. "Selected Isothiocyanates Rapidly Induce Growth Inhibition of Cancer Cells." *Mol. Cancer Ther.*; 2, 1045-52.

Zietz, M., Weckmüller, A., Schmidt, S., Rohn, S., Schreiner, M., Krumbein, A. y Kroh, L. W. 2010. Genotypic and climatic influence on the antioxidant activity of flavonoids in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *J Agric Food Chem.*; 58, 2123-30.

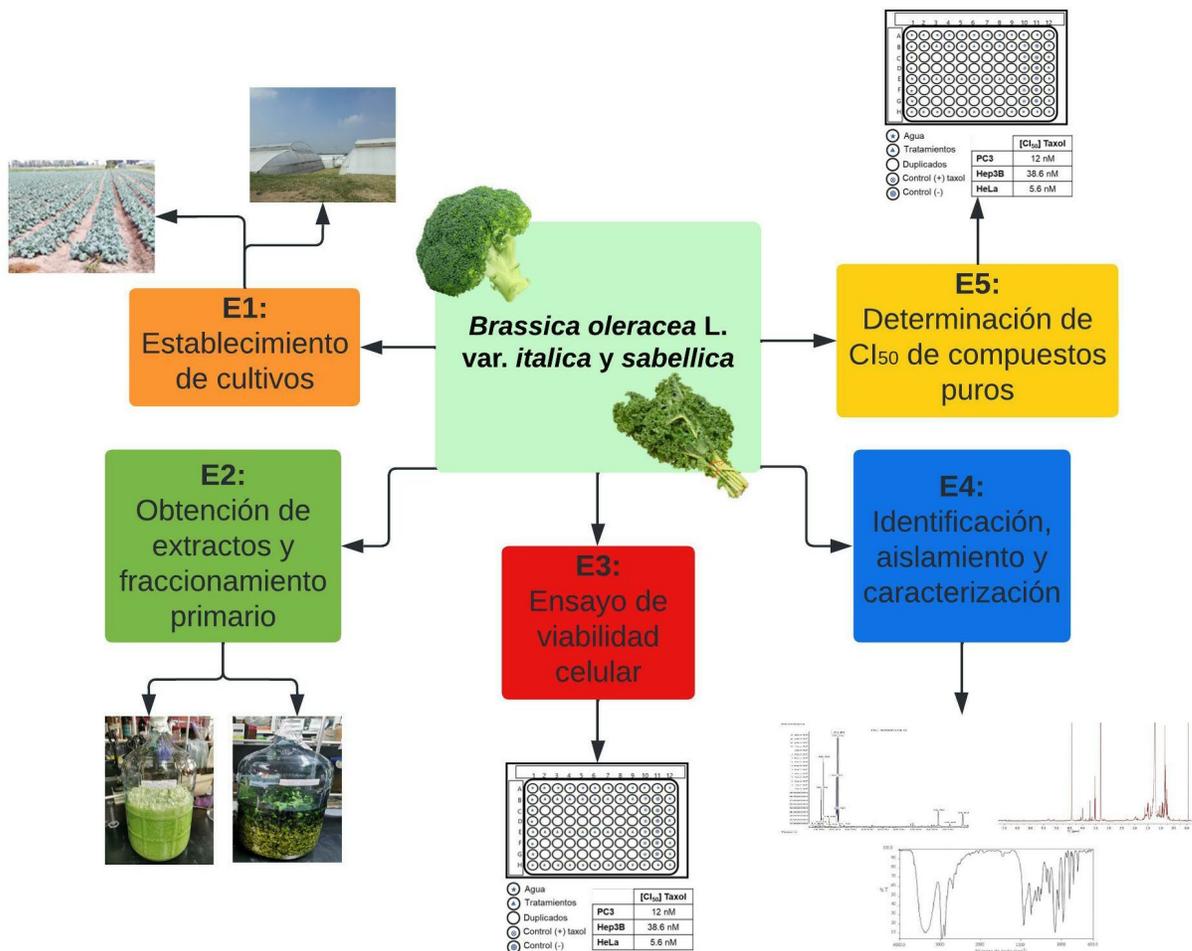
CAPÍTULO II

"El conocimiento científico debe ser objetivo y, por tanto, sincero".

<Louis Pasteur>

Estudio químico-farmacológico

2.1 Metodología



Esquema 2.1 Metodología general del estudio químico-farmacológico.

2.1.1 Establecimiento de los cultivos de las variedades de *Brassica oleracea* L.

2.1.1.1 Cultivo de brócoli

La producción de las plantas de *Brassica oleracea* L. var. *italica* (brócoli variedad comercial Tlaloc) se realizó en condiciones de campo abierto en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo bajo la supervisión del Ing. Raúl Jacinto Mata del departamento de Olericultura de la unidad académica de Fitotecnia. Se realizó la cosecha del vegetal crucífero de *Brassica oleracea* L. var. *italica* (brócoli) el día 9 de diciembre de 2019.

Los cultivos se establecieron mediante siembra directa en charolas de poliestireno de 200 cavidades x 25 mL; las semillas se sembraron a 2 cm de profundidad y 0.5cm de compacta el día 26 de septiembre de 2019; como sustrato se utilizó una mezcla de COSMOPEAT (TURBA) con vermiculita fina; una vez germinadas fueron regadas con la solución nutritiva universal de Steiner al 30% y las 3 semanas posteriores con la misma solución al 50%. El día 7 de octubre de 2019 las plantas fueron trasplantadas a siembra directa en suelo a temperatura y precipitación normales promedio de 16.03 ° C y 49.8 mm respectivamente, se realizó una fertilización fraccionada al suelo durante la siembra, riegos oportunos y control de plagas y enfermedades con Tricoderma (Figura 2.1). La cosecha se realizó 74 días posteriores a la siembra y se cosecharon pellas de 7 cm de diámetro de plantas de 65 cm de ancho y 51 cm de alto, las cuales fueron colectadas en costales de nylon para su transporte a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.



Figura 2.1 Cultivo en campo abierto de brócoli, y dimensiones de las plantas cosechadas.

2.1.1.2 Cultivo de kale

El 17 de julio de 2019 se realizó la compra de las semillas de *Brassica oleracea* L. var. *sabellica* (kale) variedad comercial green rizado con número de lote 18368602, en la comercializadora Hydro envirement. La producción de las plantas de *Brassica oleracea* L. var. *sabellica* (kale) se realizó en condiciones de invernadero en el Campo Agrícola Experimental de la Universidad Autónoma Chapingo bajo la supervisión del Dr. Efraín Contreras Magaña del departamento de Agricultura protegida de la unidad académica de Fitotecnia. Se realizó la cosecha del vegetal crucífero de *Brassica oleracea* L. var. *sabellica* (kale) el día 14 de octubre de 2019.

Los cultivos se establecieron mediante siembra directa en charolas de poliestireno de 200 cavidades x 25 mL; las semillas se sembraron a 2 cm de profundidad el día 3 de agosto de 2019; como sustrato se utilizó una mezcla de PEAT MOSS Sphagnum (TURBA) con perlita (75:25 v/v respectivamente); una vez germinadas fueron regadas con una solución nutritiva compuesta de 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 de 2019 las plantas fueron trasplantadas a bolsas de polietileno negro de 18 L de capacidad, que contenían arena de tezontle con partículas menores a 4 mm de diámetro; finalmente 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 (Figura 2.2). La cosecha se realizó 72 días posteriores a la siembra y Se cosecharon las hojas adultas de entre 25 a 30 cm de tamaño y de coloración verde intenso de las plantas de kale, las cuales fueron cortadas a partir del pecíolo y colectadas en costales de nylon para su transporte.



Figura 2.2 Plántulas de Kale y plantas adultas para cosecha.

2.1.2 Consideraciones generales de estudio fitoquímico

Para el fraccionamiento primario y purificación de compuestos se utilizó cromatografía en columna abierta y gel de sílice (230-400, 70–230 mesh; Merck). El monitoreo del fraccionamiento se realizó mediante cromatografía en capa fina fase normal (60 F₂₅₄; Merck). Tanto la sílica gel como las cromatoplasmas utilizados fueron de grado comercial y se utilizaron como tal. Los reveladores que se utilizaron fueron sulfato cérico amoniacal, $uv \lambda = 254$, $\lambda = 366$ y α -naftol; los disolventes utilizados fueron destilados previos a su uso, y deshidratados utilizando sulfato de sodio anhidro.

Los espectros de RMN se adquirieron en equipos Jeol ECZ 600R (600 MHz para 1H y 150 MHz para ^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) se enumeran en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz, las multiplicidades se indican como singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (q), doble de doble (dd), doble de doble de doble (ddd), doble de triple (dt), multiplete (m) y singlete ancho (brs). $CDCl_3$ y CD_3OD se usaron como solventes y se referenciaron a Me_4Si (0 ppm). Las caracterizaciones estructurales se llevaron a cabo utilizando una combinación de experimentos 1D 1H , ^{13}C y 2D (HSQC, HMBC, COSY).

Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de masas JEOL MS-700 de alta resolución utilizando la técnica de ionización química. Los espectros IR se midieron con un espectrómetro infrarrojo de transformada de Fourier NICOLET

6700 y se midieron en el rango de 4000-525 cm^{-1} usando el accesorio Smart iTR con un cristal ATR de diamante.

2.1.3 Estudio fitoquímico

El material vegetal de ambas variedades de *Brassica oleracea* L. (*italica* y *sabellica*) fueron sometidos a un lavado por duplicado utilizando únicamente agua, posteriormente se colocaron en un escurridor para eliminar el exceso de agua y finalmente se extendieron en papel craft para terminar el secado. Ambos se trabajaron en condiciones de bagazo (pella <*italica*> y hoja <*sabellica*>) y en fresco (hoja <*italica*> y hoja <*sabellica*>).

2.1.3.1 Obtención del bagazo de brócoli y kale

Para la obtención del bagazo del material vegetal de la variedad *italica* (6.06 kg) y la variedad *sabellica* (8.00 kg) se realizó una extracción utilizando un extractor de jugos marca TURMIX. Obteniéndose además del bagazo que se destinó para someterse a extracción por maceración, el jugo de brócoli (1.50 L, 24.70 %) y de kale (2.10 L, 26.25%).

2.1.3.2 Obtención de los extractos

El bagazo de brócoli (4.51 kg, 74.30 %) y el de kale (5.23 kg, 65.39%) fueron extraídos de manera independiente por una maceración única, utilizando metanol al 100 % durante 72 h a temperatura ambiente, y por triplicado. Por otro lado, el material vegetal fresco de brócoli (2 kg) y el de kale (2 kg) fueron cortados en trozos de aproximadamente 0.7 - 10 mm de ancho y sometidos a extracción vía maceración con metanol al 100 % a temperatura ambiente durante 72 h y por triplicado. Pasado el tiempo de maceración, el disolvente de los 4 extractos se eliminó a presión reducida utilizando un rotaevaporador BÜCHI, una vez secos fueron pesados para determinar los rendimientos.

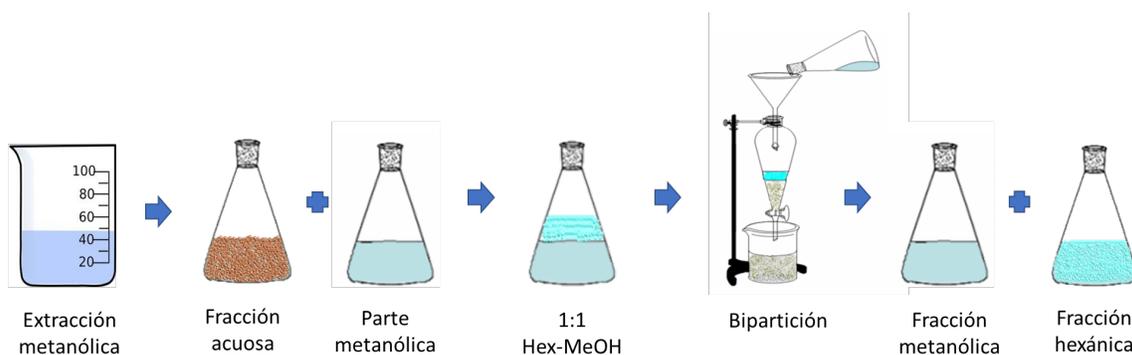
A partir de este apartado los extractos de cada variedad recibirá las claves que a continuación se muestran en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2 Extractos obtenidos.

Material vegetal	Clave	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
Bagazo de brócoli	BB-01	130.50	2.89
Hoja de brócoli	BH-02	164.50	8.22
Bagazo de kale	KB-01	224.20	4.50
Hoja de kale	KH-02	117.4	5.87

2.1.3.3 Fraccionamiento grueso de los extractos

A cada uno de los extractos se les realizaron repetidas extracciones con metanol, a fin de separar la parte alcohólica de la parte soluble en agua. Una vez obtenida la parte soluble en metanol (BB-01-EM, 50.16 g; BH-02-EM, 66.90 g; KB-01-EM, 125.60 g; KH-02-EM, 62.20 g), se llevó a cabo una bipartición en un embudo de separación utilizando una mezcla 1:1 hexano-metanol para obtener la fracción hexánica como se muestra en el **Esquema 2.2** y las fracciones resultantes del fraccionamiento grueso se encuentran en la **Tabla 2.3**



Esquema 2.2 Extracción para la obtención de la fracción de hexano, metanol, y acuosa.

Tabla 2.3 Rendimiento del fraccionamiento grueso de BB-01, BB-02 KB-01 Y KH-02.

Fracción	(%) R / M.V.	(%) R / E. MeOH
BB-01		
BB-01-H	0.07	2.41
BB-01-M	1.11	48.38
BB-01-A	1.39	50.72
BH-02		
BH-02-H	0.17	2.03
BH-02-M	3.31	60.24
BH-02-A	4.27	51.91
KB-01		
KB-01-H	0.18	4.16
KB-01-M	2.40	56.02
KB-01-A	1.69	40.1
KH-02		
KH-02-H	0.17	3.00
KH-02-M	3.11	52.98
KH-02-A	1.67	28.53

BB-01: extracto de bagazo de brócoli; **BH-02:** extracto de hoja de brócoli;
KB-01: extracto de bagazo de kale; **KH-02:** extracto de hoja de Kale;
H: fase de hexano; **M:** fase de metanol; **A:** fase acuosa.

A partir de las evaluaciones citotóxicas (ver sección 2.2.1) de los 4 extractos de brócoli y kale, se continuo con la purificación únicamente de los extractos que resultaron activos (BB-01, BH-02, KH-02), la cual se encuentra descrita a partir de la [sección 2.1.3.5](#).

2.1.3.4 Determinación de la composición química mediante CG-EM

El estudio fitoquímico de ambos vegetales partió con la determinación de los componentes químicos volátiles presentes en las fracciones de hexano (BB-01-H, BH-02-H, KB-01-H y KH-02-H) a través de un análisis de CG-EM utilizando de 2 mg de cada muestra disueltos en 0.5 mL de CH₂Cl₂; el equipo utilizado fue un cromatógrafo de Gases Agilent Technology modelo 6890 plus, acoplado a un espectrofotómetro de masas 5973N, el modo de ionización es por Impacto Electrónico (IE). La determinación se realizó por comparación de identidad

eligiéndose así los compuestos que cumplieran con un criterio de similitud de $\geq 80\%$ con la biblioteca NIST (versión 1.7a, 2000).

2.1.3.5 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en BB-01-M

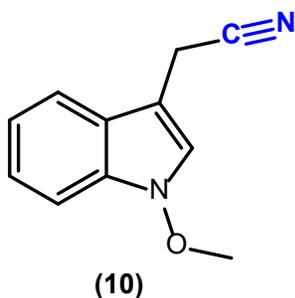
La fracción metanólica del bagazo de brócoli BB-01-M (48.0 g) se fraccionó a través de cromatografía en columna (Φ 9 cm x 60 cm, 300 g 230-400 mesh; Merck); el sistema de elución fue CH_2Cl_2 :MeOH con incrementos en gradiente del 15 % hasta llegar me metanol puro, posteriormente se realizó el lavado con 80:20 MeOH:H₂O. A partir de este fraccionamiento se obtuvieron 36 sub-fracciones de 250 mL cada una, las cuales fueron reunidas en 8 grupos de acuerdo con su similitud observada en cromatografía en capa fina (CCF) (Tabla 2.4).

Tabla 2.4 Fraccionamiento cromatográfico de BB-01-M.

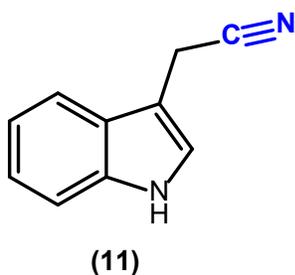
Reunión	Sistema de elución (%) CH_2Cl_2 :MeOH	Clave	Peso
1	100:00	BB-01-M-1	0.39 g
2-7	100:00	BB-01-M-2	0.29 g
8-9	85:15	BB-01-M-3	2.30 g
10-14, 18-26	85:15 \rightarrow 00:100	BB-01-M-4	24.00 g
15-17	70:30	BB-01-M-5	2.70 g
27-35	80:20*	BB-01-M-6	16.51 g
36	80:20*	BB-01-M-7	1.80 g

*MeOH:H₂O

El grupo BB-01-M-2 (291.0 mg) fue purificado mediante cromatografía en columna (Φ 3 cm x 60 cm, 15 g silica flash, 70–230 mesh; Merck) utilizando un sistema de gradiente al 10 % con n-hexano:AcOEt; como resultado en sistema 90:10 n-hexano:AcOEt se obtuvieron 5 mg del compuesto 1-metoxi-1H-indol -3-acetonitrilo conocido coloquialmente como caulilexina C (**10**) y 5 mg del compuesto 3-indolacetonitrilo (**11**). Los compuestos aislados fueron identificados con base a la evidencia espectroscópica de RMN de 1 y 2D, EM e IR.



1-metoxi-1H-indol-3-acetonitrilo o caulilexina C (**10**) se obtuvo como un líquido color naranja. ^1H NMR (600 Hz, CDCl_3) δ 7.56 (dt, $J = 8.01, 0.96, 0.96$ Hz, 1H, H-5), 7.45 (dt, $J = 8.26, 0.93, 0.93$ Hz, 1H, H-8), 7.31 (m, 2H, H-7, H-2), 7.18 (ddd, $J = 8.04, 7.01, 1.02$ Hz, 1H, H-6), 4.08 (s, 3H, H-13), 3.79 (d, $J = 1.09$ Hz, 2H, H-10_{a,b}). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 132.42 (C-9), 123.30 (C-7), 122.50 (C-4), 121.80 (C-2), 120.50 (C-6), 118.40 (C-5), 118.02 (C-11), 108.70 (C-8), 100.40 (C-3), 66.20 (C-13), 14.39 (C-10) ppm. EM-IQ m/z 186 calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$. El espectro de ATR IR presenta una banda $\nu_s = 2248.56$ cm^{-1} correspondiente al grupo funcional $\text{C}\equiv\text{N}$. La identidad de este compuesto fue corroborada con los datos descritos en la literatura (**Takasugi et al., 1986, Kang et al., 2018**).



indol-3-acetonitrilo (**11**) se obtuvo como un líquido de color naranja. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (s, 1H, NH), 7.59 (dd, $J = 7.92, 0.86$ Hz, 1H, H-5), 7.40 (dt, $J = 8.18, 0.82, 0.82$, Hz, 1H, H-8), 7.25 (ddd, $J = 8.18, 7.06, 1.12$, Hz, 1H, H-7), 7.23 (ddd $J = 2.32, 1.12, 1.07$ Hz, 1H, H-2), 7.18 (ddd, $J = 8.00, 7.10, 0.99$ Hz, 1H, H-6), 3.84 (d, $J = 1.0$ Hz, 2H, H-10_{a,b}). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 136.35 (C-9), 126.08 (C-4), 123.04 (C-7), 122.83 (C-2), 120.37 (C-6), 118.33 (C-11), 118.19 (C-5), 111.61 (C-8), 104.91 (C-3), 14.53 (C-10). EM-IQ m/z 156 calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$. El espectro de ATR IR presenta una banda $\nu_s = 3405.09$ cm^{-1} correspondiente al grupo NH y una vibración a 2250.92 cm^{-1} perteneciente a $\text{C}\equiv\text{N}$.

2.1.3.6 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en BH-02-M

La fracción de metanol del extracto de hoja de brócoli BH-02-M (60.0 g) se sometió a fraccionamiento cromatográfico usando una columna (Φ 9 cm x 60 cm) empacada con 400 g de silica gel 60 Merck (230-400 mesh), y como fase móvil una mezcla de

CH₂Cl₂:MeOH con gradiente de polaridad del 15 % (100:00→00:100) como resultado se obtuvieron 55 sub-fracciones de 500 mL cada una, mismas que fueron reunidas en grupos de acuerdo con las características observadas en CCF ([Tabla 2.5](#)); finalmente este fraccionamiento cromatográfico dio lugar a 10 grupo de fracciones.

Tabla 2.5 Fraccionamiento cromatográfico de BH-02-M.

Reunión	Sistema de elución (%) CH ₂ Cl ₂ :MeOH	Clave	Peso
1	100:00	BH-02-M-1	0.1 g
2-8	100:00	BH-02-M-2	0.17 g
9-16	100:00	BH-02-M-3	0.36 g
17-20	90:10	BH-02-M-4	2.70 g
21-24	80:20	BH-02-M-5	4.03 g
25-27	80:20, 70:30	BH-02-M-6	6.01 g
28-33	70:30, 60:40	BH-02-M-7	17.27 g
34-38	60:40, 50:50	BH-02-M-8	10.00 g
39-43	50:50, 40:60	BH-02-M-9	5.30 g
44-55	40:60→00:100	BH-02-M-10	15.00 g

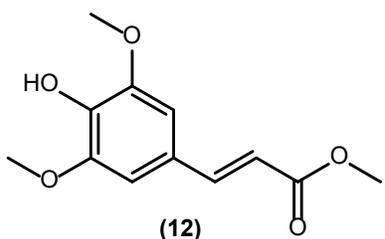
El grupo BH-02-M-2 (174 mg) se sometió a purificación mediante cromatografía en columna (Φ 1.5 cm x 45 cm, 10 g silica flash, 70–230 mesh; Merck) utilizando un sistema de elución en gradiente de n-hexano:AcOEt; obteniéndose en el sistema 95:5 n-hexano:AcOEt, 6.4 mg del compuesto 1-metoxi-1H-indol -3-acetonitrilo (**10**) y en el sistema 90:10 n-hexano:AcOEt, 5 mg del compuesto indol-3-acetonitrilo (**11**).

El grupo BH-02-M-3 (354.7 mg) fue fraccionado por cromatografía en columna (Φ 3 cm x 40 cm, 35 g silica gel 60, 230-400 mesh; Merck) eluyendo con una mezcla de n-hexano - AcOEt (90:10→00:100) como resultado se obtuvieron 7 sub-fracciones ([Tabla 2.6](#)).

Tabla 2.6 Fraccionamiento cromatográfico de BH-02-M-3.

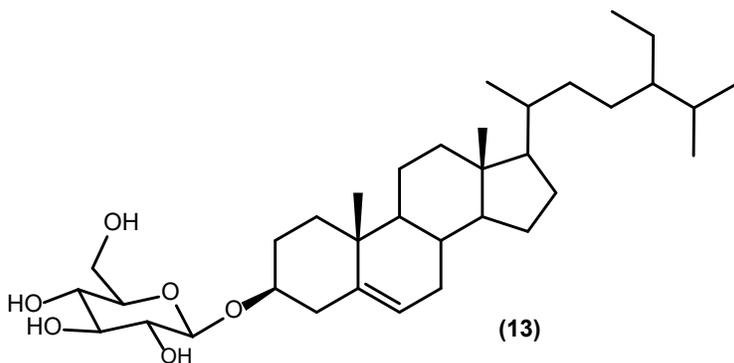
Reunión	Sistema de elución (%) n-hexano:AcOEt	Clave	Peso
1-5	90:10	BH-02-M-3-1	0.06 g
6-8	90:10	BH-02-M-3-2	0.02 g
9-11	90:10	BH-02-M-3-3	0.03 g
12-55	90:10→86:14	BH-02-M-3-4	0.15 g
56-95	86:14→83:17	BH-02-M-3-5	0.03 g
96-159	83:17→00:100	BH-02-M-3-6	0.14 g
160-164	00:100	BH-02-M-3-7	0.02 g

BH-02-M-3-5 (29.22 mg) fue purificada por cromatografía en placa preparativa (2 mm x 20 cm x 20 cm, silica gel 60, Merck) la cual fue eluida 5 veces con 100% CH₂Cl₂, como resultado se obtuvieron 5 mg del compuesto 3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) acrilato de metilo conocido coloquialmente como sinapato de metilo (**3**). Este compuesto fue identificado con base a la evidencia espectroscópica de RMN de 1 y 2D.



3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil) acrilato de metilo o sinapato de metilo (**12**) se obtuvo como un líquido color amarillo. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 7.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-β), 6.77 (s, 2H, H-2, H-6), 6.39 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, H-α), 5.76 (s, 1H, OH), 3.92 (s, 6H, H-3', H-5'), 3.8 (s, 3H, H-8); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 167.69 (C-7), 147.30 (C-3, C-5), 145.25 (C-β), 137.22 (C-4), 125.99 (C-1), 115.65 (C-α), 105.13 (C-2, C-6), 56.42 (C-5', C-3'), 51.71 (C-8).

El grupo BH-02-M-04 (2.7 g) se fraccionó en cromatográfica en columna (Φ 4 cm x 60cm, 100 g de silica gel 230-400 mesh) utilizando como sistema de elución una mezcla n-hexano:Acetona (90:10→00:100), como resultado de este fraccionamiento, en el sistema de elución 55:45 n-hexano:Acetona se obtuvieron 2.5 mg de un sólido blanco amorfo identificado a través de la evidencia espectroscópica de RMN de 1D y 2D como β-sitosterol-3-O-β-D-glucósido (**13**).



β-sitosterol-3-O-β-D-glucósido (**13**) fue aislado como un polvo blanco amorfo. ¹H NMR (600 MHz CD₃OD- CDCl₃): δ 5.32 (brs, 1H, H-6), 4.35 (d, *J* = 7.8 Hz,

1H, H-1'), 3.79 (dd, $J = 12.20, 2.92$ Hz, 1H, H-6'), 3.68 (dd, $J = 5.47$ Hz, 12.20 Hz, 1H, H-6'), 3.55 (m, 1H, H-3), 3.35 (dd, $J = 8.9$ Hz, H-3'), 3.33 (dd, $J = 2.64$ Hz, 8.99 Hz, 1H, H-5'), 3.22 (ddd, $J = 2.65$ Hz, 5.16 Hz, 8.11 Hz, 1H, H-4'), 3.17 (dd, $J = 8.14$ Hz, 1H, H-2'), 0.96 (s, 3H, H-19), 0.88 (d, $J = 6.40$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (t, $J = 7.43$ Hz, 3H, H-29), 0.78 (d, $J = 6.64$ Hz, 3H, H-26), 0.76 (d, $J = 6.64$ Hz, 3H, H-27), 0.64 (s, 3H, H-18); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$): 140.94, 122.48, 101.69, 79.50, 77.15, 76.68, 74.18, 70.80, 62.21, 57.32, 56.59, 50.79, 49.52, 46.42, 42.82, 40.31, 39.12, 37.8, 36.67, 34.43, 32.44, 32.42, 30.05, 29.63, 28.72, 26.49, 24.74, 23.51, 21.55, 20.01, 19.61, 19.22, 19.07, 12.16, 12.14. La identidad de este compuesto fue corroborada con los datos descritos en la literatura (**Khatun et al., 2012**).

2.1.3.7 Aislamiento de metabolitos secundarios presentes en KH-02-M

La fracción metanólica de las hojas de kale KH-02-M (53 g) se sometieron a fraccionamiento utilizando una columna (Φ 9 cm x 60 cm) empacada con 1 kg de sílica gel 60 (230-400 mesh; Merck) como sistema de elución se utilizó un sistema de gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (100:00 \rightarrow 00:100) Se colectaron 40 sub-fracciones de 500 mL cada una las cuales posteriormente por similitud aparente en CCF fueron reunidos entre ellas dando lugar a 7 grupos (**Tabla 2.7**).

Tabla 2.7 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M.

Reunión	Sistema de elución (%) $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$	Clave	Peso
1-4	100:00	KH-02-M-1	0.03 g
5-10	100:00, 85:15	KH-02-M-2	0.10 g
11-14	85:15, 70:30	KH-02-M-3	2.13 g
15-20	70:30, 55:45	KH-02-M-4	2.76 g
21-25	40:60	KH-02-M-5	5.20 g
26-30	25:75	KH-02-M-6	26.20 g
31-40	10:90, 00:100	KH-02-M-7	15.90 g

El grupo KH-02-M-4 (2.76 g) se fraccionó en una columna cromatográfica HF Mega BE-C18 (5 g, 20 mL) usando un sistema decreciente de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (50:50 \rightarrow 00:100 MeOH) y dando lugar a 6 sub -fracciones (**Tabla 2.8**).

Tabla 2.8 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M-4.

Reunión	Sistema de elución (%) H ₂ O:MeOH	Clave	Peso
1-3	50:50	KH-02-M-4-1	1.48 g
4-10	50:50, 30:70	KH-02-M-4-2	0.31 g
11-19	30:70, 25:75	KH-02-M-4-3	0.18g
20-25	25:75, 20:80	KH-02-M-4-4	0.13 g
26-32	10:90	KH-02-M-4-5	0.46 g
33-45	00:100	KH-02-M-4-6	0.06 g

KH-02-M-4-1 (1.48 g) se fraccionó utilizando cromatografía en columna (Φ 2 cm x 42 cm, 25 g silica gel 60, 230-400 mesh; Merck) y se eluyó con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH con aumento gradual de polaridad hasta metanol puro, como resultado se obtuvieron 10 sub-fracciones (Tabla 2.9).

Tabla 2.9 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M-4-1.

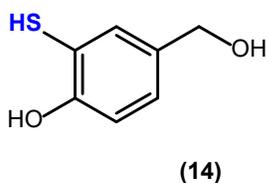
Reunión	Sistema de elución (%) CH ₂ Cl ₂ :MeOH	Clave	Peso
1-7	95:05	KH-02-M-4-1-1	0.01 g
8-10	95:05	KH-02-M-4-1-2	0.03 g
11-14	94:06	KH-02-M-4-1-3	0.02 g
15-20	94:06	KH-02-M-4-1-4	0.06 g
21-27	93:07	KH-02-M-4-1-5	0.16 g
28-30	93:07	KH-02-M-4-1-6	0.11 g
31-60	92:08→ 90:10	KH-02-M-4-1-7	0.40 g
61-85	88:12→84:16	KH-02-M-4-1-8	0.20 g
86-120	82:18→70:30	KH-02-M-4-1-9	0.14 g
121-122	50:50, 00:100	KH-02-M-4-1-10	0.19 g

KH-02-M-4-1-5 (157 mg) se fraccionó utilizando cromatografía en columna (Φ 0.6 cm x 40 cm, 7 g silica gel 60, 230-400 mesh; Merck) eluyendo con una mezcla de gradiente de CH₂Cl₂:MeOH (95:05→00:100) para dar lugar a 10 sub-fracciones (Tabla 2.10).

Tabla 2.10 Fraccionamiento cromatográfico de KH-02-M-4-1-5.

Reunión	Sistema de elución (%) CH ₂ Cl ₂ :MeOH	Clave	Peso
1-5	94:06	KH-02-M-4-1-5-1	0.01 g
6-14	94:06	KH-02-M-4-1-5-2	0.01 g
15-29	94:06	KH-02-M-4-1-5-3	0.06 g
30-34	94:06	KH-02-M-4-1-5-4	0.01 g
35-39	94:06	KH-02-M-4-1-5-5	0.01 g
40-42	94:06	KH-02-M-4-1-5-6	0.01 g
43-59	94:06, 95:05	KH-02-M-4-1-5-7	0.01 g
60-65	95:05	KH-02-M-4-1-5-8	0.01 g
60-80	95:05	KH-02-M-4-1-5-9	0.02 g
81-100	80:20,50:50, 00:100	KH-02-M-4-1-5-10	0.01 g

KH-02-M-4-1-5-3 (60 mg) se purificó mediante cromatografía de placa preparativa (2 mm x 20 cm x 20 cm, silica gel 60, Merck), eluyendose 17 veces con el sistema n-hexano:AcOEt 60:40, finalmente se obtuvieron 3 mg el compuesto **14**. (5-(hidroximetil) 2-mercaptofenol).Queda pendiente la confirmación de la presencia de SH sugerida por la CG-EM.



Posiblemente, 4-(hidroximetil)-2-mercaptofenol **14**. fue aislado como un líquido naranja. ¹H NMR (600 MHz CD₃OD- CDCl₃): 8.02 (H, d J= 2.8 Hz, H-2), 7.36 (H, d, J= 8.5 Hz H-5), 7.24 (H dd J=8.5, 2.8 Hz, H-6), 4.6 (2H s, H-7). ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD- CDCl₃): 154.66 C-4, 152.37 C-1, 137.32 C-2, 125.06 C-6, 123.31 C-5, 90.09 C-3, 65.60 C-7. El espectro de ATR IR presenta una banda $\nu = 3600- 3200\text{cm}^{-1}$ correspondiente al grupo OH.

KH-02-M-4-5 (454 mg) se fraccionó mediante cromatografía en columna (Φ 1.2 cm x 40 cm, 13 g silica gel 60, 230-400 mesh; Merck) utilizando un sistema de gradiente CH₂Cl₂:MeOH. A partir de este fraccionamiento en el sistema de elución 95:5 CH₂Cl₂:MeOH se obtuvieron 1.5 mg del compuesto **13** (β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido).

2.1.4 Ensayo de citotoxicidad

2.1.4.1 Ensayo de citotoxicidad de extractos

Los extractos de *Brassica oleracea* L. var. *itálica* y *sabellica* (BB-01, BH-02, KB-01 y KH-02), así como los productos metanólicos de la primera extracción (BB-01-EM, BH-02-EM, KB-01-EM y KH-02-EM), se sometieron a ensayos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer humano PC3 (próstata), Hep3B (hepatocelular) y HeLa (cervical), obtenidas de ATCC.

Tabla 2.1 Especificaciones de las líneas celulares.

Línea celular	ATCC	Medio de cultivo
HeLa	CCL-2™	DMEM*
PC3	CRL-1435™	RPMI-1640**
Hep3B	HB-8064™	DMEM*

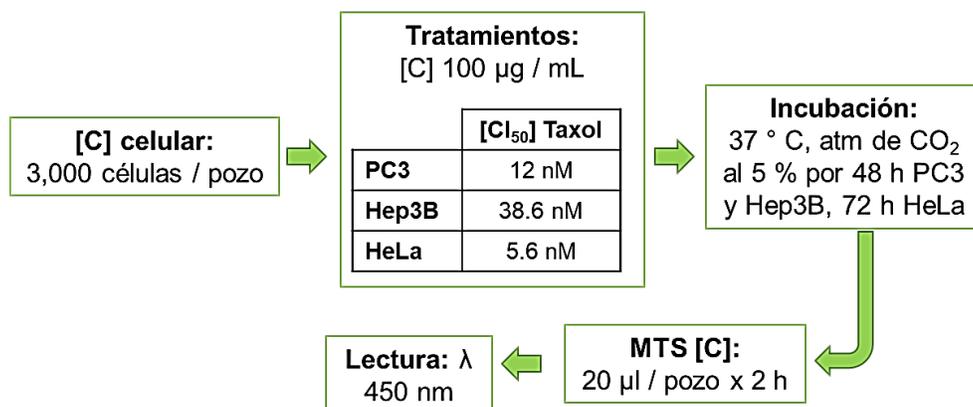
*(Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EE. UU.)

** (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.)

Las células PC3 se cultivaron en medio RPMI-1640, mientras que las células Hep3B y HeLa en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y con glutamina 2 mM, todos los cultivos se incubaron a 37 ° C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Se cultivaron 3000 células por pozo en una placa de 96 pozos para iniciar la evaluación citotóxica, todos los ensayos se realizaron por triplicado en experimentos independientes y a la concentración única de 100 µg / mL utilizando DMSO para solubilizar las muestras (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 realizados los tratamientos, se incubaron 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 siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. La viabilidad celular se determinó por absorbancia a 450 nm usando un lector de ELISA automatizado.



Esquema 2.3 Ensayo de citotoxicidad con MTS.

2.1.4.2 Ensayo de citotoxicidad de compuestos puros

Los compuestos **10**, **11** y **12** obtenidos de los extractos de bagazo y hoja de brócoli, fueron evaluados en un ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular HeLa, para la cual las evaluaciones a los extractos mostraron selectividad.

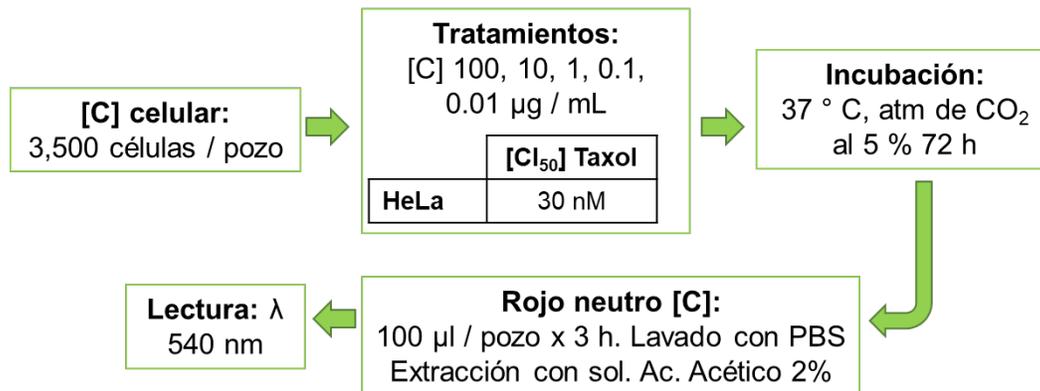
Se cultivaron 3500 células por pozo en una placa de 96 pozos para iniciar la evaluación citotóxica, todos los ensayos se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

Antes del ensayo, las soluciones stock de 100 mg/mL (100 000 µg / mL) de cada compuesto fueron preparadas, (2 mg de extracto disuelto en 20 µL de DMSO), para cada caso se llevó a cabo una curva dosis-respuesta con las siguientes concentraciones: 100, 10, 1.0, 0.1 µg / mL.

Las soluciones se prepararon a partir de la solución stock como sigue: la concentración de 100 µg / mL se preparó a partir de 0,5 µL de una solución stock de 100 mg / mL (100.000 µg / mL) en 500 µL de medio de cultivo. La concentración de 10 µg/mL se preparó a partir de 50 µL de la solución de 100 µg / mL en 450 µL de medio. La concentración de 1 µg / mL se preparó a partir de 50 µL de la solución de 10 µg / mL en 450 µL de medio. La concentración de 0,1 µg / mL se preparó a partir de 50 µL de la solución de 1 µg / mL en 450 µL de medio.

Como control positivo se utilizó Taxol a la concentración 30 nM. Una vez realizados los tratamientos, se incubaron a 37 ° C en atmósfera de CO₂ al 5 % 72 h.

El número de células viables en la proliferación se determinó utilizando la tinción con rojo neutro; pasado el tiempo de exposición a los tratamientos, los cultivos se lavaron con 200 µL de PBS, y se adicionó a cada pocillo 100 µL de rojo neutro (50 µg / mL). Se incubaron durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se retiró el medio y se lavaron los pocillos con 100 µL de PBS. Finalmente, el rojo neutro se eluyó con 100 µL de etanol-ácido acético-agua destilada (50%:2%:48%). Después de 10 min de incubación, se determinó la viabilidad celular por absorbancia a 540 nm (**Borenfreund *et al.*, 1985; Repetto *et al.*, 2008.**) utilizando un lector de ELISA automatizado. Posteriormente a partir de los datos obtenidos de la curva dosis-respuesta se calculó la CI₅₀ para cada uno utilizando el software estadístico GraphPad Prism, versión: 9.4.1.681.



Esquema 2.4 Ensayo de citotoxicidad con rojo neutro.

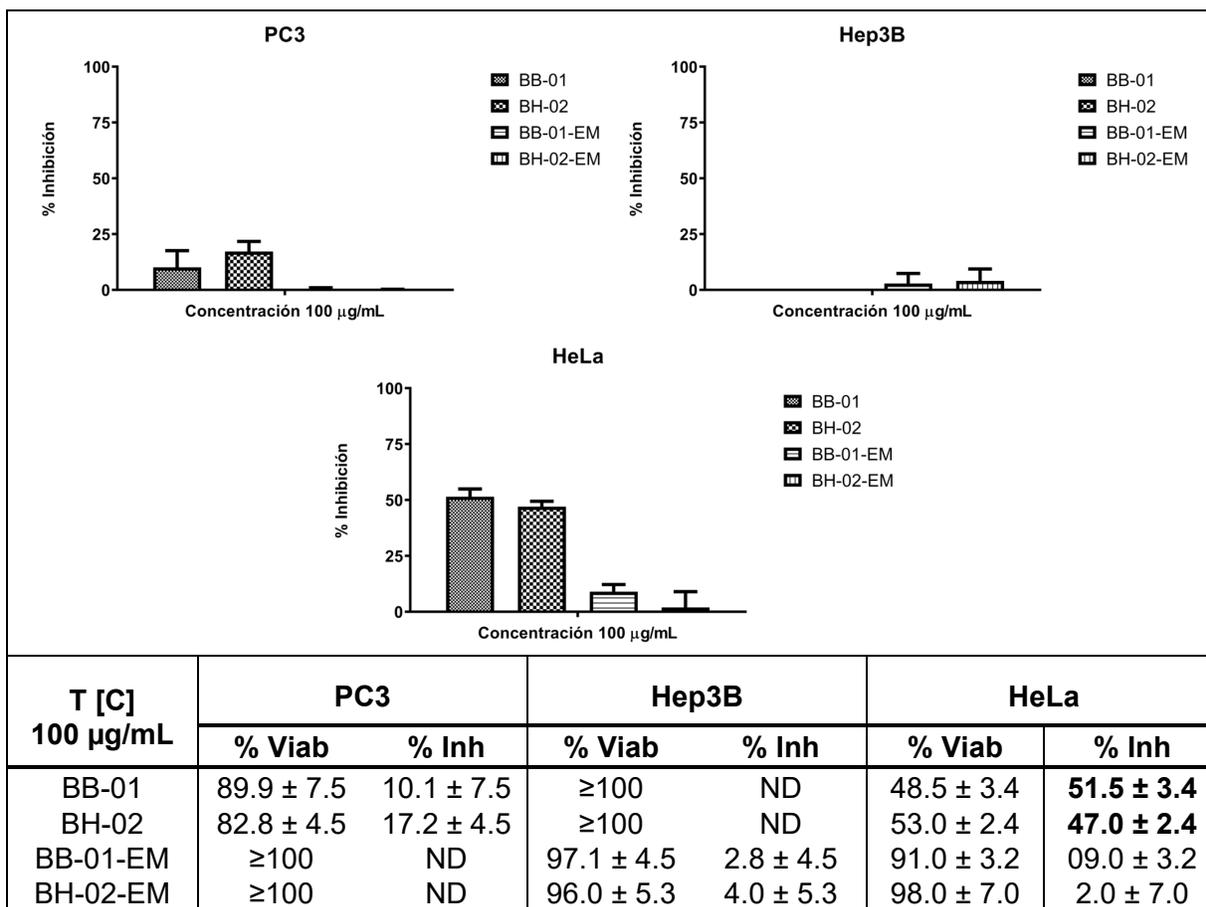
2.2 Resultados y discusión

2.2.1 Evaluación *in vitro* de los extractos

Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico de MTS, de los extractos BB-01, BH-02, KB-01 y KH-02 así como de las fracciones BB-01-EM, BH-02-EM, KB-01-EM y KH-02-M a la concentración única de 100 µg / mL. Estos fueron probados sobre las líneas celulares de cáncer humano PC3 (próstata), Hep3B (hepatocelular) y HeLa (cervical).

Los resultados mostraron que los extractos BB-01 y BH-02 presentaron de manera importante actividad inhibitoria sobre la viabilidad celular en la línea HeLa, 51.5 % y 47.0 % respectivamente. Sin embargo, en las líneas celulares PC3 y Hep3B no mostraron valores relevantes en la inhibición de la viabilidad celular a la concentración probada (100 µg / mL). Por otro lado, las fracciones metanólicas BB-01-EM y BH-02-EM no mostraron inhibición de la viabilidad celular en ninguna de las 3 líneas celulares evaluadas ([Tabla 2.11](#)).

Tabla 2.11 Ensayo de viabilidad celular de *Brassica oleracea L. var.italica* (brócoli) en 3 líneas celulares de cánceres humanos.

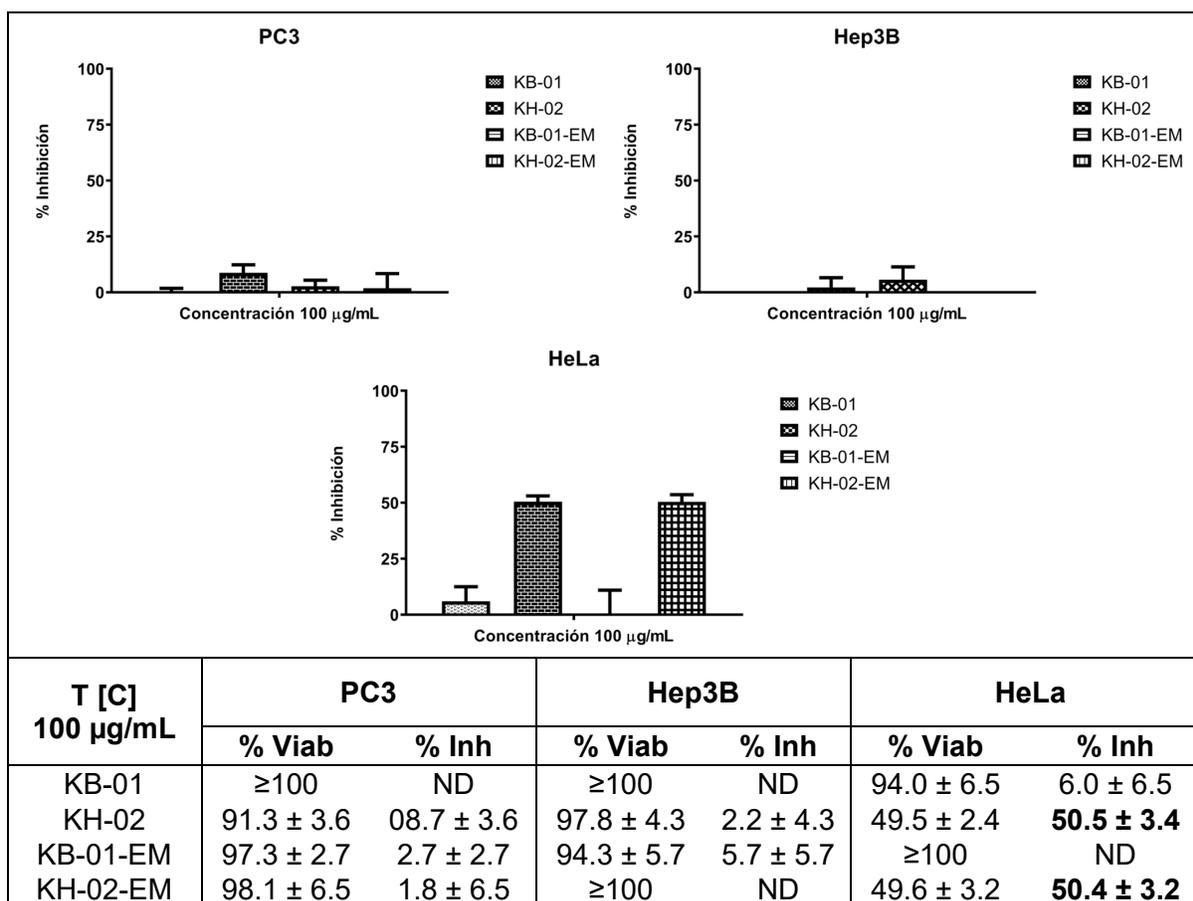


Control positivo Taxol CI_{50} 5.6 nM; **Control negativo** DMSO 0.1%

% **Viab**: porcentaje de viabilidad; % **Inh**: porcentaje de inhibición; **ND**: no determinado; **PC3**: línea celular de cáncer de próstata; **Hep3B**: línea celular de cáncer de hígado; **HeLa**: línea celular de cáncer cervicouterino;

El extracto de hoja de kale KH-02 presentó actividad inhibitoria sobre la viabilidad celular de la línea HeLa de 50.5 %, así mismo su fracción metanólica KH-02-EM presentó actividad sobre la viabilidad celular en la línea de cáncer cervicouterino HeLa con un porcentaje de inhibición del 50.4% a 100 µg / mL. Por el contrario, la fracción metanólica del bagazo de kale y su extracto integro, no presentaron buena actividad antiproliferativa sobre ninguna de las 3 líneas celulares evaluadas; estos resultados se presentan a continuación en la [Tabla 2.12](#).

Tabla 2.12 Ensayo de viabilidad celular de *Brassica oleracea L. var. sabellica* (kale) en 3 líneas celulares de cánceres humanos.



Control positivo Taxol CI_{50} 5.6 Nm; **Control negativo** DMSO 0.1%

% Viab: porcentaje de viabilidad; **% Inh**: porcentaje de inhibición; **ND**: no determinado; **PC3**: línea celular de cáncer de próstata; **Hep3B**: línea celular de cáncer de hígado; **HeLa**: línea celular de cáncer cervicouterino

2.2.2 Caracterización química

La determinación de la composición química de las fases de baja polaridad (hexano) se realizó mediante análisis por CG-EM. Por otro lado, los resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad celular fueron determinantes para la elección de los extractos de bagazo (BB-01) y hoja de brócoli (BH-02), así como el extracto de hoja fresca de kale (KH-02) para su fraccionamiento cromatográfico y purificación de los metabolitos secundarios presentes en estos.

A través de fraccionamiento en columna de las fases metanólicas de los extractos de bagazo de brócoli y hoja de brócoli, se aislaron los compuestos **10** y **11**, el compuesto **12** fue aislado de la fase metanólica de la hoja de brócoli, el compuesto **13** de la fase metanólica de la hoja de brócoli y del kale fresco y el compuesto **14** se aisló de la fase metanólica de kale fresco. Para la caracterización inequívoca de estos compuestos se utilizaron experimentos de RMN 1D (^1H Y ^{13}C) así como 2D (HSQC, HMBC, y COSY) ([Ver Anexos 2.4](#)).

2.2.2.1 Compuestos de baja polaridad

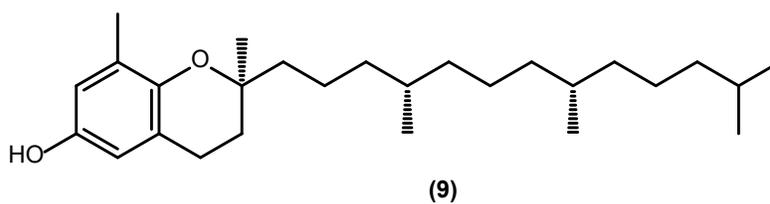
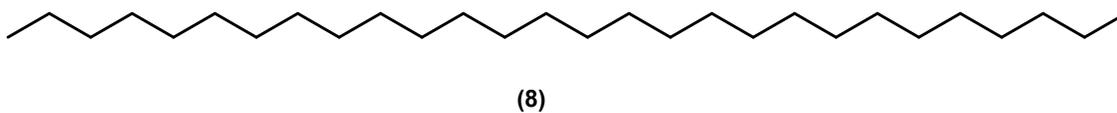
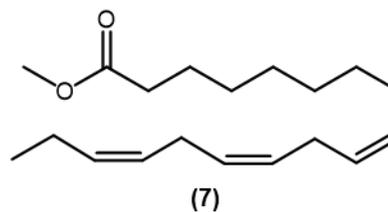
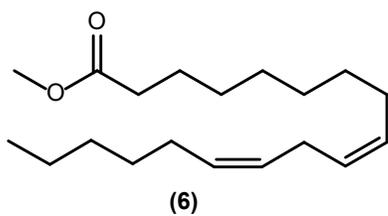
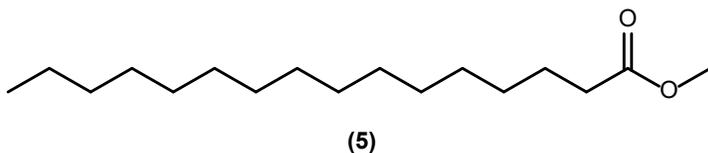
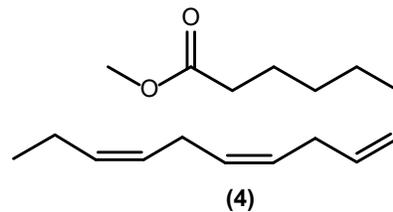
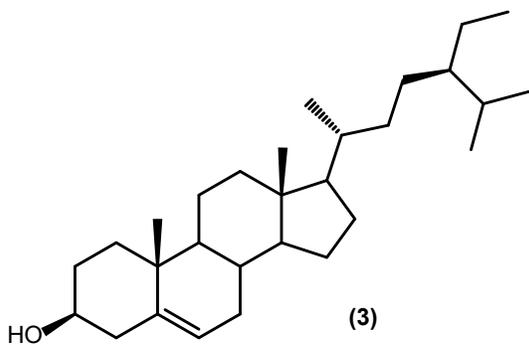
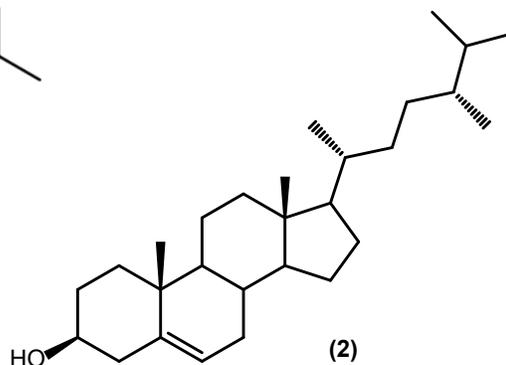
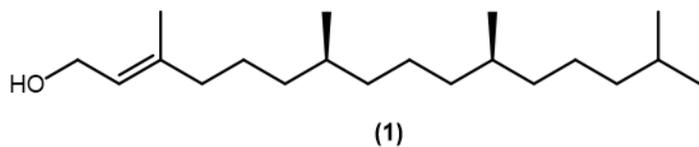
Como ya se ha mencionado en la parte experimental, el estudio fitoquímico de ambas variedades de vegetales se inició con un análisis por CG-EM de las fases de *n*-hexano de cada uno de los cuatro extractos, a través de la comparación de los espectros de masas obtenidos, con los reportados en la biblioteca NIST, encontramos que para las fracciones de hexano de *Brassica oleracea* L. var. *italica*; la fracción BB-01-H contiene en su mayoría fitol (**1**) ($M^+ = 296$, A = 4.62 %); campesterol (**2**) ($M^+ = 400$, A = 17.61 %); ψ -sitosterol (**3**) ($M^+ = 414$, A = 74.93 %).

La fracción BH-02-H contiene: fitol (**1**) ($M^+ = 296$, A = 31.07 %); campesterol (**2**) ($M^+ = 400$, A = 1.17 %); ψ -sitosterol (**3**) ($M^+ = 414$, A = 6.50 %); éster metílico del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico (**4**) ($M^+ = 264$, A = 4.99 %); éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**) ($M^+ = 270$, A = 13.74 %); éster metílico del ácido 9,12-octadecadienoico (**6**) ($M^+ = 294$, A = 7.53 %), éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (**7**) ($M^+ = 292$, A = 26.86 %).

En cuanto a las fracciones de hexano de *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*, el análisis en CG-EM reveló que la fracción KB-01-H contiene en su mayoría al fitol (**1**) ($M^+ = 296$, A = 58.95 %); éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**) ($M^+ = 270$, A = 11.17 %); éster metílico del ácido 9,12-octadecadienoico (**6**) ($M^+ = 294$, A = 6.82 %), éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (**7**) ($M^+ = 292$, A = 20.71 %).

Y la fracción KH-02-H contiene fitol (**1**) ($M^+ = 296$, A = 43.85 %); éster metílico del ácido hexadecanoico (**5**) ($M^+ = 270$, A = 7.42 %); éster metílico del ácido 9,12-

octadecadienoico (**6**) ($M^+ = 294$, $A = 8.18$ %), éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (**7**) ($M^+ = 292$, $A = 23.37$ %); nanocosano (**8**) ($M^+ = 408$, $A = 6.65$ %); vitamina E (**9**) ($M^+ = 430$, $A = 3.01$ %).



Este análisis de CG-EM confirma la presencia mayoritaria de compuestos de baja polaridad en las fases de hexano, principalmente de tipo éster de ácido graso (**4**, **5**, **6**, y **7**), diterpeno (**1**) y esteroides (**3** y **2**), así como poliprenoides (**9**).

Por otro lado, estos compuestos poco polares han sido reportados con diferentes actividades biológicas principalmente antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas.

En el caso del fitol (**1**), un alcohol diterpénico que se puede extraer de la clorofila de las plantas verdes se ha reportado que posee actividad antimicrobiana contra *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Lee *et al.*, 2016, Inoue *et al.*, 2005), actividad antiinflamatoria (Olofsson, *et al* 2014, Silva *et al.*, 2014), efecto anticonvulsivo (Costa *et al.*, 2012), actividad anticancerígena (Pejin *et al.*, 2014) y propiedades antinociceptiva antivirales y carminativas (Olofsson *et al.*, 2014).

Los fitoesteroides campesterol (**2**) y sitoesterol (**3**) son esteroides alquilados en C-24 que participan principalmente como constituyentes de la membrana celular. Se ha demostrado que reducen los niveles plasmáticos de colesterol y colesterol de lipoproteínas de baja densidad, previniendo la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Moreau *et al.*, 2002, Rozner y Garti, 2006), así como enfermedades cardiovasculares (Jones y AbuMweis, 2009). Además, se ha reportado su efecto antioxidante, antiinflamatorio (Santas *et al.*, 2013) antipirético, quimiopreventivo (Blanco-Vaca *et al.*, 2018) citotóxico sobre diversas líneas celulares de cánceres humanos (Woyengo *et al.*, 2009, Awad *et al.*, 2005, 2007, Park *et al.*, 2007) su efecto proapoptótico por incremento de las enzimas caspasas (Moon *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2007) y su actividad antimicrobiana (Kanimozhi *et al.*, 2012, Guerrero, 2019).

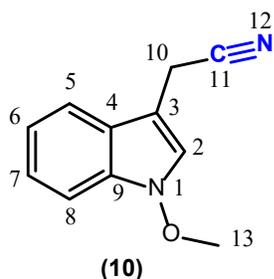
Respecto a los ésteres de ácidos grasos 7,10,13-hexadecatrienoico (**4**) linoleico (**6**) y α -linolénico (**7**), se ha demostrado que poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria (Fulwah *et al.*, 2019). Para el éster metílico del ácido palmítico (**5**) y los ésteres **6** y **7** se ha descrito actividad antimicrobiana y antifúngica

(Chandrasekaran *et al.*, 2007, Davoodbasha *et al.*, 2018). Y, además, para los esteres **6** y **7** se reporta actividad anticancerígena (Krishnamoorthy y Subramaniam, 2014).

Para el nanocosano (**8**) se ha reportado actividad antimicrobiana de baja a moderada sobre *E. coli* , *B. subtilis* , *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Keroletswe *et al.*, 2018).

Y finalmente dentro de los compuestos mayoritarios de las fases hexánicas de los extractos de brócoli y kale se encuentra la vitamina E (**9**) la cual es ampliamente reconocida por su función antioxidante (Bruno y Mah, 2014), así mismo se le ha conferido efecto antiinflamatorio (Combs y McClung, 2017) por lo que se considera tiene capacidad de prevenir el cáncer (Ju *et al.*, 2010, Alkhenizan *et al.*, 2007), la aterosclerosis y los trastornos del sistema nervioso central como la enfermedad de Alzheimer (Atkinson *et al.*, 2013, Foley y White, 2002).

2.2.2.2 Elucidación estructural de caulilexina C



El compuesto **10** se obtuvo como un líquido color naranja. Con un $m/z=186$ en su espectro de masas obtenido por la técnica EM-IQ, y corresponde a la fórmula molecular $C_{11}H_{10}N_2O$. La vibración stretching a 2248.56 cm^{-1} observada en el espectro de IR indica la presencia de un grupo nitrilo ($C\equiv N$), además se observan las vibraciones C-H de un sistema aromático en ($\delta=2916.23\text{-}2848.48\text{ cm}^{-1}$, $\nu = 736.88\text{ cm}^{-1}$). En el espectro de RMN 1H de 600 MHz (**Espectro1**), se observó una señal simple que integra para 3H en δ_H 4.08, la cual corresponde a un grupo metoxilo. A campo bajo se evidencia la presencia de un sistema AMBX conformado por una señal doble de triple que integra para un H en δ_H 7.56 con $J = 8.01$ y 0.96 , 0.96 Hz, una señal doble de triple centrada en δ_H 7.45 ($J = 8.26$, 0.93 , 0.93 Hz, 1H), una señal doble de doble de doble que integra para un H en δ_H 7.18 con $J = 8.04$, 7.01 , 1.02 Hz y una señal multiplete en δ_H 7.31 que integra para 2H de los cuales solo uno pertenece a este sistema aromático 1,2-disustituido (**Figura 2.3**).

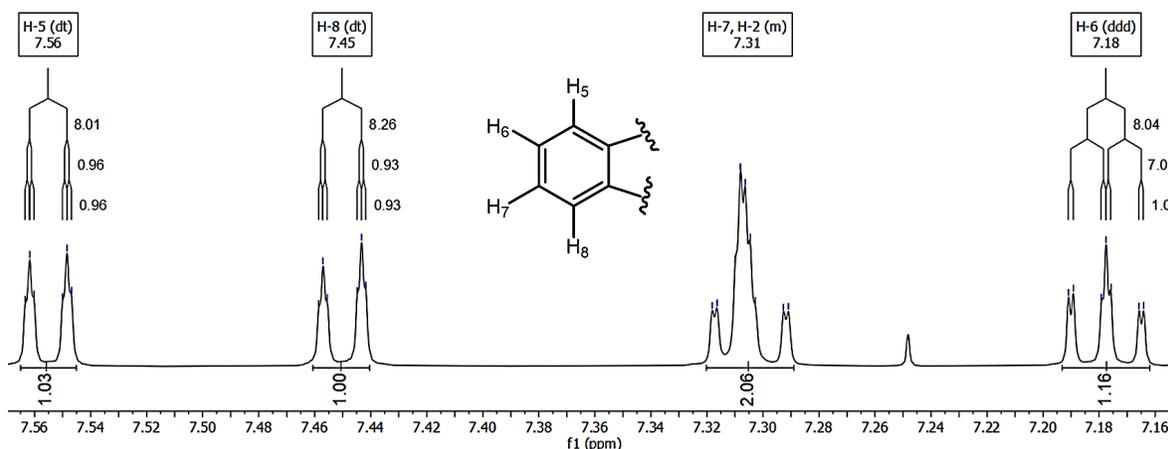


Figura 2.3 Señales de protones aromáticos del anillo aromático 1,2-disustituido del compuesto 10.

Aunado a esto, en la región media del espectro se evidencia una señal doble que integra para 2H en δ_H 3.79 ($J = 1.09$ Hz), que por su desplazamiento químico pertenece a un metileno alfa a un grupo nitrilo ($C\equiv N$).

En el espectro de ^{13}C de este compuesto ([Espectro 2](#)) observan 11 señales, de las cuales 5 corresponden a metinos aromáticos pertenecientes a un anillo de indol (δ_{C} 118.40, δ_{C} 108.70, δ_{C} 121.80, δ_{C} 123.3, δ_{C} 120.50), cuatro carbonos cuaternarios, tres de ellos pertenecientes al indol en δ_{C} 132.42, 122.5, 100.40 y uno al grupo ciano δ_{C} 118.02 y un metoxilo en δ_{C} 66.20. Además, un metileno que debido al efecto anisotrópico ejercido por parte del grupo nitrilo se encuentra desplazado a campo alto, en δ_{C} 14.39.

La contribución del experimento HSQC ([Espectro 3](#)) nos permitió asignar de forma inequívoca el protón correspondiente a cada uno de los C de metino (δ_{H} 7.56/ δ_{C} 118.40, δ_{H} 7.45/ δ_{C} 108.70, δ_{H} 7.30/ δ_{C} 121.80, δ_{H} 7.31/ δ_{C} 123.3, δ_{H} 7.18/ δ_{C} 120.50) así como confirmar la identidad del metoxilo y metileno (δ_{H} 3.79/ δ_{C} 14.39, δ_{H} 4.08/ δ_{C} 66.20)

La información obtenida hasta este momento indica que el grupo metoxilo en δ_{H} 4.08/ δ_{C} 66.20 no se encuentra dentro del anillo aromático, esto nos lleva a sugerir que éste se encuentra unido al nitrógeno del indol. Lo cual se confirma con la ausencia de una vibración stretching en aproximadamente 3400cm^{-1} característica de un grupo amino secundario en el espectro de IR ([Espectro 6](#)). Así como que el otro protón en δ_{H} 7.30 corresponde al de la posición 2 del anillo de pirrol unido al anillo de benceno. Por tanto, se sugiere que el compuesto **10** se trata una fitoalexina de tipo indol.

Las correlaciones de COSY ([Espectro 4](#)) confirman el sistema de espines aromáticos, permitiendo asignar la resonancia mediante cruces de δ_{H} 7.18 ($J = 8.04$, 7.01, 1.02 Hz) con δ_{H} 7.56 ($J = 8.01$ Hz), δ_{H} 7.45 ($J = 0.93$ Hz). Las constantes de acoplamiento orto de 7.01 Hz del protón en δ_{H} 7.18 y la de 8.04 Hz que presenta el protón en δ_{H} 7.45 corresponderán a las compartidas con la señal en δ_{H} 7.31, la cual al encontrarse en traslape con otro metino no se distingue adecuadamente, sin embargo, el experimento de COSY hace evidentes estas correlaciones. Así mismo se observa la correlación debida al efecto W entre los protones en $\delta_{\text{H}10\text{a,b}}$ 3.79 de la

posición α al grupo $C\equiv N$ con el protón de δ_H 7.31 perteneciente al anillo de pirrol (Figura 2.4).

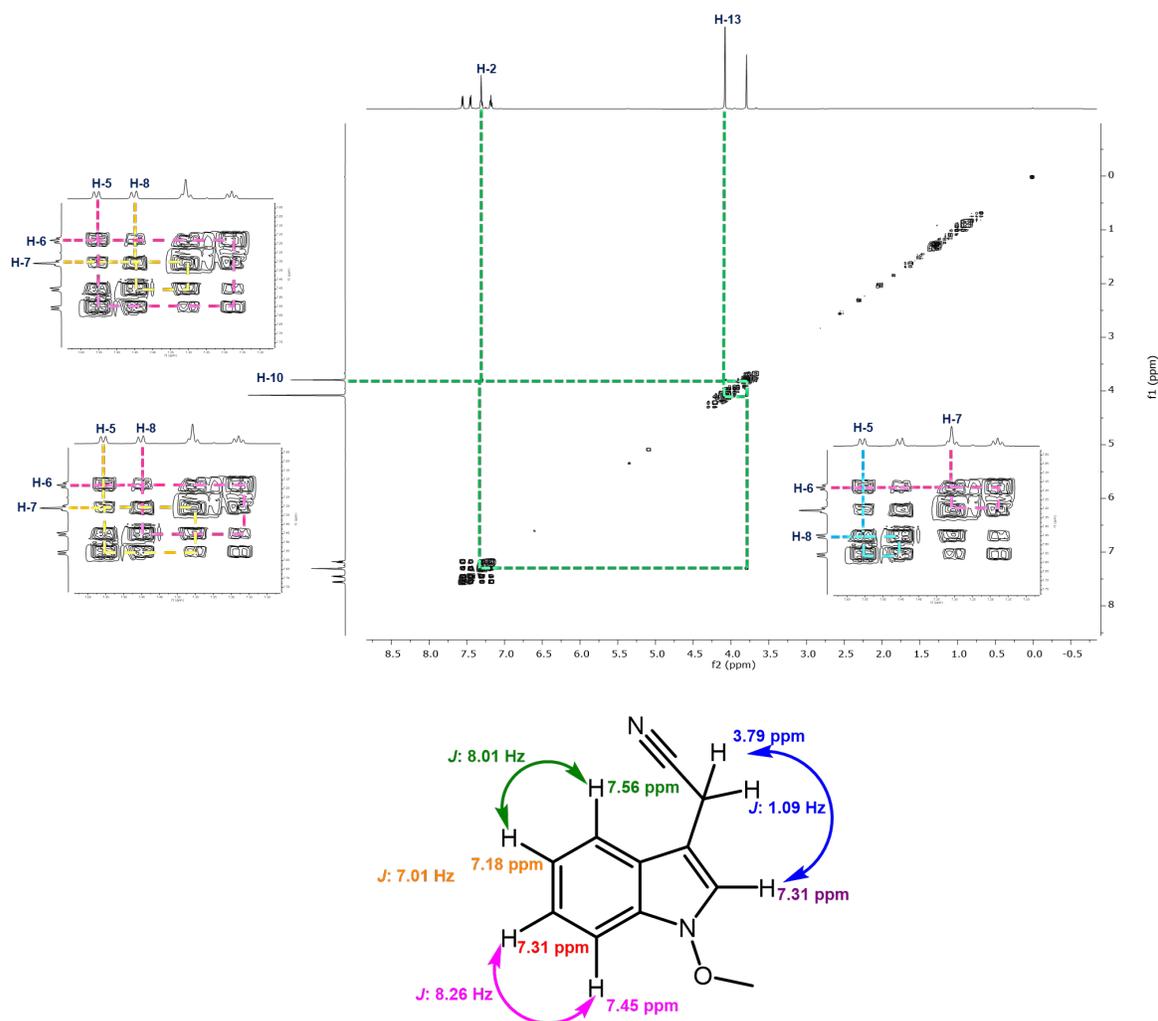


Figura 2.4 Correlaciones homonucleares H-H, COSY de compuesto 10.

A fin de definir inequívocamente la identidad de las señales también se analizaron las correlaciones a dos y tres ligaduras (HMBC). La señal en δ_C 100.40 mostró correlación a 2J con el metileno en δ_H 3.79/ δ_C 14.39 y los metinos en δ_H 7.56/ δ_C 118.40 y 7.31/ δ_C 121.80, a 3J y 2J respectivamente en el experimento de HMBC (Espectro 5), lo que permite asignar estas señales a C-10, C-5 y C-2 respectivamente. Por otro lado, el metino en 7.31/ δ_C 121.80 (C-2) muestra

correlación con el carbono en 14.39 (C-10) lo que confirma su asignación. La asignación de C-5 a través del sistema de espines y las correlaciones en COSY permite asignar los metinos en δ_H 7.18/ δ_C 120.50, δ_H 7.31/ δ_C 123.3 y 7.45/ δ_C 108.70 como 6, 7 y 8 respectivamente. Este análisis y lo reportado en la literatura (Takasugi *et al.*, 1986, Kang *et al.*, 2018) permite confirmar la estructura propuesta para una fitoalexina de tipo indol caracterizada como 1-metoxi-1H-indol-3-acetonitrilo o caulilexina C, el cual se sugiere es un derivado hidrolizado del glucosinolato neoglucobrasicina (Figura 2.5).

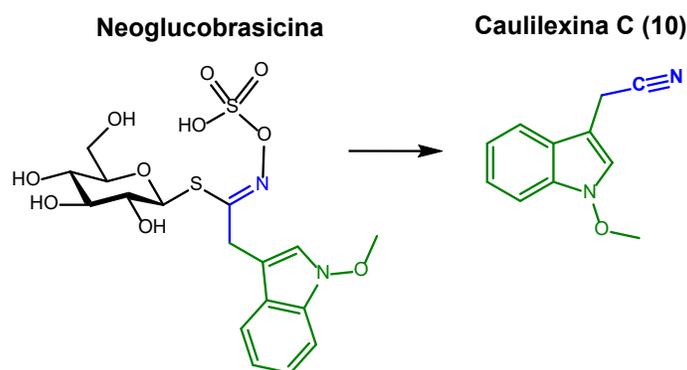
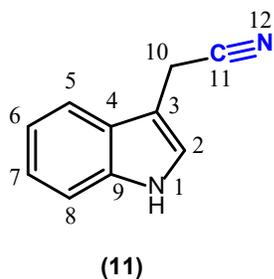


Figura 2.5 Posible glucosinolato precursor de caulilexina C.

2.2.2.3 Elucidación estructural de indol-3-acetonitrilo



El siguiente compuesto aislado fue el **11** el cual se obtuvo como un líquido de color naranja. Con un $m/z=156$ en su espectro de masas obtenido por la técnica EM-IQ, que corresponde a la fórmula molecular $C_{10}H_8N_2$.

El espectro de IR presenta una banda $\nu = 3405.09\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo N-H, por otro lado, la vibración stretching a 2250.92 cm^{-1} indica la presencia de un grupo nitrilo ($C\equiv N$), además se observan las vibraciones C-H del sistema aromático a $\delta = 3057.07\text{--}2914.91\text{ cm}^{-1}$ y $\nu = 740.44\text{ cm}^{-1}$.

El espectro de RMN de 1H de 600 MHz (Espectro 8) se observó prácticamente el mismo patrón de señales que en el compuesto **10** por lo que se infirió que se trataba

de otro compuesto fitoalexínico de tipo indol. Para este compuesto se observa una señal singlete ancha que integra para un protón en δ_H 8.17, el cual corresponde a una amina secundaria

Al igual que en el compuesto **10**, a campo bajo se evidencia la presencia de cinco metinos aromáticos, así como un sistema AMBX conformado por una señal doble de doble que integra para un H en δ_H 7.59 con $J = 7.92$ y 0.86 Hz, una señal doble de triple en δ_H 7.40 ($J = 8.18$ y 0.82 , 0.82 Hz, 1H), una señal doble de doble de doble que integra para un H en δ_H 7.25 con $J = 8.18$, 7.06 y 1.12 Hz, así como una señal doble de doble de doble en δ_H 7.18 (ddd, $J = 8.0$, 7.10 , 0.99 Hz, 1H) (Figura 2.6). El quinto metino que se encuentra en δ_H 7.23 ($J = 2.32$ y 1.12 Hz) corresponderá entonces, al presente en el anillo de pirrol.

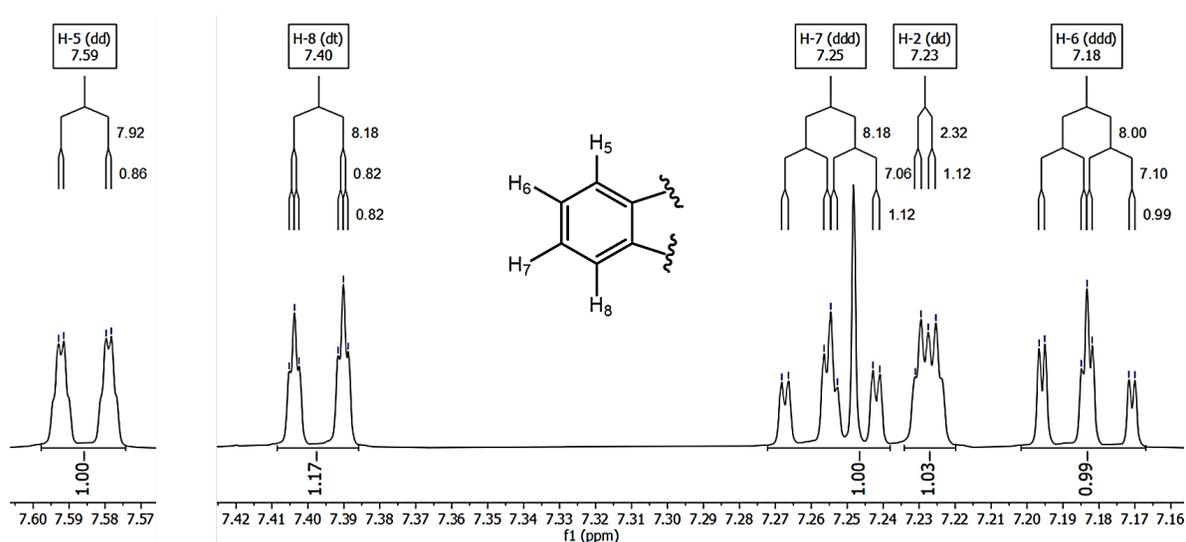


Figura 2.6 Señales de protones aromáticos del anillo aromático 1,2-disustituido del compuesto 11.

En la región media del espectro se observa una señal doble que integra para 2H en δ_H 3.84 ($J = 1.00$ Hz), que por su desplazamiento químico al igual que en el compuesto **10**, pertenece a un metileno alfa a un grupo nitrilo ($C\equiv N$).

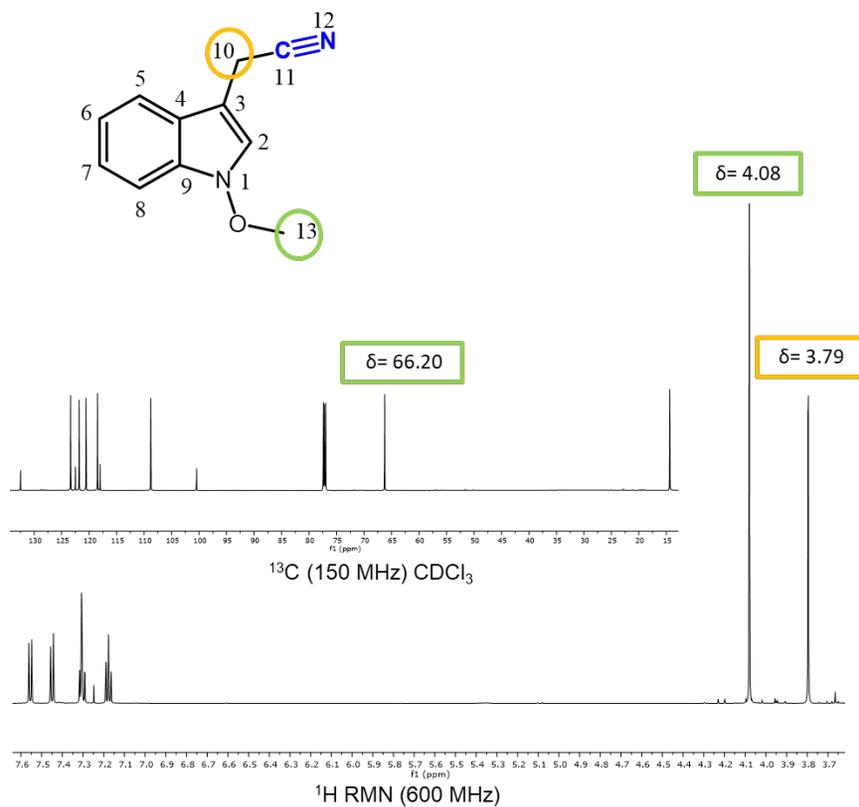
Para este compuesto el espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 9) mostró 10 señales de carbono correspondientes a 4 carbonos cuaternarios (δ 118.33, 136.35, 126.08 y 104.90), siendo tres de ellos parte del anillo de indol y el cuarto pertenece al grupo

nitrilo, también se observa el C perteneciente al metileno alfa al grupo C≡N en δ 14.53, así como 5 metinos (δ 122.83, 118.19, 120.37, 123.04 y 111.61) que conforman el sistema aromático de tipo indol.

Nuevamente las correlaciones C-H a un enlace del experimento HSQC ([Espectro 10](#)) nos permitió asignar de forma inequívoca el protón correspondiente a cada uno de los C: δ_H 3.84/ δ_C 14.53, δ_H 7.18/ δ_C 120.37, δ_H 7.23/ δ_C 122.83, δ_H 7.25/ δ_C 123.04, δ_H 7.40/ δ_C 111.61, δ_H 7.59/ δ_C 118.19.

Como ya se ha mencionado los experimentos de este compuesto comparten gran semejanza con el compuesto **10**; ambos presentan el mismo patrón de di sustitución y difieren únicamente en que en este compuesto no se encuentra presente el grupo metoxilo unido al N del indol o a cualquier otra posición, lo cual se confirma con la presencia de 5 carbonos cuaternarios constituyentes del anillo indol y del grupo ciano ([Figura 2.7](#)) y en el espectro de IR con la presencia de una banda $\nu = 3405.09$ cm^{-1} perteneciente al grupo amino secundario ([Espectro 13](#)).

A) Caulilexina C (10)



B) 3-indolacetonitrilo (11)

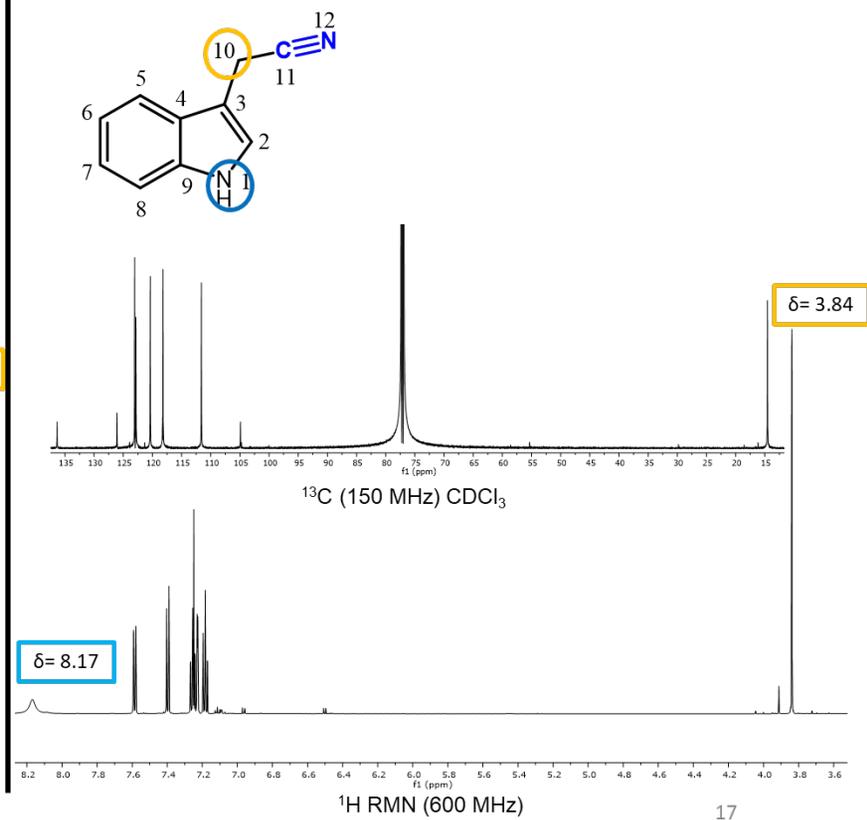


Figura 2.7 A) espectros de ¹H, ¹³C del compuesto 10 (Caulilexina C). B) espectros de ¹H, ¹³C del compuesto 11 (indol-3-acetonitrilo); (¹³C, 150 MHz; ¹H, 600 MHz).

Al igual que en el compuesto anterior, las correlaciones de COSY ([Espectro 11](#)) confirman el sistema de espines aromáticos, permitiendo asignar la resonancia mediante cruces de δ_H 7.18 ($J = 7.10$ Hz) con δ_H 7.59 ($J = 7.92$ Hz), y de δ_H 7.40 ($J = 8.18$ Hz) con δ_H 7.25 ($J = 8.18$ Hz). Además se observa la correlación debida al efecto W entre los protones en $\delta_{H10a,b}$ 3.84 ($J = 1.00$ Hz) de la posición α al grupo $C\equiv N$ con el protón de 7.23 ($J = 1.12$ Hz) perteneciente a la posición 2 del anillo de indol. (Figura 2.8)

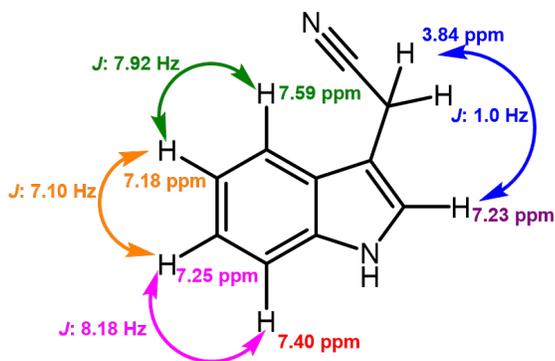
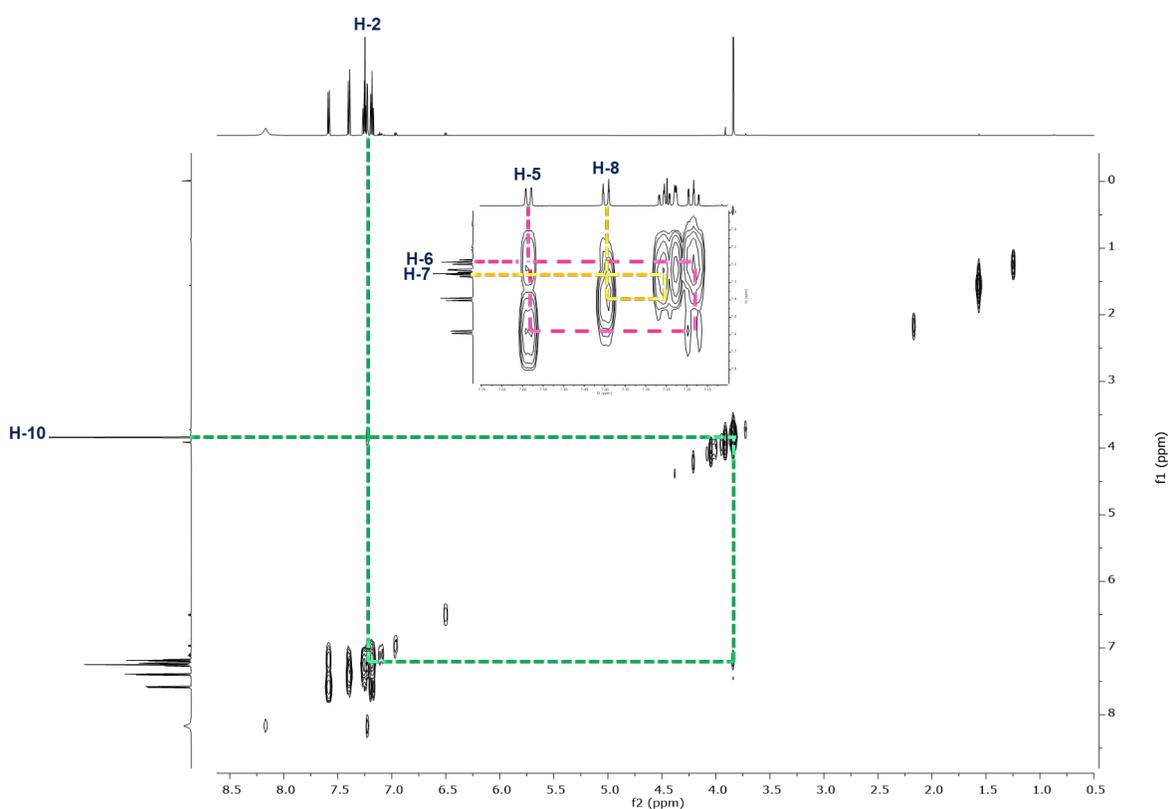


Figura 2.8 Correlaciones homonucleares H-H, COSY de compuesto 11.

Al analizarse el espectro de HMBC ([Espectro 12](#)) se observa que la señal en δ_C 104.90 correlaciona con el metileno en δ_H 3.84/ δ_C 14.53 y los metinos en δ_H 7.59/ δ_C 118.19 y 7.23/ δ_C 122.83, lo que permite asignar a estas señales a C-10, C-5 y C-2 respectivamente. Por otro lado, el metino en δ_H 7.40/ δ_C 111.61 correlaciona con δ_H 7.59/ δ_C 118.19, δ_H 7.25/ δ_C 123.04 y δ_H 7.18/ δ_C 120.37 lo que permite en conjunto con el experimento de COSY y las constantes de acoplamiento en H asignar a los metinos a las posiciones 6, 7 y 8 respectivamente. La correlación de δ_H 7.23/ δ_C 122.83 con el metileno en δ_C 14.53, confirma su asignación a la posición 2. A través de la evidencia de este análisis se caracteriza al compuesto **11** como indol-3-acetonitrilo, lo cual se confirmó por CG-EM por comparación del espectro de masas con la base de datos de la biblioteca NIST ([Cromatograma 1](#)). Se sugiere que este compuesto es un derivado hidrolizado de tipo ciano del glucosinolato glucobrasisina ([Figura 2.9](#)).

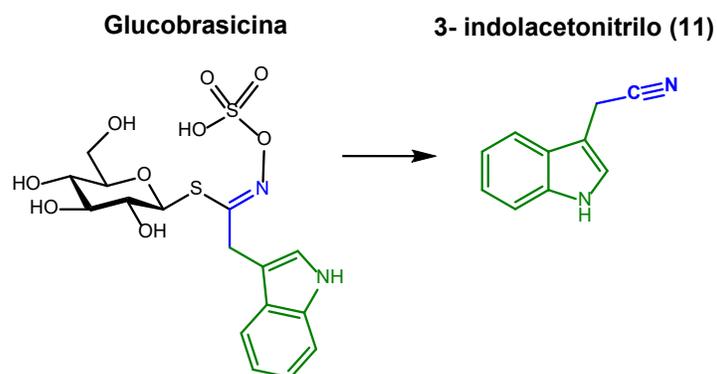
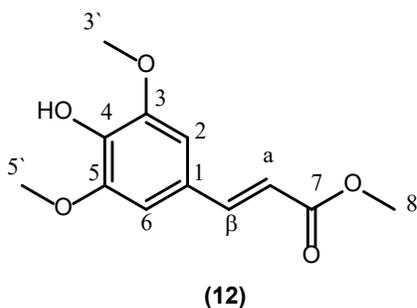


Figura 2.9 Posible glucosinolato precursor de indol-3-acetonitrilo.

2.2.2.4 Elucidación estructural de sinapato de metilo



El compuesto **12** fue aislado como un líquido amarillo. El espectro de RMN 1H de 600MHz ([Espectro 15](#)) mostró a campo bajo dos protones vinílicos a δ_H 7.61 y δ_H 6.39 con una constante de acoplamiento trans de 15.87 Hz ([Figura 2.10](#)), además de una señal singulete que integra para 2H

en δ_H 6.77 que forman parte del sistema aromático. AA'. En la zona media del espectro se observa una señal singulete de metoxilo, en δ_H 3.92 que integra para 6H es decir 2 metoxilos simétricos pertenecientes al anillo aromático, una señal singulete en δ_H 3.80 base de oxígeno tipo éster que integra para 3H, así como una señal singulete en δ_H 5.7 (1H) perteneciente al grupo hidroxilo.

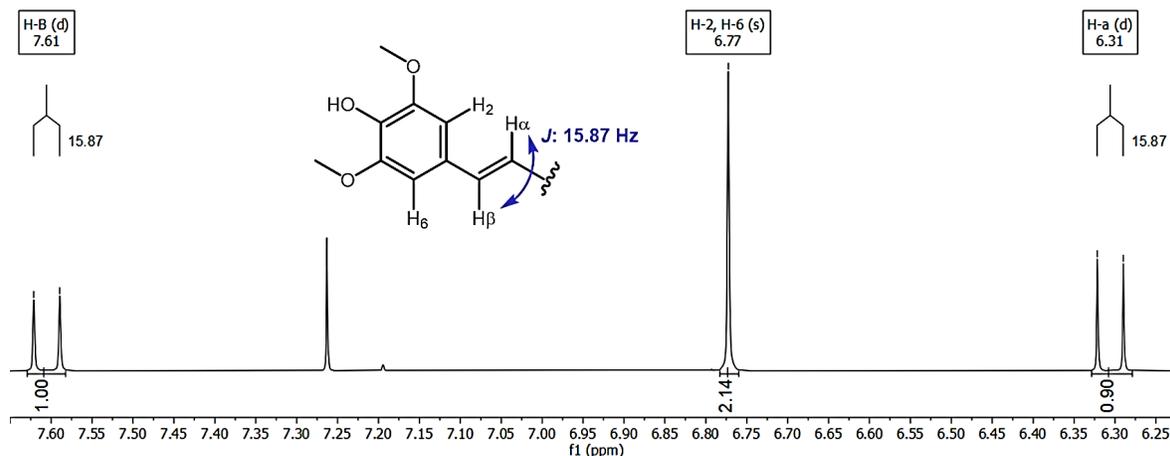


Figura 2.10 Señales de los protones vinílicos del compuesto 12.

En el espectro de RMN de ^{13}C ([Espectro 16](#)) mostró 9 señales ($\delta_C = 167.69, 147.30, 145.25, 137.22, 125.99, 115.65, 105.13, 56.42, 51.71$), observándose la evidente presencia de 3 carbonos cuaternarios ($\delta_C = 167.69, 137.22$ y 125.99) siendo la señal en $\delta_C 167.69$ perteneciente a un carbonilo. Por otro lado, por la duplicación en el tamaño de la señal en $\delta_C 147.30$ se asume que corresponde a 2 carbonos cuaternarios simétricos. En $\delta_C 145.25$ y $\delta_C 125.99$ se observan 2 señales pertenecientes a metinos, y por el tamaño de la señal en $\delta_C 105.13$ se infiere la presencia de 2 metinos simétricos. En la zona media se observan 2 señales de carbonos base de oxígeno, una en $\delta_C 51.71$ y otra en $\delta_C 56.42$ que de acuerdo con su tamaño corresponde a 2 metoxilos simétricos. La contribución de HSQC ([Espectro 17](#)) nos proporcionó de manera inequívoca la correlación C-H a una ligadura de los bases de oxígeno: $\delta_H 3.92/\delta_C 56.42$, $\delta_H 3.80/\delta_C 51.71$, los vinílicos: $\delta_H 7.61/\delta_C 145.25$, $\delta_H 6.39/\delta_C 115.65$ y los metinos aromáticos $\delta_H 6.77/\delta_C 105.13$.

A través del experimento COSY ([Espectro 18](#)) mediante la correlación por cruces se confirmaron los protones vinílicos δ_H 7.61/ δ_C 145.25, δ_H 6.39/ δ_C 115.65. con $J=15.87$ Hz característica del doble enlace de los compuestos fenólicos de tipo cinámico. Por lo tanto, con la información obtenida hasta este momento se sugiere que el compuesto **12** es de tipo éster de ácido cinámico.

El experimento de HMBC ([Espectro 19](#)) fue crucial para asignar de manera inequívoca la estructura y conocer de qué éster de ácido cinámico se trataba. La señal protón en δ_H 3.92 que representa a 2 metoxilos correlaciona a 3J con la señal de carbono en δ_C 147.30 que representa a 2 carbonos cuaternarios. La señal de carbono en δ_C 137.22 correlaciona a 3J con la señal en δ_H 6.77 la cual corresponde a 2 metinos, los carbonos presentes en la señal en δ_C 147.30 correlacionan a 3J con el protón en δ_H 5.70 perteneciente a un grupo hidroxilo, y a 2J con los metinos en δ_H 6.77. A partir de este análisis se establece el fragmento estructural del anillo aromático del ácido, asignando la posición H-1 al carbono en δ_C 125.99, los metinos en δ_H 6.77/ δ_C 105.13 corresponden a las posiciones H-2 y H-6, las posiciones H-3 y H-5 pertenecen a los cuaternarios en δ_C 147.30 los cuales se encuentran directamente unidos a los metoxilos en δ_H 3.92/ δ_C 56.42 (H-3' y H-5'). El grupo OH se encuentra en la posición 4 (δ_C 137.22) del anillo aromático. El fragmento alifático se establece mediante la correlación de C-1 a 3J con el protón vinílico en δ_H 6.39 al cual por el efecto de desprotección del carbonilo (C-7) se le atribuye la posición alfa; C-7 correlaciona a 3J con el protón vinílico en δ_H 7.61 a quien se le asigna la posición B y a su vez correlaciona con los protones del base de oxígeno en δ_H 3.80 de la posición H-8, confirmando que este ácido se encuentra esterificado ([Figura 2.11](#)). Por tanto, de acuerdo con el análisis el compuesto **12** es caracterizado como sinapato de metilo, un derivado esterificado del ácido sinapico.

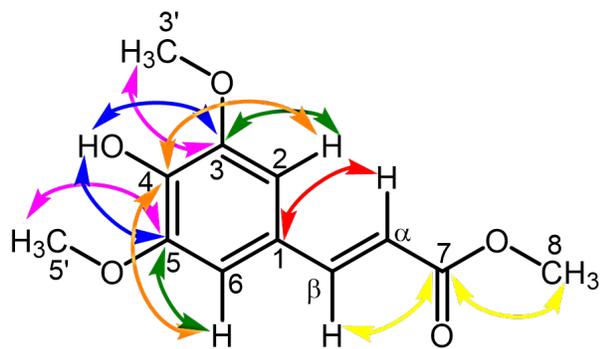
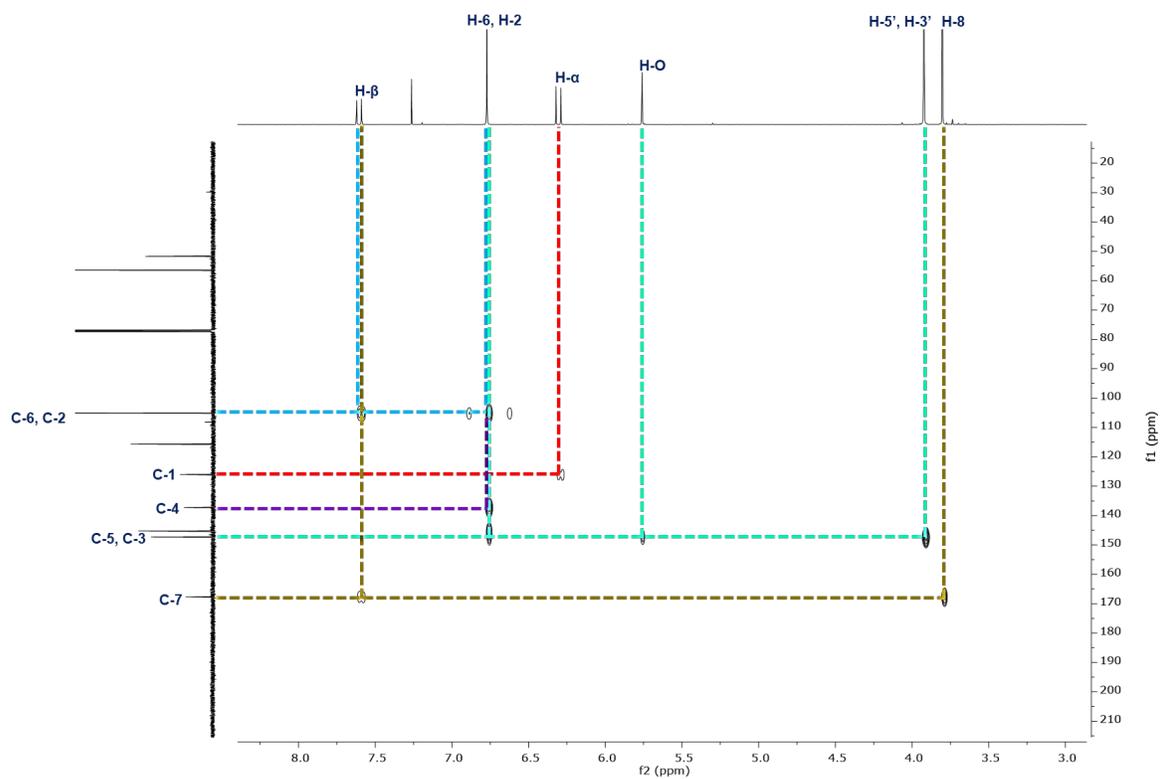
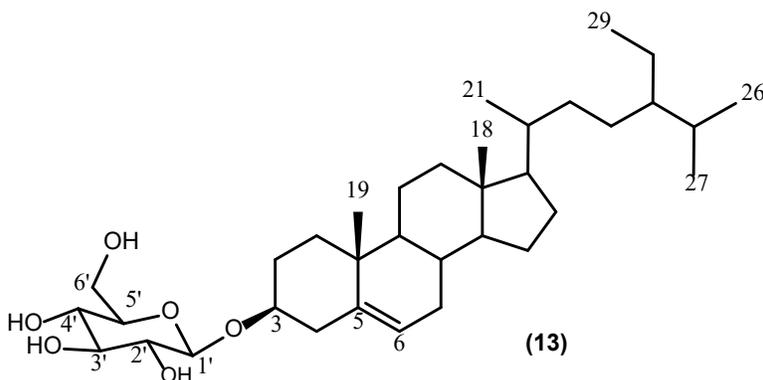


Figura 2.11 Correlaciones heteronucleares C-H, HMBC de compuesto 12.

2.2.2.5 Elucidación estructural de β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido



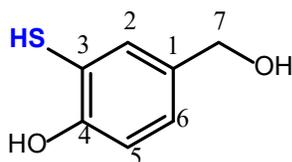
El compuesto **13** fue aislado como un polvo amorfo. Los espectros de RMN de ^{13}C y ^1H ([Espectro 20 y 21](#)) presentan señales de un esqueleto de esterol, lo cual se confirmó por la presencia de una señal

multipléte en 3.55 que corresponde H-3, además de dos carbonos olefínicos, un cuaternario con δ 140.94 correspondiente a C-5, y un metino con δ 122.48 asignado al C-6 (δ_{H} 5.32), y 6 grupos metilo: δ_{C} 20.01/ δ_{H} 0.96 CH₃-19, δ_{C} 19.61/ δ_{H} 0.88 CH₃-21, δ_{C} 19.22/ δ_{H} 0.80 CH₃-29, δ_{C} 19.07/ δ_{H} 0.78 CH₃-26, δ_{C} 12.29/ δ_{H} 0.76 CH₃-27, δ_{C} 12.14/ δ_{H} 0.64 CH₃-18 distinguiéndose la señal característica de los metilos de las posiciones 26, 27 y 29 con multiplicidades de, dos señales dobles ($J = 6.64$ Hz) y una señal triple respectivamente ($J = 7.43$ Hz). También se observaron señales de un azúcar en δ_{H} 4.35/ δ_{C} 101.69 (anomérico), δ_{H} 3.35/ δ_{C} 77.15 (C-3'), δ_{H} 3.22/ δ_{C} 76.68 (C-4'), δ_{H} 3.17/ δ_{C} 74.18 (C-2'), δ_{H} 3.33/ δ_{C} 70.80 (C-5'), δ_{H} 3.79, 3.68/ δ_{C} 62.21 (C-6'); estas señales son características de una glucopiranososa y este sustituyente está en C-3 (δ 79.50) junto con el protón en δ_{H} 3,55. De acuerdo con el análisis espectroscópico y lo reportado en la literatura ([Khatun et al., 2012](#)), el compuesto **13** fue caracterizado como β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido.

Este glucósido esteroideo se ha reportado con diferentes actividades biológicas como actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *P. mirabilis*, *S. typhi*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *B. subtilis* ([Njinga et al., 2016](#); [Njoroge et al., 2019](#)), actividad antifúngica sobre *C. albicans*, *P. notatum* y *A. niger* ([Njoroge et al., 2019](#)), actividad citotóxica contra diferentes líneas celulares de cáncer como el de mama (MCF-7, IC₅₀ = 3.31 – 52.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hígado (Hep-G2, IC₅₀ = 21,40 - 54,34 $\mu\text{g}/\text{ml}$) colorrectal (HCT-116, IC₅₀ = 3,30 - 15,82 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

(Youssif *et al.*, 2020; Elsbaey *et al.*, 2017), laringe (Hep-2, IC₅₀= 30,89 µg/ml) (Elsbaey *et al.*, 2017).

2.2.2.6 Elucidación estructural del compuesto 14



El compuesto **14** fue aislado como un líquido naranja. En el espectro de IR se observa una banda $\nu = 3600- 3200\text{cm}^{-1}$ correspondiente al grupo hidroxilo OH ([Espectro 27](#)).

(14) El espectro de RMN ¹H de 600MHz evidenció, a campo bajo, la presencia de 3 señales de metinos pertenecientes a un sistema aromático en δ_{H} 8.02 (d $J= 2.8$ Hz), δ_{H} 7.36 (d, $J = 8.5$ Hz) δ_{H} 7.24 (dd $J=8.5, 2.8$ Hz) así como una señal de metileno base de oxígeno en la región media del espectro en δ_{H} 4.56 2H s.

En el espectro de RMN de ¹³C ([Espectro 23](#)) se observan 7 señales de carbono, de las cuales 3 son cuaternarios (δ_{C} 154.66, δ_{C} 152.37, δ_{C} 90.09), tres más corresponden a metinos aromáticos (δ_{C} 137.32, δ_{C} 125.06, δ_{C} 123.31) y se observa una señal de metileno en δ_{C} 65.60.

El experimento de HSQC ([Espectro 24](#)) nos permitió asignar de manera inequívoca la correlación C-H a una ligadura. (δ_{H} 8.02/ δ_{C} 137.32; δ_{H} 7.24/ δ_{C} 123.31; δ_{H} 7.36/ δ_{C} 125.06).

De acuerdo con las correlaciones observadas en el espectro COSY ([Espectro 25](#)) y a través de las constantes de acoplamiento podemos recrear el sistema aromático de la siguiente manera, la señal en δ_{H} 8.02 ($J = 2.8$ Hz) está en la posición meta respecto a la señal en δ_{H} 7.24 ($J = 2.8, 8.5$ Hz) la cual a su vez se encuentra en la posición orto respecto a δ_{H} 7.36 ($J= 8.5$ Hz) conformando así un sistema aromático ABX, asignándoles las posiciones 2, 6 y 5 respectivamente ([Figura 2.12](#)). El espectro HMBC ([Espectro 26](#)) muestra las correlaciones ²J del carbono cuaternario en δ_{C} δ_{C} 152.37 con los protones 2 y 6 por lo que se asigna a este C la posición 1. El carbono en δ_{C} 123.31(C-5) presenta una correlación ²J con H-6. Por otro lado, el

carbono en δ_c 154.66 (C-4) presenta una correlación 2J con H-5, y el C-2 (δ_c 137.32) tiene una correlación 3J con H-6, por lo que tentativamente al carbono en δ_c 90.09 se le asigna la posición C-3.

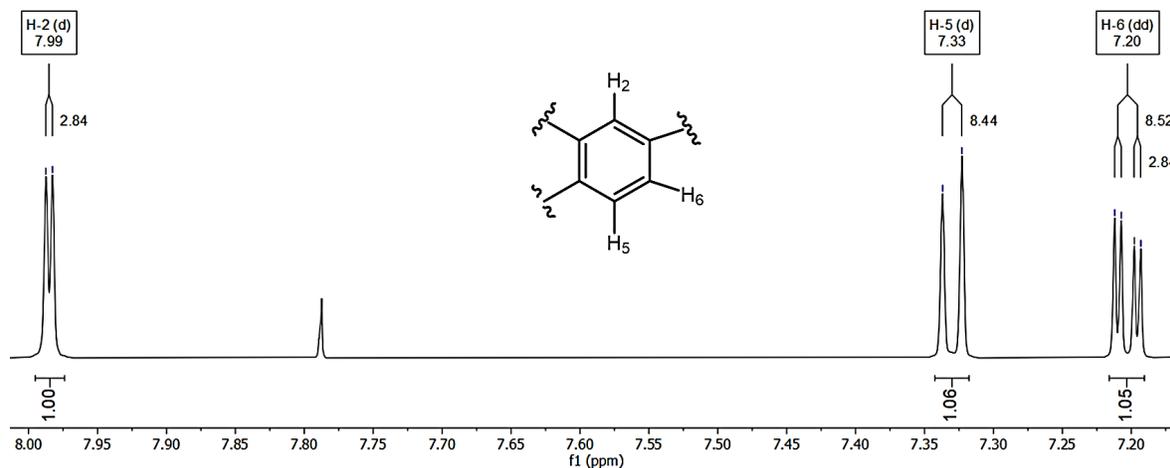


Figura 2.12 Señales de los protones aromáticos del compuesto 14.

La información del espectro de IR nos sugiere la presencia de hidroxilos, sin embargo, debido a los desplazamientos de los carbonos cuaternarios (C-3 δ_c 90.09) se sugiere además la presencia de otro tipo de heteroátomo, como el azufre. Esta hipótesis la respaldamos con un análisis de CG-EM, en el cual, por una comparativa por el espectro de masas, la biblioteca NIST nos sugiere con un score de alrededor del 75 % que puede tratarse de algún mercaptofenol ([Cromatograma 2](#)). Por tanto, con la evidencia obtenida hasta el momento, se propone que el compuesto **14** puede tratarse de 4-(hidroximetil)-2-mercaptofenol. Para confirmar la presencia de azufre, y la identidad de este compuesto será necesario realizar análisis enfocados a este átomo (análisis elemental, RMN ^{33}S), lo cual al momento no ha sido posible por la poca cantidad con la que se cuenta.

2.2.3 Actividad citotóxica de compuestos puros

Las fitolexinas **10**, **11** y el compuesto fenólico **12** aisladas de brócoli fueron evaluados en un ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular de cáncer

cervicouterino (HeLa), para la cual las evaluaciones previas de los extractos mostraron selectividad. Se llevó a cabo una curva dosis respuesta con las siguientes concentraciones: 100, 10, 1.0, 0.1, 0.01 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y a partir de ella se calculó la Cl_{50} para cada compuesto, los resultados se muestran en la [Tabla 2.13](#).

Tabla 2.13 Cl_{50} de 10, 11 y 12 de Brassica oleracea L. var. italica.

Compuesto	HeLa $\text{Cl}_{50} \mu\text{g} / \text{mL}$	HeLa $\text{Cl}_{50} \mu\text{M}$
Caulilexina C (10)	23.43 \pm 2.44	125.97 \pm 2.44
indol-3-acetonitrilo (11)	33.65 \pm 1.68	215.71 \pm 1.68
Sinapato de metilo (12)	42.47 \pm 2.23	178.27 \pm 2.23
Sulforafano	24.48 \pm 2.98	138.07 \pm 2.98

Cl_{50} : Concentración a la cual se inhibe el 50 % de la población celular. Control (+) Taxol Cl_{50} 30 nM

Los resultados obtenidos de los ensayos citotóxicos realizados a las fitoalexinas caulilexina C e indol-3-acetonitrilo, así como al compuesto fenólico sinapato de metilo, indican que tienen una Cl_{50} de 125.97, 215.71 y 178.27 μM respectivamente, sobre la línea celular HeLa.

Ya se ha establecido anteriormente que la única diferencia estructural entre indol-3-acetonitrilo y 1-metoxi-1H-indol-3-acetonitrilo (caulilexina C) es la sustitución del H del amino del indol por un grupo metoxilo, los resultados del ensayo de citotoxicidad, sugieren que esta modificación es la responsable del incremento en un 30% del efecto citotóxico por parte de caulilexina C. Esto podría deberse al incremento de la lipofilicidad de caulilexina C ($c \log P = 1.67$ vs $c \log P 1.18$ indol-3-acetonitrilo), aunado a esto, el metoxilo confiere a caulilexina C un incremento en el volumen, lo que podría provocar una mejor interacción con el blanco biológico.

Actualmente existe reportado en la literatura el 3-indolcarbinol, una fitoalexina también de origen crucífero que posee a diferencia de los compuestos **10** y **11** un grupo OH en la posición 10. A esta fitoalexina se le han atribuido actividades como antimicrobiano (**Monte et al., 2014; Julliard et al. 2017**), antiarrítmico, antioxidante, antihipertensivo (**Prado et al., 2022**), antiviral sobre el virus del herpes simple (**Stoner, 2008**), antiinflamatorio (**Jiang, et al., 2013; Busbee, et al., 2014; Prado,**

et al., 2022), recientemente se ha evaluado su actividad como neuroprotector en el modelo de enfermedad de Parkinson en ratas (Mohamad, *et al.*, 2022), así como su potencial citotóxico sobre líneas celulares de cáncer de mama ($IC_{50} = 248.1 \mu M$) (Curaso, *et al.*, 2014) próstata ($IC_{50} = 150 - 285 \mu M$) (Nachshon-Kedmi, *et al.*, 2003), melanoma ($IC_{50} = 284 \mu M$) (Quirit, *et al.*, 2017), hígado ($IC_{50} = 488 \mu M$) (Lee, *et al.*, 2019), y colorectal ($IC_{50} = 456 \mu M$) (Lee, *et al.*, 2021).

Por otro lado, una de las fitoalexinas más representativa y ampliamente estudiada es el 3-indolcarbinol (I3C), la cual al igual que el indol-3-acetonitrilo (**11**) es producto de la hidrólisis de la glucobrasicina, este compuesto posee a diferencia del compuesto **11** un grupo OH en la posición 10. Esta fitoalexina se ha demostrado que I3C modula varios factores de transcripción nuclear (Kim y Milner, 2005; Rahman *et al.*, 2004), induce enzimas de fase I y fase II que metabolizan carcinógenos, incluidos los estrógenos (Curaso *et al.*, 2014), mejora la reparación del ADN al afectar varias de las proteínas involucradas en este proceso e induce la detención del ciclo celular en G1 y la apoptosis (Rogan, 2006; Chen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014), por lo que todas estas actividades conducen a posibles efectos citotóxicos, los cuales se han reportado sobre líneas celulares de cáncer de mama ($CI_{50} = 248.1 \mu M$; línea celular MCF-7) (Curaso *et al.*, 2014) próstata ($CE_{50} = 100 \mu M$; línea celular PC-3) (Wang *et al.*, 2012), melanoma ($[C] = 200 \mu M$; líneas celulares G-361, SK-MEL-28, SK-MEL-30, RPMI-7951) (Aronchik *et al.*, 2014), hígado ($CI_{50} = 93 \mu M$; línea celular HepG2) (Krajka *et al.*, 2015) y páncreas ($[C] = 100 \mu M$; línea celular Panc-1) (Paik *et al.*, 2013), y colorrectal ($[C] = 300 \mu M$; línea celular HT-29) (Nakamura *et al.*, 2009). Además de que se ha comprobado la inhibición de la tumorigénesis en un modelo de ratón al observarse la reducción tumoral de cáncer pulmonar en hasta un 40% (Kassie *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, las CI_{50} de los compuestos **10** y **11** son 125.97 y 215.75 μM , respectivamente sobre la línea celular cáncer cervicouterino (HeLa); estas concentraciones se encuentran dentro de los rangos de CI_{50} reportados para I3C en diferentes líneas celulares de cánceres humanos (90 – 250 μM), a pesar de que el I3C no se ha evaluado sobre este tipo de cáncer (cervicouterino), nos permite

proponer que **10** y **11** podrían tener potencial citotóxico no solo sobre cáncer cervicouterino, sino sobre otros tipos de cánceres incluyendo cáncer de mama, otro de los tipos de cáncer de importancia médica en mujeres.

Cabe resaltar que la diferencia estructural entre **11** y I3C es un grupo ciano y un OH en la posición **10**, respectivamente (**Figura 2.13**). El grupo nitrilo presente en **11** parece conferirle a la molécula una mayor actividad citotóxica ($CI_{50} = 215.71 \mu M$) si lo comparamos con la CI_{50} reportada para I3C en cáncer de mama de $CI_{50} = 248.1 \mu M$.

Así mismo, la única diferencia estructural entre **11** y **10** es la sustitución del H del amino del indol por un grupo metoxilo, los resultados del ensayo de citotoxicidad, sugieren que esta modificación es la responsable del incremento en un 30% del efecto antiproliferativo por parte de caulilexina C (**10**).

Teniendo como precedente el hecho de que I3C ha presentado actividad antiviral sobre el virus del herpes simple (**Stoner, 2008**), y considerando que el cáncer cervicouterino es de origen viral, los compuestos **10** y **11** podrían proponerse como agentes antivirales y ser evaluados sobre el VPH.

Otras actividades que se le han atribuido a I3C son antiarrítmico, antioxidante, antihipertensivo (**Prado et al., 2022, 2008**), antiinflamatorio (**Jiang et al., 2013; Busbee et al., 2014; Prado et al., 2022**), y recientemente se ha evaluado su actividad como neuroprotector en el modelo de enfermedad de Parkinson en ratas (**Mohamad et al., 2022**). Mismas sobre las cuales sería interesante evaluar a los compuestos **10** y **11**.

Adicionalmente, I3C, fitoalexinas de tipo isotiocianato como rapalexina A (3IMI) y B (3IMIO), y fitoalexinas del grupo de las camalexinas, las cuales poseen un grupo tiazol en la posición 3 del anillo indólico (3TI), son de interés fúngico sobre hongos patógenos de cultivos crucíferos de Brassica como *Leptosphaeria maculans* y *Alternaria brassicicola* (**Pedras et al., 2012; Soledade et al., 2013**) lo cual nos genera nuevas áreas de interés para estos compuestos en el campo agrícola.

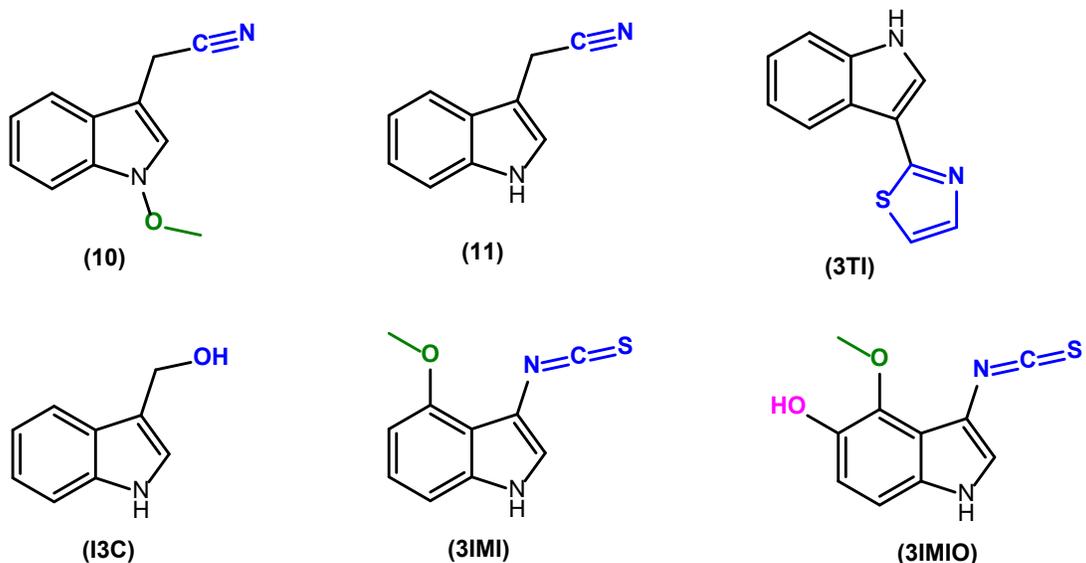


Figura 2.13 1-metoxi-1H-indol-3-acetonitrilo (10) (*caulilexina C*), indol-3-acetonitrilo (11), 3-(tiazol-2-il)indol (3TI) (*camalexina*), 3-indolcarbinol (I3C), 3-isothiocyanato-4-metoxi-1H-indole (3IMI) (*rapalexina A*), 3-isothiocyanato-4-metoxi-1H-indol-5-ol (3IMIO) (*rapalexina B*).

El sinapato de metilo (12) es un éster del ácido sinápico a la familia de los ácidos *p*-hidroxicinámicos (Figura 2.14), se encuentra abundantemente en las plantas de género *Brassica*. Los ácidos fenólicos de tipo cinámico muestran actividades anticancerígenas, antiaterogénicas, antipalúdicas, antifúngicas, antimicrobianas y antioxidantes (Abotaleb *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2021) y sus ésteres se consideran la clase más potente en comparación con las formas metoxiladas o hidroxiladas (Anantharaju *et al.*, 2016).

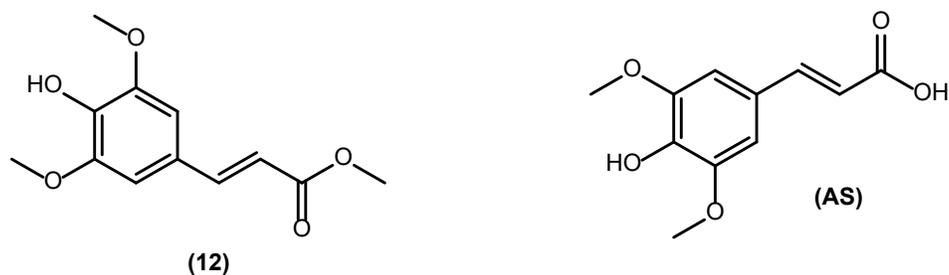


Figura 2.14 Estructura de sinapato de metilo (12) y su análogo el ácido sinápico.

Sinapato de metilo (**12**) ha sido reportado con actividad antioxidante, antimicrobial sobre *E. coli*. (**Nguyen et al., 2021**) y Filtro Uv (**Fan et al., 2021; Nguyen et al., 2021**) pero su actividad citotóxica aún no se ha descrito.

Sin embargo, su precursor el ácido sinápico (AS) además de que se ha reportado como eliminador de radicales ($CI_{50} = 30 \mu\text{g} / \text{mL}$), y se ha asociado con la detención del ciclo celular en fase S y la inducción de apoptosis, también se ha evaluado su efecto citotóxico sobre líneas de cáncer de colon ($CI_{50} = 200 \mu\text{M}$, línea celular SW480) (**Hudson et al., 2000**), próstata ($CI_{50} = 1000 \mu\text{M}$, líneas celulares PC-3, LNCaP) (**Canan et al., 2018**) mama ($CI_{50} = 4020 \mu\text{M}$, línea celular MCF-7, $CI_{50} = 7 \times 10^{-11} \text{ M}$, línea celular T47D) (**Somprasong et al., 2016; Kampa et al., 2004**), hepático ($CI_{50} = 1.7 \mu\text{M}$, línea celular HepG2) (**El-Hawary et al., 2018**), pulmón ($CI_{50} = 50 \mu\text{M}$, línea celular A549) (**Xinglong et al., 2021**) y cervicouterino ($CI_{50} = 1760 \mu\text{M}$, $7248 \mu\text{M}$, $910 \mu\text{M}$, línea celular HeLa) (**Somprasong et al., 2016; Hameed et al., 2016; Senawong et al., 2013**).

Los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad de esta tesis muestra que la CI_{50} determinada para el éster, sinapato de metilo (**13**) es $178.27 \mu\text{M}$, lo que significa que es que es alrededor de 100 más potente que la actividad reportada para el ácido precursor (AS, $CI_{50} = 910 - 7248 \mu\text{M}$) por 3 autores; por lo que podemos atribuir la mejora de la actividad a la presencia del grupo éster, además de volverlo un candidato de interés para contrarrestar la proliferación celular en distintas líneas celulares tomando como precedente que ya existe un estudio por parte de nuestro grupo de trabajo, sobre 4 análogos del ácido sinápico sobre la línea celular Hep3B con CI_{50} en un rango de $198.2 \mu\text{M}$ a $260.8 \mu\text{M}$ (**Castro et al., 2022**).

Aunado a esto, se decidió evaluar el sulforafano, el cual fue obtenido de manera comercial, ya que es uno de los principales compuestos de tipo isotiocianato reportados para el brócoli, y se le atribuye actividad anticancerígena (**Su et al., 2018**), antioxidante (**de Figueiredo et al., 2015**) y quimiopreventiva (**Jiang et al., 2018**). A pesar de que este compuesto ha sido ampliamente estudiado sobre diversas líneas celulares, no ha sido evaluado sobre la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa, por lo que es de relevancia la obtención de su $CI_{50} = 138.07 \mu\text{M}$.

Podemos observar que aún sobre el sulforafano el compuesto **10** (caulilexina C) es el que presenta mayor inhibición de la proliferación.

2.3 Conclusión

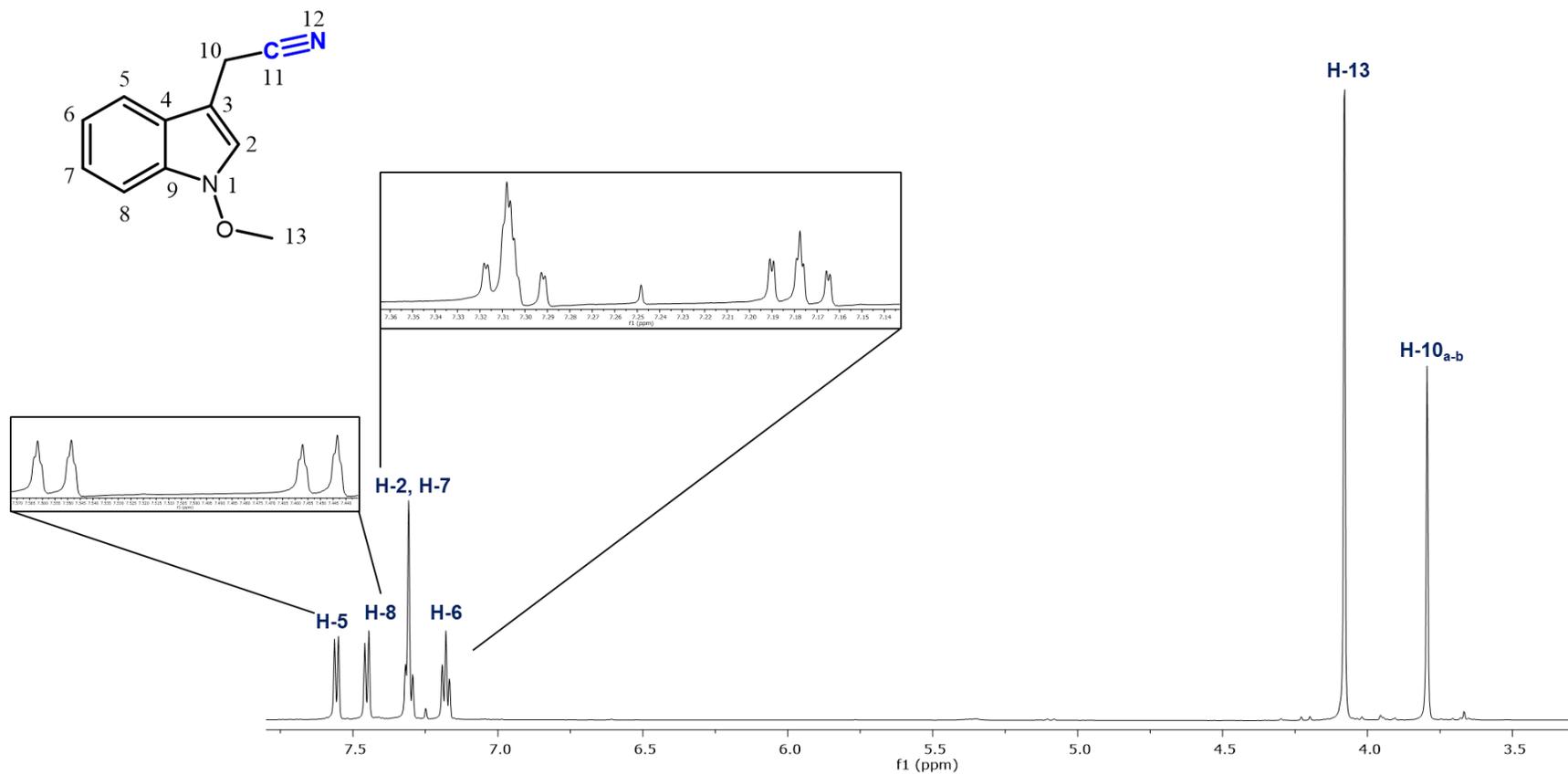
El estudio fitoquímico de extractos metanólicos de bagazo de pella, hoja de brócoli, permitió la obtención de caulilexina C (**10**), indol-3-acetonitrilo (**11**), sinapato de metilo (**12**), los cuales no se habían reportado en extractos de hoja de brócoli. Además, se aisló tanto de brócoli como de kale a β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido (**13**) un fitoesterol no reportado en esta especie. Además, a través del análisis por CG-EM, en las fracciones de hexano de cada uno de los vegetales, se identificaron esteroides como el γ -sitosterol, ésteres de ácido graso mayormente insaturados como el éster metílico del ácido hexadecanoico, así como un diterpeno mayoritario identificado como fitol.

Se realizó la evaluación de la actividad antiproliferativa de los extractos brócoli y kale, así como de las fases de metanol; los E. MeOH de hoja (var. *sabellica*), hoja y bagazo de pella (var. *itálica*), mostraron selectividad para la línea celular HeLa a [100 μ g / mL] con porcentajes de inhibición del 50.47, 47.04 y 51.20 %, respectivamente.

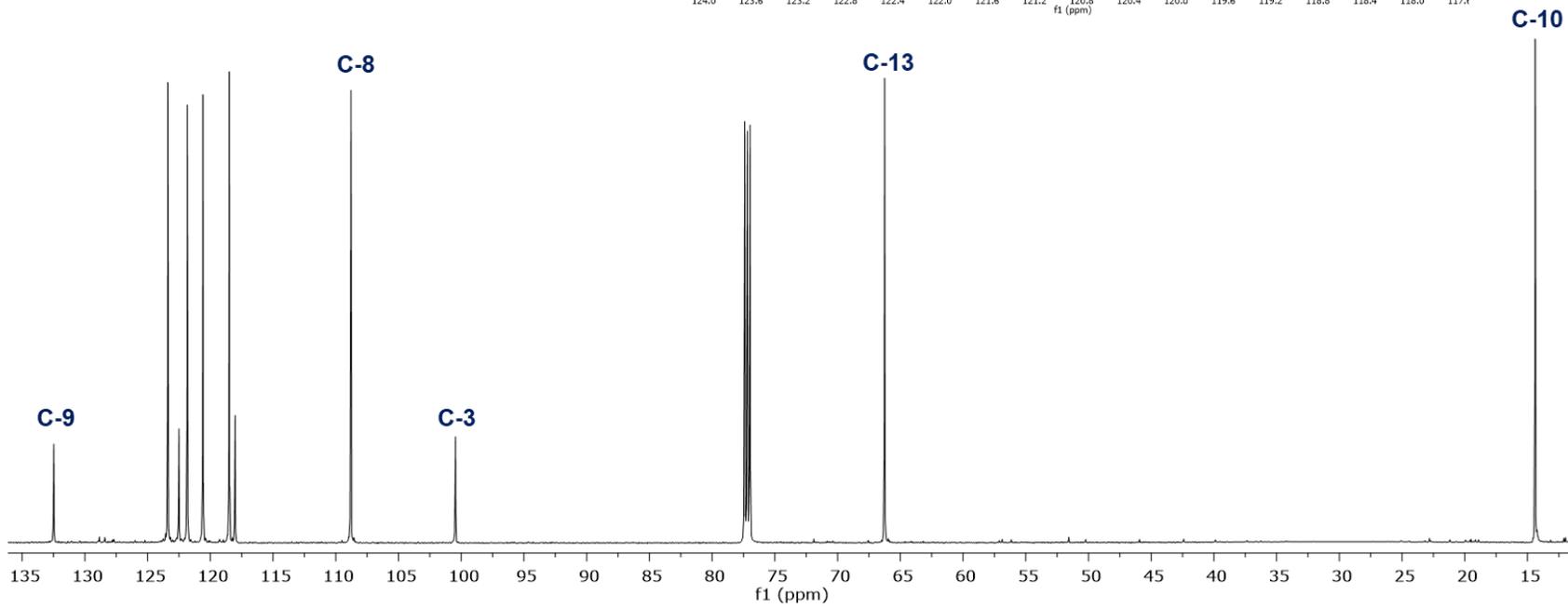
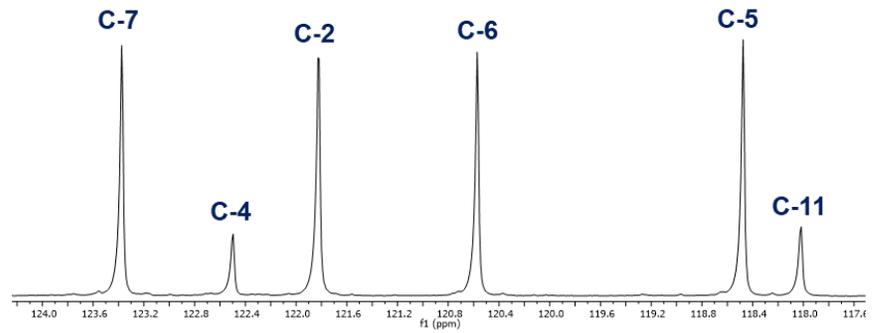
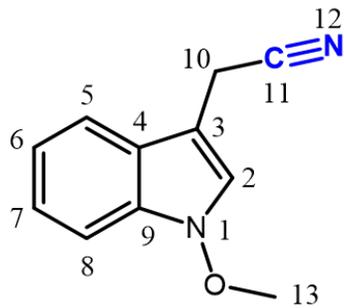
Los compuestos caulilexina C (**10**), indol-3-acetonitrilo (**11**), sinapato de metilo (**12**) aislados de los extractos activos, fueron evaluados en la línea celular HeLa sobre la cual se encontró selectividad, presentando CI_{50} de 125.97, 215.71, 178.27 μ M respectivamente.

Finalmente, el presente trabajo contribuye al estudio fitoquímico y citotóxico de los vegetales crucíferos de *Brassica oleracea* L. brócoli y kale. Proponiendo así a los compuestos fitoalexinicos como candidatos a posibles nutraceuticos enfocados al tratamiento del cáncer.

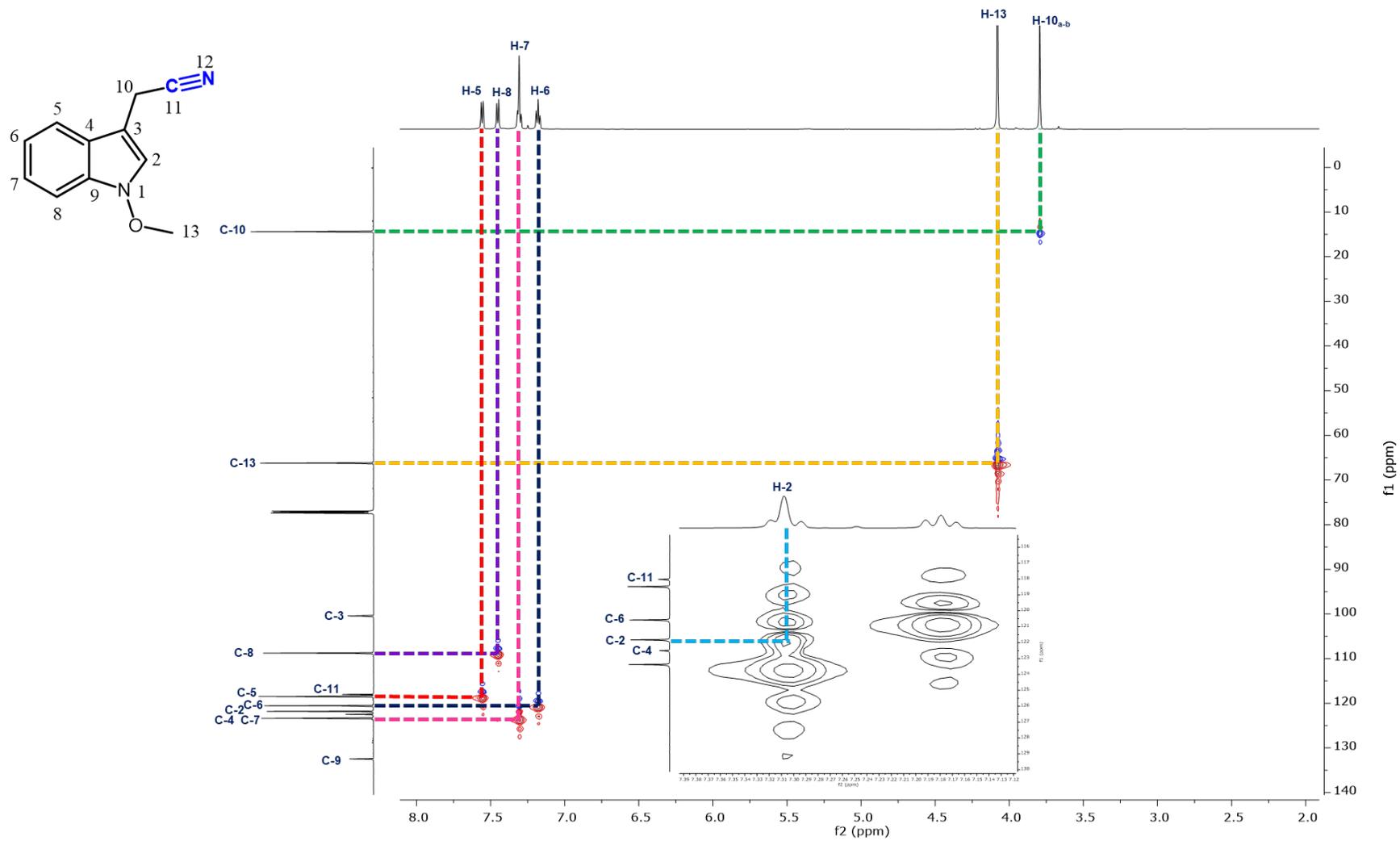
2.4 Anexos capítulo II



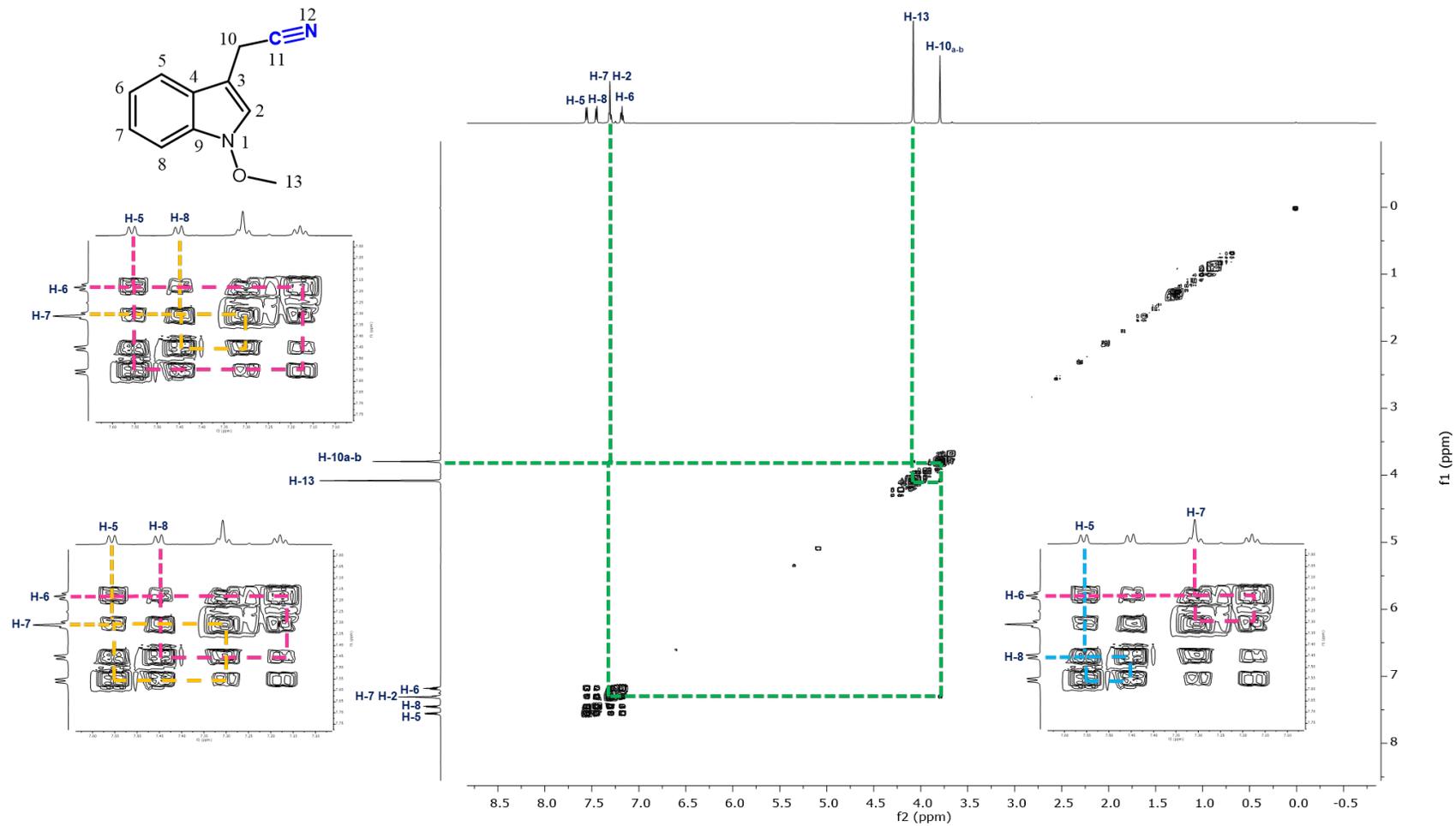
Espectro 1: RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃) de caulilexina C (10).



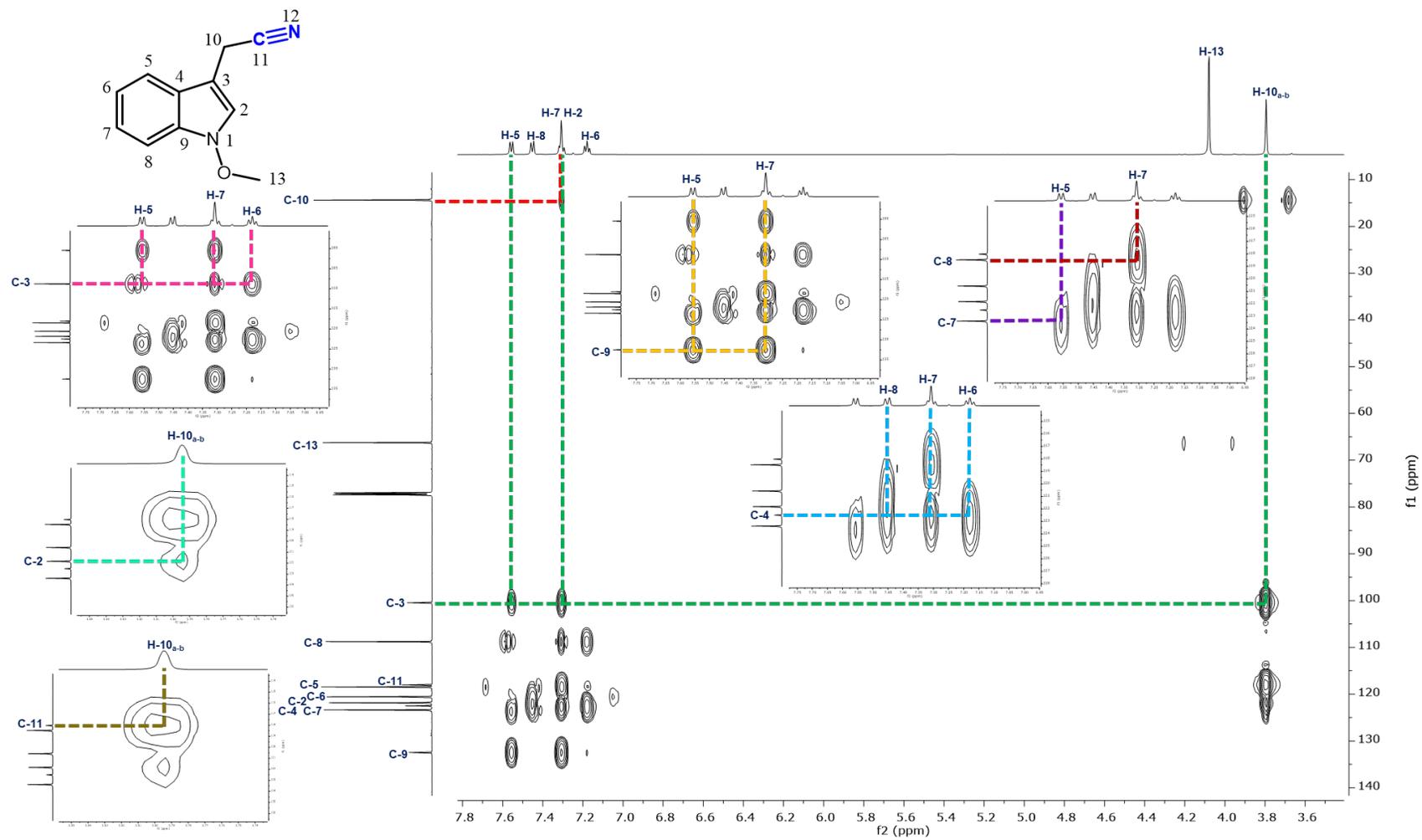
Espectro 2: RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de caulilexina C (10).



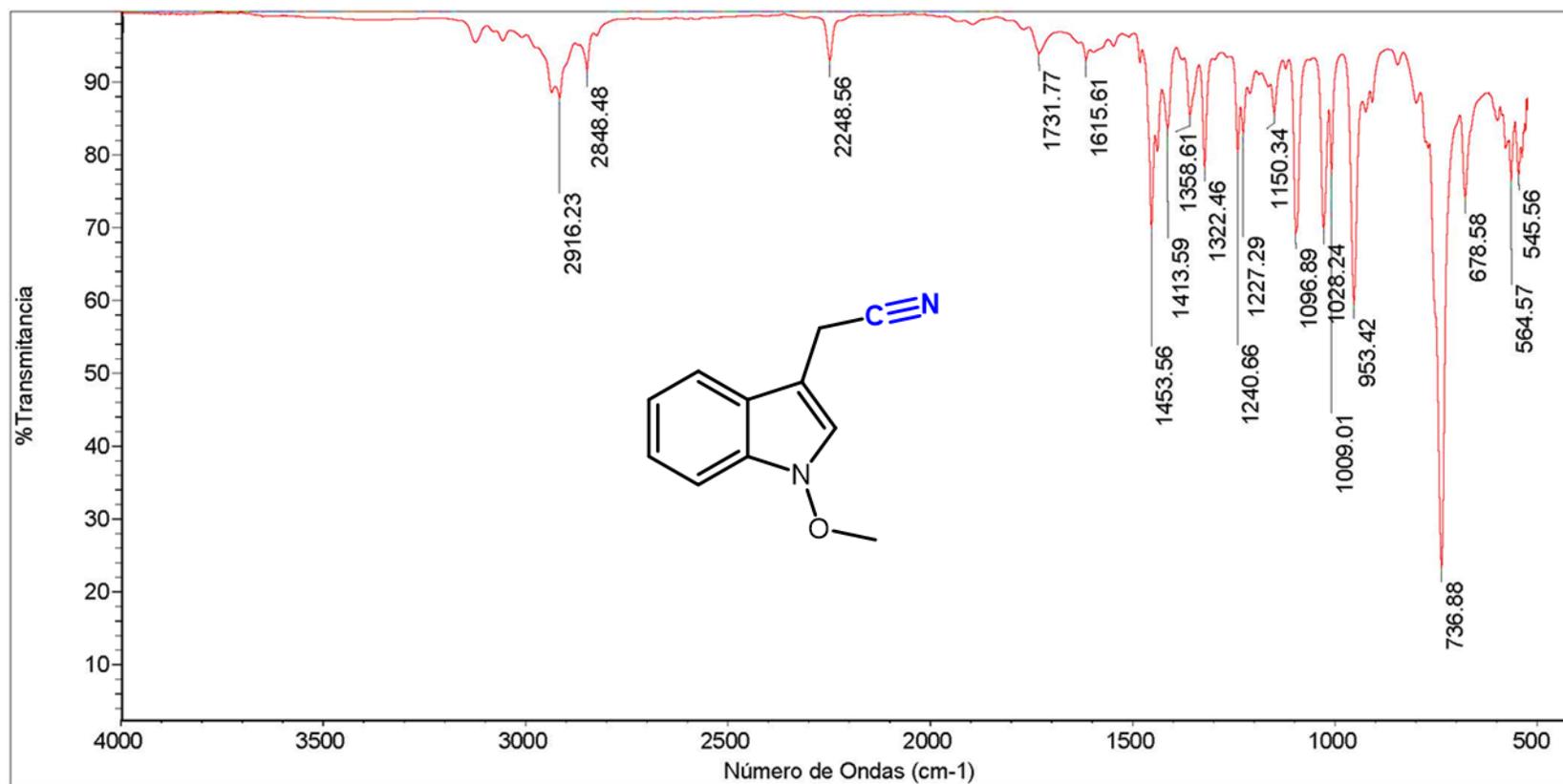
Espectro 3: RMN HSQC (600 MHz, CDCl_3) de caulilexina C (10).



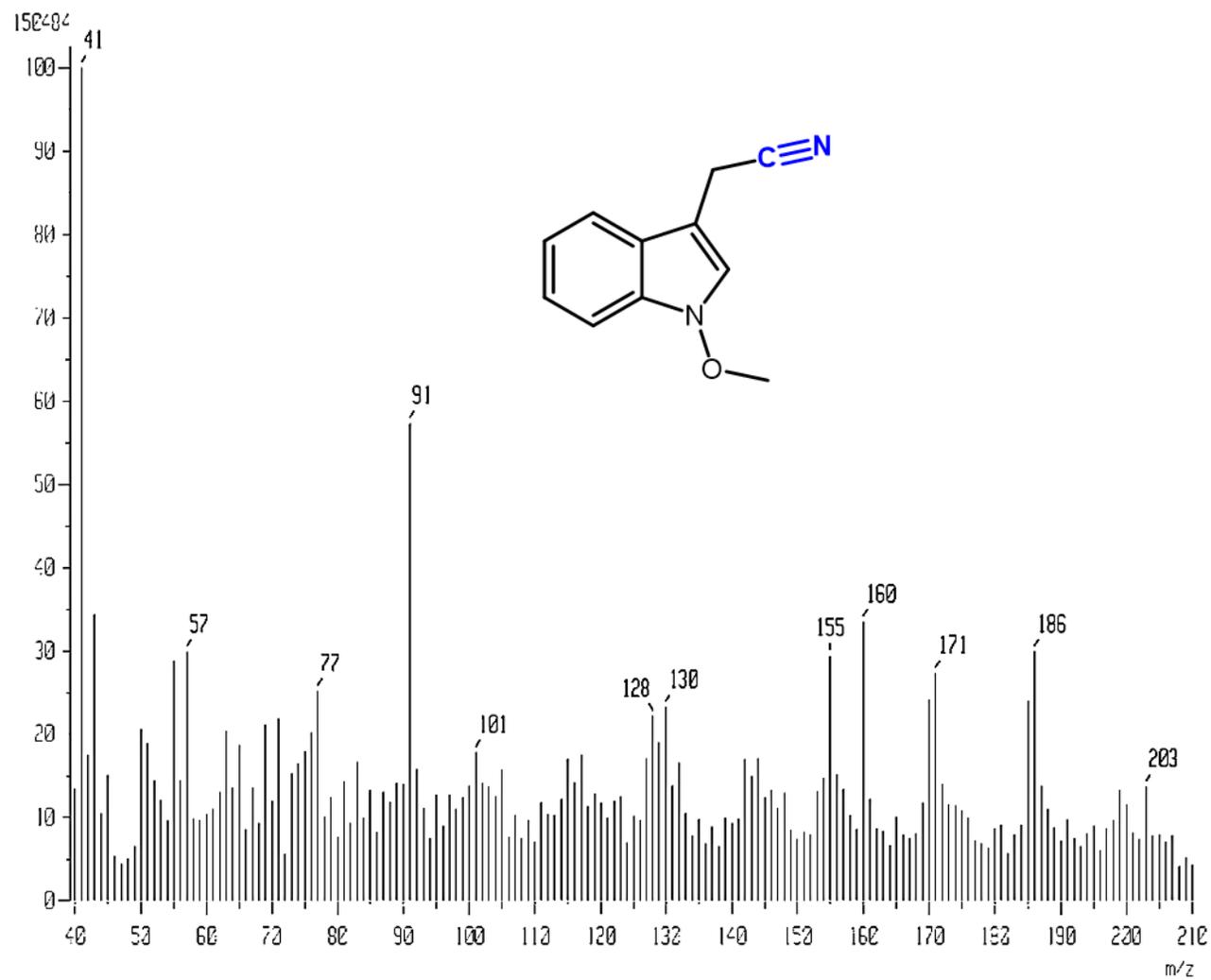
Espectro 4: de RMN 2D, COSY (600 MHz, CDCl₃) de caulilexina C (10).



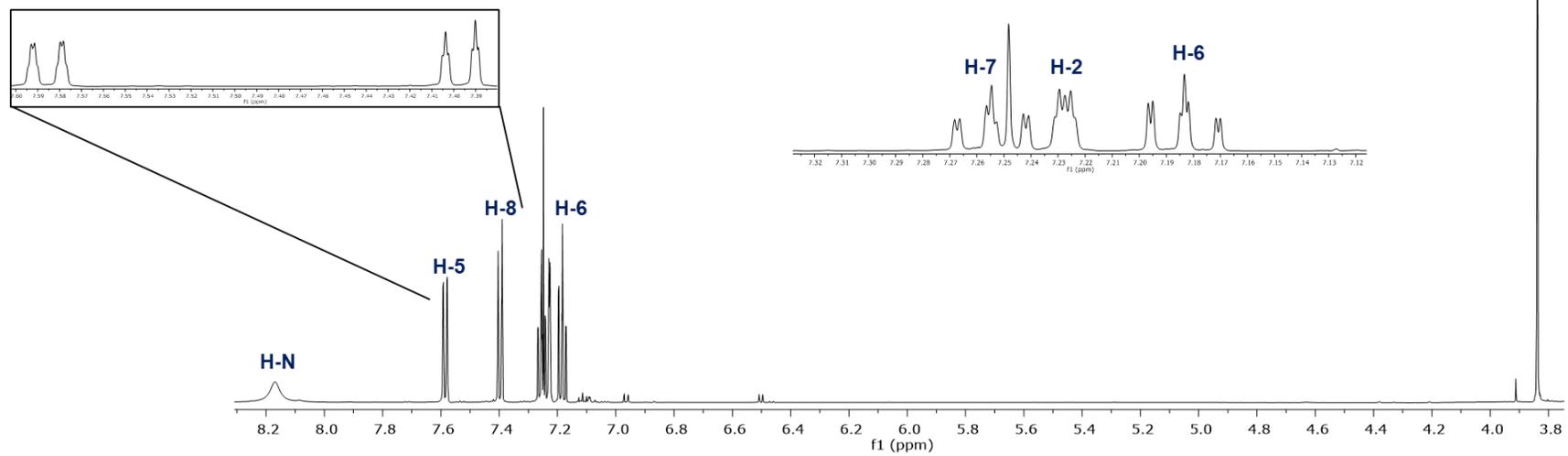
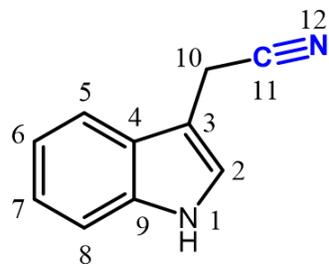
Espectro 5: RMN 2D, HMBC (600 MHz, CDCl_3) de caulilexina C (10).



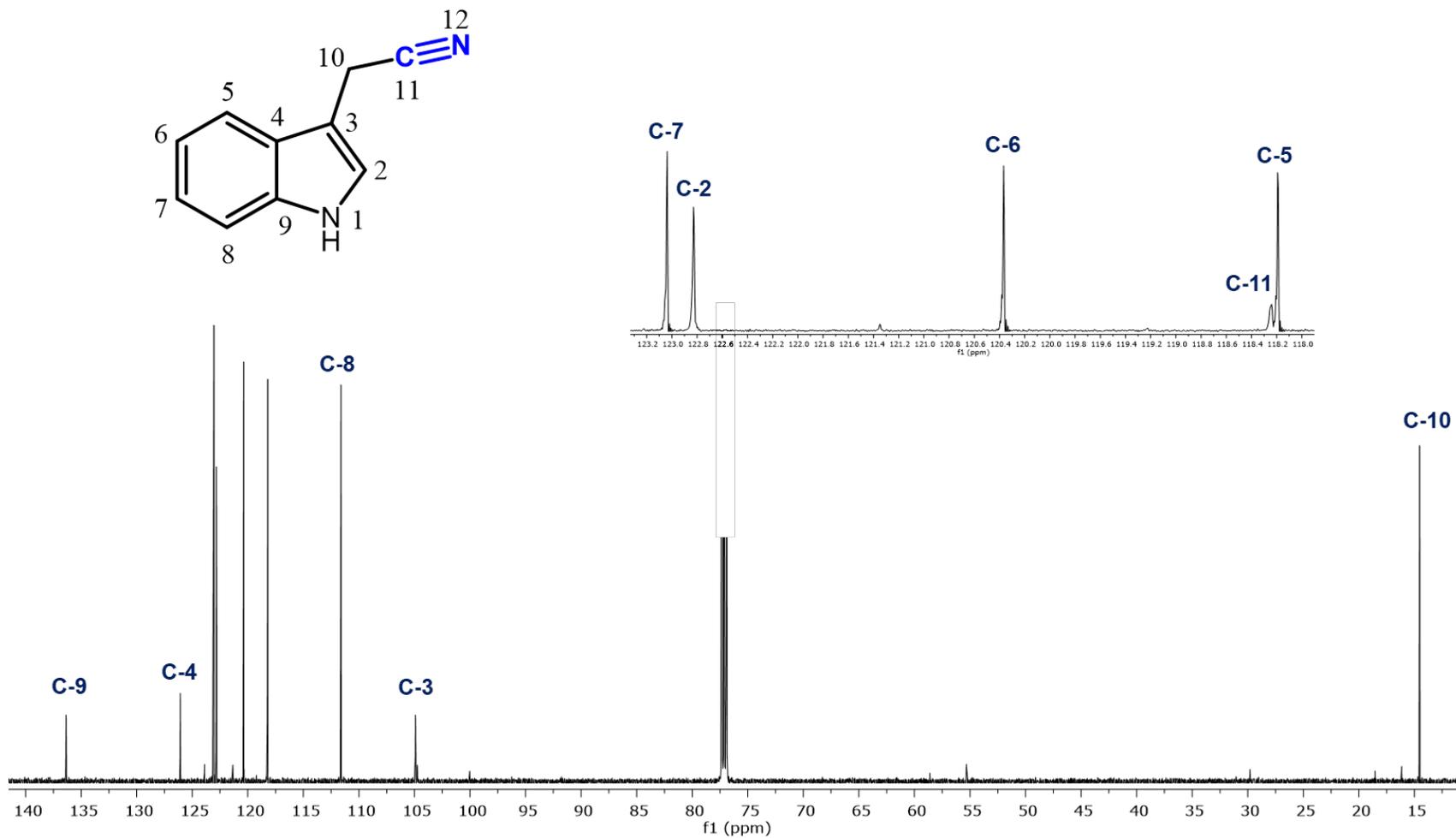
Espectro 6: IR de caulilexina C (10).



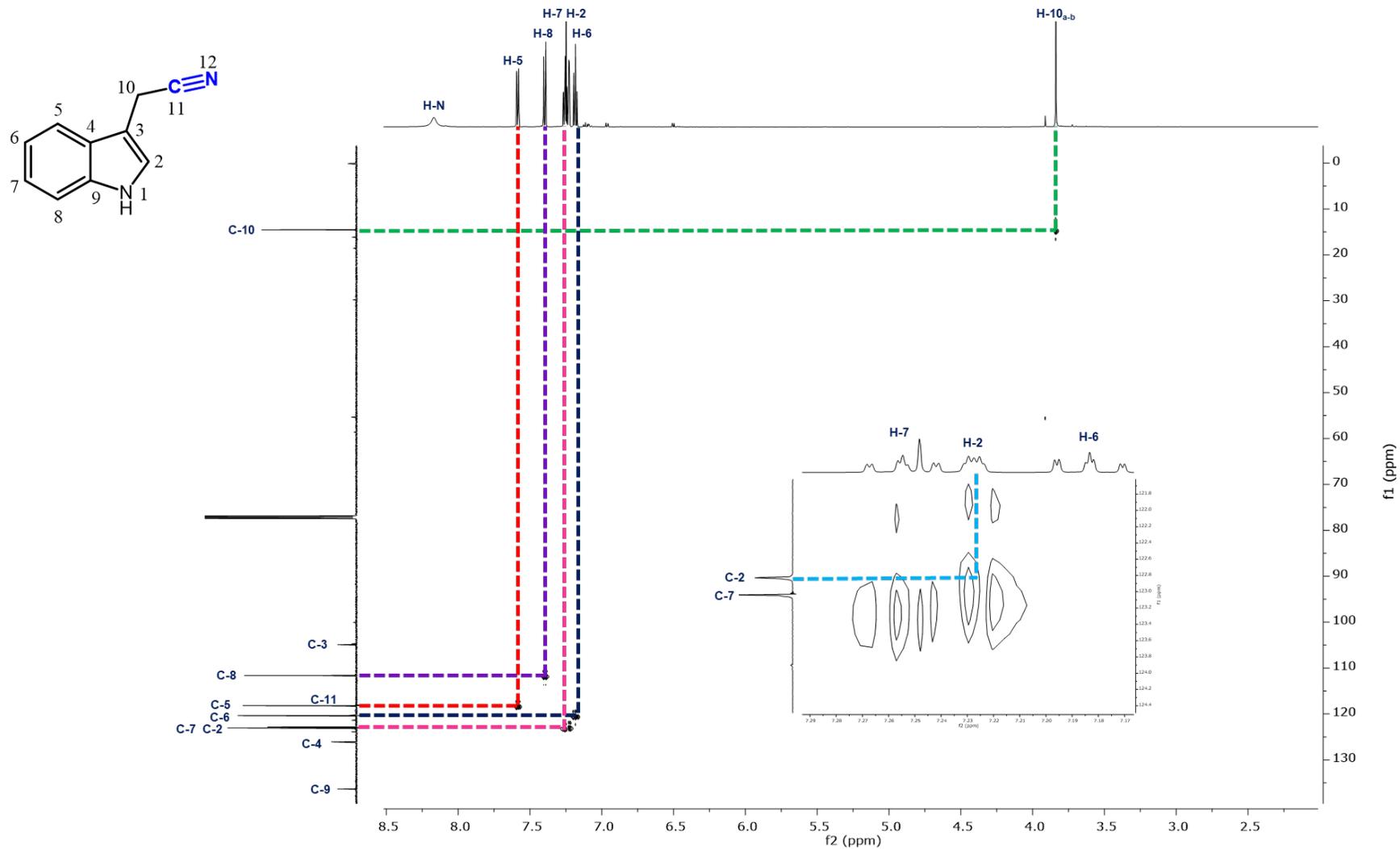
Espectro 7: Masas (IQ) de caulilexina C (10).



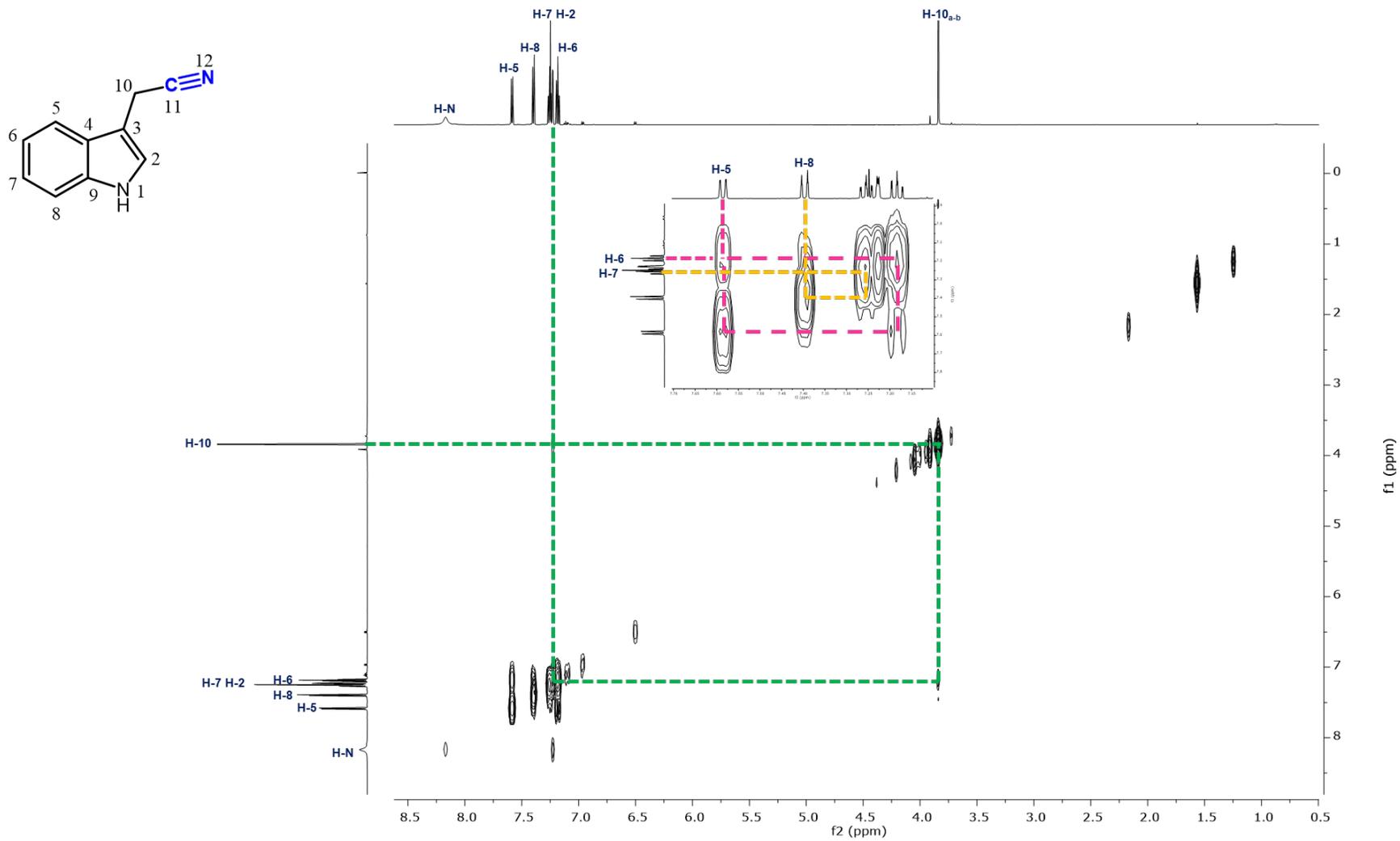
Espectro 8: RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) de indol-3-acetonitrilo (11).



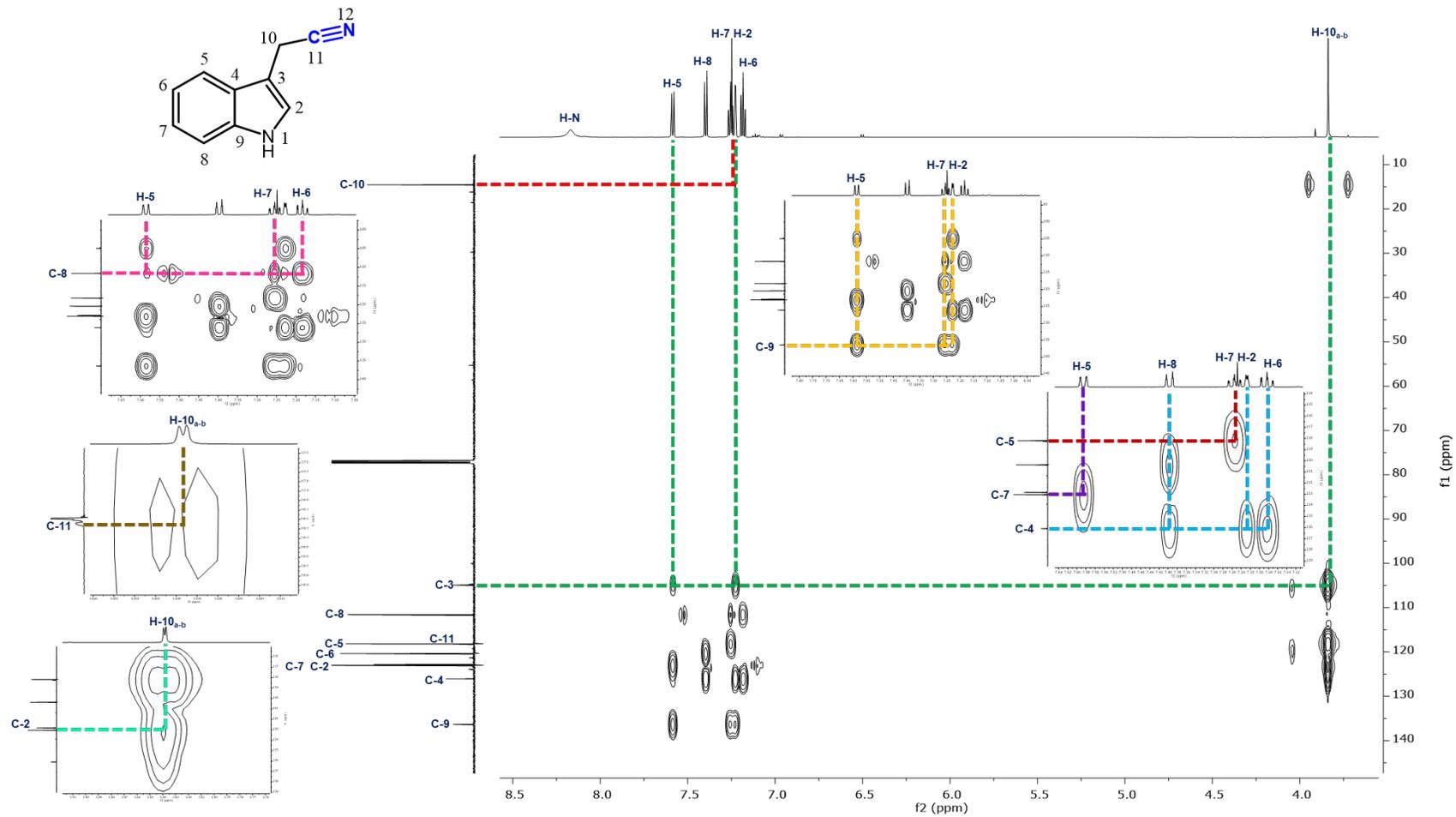
Espectro 9: RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de indol-3-acetonitrilo (11).



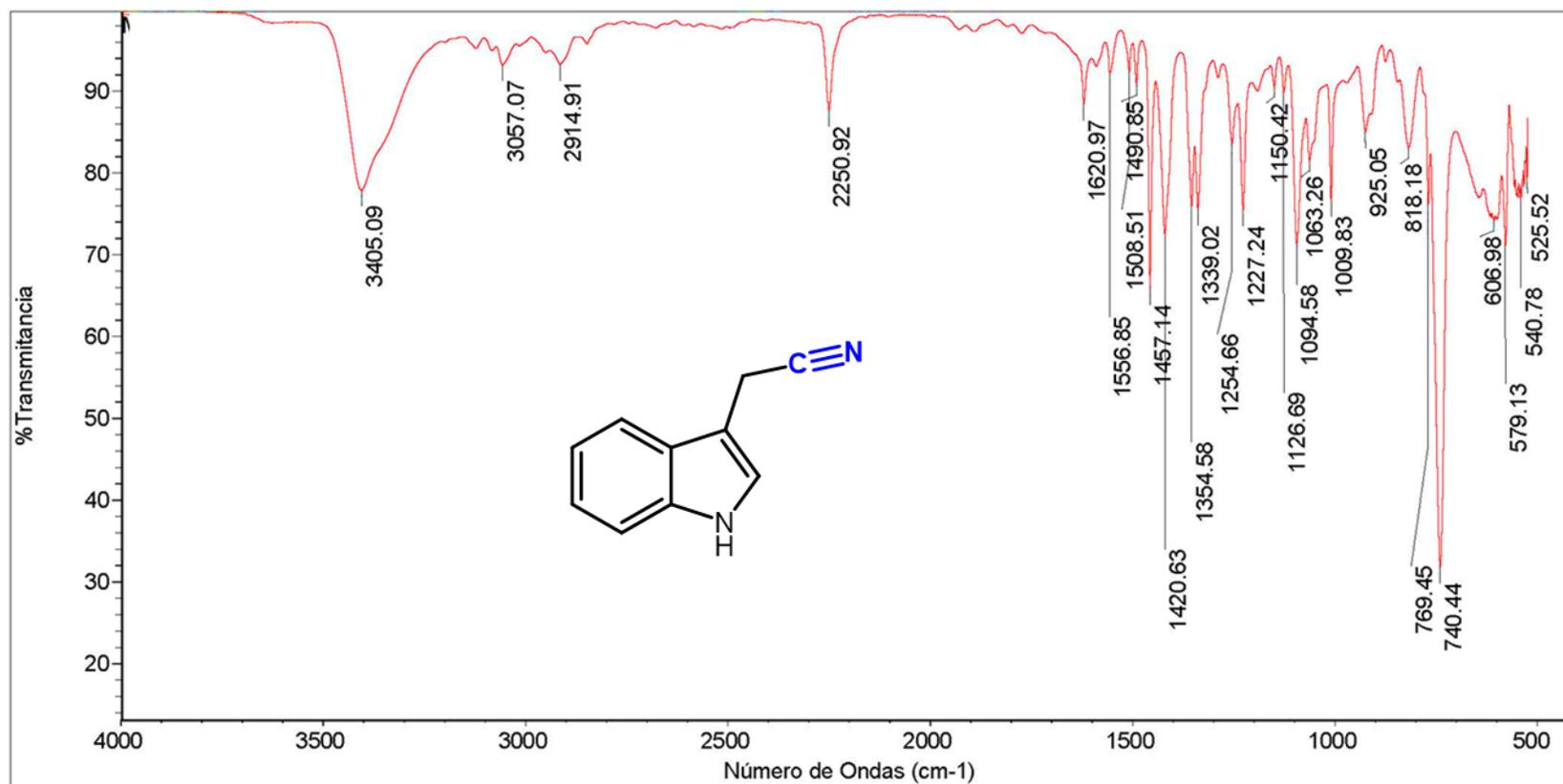
Espectro 10: RMN HSQC (600 MHz, CDCl₃) de indol-3-acetonitrilo (11).



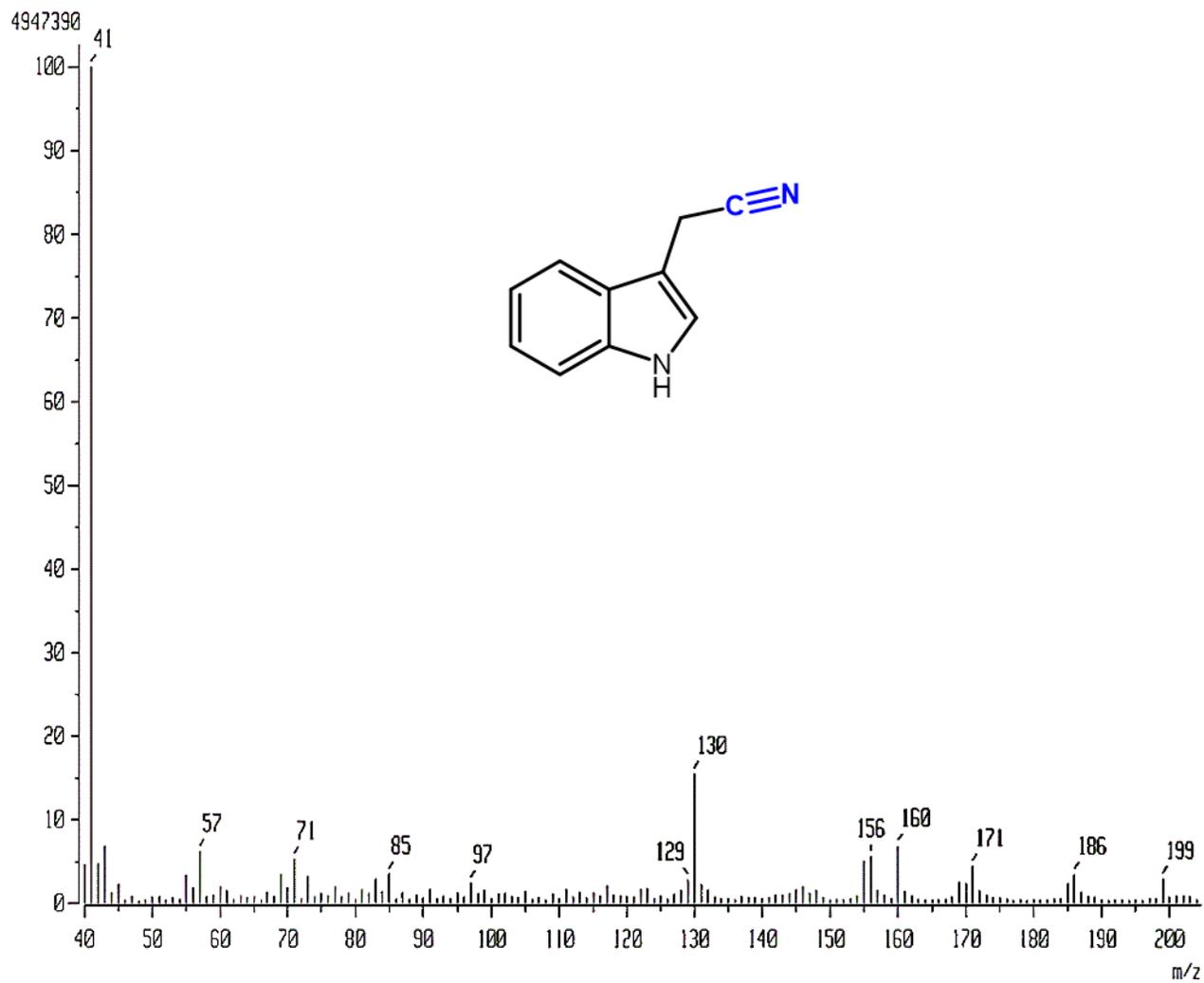
Espectro 11: RMN 2D, COSY (600 MHz, CDCl_3) de indol-3-acetonitrilo (11).



Espectro 12: RMN 2D, HMBC (600 MHz, $CDCl_3$) indol-3-acetonitrilo (11).

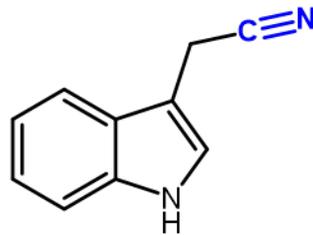
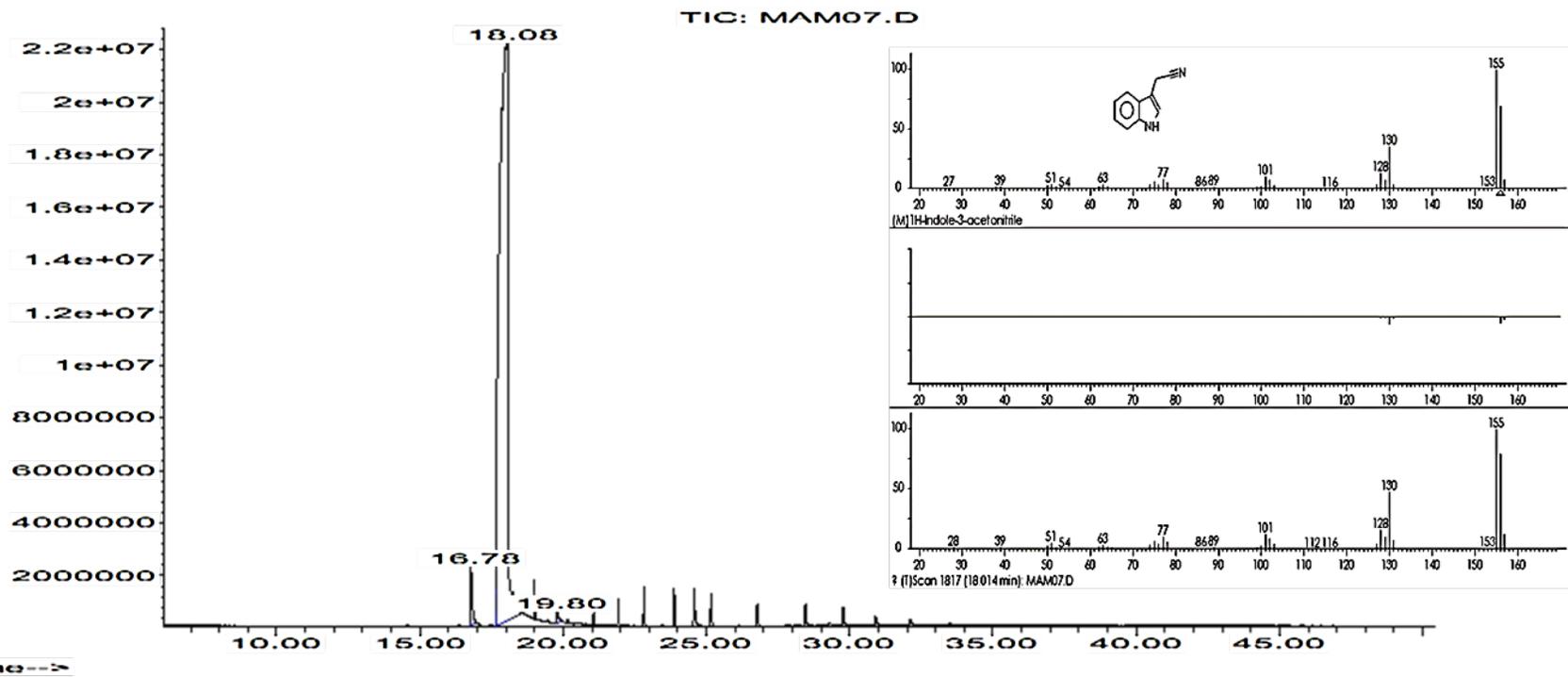


Espectro 13: IR de indol-3-acetonitrilo (11).

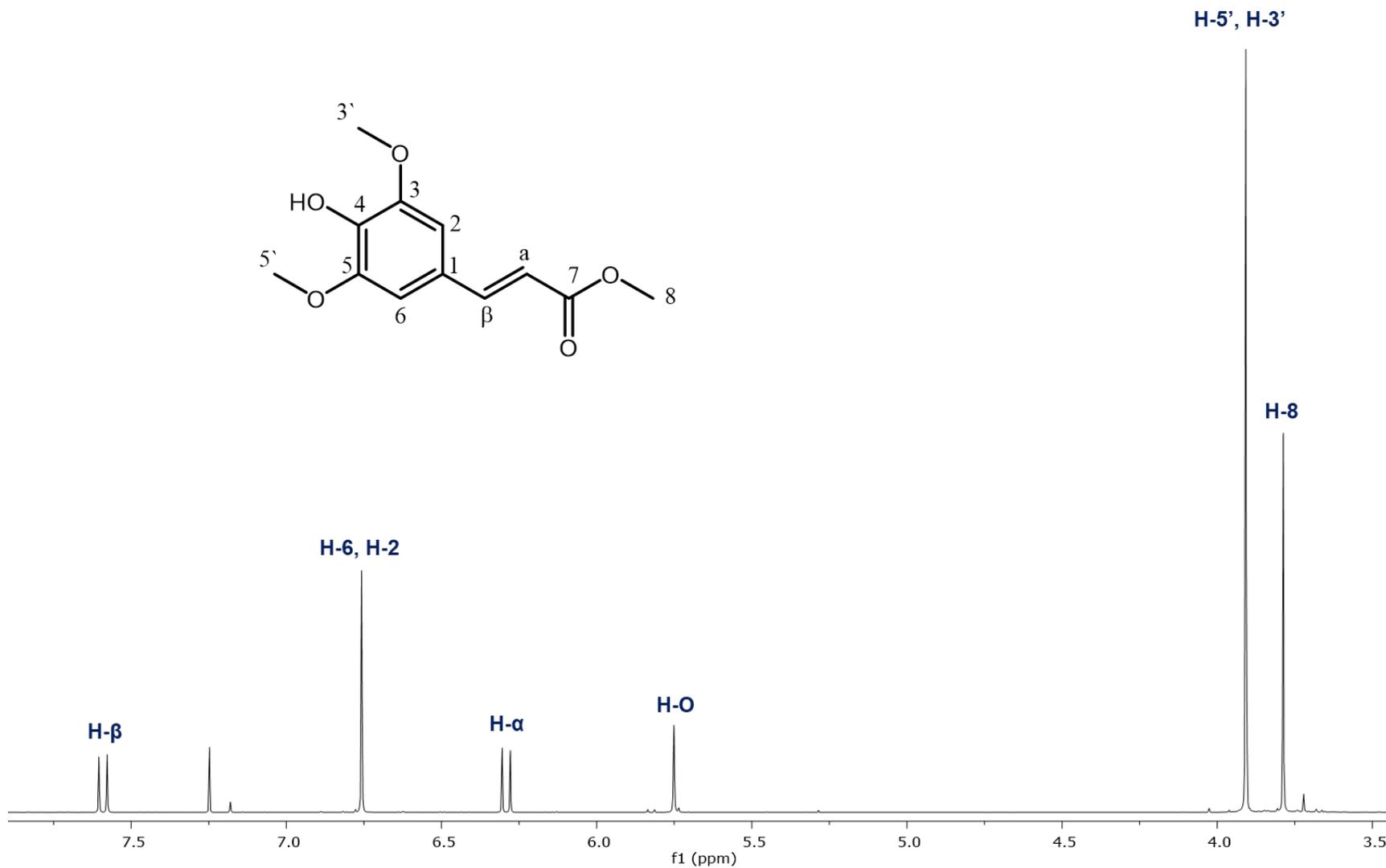


Espectro 14: Masas (IQ) de indol-3-acetonitrilo (11).

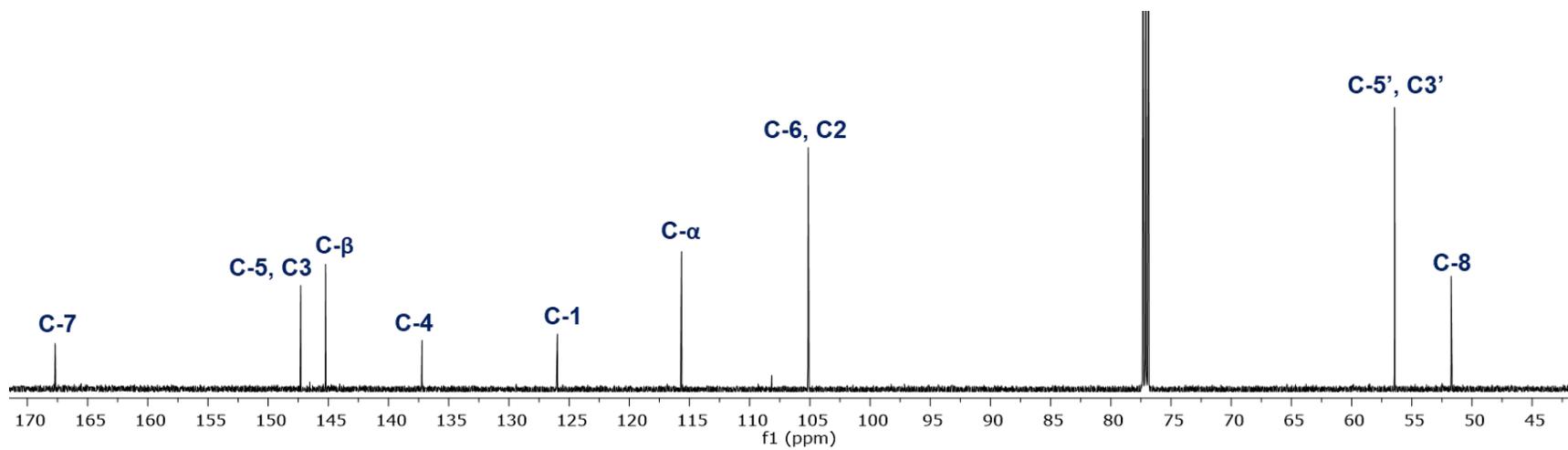
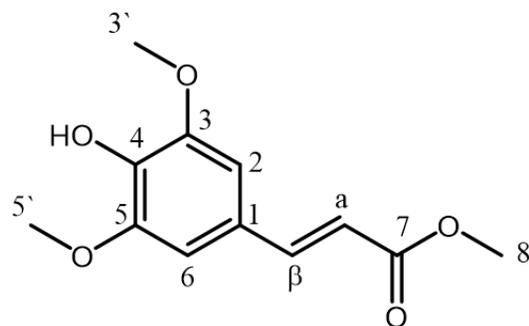
Abundance



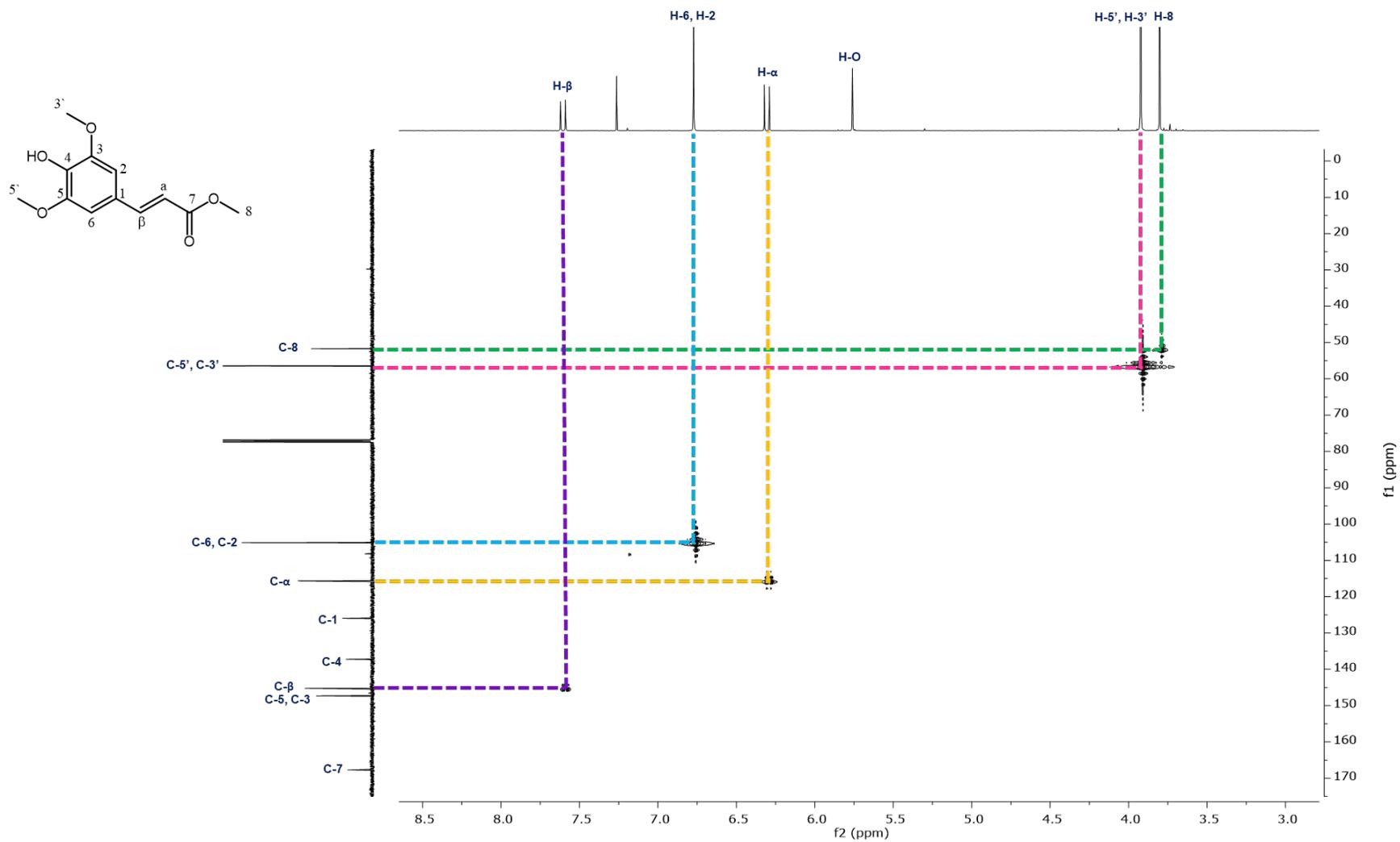
Cromatograma 1: (CG-EM) de indol-3-acetonitrilo.



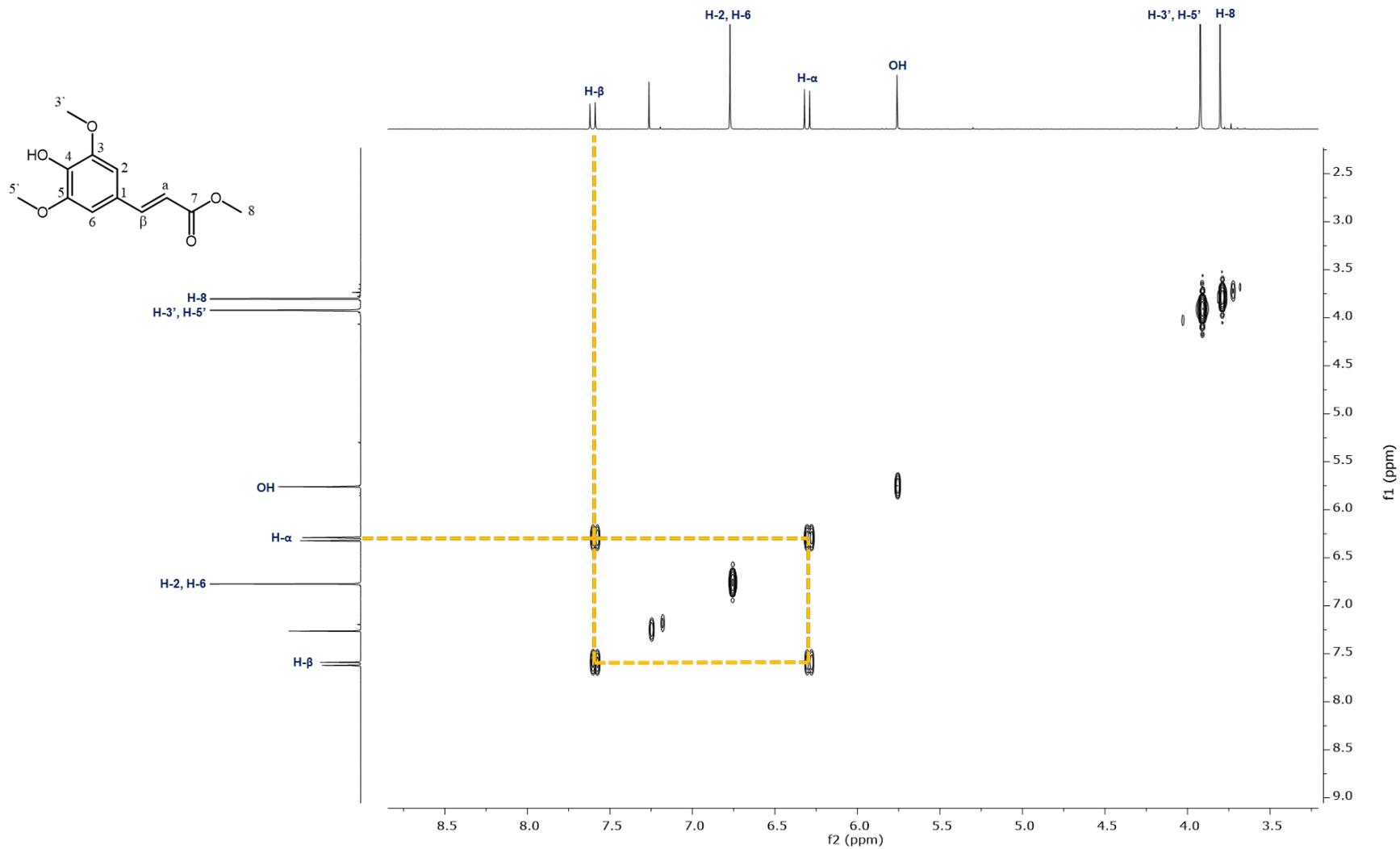
Espectro 15: RMN 1H (600 MHz, CDCl₃) de sinapato de metilo (12).



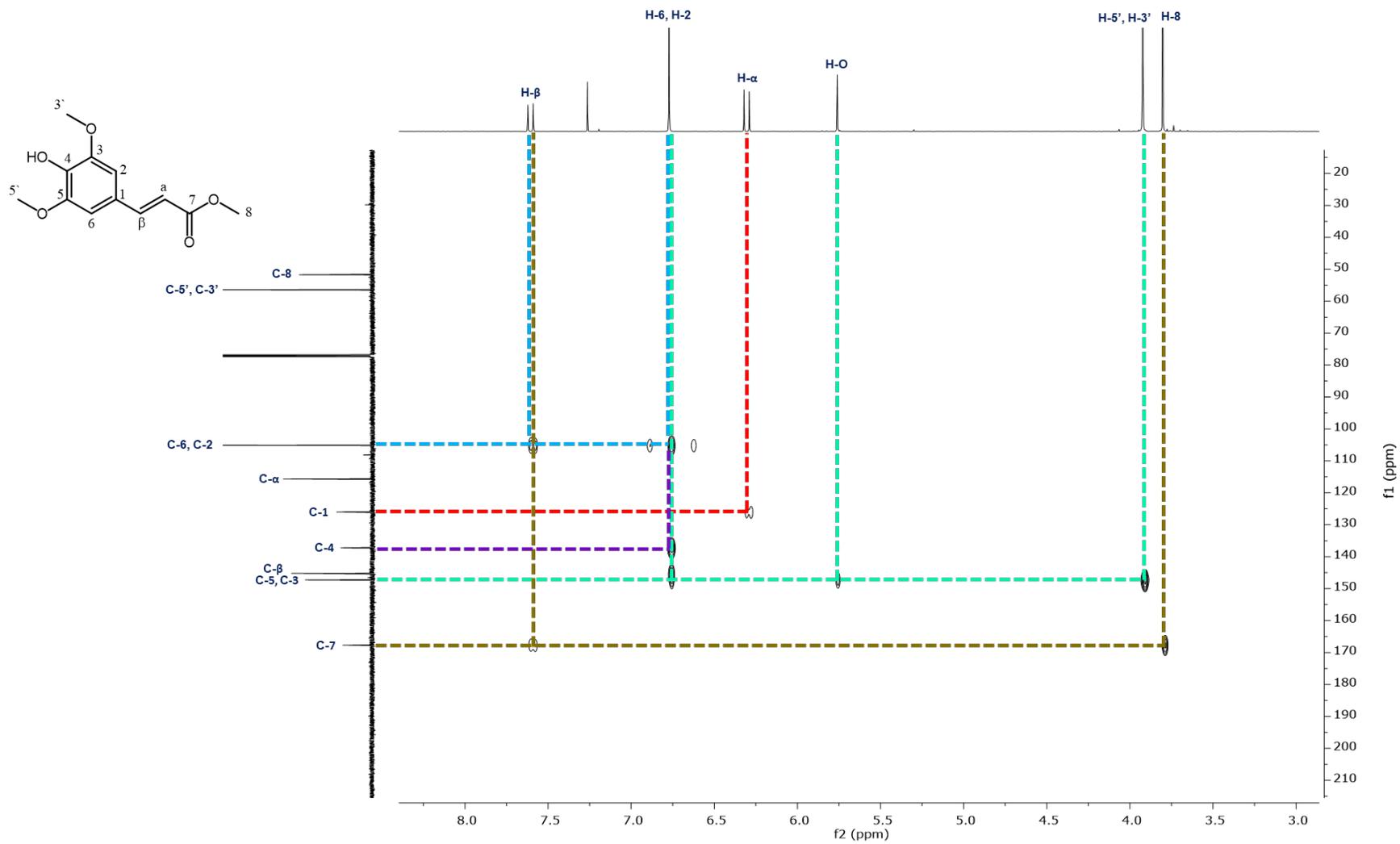
Espectro 16: RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de sinapato de metilo (12).



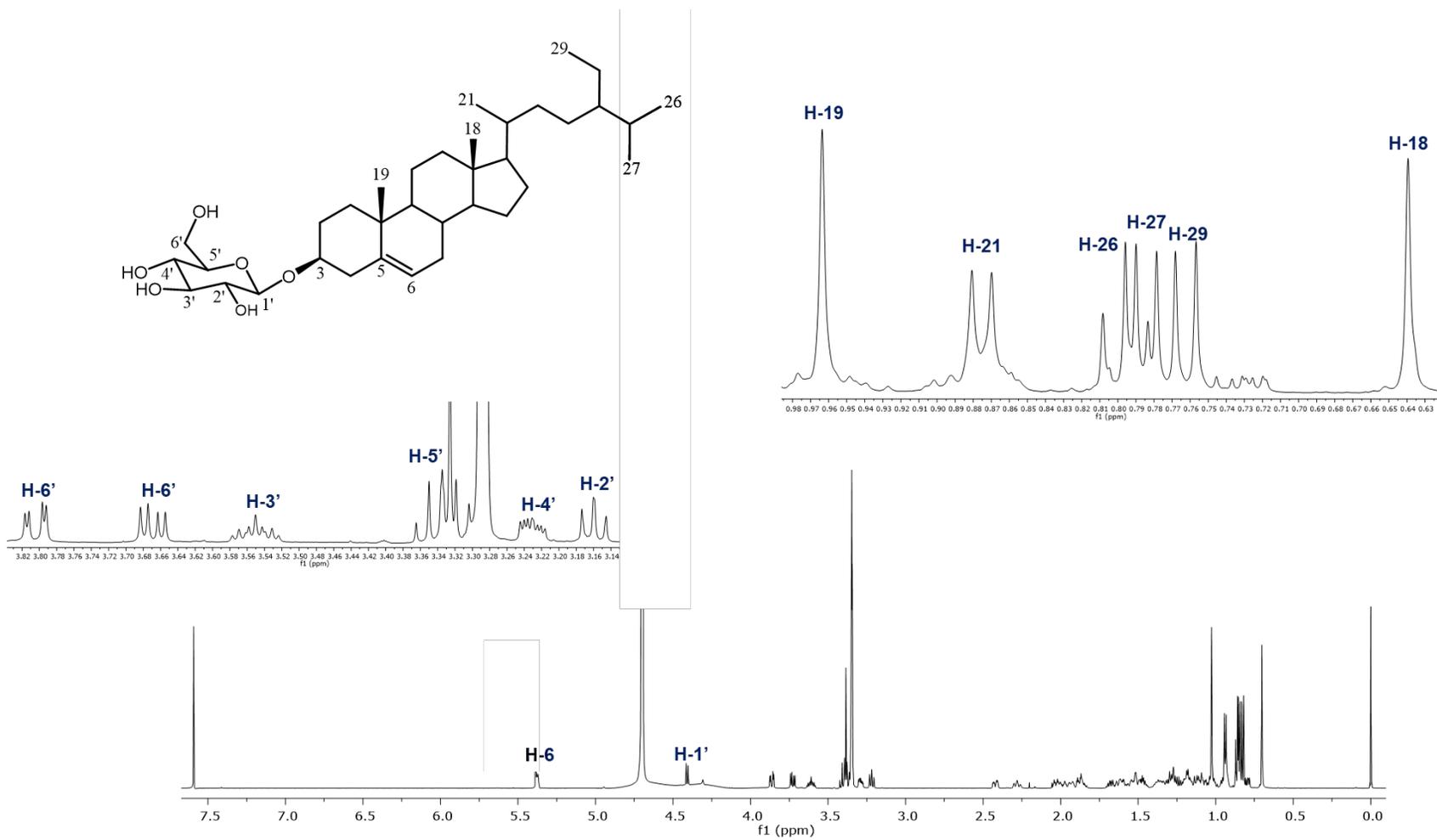
Espectro 17: RMN HSQC (600 MHz, CDCl_3) de sinapato de metilo (12).



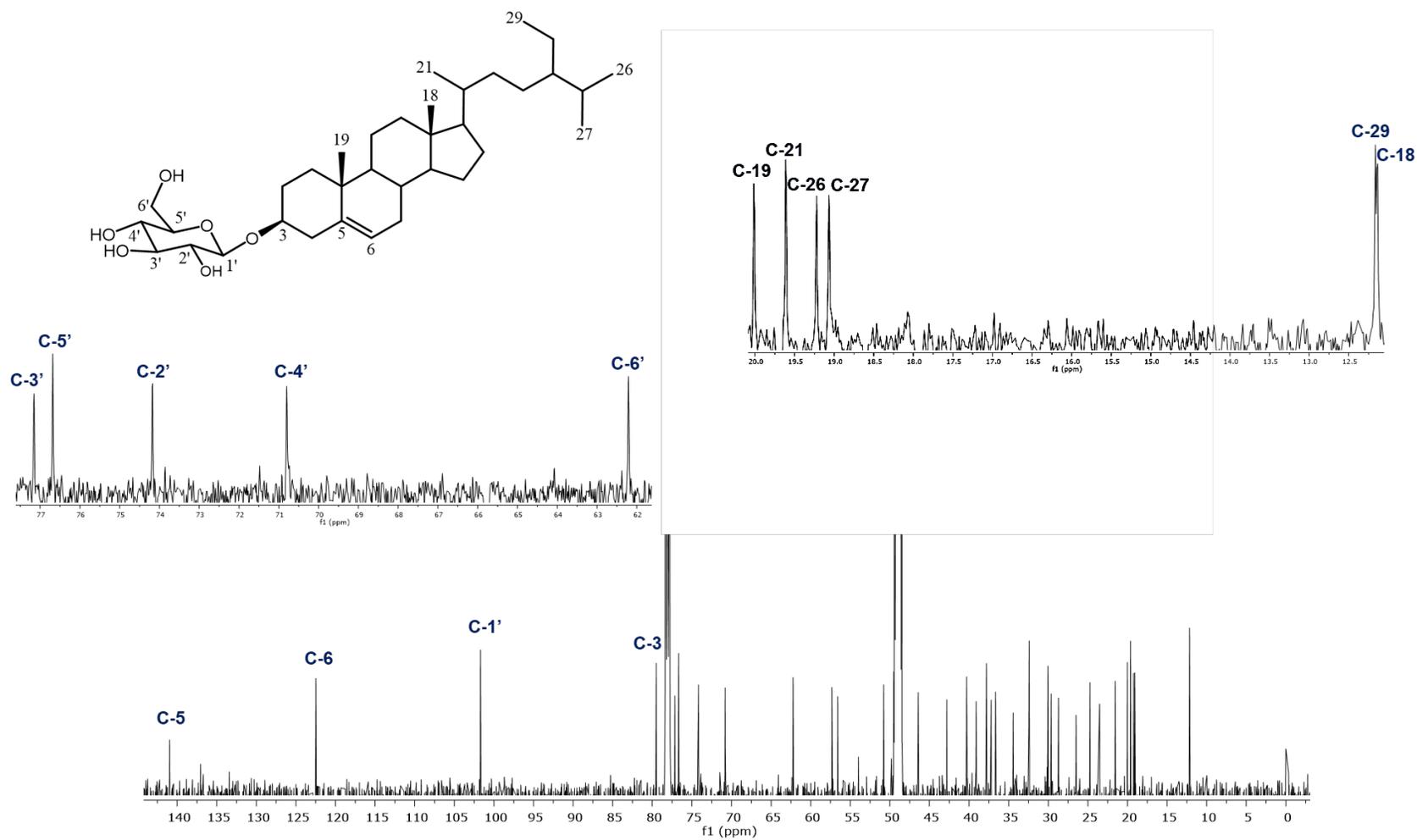
Espectro 18: RMN 2D, COSY (600 MHz, CDCl₃) de sinapato de metilo (13).



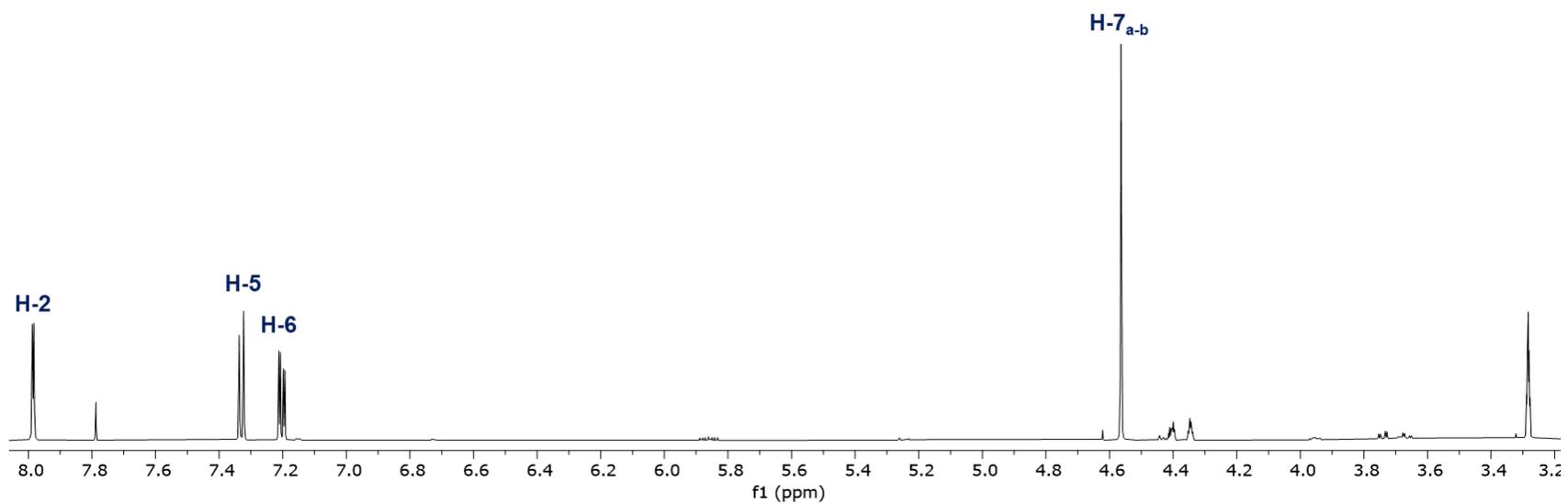
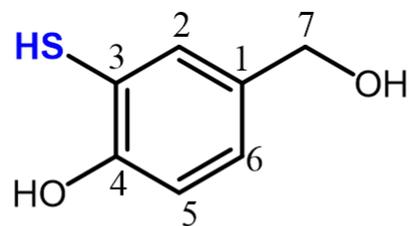
Espectro 19: RMN HMBC (600 MHz, CDCl_3) de sinapato de metilo (12).



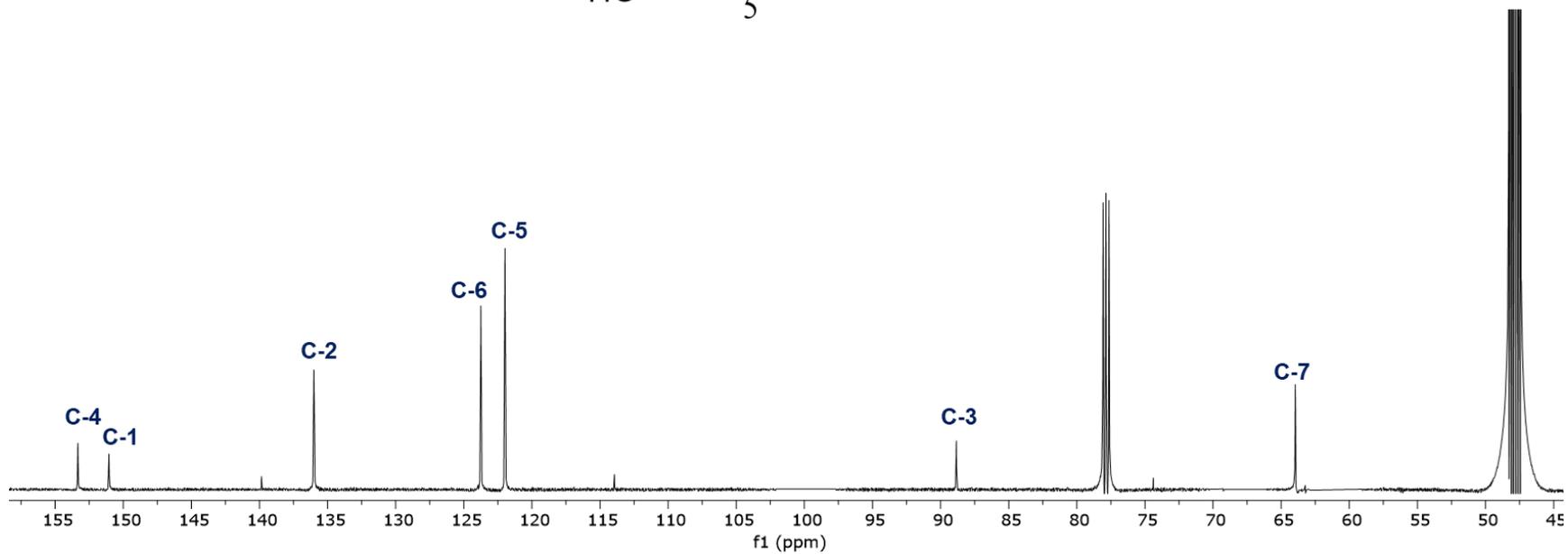
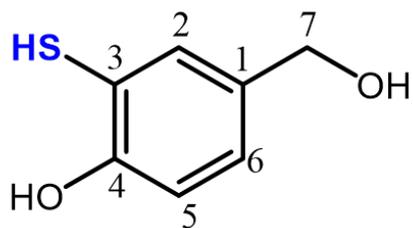
Espectro 20: RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3) de β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido (13).



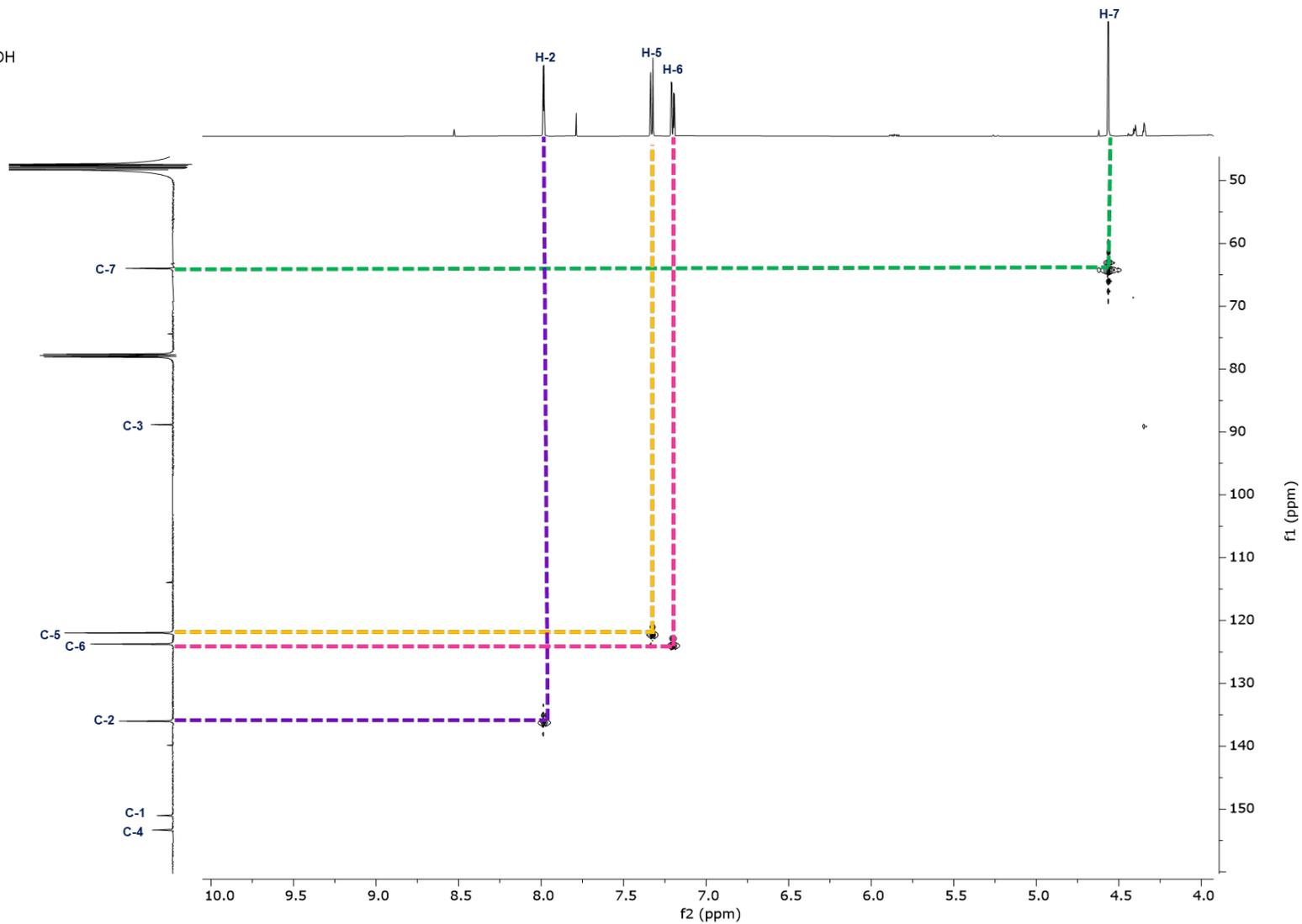
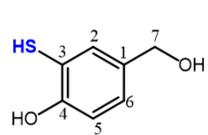
Espectro 21: RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido (13).



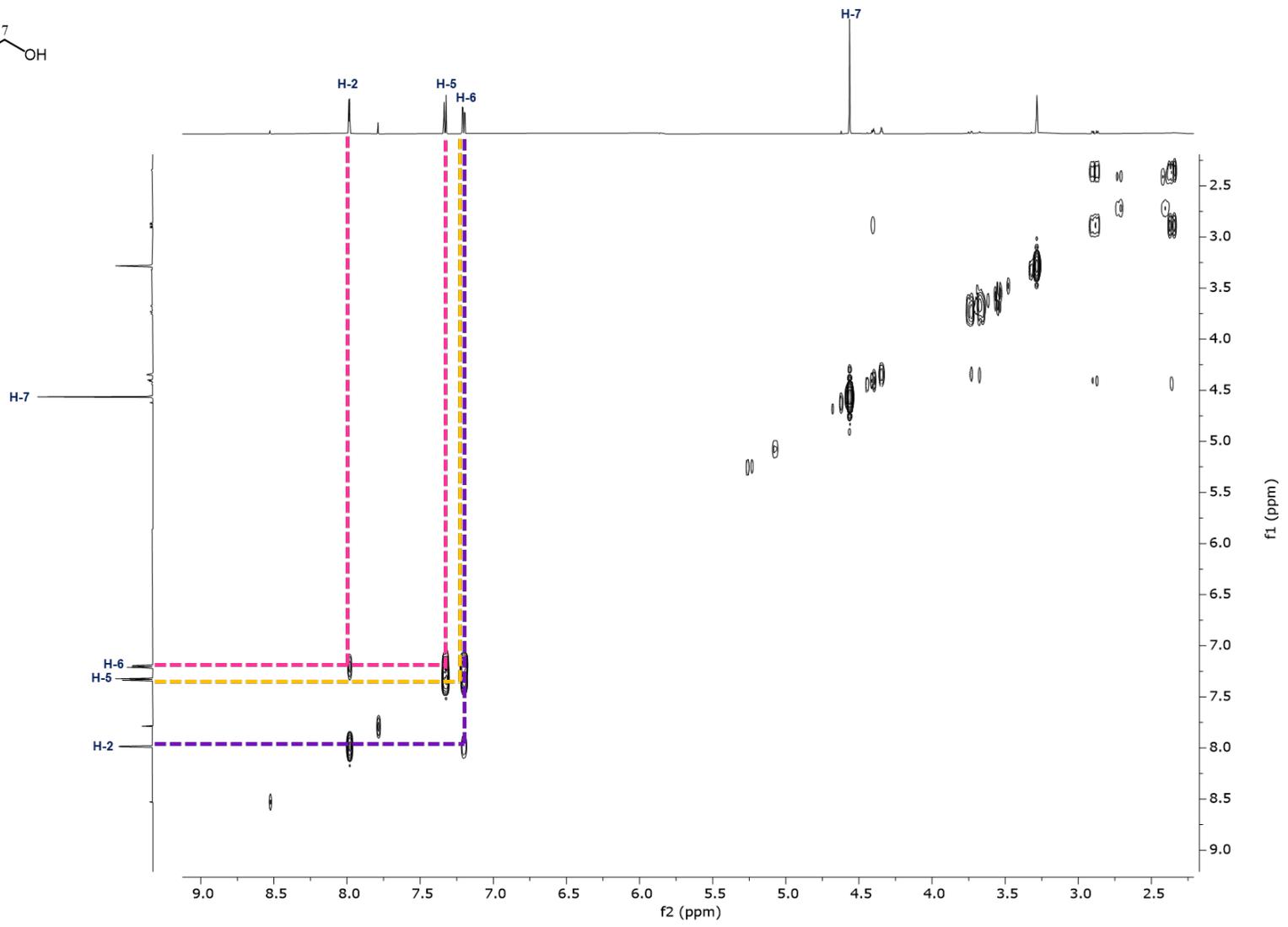
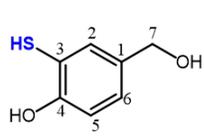
Espectro 22: RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃-CD₃OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.



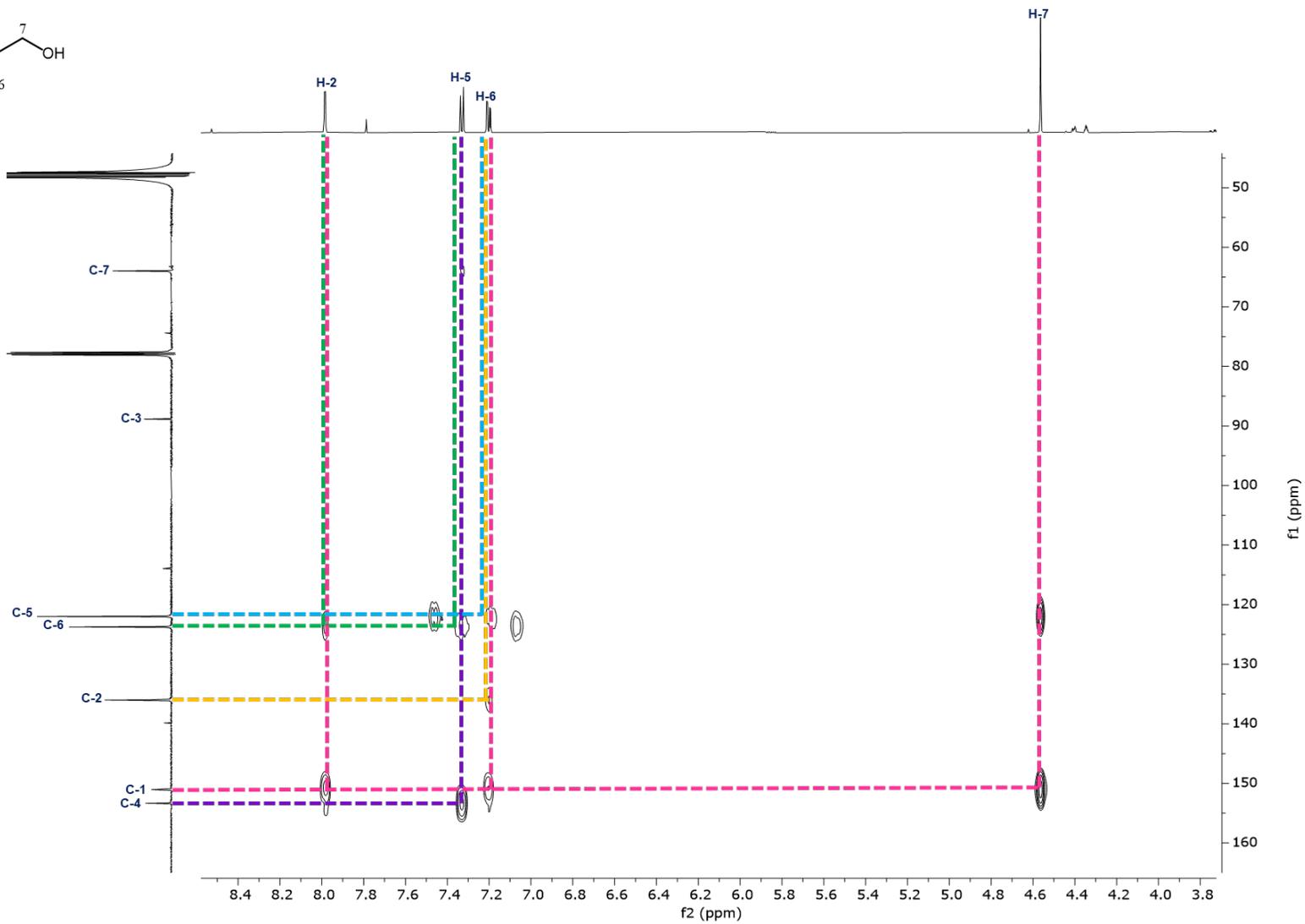
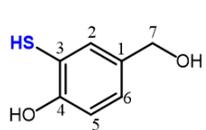
Espectro 23: RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.



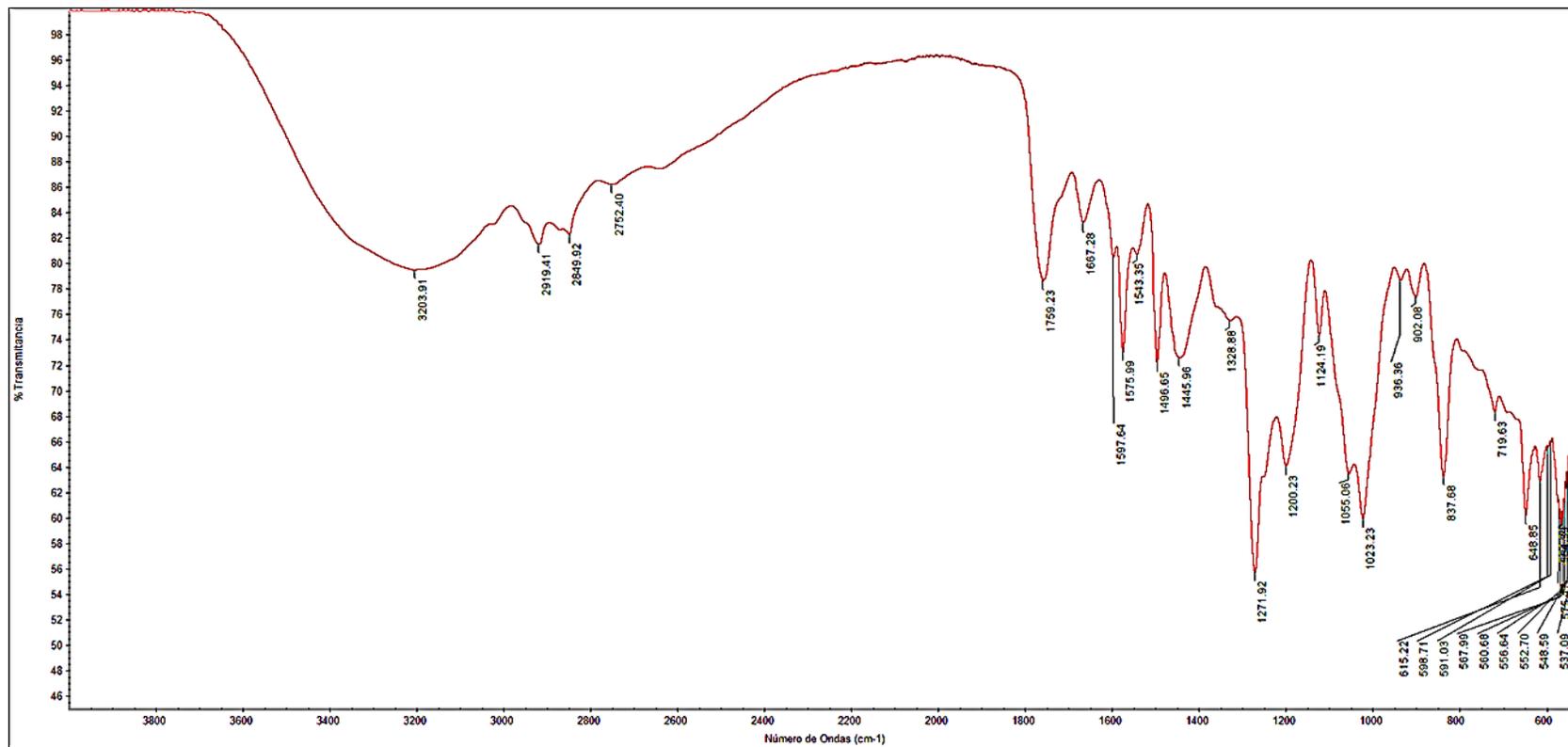
Espectro 24: RMN HSQC (600 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.



Espectro 25: COSY (600 MHz, CDCl₃-CD₃OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.

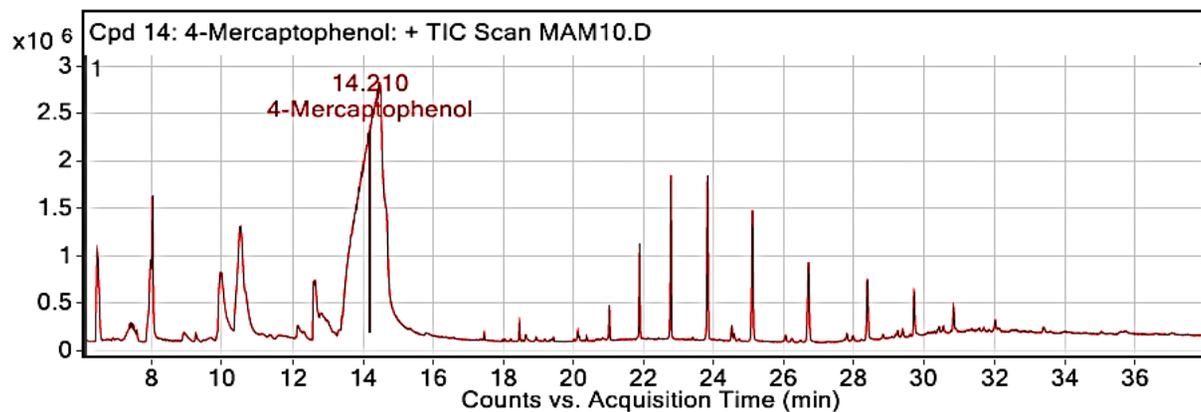


Espectro 26: HMBC (600 MHz, CDCl₃-CD₃OD) del compuesto 14, posiblemente 4-(hidroximetil) 2-mercaptofenol.

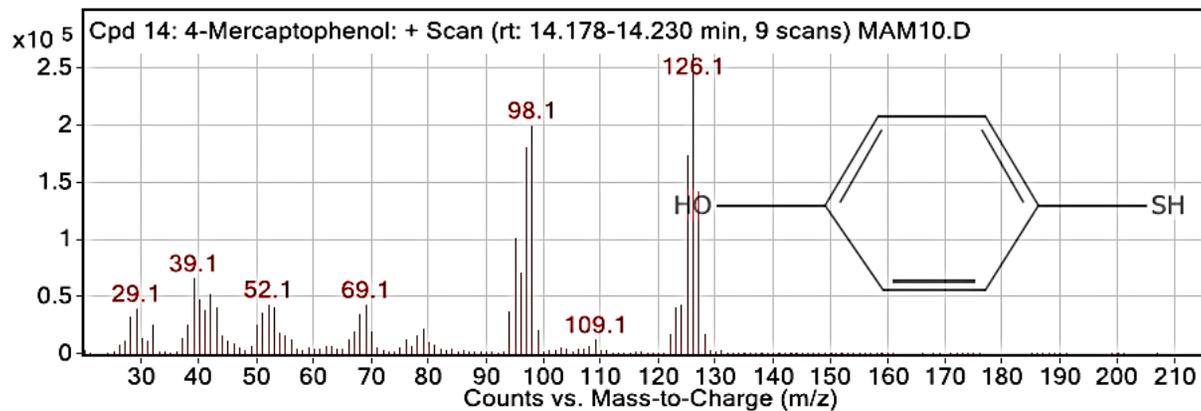


Espectro 27: IR del compuesto 14.

Compound Label	Name	RT	Algorithm
Cpd 14: 4-Mercaptophenol	4-Mercaptophenol	14.21	Find by Integration

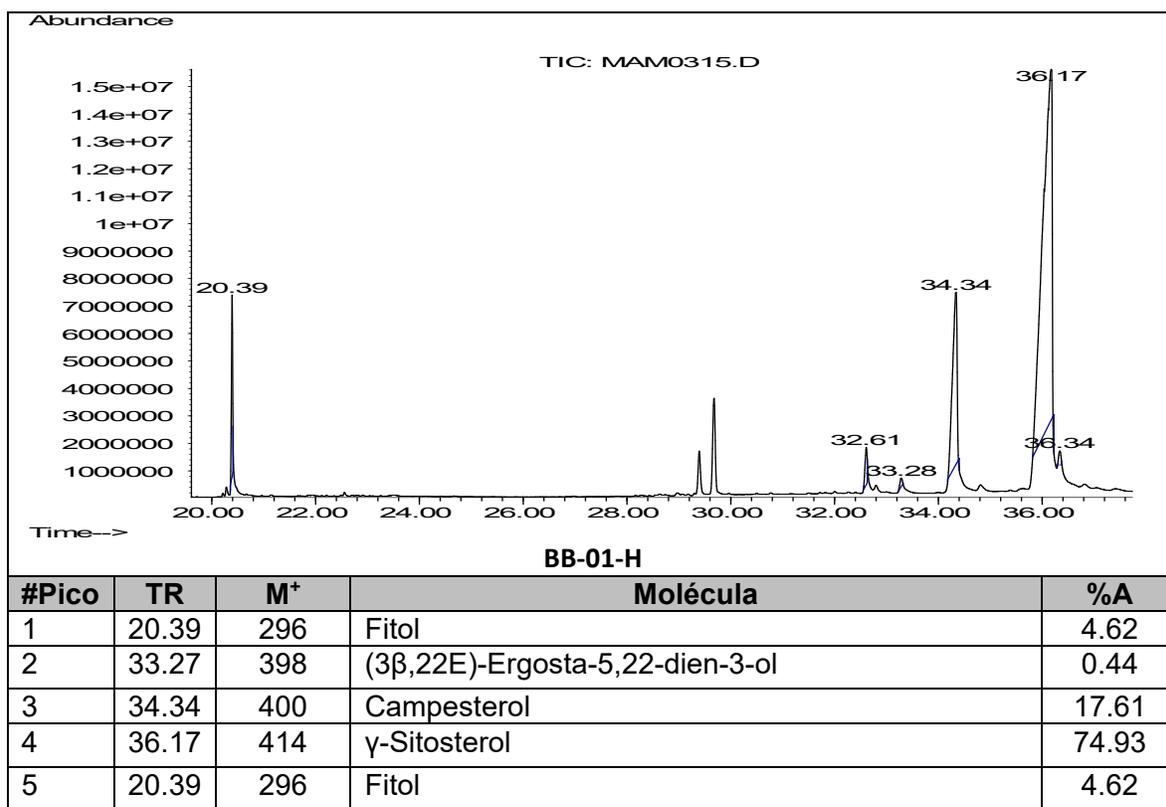


MS Spectrum



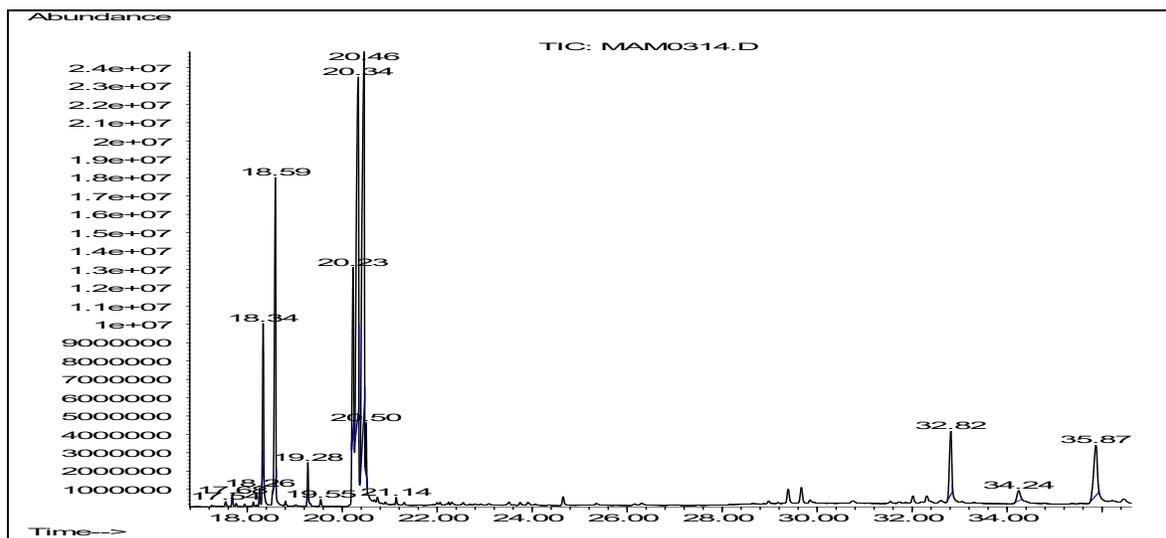
Cromatograma 2: (CG-EM) del compuesto 14.

Cromatograma 3: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción BB-01-H de *Brassica oleracea* L. var. *itálica*.



TR: tiempo de retención; M⁺: ión molecular

Cromatograma 4: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción BH-02-H de *Brassica oleracea* L. var. *itálica*.

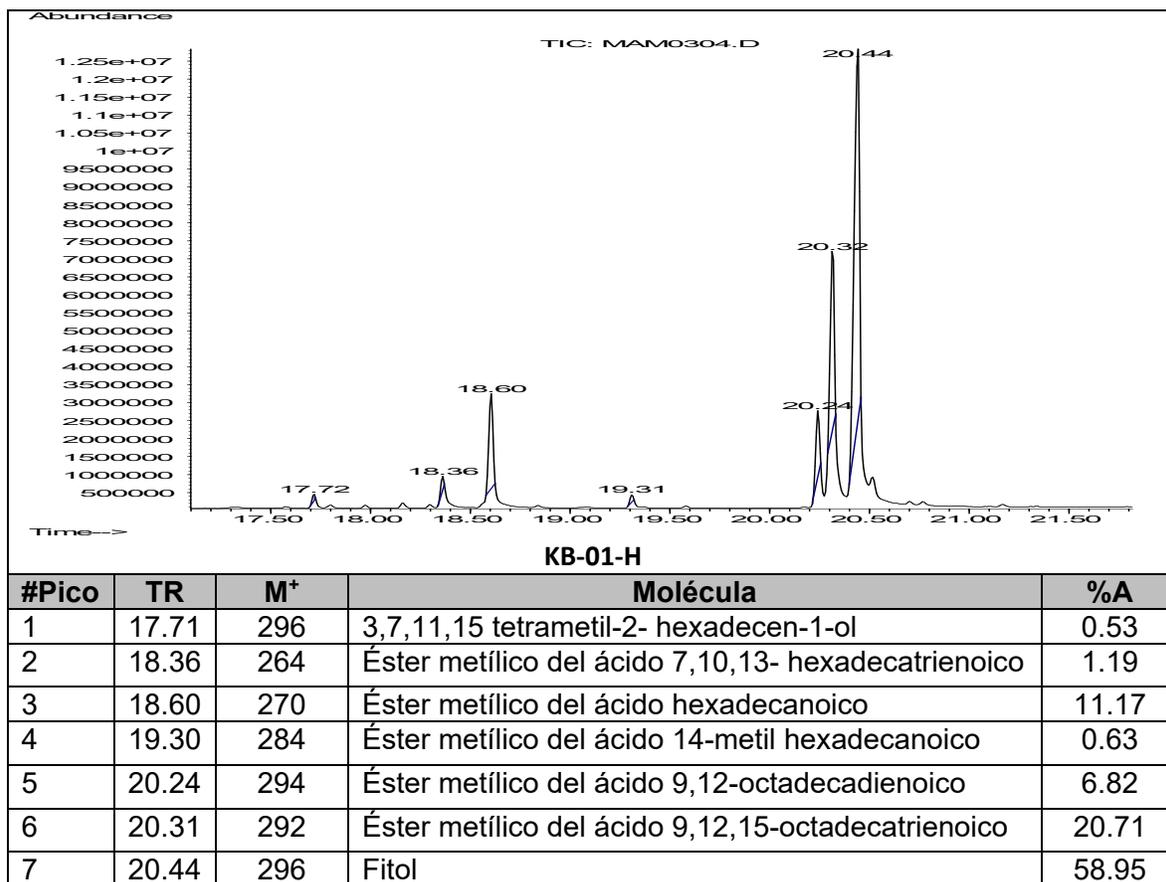


BH-02-H

#Pico	TR	M ⁺	Molécula	%A
1	17.55	256	Éster metílico del ácido pentadecánico	0.05
2	17.76	296	3,7,11,15 tetrametil-2- hexadecen-1-ol	0.10
3	18.26	266	Éster metílico del ácido 7,10- hexadecadienoico	0.21
4	18.33	264	Éster metílico del ácido 7,10,13-hexadecatrienoico	4.99
5	18.59	270	Éster metílico del ácido hexadecanoico	13.74
6	19.27	284	Éster metílico del ácido 14-metil hexadecanoico	1.12
7	19.54	284	Éster metílico del ácido heptadecanoico	0.08
8	20.22	294	Éster metílico del ácido 9,12-octadecadienoico	7.53
9	20.33	292	Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	26.86
10	20.46	296	Fitol	31.07
11	20.50	298	Éster metílico del ácido octadecanoico	1.32
12	21.13	312	Éster metílico del ácido 17-metil octadecanoico	0.140
14	34.24	400	Campesterol	1.17
15	35.86	414	γ-Sitosterol	6.50

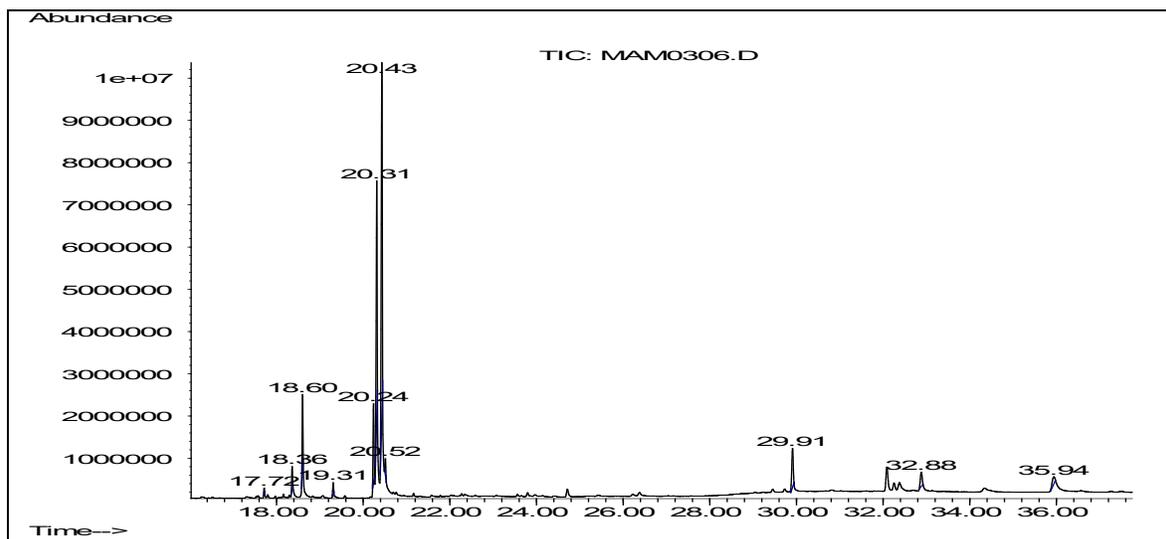
TR: tiempo de retención; M⁺: ión molecular

Cromatograma 5: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción KB-01-H de *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*.



TR: tiempo de retención; M⁺: ión molecular

Cromatograma 6: Tabla del análisis por CG-EM de la fracción KH-02-H de *Brassica oleracea* L. var. *sabellica*.



KH-02-H

#Pico	TR	M ⁺	Molécula	%A
1	17.71	296	3,7,11,15 tetrametil-2- hexadecen-1-ol	0.37
2	18.36	266	Éster metílico del ácido 7,10,13 hexadecatrienoico	2.29
3	18.59	270	Éster metílico del ácido hexadecanoico	7.42
4	19.30	284	Éster metílico del ácido 14-metil hexadecanoico	0.97
5	20.24	294	Éster metílico del ácido 9,12-octadecadienoico	8.18
6	20.31	292	Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico	23.37
7	20.43	296	Fitol	43.85
8	20.51	298	Éster metílico del ácido octadecanoico	1.57
9	29.90	408	Nonacosano	6.65
10	32.88	430	Vitamina E	3.01

TR: tiempo de retención; M⁺: ión molecular

2.5 Referencias

- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P. y Büsselberg, D. 2020. Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules*; 10, 221-226.
- Anantharaju, P. G., Gowda, P. C., Vimalambike, M. G. y Madhunapantula, S. V. 2016. An overview on the role of dietary phenolics for the treatment of cancers. *Nutr. J.*;15, 99.
- Aronchik, I., Kundu, A., Quirit, J. G. y Firestone, G. L. 2014. The antiproliferative response of indole-3-carbinol in human melanoma cells is triggered by an interaction with NEDD4-1 and disruption of wild-type PTEN degradation. *Mol Cancer Res.*; 12, 1621-1634.
- Borenfreund, E., Babich, H. y Martin-Alguacil, N. 1985. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in Vitro*; 2, 1-6.
- Canan Eroğlu, Ebru Avcı, Hasibe Vural, Ercan Kurar. 2018. Anticancer mechanism of Sinapic acid in PC-3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *Gene*; 671, 127-134.
- Caruso, J. A., Campana, R., Wei, C., Su, C. H., Hanks, A. M., Bornmann W. G. y Keyomarsi, K. 2014. Indole-3-carbinol and its N-alkoxy derivatives preferentially target ER α -positive breast cancer cells. *Cell Cycle*;13, 2587-99.
- Chen, L., Cheng, P. H., Rao, X. M., McMasters, K. M. y Zhou, H. S. 2014. Indole-3-carbinol (I3C) increases apoptosis, represses growth of cancer cells, and enhances adenovirus-mediated oncolysis. *Cancer Biol Ther.*; 15, 1256-67.
- El-Hawary, S. S., Sayed, A. M., Mohammed, R., Hassan, H. M., Zaki, M. A., Rateb, M. E., Mohammed, T. A. Amin, E. y Abdelmohsen, U. R. 2018. Epigenetic Modifiers Induce Bioactive Phenolic Metabolites in the Marine-Derived Fungus *Penicillium brevicompactum*. *Mar. Drugs*;16, 253.
- Elsbaey, M., Ahmed, K., Elsebai, M. F., Zaghoul, A., Amer, M. M., y Lahloub, M. F. I., 2017. Cytotoxic constituents of *Alocasia macrorrhiza*. *Zeitschrift für Naturforschung C.*; 72, 21-25.
- de Figueiredo, S. M., Binda, N. S., Nogueira-Machado, J. A., Vieira-Filho, S. A., Caligorne, R. B. 2015. The antioxidant properties of organosulfur compounds (sulforaphane). *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.*; 9, 24-39.
- Hameed, H., Aydin, S., Başaran, A. A. y Başaran, N. 2016. Evaluación de las propiedades citotóxicas del ácido sinápico in vitro. *Turco. J. Pharm. Sci.*; 13, 225-232.
- Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, MS. y Gescher, A. 2000. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 9, 1163-1170.
- Jiang, X., Liu, Y., Ma, L., Ji, R., Qu, Y., Xin, Y., Lv, G. 2018. Chemopreventive activity of sulforaphane. *Drug Des Devel Ther.*; 12, 2905-2913.

-
- Jiayun, F., Wim, R. y Wybren, J. B. 2021. Excited-state dynamics of isolated and (micro)solvated methyl sinapate: the bright and shady sides of a natural sunscreen. *Molecular Physics.*; 119, 1-2.
- Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A. Y Castanas, E. 2004. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res.*; 6, 63-74.
- Kang, U., Ryu, S. M, Lee, D. y Seo E. K. 2018. Chemical constituents of the leaves of *Brassica oleracea* var. acephala. *Chem Nat Compd.*; 54, 1023–1026
- Khalid A., Reem, M., El-Naga, N., Wahdan, S. A. 2022. Neuroprotective effects of indole-3-carbinol on the rotenone rat model of Parkinson's disease: Impact of the SIRT1-AMPK signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 435,115853.
- Khatun, M., Billah, M. y Quader, M. A. 2012. Sterols and Sterol Glucoside from *Phyllanthus* Species. *Dhaka University Journal of Science*; 60, 5–10.
- Kassie, F., Anderson, L. B., Scherber, R., Yu, N., Lahti, D., Upadhyaya, P. y Hecht, S. S. 2007. Indole-3-carbinol inhibits 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone plus benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis in A/J mice and modulates carcinogen-induced alterations in protein levels. *Cancer Res.*; 67, 6502-11.
- Kim, Y. S. y Milner, J. A. 2005. Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention. *J Nutr Biochem.*; 16, 65-73.
- Krajka-Kuźniak, V., Paluszczak, J., Szaefer, H. y Baer-Dubowska, W. 2015. The activation of the Nrf2/ARE pathway in HepG2 hepatoma cells by phytochemicals and subsequent modulation of phase II and antioxidant enzyme expression. *J Physiol Biochem.*; 71, 227-38.
- Lee, C. M., Park, S. H., y Nam, M. J. 2019. Anticarcinogenic effect of indole-3-carbinol (I3C) on human hepatocellular carcinoma SNU449 cells. *Hum Exp Toxicol*; 38, 136-147.
- Lee, J. Y., Lim, H. M., Lee, C. M., Park, S. H., y Nam, M. J. 2021. Indole-3-carbinol inhibits the proliferation of colorectal carcinoma LoVo cells through activation of the apoptotic signaling pathway. *Hum Exp Toxicol*; 40, 2099-2112.
- Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., Haj, A., y Fares, F. A. 2003. Indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells. *Food Chem. Toxicol*; 41, 745–752.
- Nakamura, Y., Yogosawa, S., Izutani, Y., Watanabe, H., Otsuji, E. y Sakai, T. 2009. A combination of indol-3-carbinol and genistein synergistically induces apoptosis in human colon cancer HT-29 cells by inhibiting Akt phosphorylation and progression of autophagy. *Mol Cancer.*; 12,100-9.
- Nguyen, V. P. T., Stewart, J. D., Ioannou, I. y Allais, F. 2021. Sinapic Acid and Sinapate Esters in *Brassica*: Innate Accumulation, Biosynthesis, Accessibility *via* Chemical Synthesis or Recovery From Biomass, and Biological Activities. *Front Chem.*; 9, 664602.
- Njinga, N. S., Sule, M. I., Pateh, U. U., Hassan, H. S., Abdullahi, S. T. y Ache, R. N., 2016. Isolation and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol-3-Oglucoside from *Lannea Kerstingii* Engl. & K. Krause (Anacardiaceae). *NUJHS.*; 6, 4-8.

-
- Njoroge, P. W. y Opiyo, S. A. 2019. Some Antibacterial and Antifungal Compounds from Root Bark of *Rhus natalensis*. *Am. J. Chem.*; 9,150-158.
- Paik, W. H., Kim, H. R., Park, J. K., Song, B. J., Lee, S. H. y Hwang, J. H. 2013. Chemosensitivity induced by down-regulation of microRNA-21 in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells by indole-3-carbinol. *Anticancer Res.*; 33, 1473-81.
- Prado, N. J., Ramirez, D., Mazzei, L., Parra, M., Casarotto, M., Calvo, J. P., Cuello, Carrión, D., Ponce, Zumino, A. Z., Diez, E. R., Camargo, A. y Manucha, W. 2022. Anti-inflammatory, antioxidant, antihypertensive, and antiarrhythmic effect of indole-3-carbinol, a phytochemical derived from cruciferous vegetables. *Heliyon*; 8, 1-9.
- Quirit, J. G., Lavrenov, S. N., Poindexter, K., Xu, J., Kyauk, C., Durkin, K. A., Aronchik, I., Tomasiak, T., Solomatin, Y. A., Preobrazhenskaya, M. N. y Firestone, G. L. 2017. Indole-3-carbinol (I3C) analogues are potent small molecule inhibitors of NEDD4-1 ubiquitin ligase activity that disrupt proliferation of human melanoma cells. *Biochem. Pharmacol*; 127, 13-27.
- Rahman K. M., Li, Y. y Sarkar F. H. 2004. Inactivation of akt and NF- κ B play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells. *Nutr Cancer.*; 48, 84-94.
- Repetto, G., del Peso, A. y Zurita, J. L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.*; 3, 1125-31.
- Rogan, E. G. 2006. The natural chemopreventive compound indole-3-carbinol: state of the science. *In Vivo*; 20, 221-8.
- Rosa, L. D. S., Silva, N. J. A., Soares, N. C. P., Monteiro, M. C., y Teodoro, A. J. 2016. Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer—a review. *J. Nutr. Food Sci.*; 6, 1-8.
- Saenglee, S., Jogloy, S., Patanothai, A., Leid, M. y Senawong, T. 2016. Cytotoxic effects of peanut phenolics possessing histone deacetylase inhibitory activity in breast and cervical cancer cell lines. *Pharmacol.*; 68,1102-1110.
- Senawong, T., Misuna, S., Khaopha, S. 2013. Histone deacetylase (HDAC) inhibitory and antiproliferative activities of phenolic-rich extracts derived from the rhizome of *Hydnophytum formicarum* Jack.: sinapinic acid acts as HDAC inhibitor. *BMC Complement Altern Med.*; 13, 232-9.
- Soledade, M., Pedras, C. y Abbas Abdoli. 2013. Metabolism of the phytoalexins camalexins, their bioisosteres and analogues in the plant pathogenic fungus *Alternaria brassicicola*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 21, 4541-4549.
- Stoner, T. D. 2008. Inhibición del indol-3-carbinol de la replicación del virus del herpes simple. *Universidad Estatal de Kent*.
- Su, X., Jiang, X., Meng, L., Dong, X., Shen, Y., Xin, Y. 2018. Anticancer Activity of Sulforaphane: The Epigenetic Mechanisms and the Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.*; 5438179, 1-10.
- Takasugi, M., Katsui, N. y Shirata, A. 1986. Isolation of three novel sulphur-containing phytoalexins from the chinese cabbage *Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*(cruciferae). *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*; 14, 1077-78.

Wang, T. T., Schoene, N. W., Milner, J. A. y Kim, Y. S. 2012. Broccoli-derived phytochemicals indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane exerts concentration-dependent pleiotropic effects on prostate cancer cells: comparison with other cancer preventive phytochemicals. *Mol Carcinog.*; 51, 244-56.

Xinglong, H. U., Geetha, R. V., Surapaneni, K. M., Veeraraghavan, V. P., Chinnathambi, A., Alahmadi, T. A., Manikandan, V. y Manokaran, K. 2021. Lung cancer induced by Benzo(A)Pyrene: ChemoProtective effect of sinapic acid in swiss albino mice. *Saudi J. Biol. Sci.*; 28, 7125-7133.

Youssif, K. A., Elshamy, A. M., Rabeh, M. A., Gabr, N., Afifi, W. M., Salem, M. A., y Haggag, E. G. 2020. Cytotoxic Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles of Lampranthus coccineus Extracts, Metabolic Profiling and Molecular Docking Study. *ChemistrySelect.*; 5, 12278-12286.

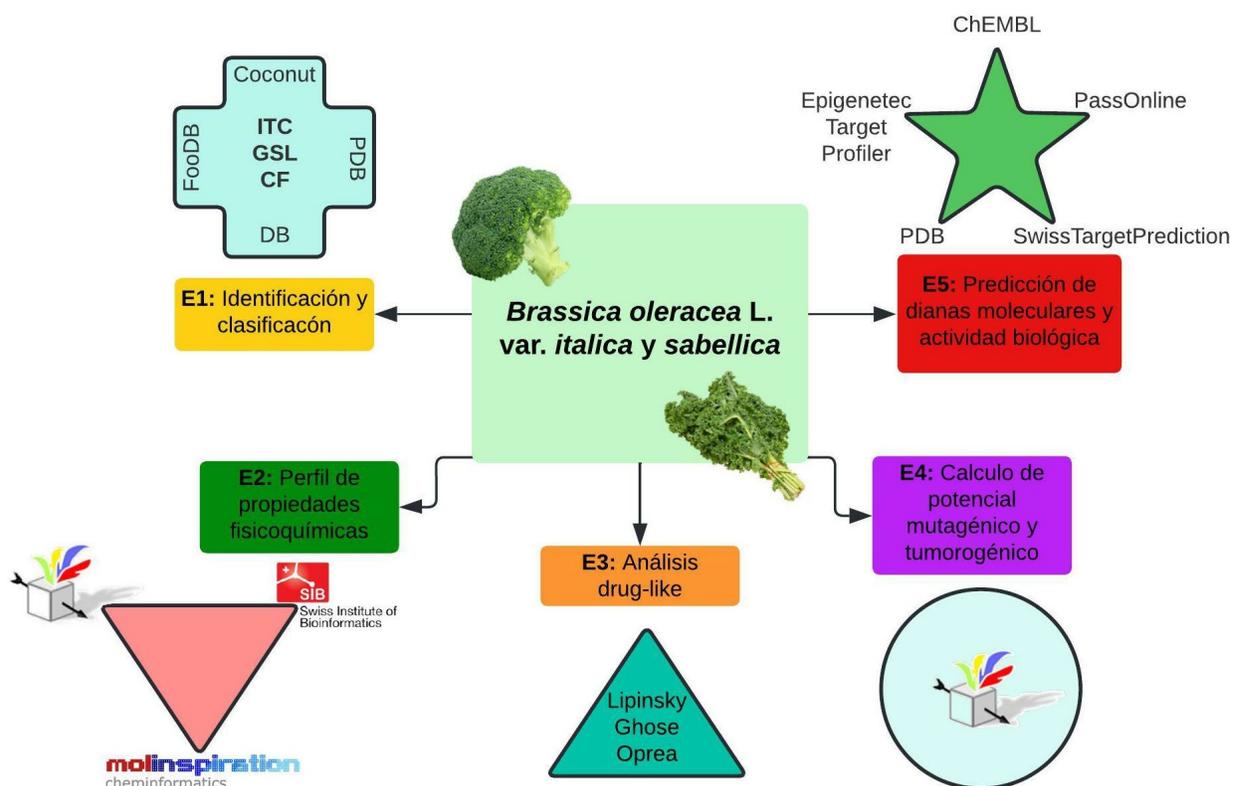
CAPÍTULO III

“Me gustaría subrayar con fuerza mi convicción de que la era de los químicos computacionales, en la que cientos, si no miles de químicos trabajarán con ordenadores en lugar de hacerlo en el laboratorio para incrementar muchos aspectos de la información sobre productos químicos, ya está próxima. Sólo hay un obstáculo, a saber, que alguien debe pagar por el tiempo de cálculo”.

<Robert Mulliken>

Análisis quimioinformático

3.1 Metodología



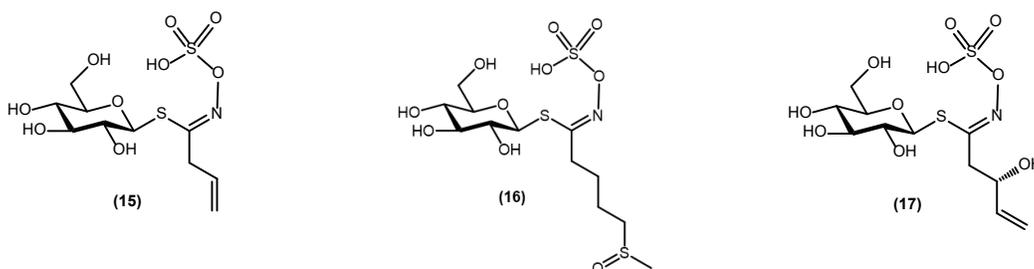
Esquema 3. 1 Metodología general del estudio quimioinformático.

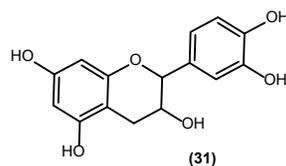
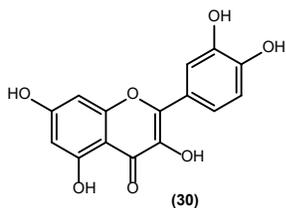
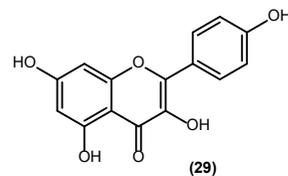
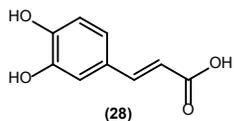
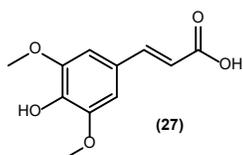
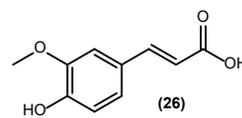
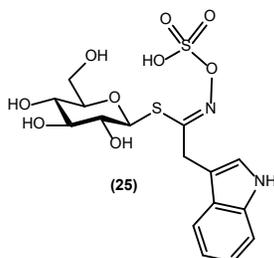
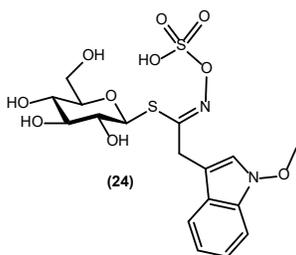
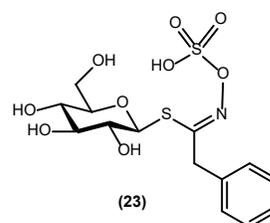
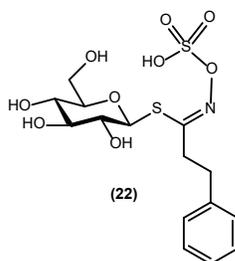
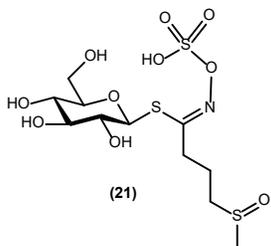
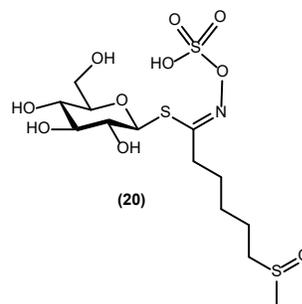
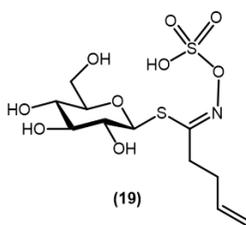
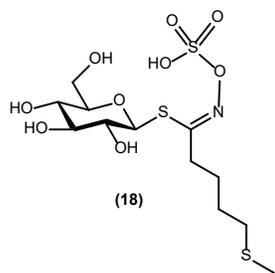
3.1.1 Análisis *in silico* de compuestos de tipo isotiocianato, glucosinato y fenólico

3.1.1.1 Recolección de datos

Las estructuras químicas que poseen el grupo funcional isotiocianato (ITC) se buscaron en las bases de datos de acceso libre COCONUT (Collection of Open Natural Products, CNT) (**Sorokina et al., 2021**), FooDB, version 1.0 (FDB) (**FooDB, 2021**), Protein Data Bank (PDB) (**Berman et al., 2000**) y DrugBank, versión 5.1.8 (DB) (**Wishart et al., 2018**) utilizando como método de búsqueda la palabra isotiocianato, la contracción ITC, así como la forma desarrollada del grupo funcional (R-N=C=S) Los resultados obtenidos de esta búsqueda se compararon entre sí y se seleccionaron los compuestos duplicados y únicos presentes en cada base de datos agrupándolos en una tabla incluyéndose su respectivo código SMILE (Simplified Molecular-Input Line-Entry System).

Por otro lado, se seleccionaron 17 compuestos, que, de acuerdo con la literatura descrita en los antecedentes, se encuentran presentes en las 2 variedades de *Brassica oleracea* L. que se trabajan en este proyecto (*italica* y *sabellica*) (Tabla 1.3 y 1.6). De los cuales 11 de ellos de tipo glucosinato: sinigrina (**15**), glucorafanina (**16**), progoitrina (**17**), glucoerucina (**18**), gluconapina (**19**), glucoalissina (**20**), glucoiberina (**21**), gluconasturtina (**22**), glucosinalbina (**23**), neoglucobrasicina (**24**), glucobrasicina (**25**). Además de 6 de tipo fenólico: ácido ferúlico (**26**), ácido sinapico (**27**), ácido caféico (**28**), kaempferol (**29**), quercetina (**30**), catequina (**31**). Los tres grupos de compuestos obtenidos se subclasificaron según sus características químicas estructurales.





3.1.1.2 Identificación de la fuente alimentaria reportadas en FooDB

Se identificaron las fuentes alimenticias de los compuestos de tipo isotiocianato que se reportan en FooDB a través de la búsqueda por nombre de cada uno de los compuestos previamente colectados. Además, se identificaron las fuentes de la familia Brassicaceae en las cuales se encuentran reportados los compuestos de tipo glucosinolato y fenólico.

3.1.1.3 Determinación de propiedades moleculares

Se inició con la elaboración del perfil de los 3 tipos de compuestos (isotiocianatos, glucosinolatos y polifenoles), con el cálculo de las propiedades fisicoquímicas relacionadas con la absorción oral para posibles candidatos a fármacos. El análisis quimioinformático se realizó utilizando los softwares gratuitos Molinspiration (**Molinspiration, 2021**), SwissADME (**SIB, 2021**) y DataWarrior, versión v05.02.01. (**Sander et al., 2015**). Se calcularon ocho propiedades moleculares de interés farmacéutico: número de átomos pesados (#A), peso molecular (PM), donadores de enlaces de hidrógeno (DPH), aceptores de enlaces de hidrógeno (APH), coeficiente de partición octanol / agua (clogP), número de enlaces rotables (ER), área de superficie polar (ASP) y refractividad molar (RM).

3.1.1.4 Análisis por criterios de Lipinsky, Ghose y Oprea de las propiedades moleculares

Se consideraron los valores de peso molecular, coeficiente de partición, número de átomos, número de enlaces rotables, número de aceptores de enlace de H, número de donadores de enlace de H y área polar superficial obtenidos en el software Molinspiration, el valor de refractividad molar fue tomado del software SwissTargetPrediction ya que es el único que lo proporciona para realizar un análisis del potencial como fármacos de absorción oral y difusión pasiva, a través de la regla de los 5's descrita por Lipinsky en el 2001, que nos dice que un

compuesto candidato a fármaco tendrá problemas de permeabilidad o de difusión pasiva si viola 2 o más de los cuatro criterios establecidos, es decir, si presenta:

- Más de 5 donadores de enlaces de hidrógeno (expresado como la suma de OH y NH).
- Un peso molecular mayor de 500 g/mol.
- Un clogP mayor de 5.
- Más de 10 (5 x 2) aceptores de enlaces de hidrógeno (expresado como la suma de N y O).

Como apoyo para fortalecer a la regla de los 5's más no para suplirla, esto al considerar otras propiedades moleculares y rangos aceptables, también se tomaron en cuenta criterios expuestos por Ghose en 1999 y Oprea en el 2000:

- Peso Molecular entre 160 y 480 g/mol, promedio 357 g/mol.
- clog P entre -0.4 y 5.6, promedio 2.52.
- Refractividad molar entre 40 y 130, promedio 97.
- Número total de átomos entre 20 y 70, promedio 48.
- PSA entre 100-150 Å para absorción oral; 60-90 Å BHE.
- Numero de enlaces rotables entre 2 y 8.
- Numero de anillos entre 1 y 4.

3.1.1.5 Predicción de actividad biológica, potencial mutagénico y tumorigénico

Las representaciones SMILES (**Weininger, 1988**) de los glucosinolatos y compuestos fenólicos reportados en brócoli y kale, así como de los isotiocianatos reportados en las bases de datos públicas, se utilizó como base para predecir la actividad biológica de cada uno de ellos con un criterio de selección de $Pa \geq 0.5$ en SwissTargetPrediction, nivel de confianza de 90% y un umbral de actividad ≥ 6.5 en ChEMBL (**Davies et al., 2015**) y $Pa \geq 0.9$ en PASS Online (**Filimonov et al., 2014**). Además, se identificaron dianas moleculares cocrystalizadas con los tres tipos de

compuestos reportados en PDB. Aunado a esto, se predijo el nivel del potencial mutagénico y tumorigénico de los compuestos con DataWarrior, versión v05.02.01.

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Análisis *in silico* de compuestos de tipo isotiocianato

Se obtuvieron un total de 198 moléculas con la subestructura ITC en las bases de datos consultadas. Encontramos que estas bases de datos tenían en común 38 estructuras químicas y 154 eran compuestos únicos. El contenido de cada base de datos se resume en la **Tabla 3.1** y el número de compuestos que se comparten entre las diferentes bases de datos se muestra en la **Figura 3.1**.

Tabla 3.1 Número de isotiocianatos reportados en 4 bases de datos.

Base de datos	Población	Fuente
Collection of Open Natural Products (CNT)	137	https://coconut.naturalproducts.net
Food Database (FDB)	48	https://foodb.ca
Protein Data Bank (PDB)	11	https://www.rcsb.org
Drug Bank (DB)	2	https://go.drugbank.com
Total	198	
Unique ITCs	154	

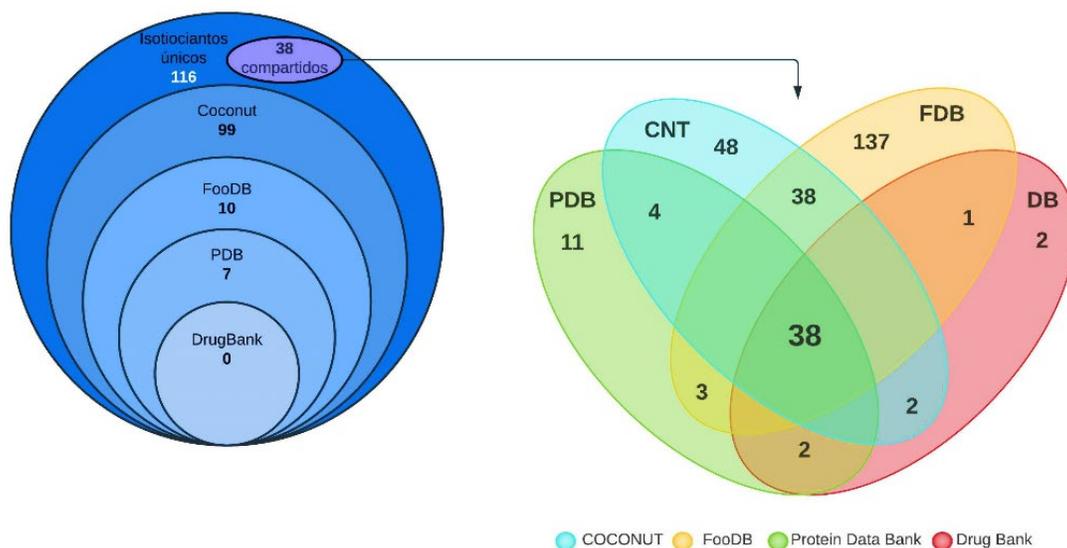


Figura 3.1 Isotiocianatos únicos y compartidos extraídos de cuatro bases de datos: COCONUT (CNT), FooDB (FDB), Protein Data Bank (PDB), y DrugBank (DB).

3.2.2 Fuente alimentaria de isotiocianatos informada en FooDB

La versión actual de FooDB reporta 48 isotiocianatos, de los cuales solo 25 tienen reportada su fuente natural. Los compuestos identificados como ((R)-iberina, isotiocianato de alilo y (E)-raphasatin) se encuentran reportados en fuentes de origen animal, como diversas variedades de carne y leche; Por otro lado 24 isotiocianatos se encuentran principalmente reportados en 18 fuentes de origen vegetal (**Gráfico 3.1**).

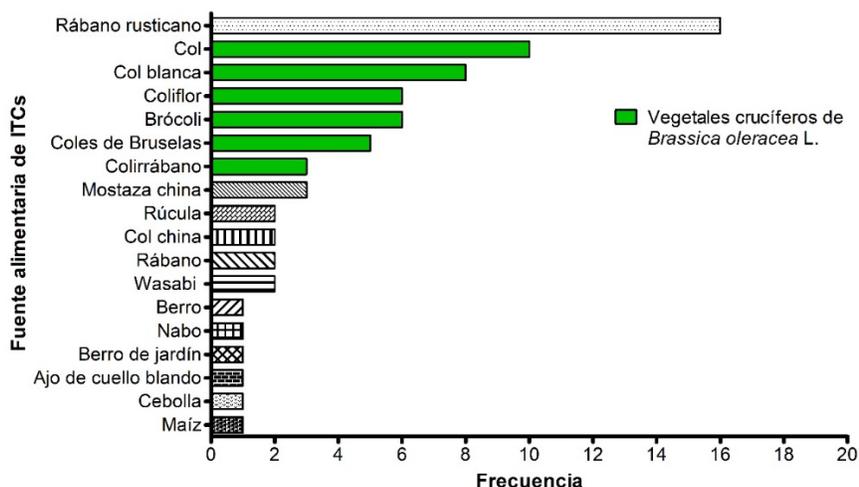


Gráfico 3.1 Principal fuente alimentaria de isotiocianatos reportada en FooDB.

Las fuentes de las vegetales de isotiocianatos fueron analizadas de acuerdo con la familia, el género y la especie. La **Tabla 3.2** muestra a las familias Amaryllidaceae, Poaceae y Brassicaceae y a 10 géneros (*Brassica*, *Rorippa*, *Lepidium*, *Eruca*, *Wasabia*, *Raphanus*, *Armoracia*, *Allium*, *Zea*, *Avena*) como las plantas que contienen mayor cantidad de isotiocianatos. A través de este análisis pudimos observar que el género *Brassica* es la principal fuente de estos compuestos orgánicos de azufre.

Se encontraron reportados 14 de 25 isotiocianatos (**Figura 3.2 A**) en las verduras crucíferas (*Brassica oleracea* L.): brócoli, coliflor, repollo, colinabo, col blanca y coles de Bruselas. La **Figura 3.2 B** muestra estos vegetales procedentes de la planta silvestre y los isotiocianatos reportados en esta especie, tales como sulforafano (SFN), isotiocianato de alilo (AITC), iberiverina (IBV) y fenetil isotiocianato (FEITC).

Tabla 3.2 Alimentos asociados a los isotiocianatos según FooDB.

Familia	Género	Nombre científico	Nombre común	
Brassicaceae	Brassica	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>	Col	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>botrytis</i>	Coliflor	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemnifera</i>	Coles de Bruselas	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gongylodes</i>	Colirabano	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	Brócoli	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC.	Col blanca	
		<i>Brassica juncea</i>	Mostaza china	
		<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>	Nabo	
		<i>Brassica rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	Col china	
		<i>Rorippa</i>	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	Berro
		<i>Lepidium</i>	<i>Lepidium sativum</i>	Berro de jardín
		<i>Eruca</i>	<i>Eruca vesicaria</i> ssp. <i>sativa</i>	Rúcula
		<i>Wasabia</i>	<i>Wasabia japonica</i>	Wasabi
<i>Raphanus</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Rábano		
<i>Armoracia</i>	<i>Armoracia rusticana</i>	Rábano rusticano		
Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	<i>Allium sativum</i> L. var. <i>sativum</i>	Ajo	
Poaceae	<i>Zea</i>	<i>Zea mays</i>	Maíz	
	<i>Avena</i>	<i>Avena sativa</i>	Cebolla	

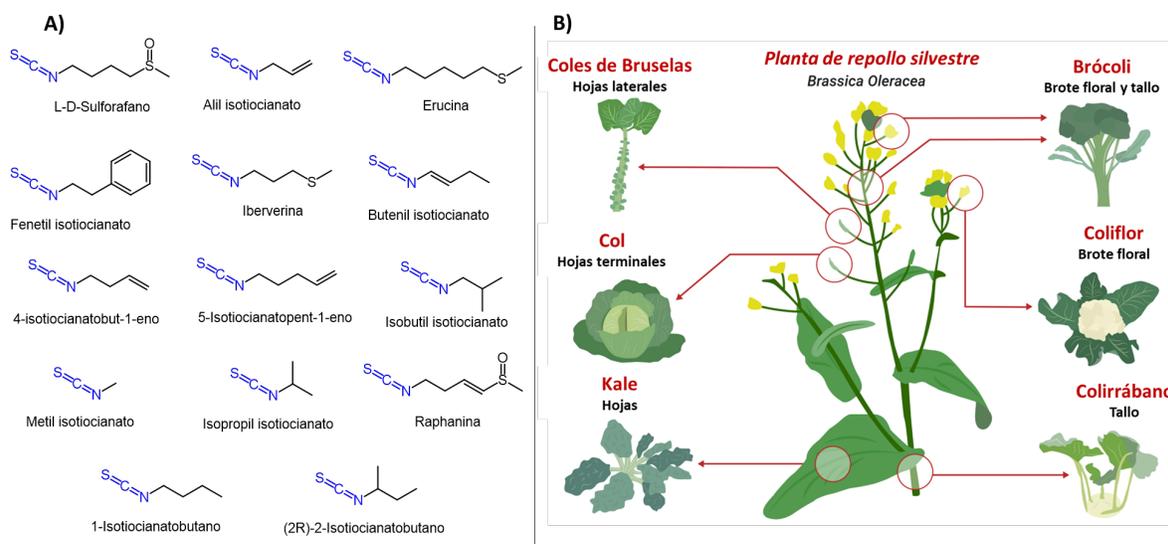


Figura 3.2 A) Estructuras de isotiocianatos reportados en vegetales crucíferos de *Brassica oleracea* L. por FooDB. B) Esquema ilustración de los vegetales de la planta silvestre.

3.2.3 Clasificación estructural

Los 154 isotiocianatos con estructuras químicas únicas obtenidas de las cuatro bases de datos se clasificaron de acuerdo con su estructura base en siete categorías: acíclico (69 moléculas), cíclico (3), policíclico (41), aromático (14), poliaromático (3), indólico (18) y glicosilado (6) (Figura 3.3 A); los Isotiocianatos representativos para cada una de las categorías se muestran a continuación en la Figura 3.3 B.

Cabe resaltar que los isotiocianatos acíclicos, cíclicos y aromáticos como sulforafano, bencil y fenetil isotiocianatos son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en las verduras crucíferas de *Brassica oleracea* L. Estos, se han descrito ampliamente en estudios anteriores como agentes quimiopreventivos (Cheung y Kong, 2010), inductores de apoptosis (Liu *et al.*, 2013), así como antiproliferativos para las líneas celulares cancerosas de mama, colon, pulmón, páncreas, entre otras (Quin *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2013), y podrían estar involucrados en los procesos antiinflamatorios (Heiss *et al.*, 2001). Por ejemplo, el isotiocianato acíclico sulforafano (SFN) es el componente más conocido de las verduras crucíferas y ha sido reconocido como un nutracéutico quimiopreventivo debido a su actividad antiproliferativa (Kaboli *et al.*, 2019).

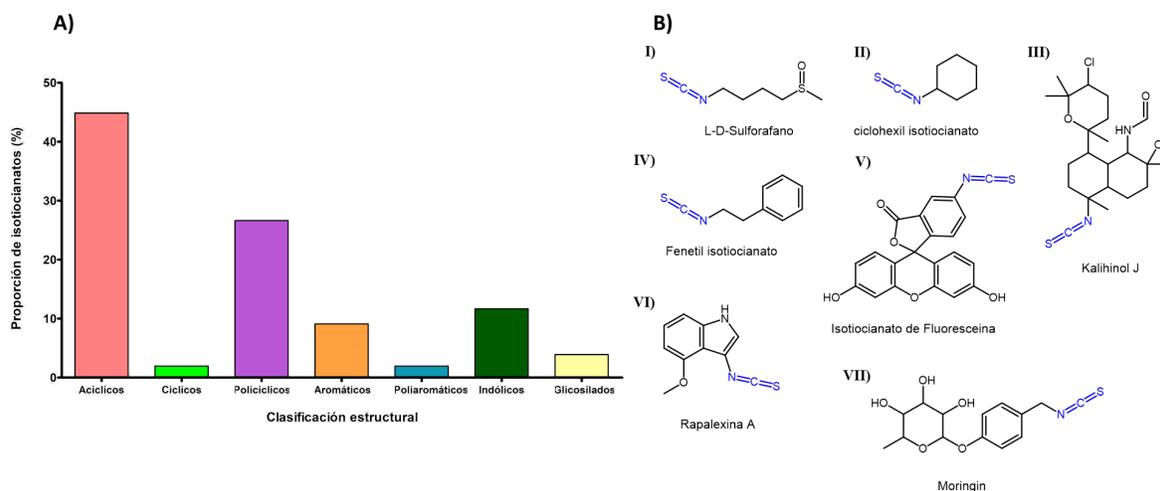


Figura 3.3 A) Proporción de isotiocianatos identificados según su estructura química. B) Isotiocianatos representativos de cada grupo estructural. I) acíclico, II) cíclico, III) policíclico, IV) aromático, VI) poliaromático, V) indólico, VI) glicosilado.

3.2.4 Propiedades fisicoquímicas

Como se describe en la sección anterior, el perfil de propiedades fisicoquímicas de los 154 ITC reportados en bases de datos públicas se realizó con: Molinspiration, SwissADME y DataWarrior. Se calcularon las ocho propiedades moleculares: #A, PM, DPH, APH, clogP, ER, ASP y RM. Cabe resaltar que estas propiedades son de interés farmacéutico y proporcionan una estimación cuantitativa de la similitud de las moléculas pequeñas con un fármaco.

A continuación, se discuten los resultados calculados con DataWarrior ya que es el software que no discrimina en el tamaño de la molécula y SwissADME, el único de los 3 servidores utilizados que permite calcular los valores de refractividad molar la cual, es una propiedad aditiva de la molécula, a mayor RM mayor es el volumen estérico del sustituyente y mayor su tendencia a interactuar a través de fuerzas de London (**Cabrera et al., 2016**).

Los resultados de los descriptores químicos de los isotiocianatos pertenecientes a los conjuntos de datos sometidos al ensayo se representaron como histogramas de proporción que revelaron un desplazamiento a la izquierda con respecto a todos los descriptores químicos de los conjuntos de datos analizados (**Figura 3.4**).

El perfil fisicoquímico calculado indica que el 95.5% de los ITCs se encuentran en un rango de 100 a 450 Da de PM, 86.7 % con clogP entre 1 y 6; la mayoría de los ITCs poseen alrededor de 18 átomos pesados (16.9 %), 64,9 % tienen alrededor de 2 a 4 ER, 67.5 % tienen 1-2 APH. En contraste, 70.1 % no tienen DPH y 29.9 % tiene 1-4 DPH, 81.8 % tiene un ASP de 40 a 120 Å. Finalmente, el 15.6 % de los isotiocianatos tienen un valor de refractividad molar de 80.

En este estudio, se llevó a cabo una evaluación preliminar del potencial de los isotiocianatos como fármacos por absorción oral y difusión pasiva mediante la comparación de la Regla de 5 de Lipinski (**Lipinski, 2001**) que como ya se ha mencionado describe que un compuesto candidato a fármaco tendrá problemas de permeabilidad o difusión pasiva si viola dos o más de los cuatro criterios establecidos. Además de considerarse también los criterios promedio de Ghose

(**Ghose et al., 1999**) y Oprea (**Oprea, 2000**). Sin embargo, es preciso tener en cuenta que cumplir estos criterios no es una garantía de que un compuesto sea candidato a fármaco. Del mismo modo, el hecho de que los compuestos no cumplan con la Regla de los 5 de Lipinski, los compuestos no deben ser excluidos de la consideración como fármacos potenciales (**Lipinski, 2003**).

Podemos observar que el 99.5 % de los isotiocianatos analizados en este trabajo están por debajo de los valores establecidos por Lipinski para PM y donantes y aceptores de enlace de hidrógeno, mientras que el 61.7% de estos, están en un rango de $\text{clogP} \geq 5$. Teniendo en cuenta los criterios complementarios de Ghose y Oprea, encontramos que alrededor del 77.7 % de los compuestos se encuentran en los rangos de PM, clogP y ER establecidos, el 37 % de estos contienen de 20 a 70 átomos pesados, el 83.4 % están entre los valores de 5 - 60 propuestos para RM.

El área de superficie polar molecular (ASP) es un parámetro muy útil para la predicción de las propiedades de transporte de fármacos. Se ha demostrado que este parámetro se correlaciona muy bien con la absorción intestinal humana y la penetración de la barrera hematoencefálica (**Feng, 2002, Pajouhesh y Lenz, 2005**). De acuerdo con nuestros resultados, el 11 % de los isotiocianatos serían adecuados para absorción por vía oral y el 48 % para la permeabilidad de la BHE (**Figura 3.4**). Los 3 autores reconocen la importancia de considerar el peso molecular y los valores de clogP , por lo que bajo este análisis podemos concluir que el 79.2 % y 61.7 % de los isotiocianatos cumplen estos criterios respectivamente para lo establecido por estas reglas empíricas.

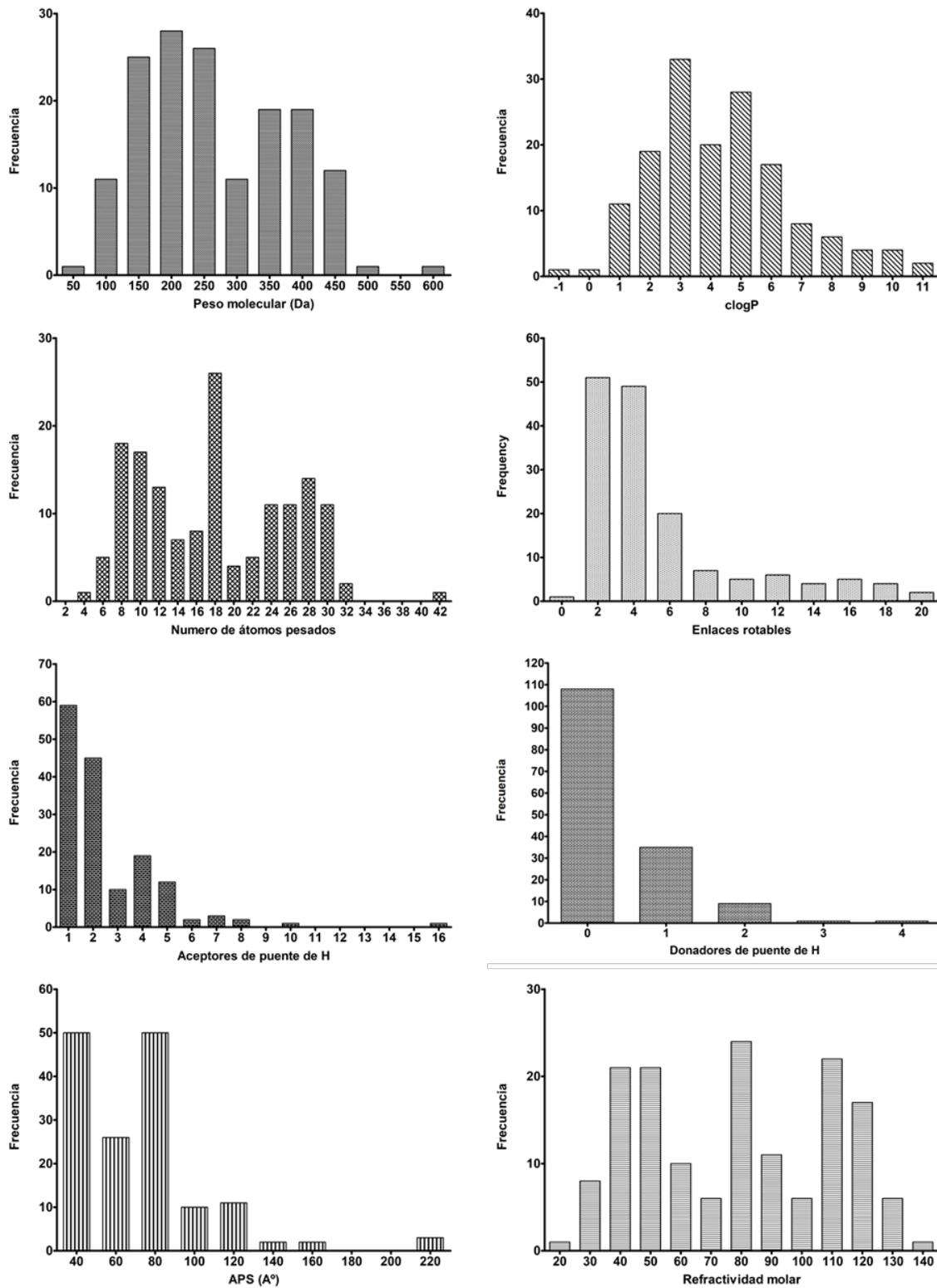


Figura 3.4 Distribución de los ocho descriptores químicos de relevancia farmacéutica calculados de los 154 compuestos.

3.2.5 Cálculo de potencial mutagénico y tumorogénico

Se utilizó DataWarrior para estimar el potencial mutagénico y tumorogénico de los 154 ITCs. El 81.2 % de los compuestos tiene un potencial mutagénico bajo y el 83.7% un potencial tumorogénico bajo. Además, el 8.1 % de los ITCs no tienen potencial mutagénico y / o tumorogénico, mientras que el 10.6 % y el 8.1 % se consideran altamente mutagénicos y tumorogénicos, respectivamente (**Gráfico 3.2**).

Teniendo en cuenta la diversidad estructural química de los ITCs, esta diferencia no es inesperada, ya que los factores involucrados en la complejidad de la molécula, como el tamaño, el tipo de enlace e incluso sus demás sustituyentes, juegan un papel importante en la determinación de la toxicidad. Por tanto, se considera que la diferencia en el perfil toxicológico determina las potenciales amenazas asociadas a su ingesta. Informes anteriores indican un potencial toxicológico en concentraciones superiores a las que se encuentran normalmente en las verduras crucíferas de los compuestos similares a los isotiocianatos más conocidos (**Fimognari et al. 2012**) Por lo tanto, es importante considerar la relación dosis-respuesta para estos compuestos, ya que los ITCs como el AITC, FEITC, SFN, IBV y BITC, también son ampliamente reconocidos como agentes antioxidantes (**Figueiredo et al., 2013**), citotóxicos, inductores de apoptosis (**Miao et al., 2017; Kntayya et al., 2018; Mas et al., 2007**), quimioprotectores (**Munday y Munday, 2004; Dayalan et al., 2018**) y quimiopreventivos (**Bianchini y Vainio, 2004; . Dayalan et al., 2020**).

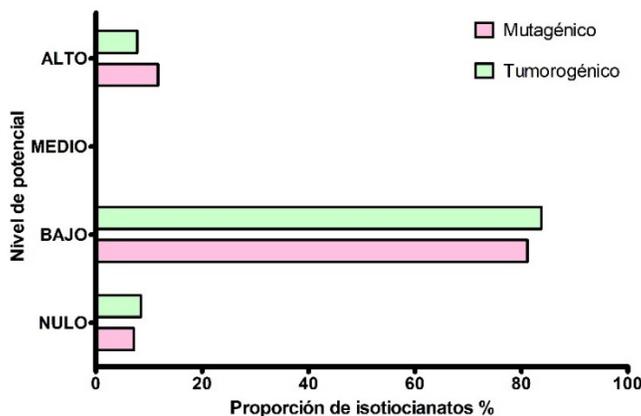


Gráfico 3.2 Potencial mutagénico y tumorogénico de los 154 isotiocianatos.

3.2.6 Perfil de dianas epigenéticas

Se realizó la predicción de la diana epigenética de cada isotiocianato utilizando un servidor web recientemente desarrollado llamado *Epigenetic Target Profiler* (Dong *et al.*, 2018). Esta aplicación web predice el perfil de bioactividad en un panel de 55 objetivos epigenéticos diferentes. Los parámetros relacionados con la fiabilidad de las predicciones son la identificación de pequeñas moléculas con potencial de actividad epigenética (Sánchez y Medina, 2021). En la búsqueda de blancos epigenéticos se encontró que los compuestos de tipo ITCs están fuera de los criterios de confiabilidad para los blancos epigenéticos (p. Ej., Q4), que es el nivel más bajo de compromiso propuesto por este servidor. Esto sugiere que tienen una probabilidad insignificante de actividad o que no se han reportado compuestos similares para hacer una comparación estructural confiable.

3.2.7 Objetivos biomoleculares de los isotiocianatos

Protein Data Bank proporciona acceso a datos de estructura 3D para moléculas biológicas, al abrir el acceso al conocimiento acumulado de estructura cristalizada, función y evolución de macromoléculas biológicas. Como resultado de este trabajo se identificaron siete objetivos para los once ITC recopilados de las bases de datos públicas y reportados en PDB. El 92.85 % de los ITC no se han co-cristalizado con biomacromoléculas. No obstante, se han reportado siete dianas moleculares cristalizadas con ITCs: factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (4.65 %), dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) (1.3 %), quitinasa A (chiA) (0.65 %), adenilil ciclasa (ADCY10) (0.65%), glutatión transferasa omega 3S (GST3S) (0.65%), liozima C (LYZ) (0.65%), glutatión S- transferasa A1 (GSTA1) (0.65%) (ver [Anexos](#)). En general, estas dianas moleculares se encuentran ampliamente relacionadas con actividades anticancerígenas y antiinflamatorias.

El MIF es una citocina inflamatoria pleiotrópica importante en la regulación ascendente de las respuestas inmunológicas innatas y adaptativas y se ha implicado en la patogenia de enfermedades autoinmunes, sepsis, enfermedades

inflamatorias como artritis reumatoide (**Bilsborrow et al., 2019; Calandra y Roger, 2003**), enfermedad cardiovascular (**Burger-Kentischer et al., 2002**), diabetes (**Herder et al., 2006**) y también se ha encontrado que se sobreexpresa en numerosos tipos de tumores, incluidos el cáncer de mama y el melanoma (**Tomiyasu et al., 2002; Lee et al., 2008**). MIF posee dos actividades catalíticas distintas: actividad tiol proteína oxidoreductasa y cataliza una reacción de tautomerasa. Algunas de las actividades proinflamatorias del MIF se ven afectadas por mutaciones que afectan la actividad enzimática (**Brown et al., 2009**).

Crichlow *et al.*, reportaron la actividad sobre MIF de dos isotiocianatos, PEITC y SFN. De acuerdo con su estudio, PEITC forma un enlace covalente en la hendidura del sitio activo hidrófobo de MIF, formando un enlace cis tiopéptido. El anillo aromático dentro del sitio activo requiere un cambio conformacional en el residuo *N*-terminal de prolina (Pro-1) para formar un enlace covalente con PEITC. En contraste, SFN extiende la cadena alifática fuera del sitio de unión en la superficie de la proteína, pero también se une covalentemente a MIF, estas uniones se muestran en la **Figura 3.5**. Esto sugiere una menor afinidad por la hendidura del sitio activo de la cadena lateral alifática del sulfurafano en relación con la de la cadena lateral aromática de PEITC (**Crichlow et al., 2012**). Por otro lado, Sokolov *et al.*, comparó la importancia del tamaño de los ligantes. En el caso de la unión MIF-PEITC, el inhibidor se ubica en el interior del centro activo debido a su pequeño tamaño, por el contrario, siendo el tamaño del isotiocianato de fluoresceína (FITC) tan grande, el inhibidor sobrepasa el centro activo y se sitúa por encima de la superficie de la molécula proteica (**Sokolov et al., 2018**)

Spencer *et al.*, Exploraron 15 de bencil y fenetil isotiocianatos que podrían inhibir a MIF, calcularon el IC₅₀ de MIF y las células T de linfoma Jurkat. La presencia de un sustituyente 4-metoxi o 4-sulfonamida aumenta la actividad a submicromolar (0,7 µM). El ITC cristalizado unido covalentemente a rhMIF puede adoptar uno de dos modos de unión distintos: a) "hacia abajo", ocupando un "bolsillo" profundo, restringido e hidrofóbico, y b) "hacia arriba", ocupando una hendidura más abierta expuesta al solvente (**Spencer et al., 2015**). Sin embargo, se ha demostrado que el

ITC no reacciona directamente con cualquiera de estos tioles, y el N- terminal de la prolina ha sido identificado como el sitio de unión de los ITC (**Figura 3.5**) Esto debido a que el aumento de la nucleofilicidad del *N* – terminal de la prolina le permite funcionar como un catalizador general básico en la reacción de tautomerasa por lo que favorece la reactividad con electrófilos como los isotiocianatos. Por lo tanto, la unión de los ITC a la prolina inhibe la actividad de la tautomerasa permitiendo que el MIF interactúe con receptores o proteínas de unión, como CD74, CXCR2 y CXCR4 (**Brown et al., 2009; Crichlow et al., 2012; Sokolov et al., 2018; Spencer et al., 2015**).

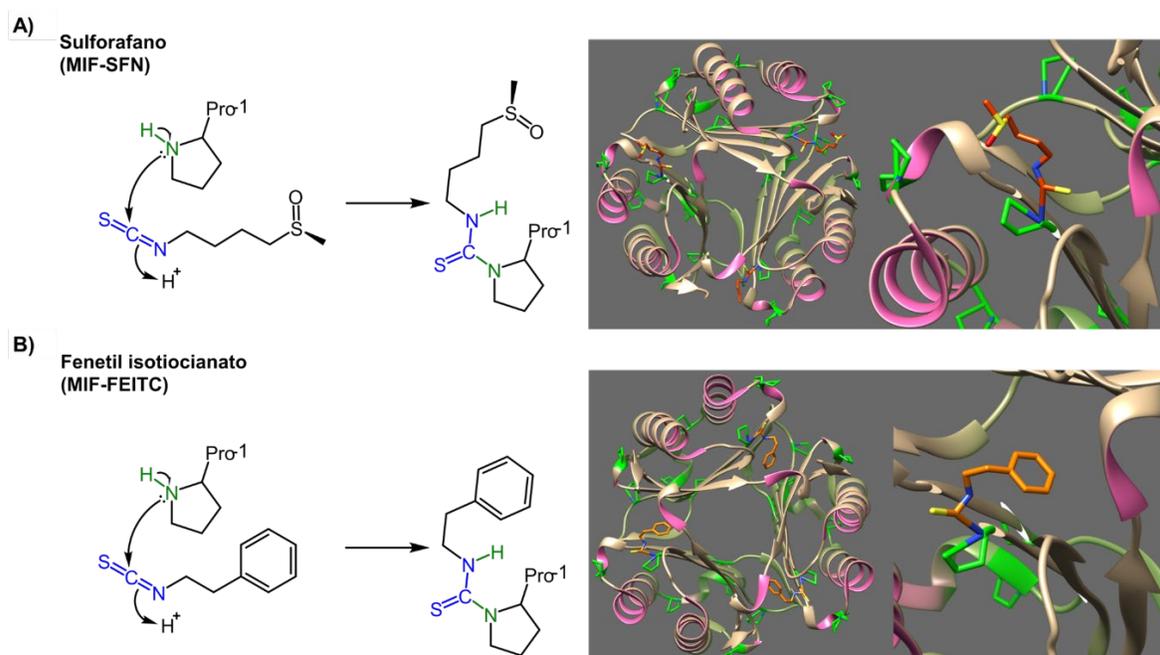


Figura 3.5 Reactividad de MIF con A) SFN (sulforafano) y B) FEITC (fenetil isotiocianato) unidos covalentemente con N-terminal de prolina.

Además, se ha reportado que el 4-nitrofenil isotiocianato y el fenil isotiocianato (PITC) se unen covalentemente con la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). Esta enzima es responsable de catalizar la síntesis de pirimidina de novo y oxidar los procesos de dihidroorotato a orotato. Este proceso está involucrado en

el metabolismo de las células cancerosas (**Reis et al., 2017**) y también está asociado con el tratamiento del cáncer (**Madak et al., 2019**) enfermedades autoinmunes, enfermedades parasitarias, infecciones bacterianas o virales como la producida por el SARS-CoV-2 (**Coelho y Oliveira, 2020**)

3.2.8 Perfil de dianas moleculares y predicción del tipo de actividad de los isotiocianatos

Se utilizaron diferentes dianas moleculares implementadas en los servidores web para determinar la posible actividad biológica de los 154 ITC (**Figura 3.6**).

Al igual que lo reportado en la información experimental de PDB, SwissTargetPrediction mostró al MIF como un posible objetivo molecular, en este caso para el 5.89 % de los ITCs; el 12.99 % de estos compuestos tienen actividad sobre el receptor potencial transitorio anquirina 1 (TRPA1), el cual es un canal iónico y un objetivo importante para las terapias antiinflamatorias y analgésicas porque se expresa en neuronas sensibles al dolor y otros tejidos (**Meents et al., 2019**). Finalmente, como se muestra en la **Figura 3.6 A**, para el 82.5 % de los ITCs no se tuvo predicción bioactiva en SwissTargetPrediction.

La predicción de los objetivos moleculares con ChEMBL (**Figura 3.6 B**) mostró que las principales dianas moleculares de los ITCs son de tipo enzimático (31.17 %). Por ejemplo, la fosfodiesterasa 5A (PDE5A), es una enzima de interés farmacológico ya que su inhibición tiene varias aplicaciones terapéuticas que incluyen disfunción eréctil e hipertensión arterial pulmonar. Además, los inhibidores de la fosfodiesterasa 5A se han asociado con un menor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (**Ahmed et al., 2021; Jovani y Chan, 2019**). Proto-oncogén tirosina-proteína quinasa ROS (ROS1), es una enzima sintetizada por un gen ROS1, que participa en el envío de señales en las células y el crecimiento celular, por lo que su inhibición puede contrarrestar el desarrollo tumoral (**Vecchiarelli y Bennati, 2018**);).

Otros objetivos moleculares que arrojó la predicción en este software de los ITC son la dihidrofolato reductasa (DHFR), el factor de coagulación X (FX) , la serina /

treonina-proteína quinasa pknB y la serina-proteína quinasa ATM. Los receptores de membrana es otra clasificación altamente reportada como un objetivo molecular para compuestos de tipo ITC (30.52 %). Los siguientes receptores de membrana se destacan por su incidencia: receptor muscarínico de acetilcolina M1 (CHRM1) y receptor prostanoide EP4 (EP4R). CHRM1 pertenece a los receptores muscarínicos de acetilcolina, que desempeñan un papel clave en la regulación de la actividad de las funciones importantes del sistema nervioso central y periférico y se han considerado como un objetivo terapéutico de importancia para diversas enfermedades, como la boca seca, la incontinencia y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (**Wess, 2004; Ishii y Kurachi, 2006**). EP4R es uno de los receptores responsables de modular las funciones biológicas de la prostaglandina (PG) E2, este está involucrado en el proceso de angiogénesis y desarrollo tumoral; sin embargo, se han propuesto efectos antiinflamatorios, antitrombóticos y vasoprotectores para este receptor de PGE2 (**Konya et al., 2013; Zhang y Daaka, 2011**). Otros receptores de membrana de menor incidencia que se observaron para los ITC son los receptores adrenérgicos alfa-2b / 2c, el receptor prostanoide EP3 y el receptor cannabinoide CB2.

Complementario a SwissTargetPrediction y ChEMBL, PASS Online es un recurso web diseñado para predecir espectros de actividad biológica, efectos farmacológicos, mecanismos de acción, efectos tóxicos y adversos, etc., de compuestos orgánicos basados en sus estructuras químicas. Para este estudio, las predicciones mostraron que los ITCs reportados en las bases de datos utilizadas en este trabajo pueden tener actividad como inhibidor del citocromo P450 2E1 (CYP2E1), pueden ser agonistas de la apoptosis y pueden actuar como sustrato del glutatión S transferasa (GST), una enzima involucrada en la desintoxicación celular. La sobreexpresión de GST se asocia con la aparición de tumores y con la resistencia a los agentes citostáticos. Específicamente, la expresión anormal de la clase π de GST se ha relacionado con la aparición de resistencia tumoral a los fármacos de quimioterapia (**Sánchez y Medina, 2021**) (**Figura 3.6 C**).



Figura 3.6 Predicción de dianas moleculares y actividad biológica de los isotiocyanatos analizado.

A) Dianas moleculares identificados en SwissTargetPrediction. P2RX3: purinoceptor 3 P2X; RAD1: proteína de punto de control del ciclo celular RAD1; TRPA1: miembro 1 de la subfamilia A de canales catiónicos de potencial receptor transitorio; MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos. B) Clasificación de proteínas dianas identificadas en ChEMBL versión 28. C) Predicción del espectro de actividad biológica en PASS Online.

3.2.9 Isotiocianatos prometedores resultado del análisis de actividad biológica

De acuerdo con el análisis de los resultados obtenidos de las bases de datos experimentales, así como de las predicciones, los isotiocianatos, bencil isotiocianato, alil isotiocianato, fenetil isotiocianato, fenil isotiocianato, 4-isotiocianatobut-1-eno, 5-isotiocianatopent-1-eno, 7-isotiocianatohept-1-eno, la iberina y el isotiocianato de etilo (Figura 3.7) son los compuestos que cuentan con la mayor diversidad de dianas moleculares y espectro de actividad biológica (alrededor de 6 o 5 predicciones).

Para estos nueve isotiocianatos, se reporta la actividad sobre el receptor de membrana EP4R y la enzima protooncogén ROS1; el bencil isotiocianato, fenetil isotiocianato, fenil isotiocianato, 4-isotiocianatobut-1-eno, 7-isotiocianatohept-1-eno, iberina así como etil isotiocianato, comparten la afinidad por el receptor muscarínico de acetilcolina CHRM1.

Además, seis de estos isotiocianatos tienen actividad sobre el canal catiónico del receptor potencial transitorio TRPA1. La Tabla 3.3 muestra el tipo de actividad y los objetivos moleculares identificados para los nueve Isotiocianatos cuyas estructuras químicas se encuentran en la Figura 3.7.

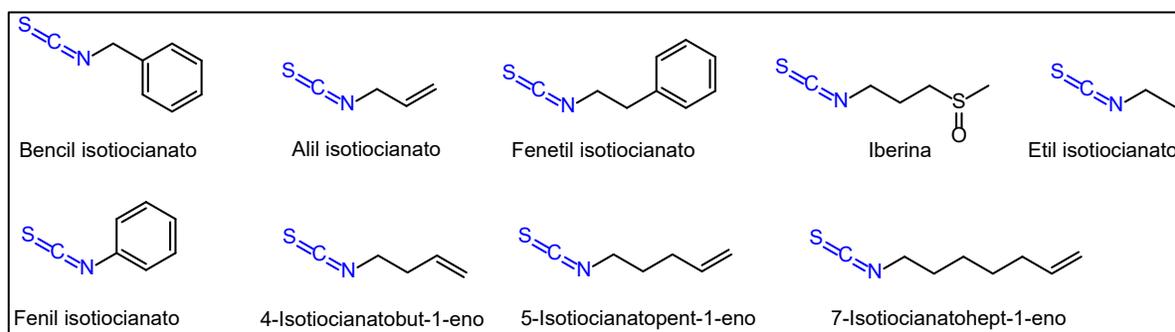


Figura 3.7 Isotiocianatos prometedores del análisis de actividad farmacológica.

Tabla 3.3 Isotiocianatos con el mayor número de dianas moleculares y potenciales bioactivos reportados.

Isotiocianato	MIF	DHODH	TRPA1	PDE5A	ROS1	CHRM1	EP4R	Agonista de la Apoptosis	Inhibidor de CYP2E1
Bencil isotiocianato	x		x	x	x	X	x		
Alil isotiocianato	x		x		x		x	x	
Fenetil isotiocianato	x		x	x	x	X	x		
Fenil isotiocianato		x		x	x	X	x		
4-Isotiocianatobut-1-eno			x		x	X	x		x
5-isotiocianatopent-1-eno			x		x		x	x	x
7-isotiocianatohept-1-eno			x		x	X	x		x
Iberina					x	X	x	x	x
Etil isotiocianato				x	x	X	x	x	

MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos; **DHODH:** Dihidroorotato deshidrogenasa; **TRPA1:** Miembro 1 de la subfamilia A de canales catiónicos de potencial receptor transitorio; **PDE5A:** Fosfodiesterasa 5A; **ROS1:** Protooncogén tirosina-proteína quinasa ROS; **CHRM1:** Receptor muscarínico de acetilcolina M1; **EP4R:** Receptor prostanoide EP4.

3.2.10 Análisis in silico de compuestos de tipo glucosinolato y fenólico

Se buscaron en las 4 bases de datos (COCONUT, FooDB, PDB, DB) 17 moléculas que de acuerdo con 22 referencias consultadas comparten los vegetales kale y brócoli; 11 son de tipo glucosinolato y 6 son compuestos fenólicos. El contenido de moléculas por cada base de datos se encuentra reportado en la [Tabla 3.4](#)

Tabla 3.4 Número de compuestos reportados en 4 bases de datos.

Base de datos	Población	Fuente
Collection of Open Natural Products (CNT)	17	https://coconut.naturalproducts.net
Food Database (FDB)	17	https://foodb.ca
Protein Data Bank (PDB)	7	https://www.rcsb.org
Drug Bank (DB)	5	https://go.drugbank.com

Los glucosinolatos fueron clasificados de acuerdo con el aminoácido precursor; el 63.63 % de los glucosinolatos son de tipo alifático, 18.18 % aromático y el 18.18 % son indólicos, en el caso de los compuestos fenólicos el 50% fue clasificado como ácido fenólico y el otro 50 % como flavonoides.

3.2.11. Vegetales de *Brassica oleracea* L. como fuente de glucosinolatos y compuestos fenólicos

Se encontraron reportados en la base de datos de alimentos, FooDB, 12 variedades de vegetales crucíferos además de la planta silvestre de *Brassica oleracea* L. con contenido de glucosinolatos y polifenoles ([Tabla 3.5](#)).

Los compuestos organosulfurados de tipo glucosinolatos se encontraron reportados en la planta silvestre y en 9 variedades, (var. *capitata*, var. *botritis*, var. *gemmifera*, var. *gongoylodes* var. *italica*, var. *capitata* L.f. alba DC., var. *sabellica*, var. *sabauda*, var. *alboglabra*) siendo la planta silvestre y los vegetales, kale, coliflor, coles de Bruselas y brócoli los que presentaron mayor incidencia en la presencia de compuestos de este tipo.

Por otro lado, los compuestos fenólicos se encontraron reportados en los 12 vegetales además del reporte en la planta silvestre. Los vegetales que presentaron mayor número de compuestos fenólicos fueron la col verde rizada, el brócoli, así como la planta silvestre. La proporción de compuestos de interés en cada uno de los vegetales los podemos observar en el **Gráfico 3.3**.

Tabla 3.5 Vegetales cruciferos reportados en FooDB como fuente de glucosinolatos y polifenoles.

Familia	Género	Especie	Nombre
Brassicaceae	Brassica	<i>Brassica oleracea</i> L.	Col silvestre
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. capitata	Col
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. botrytis	Coliflor
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. gemnifera	Coles de Bruselas
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. gongylodes	Colirábano
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. italica	Brócoli
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. capitata L. f. alba DC.	Col blanca
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. sabellica	Kale
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. sabauda	Col verde rizada
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. alboglabra	Col verde china
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. costata	Col tronchuda
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. conica	Col cónica oxheart
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. viridis	Col negra

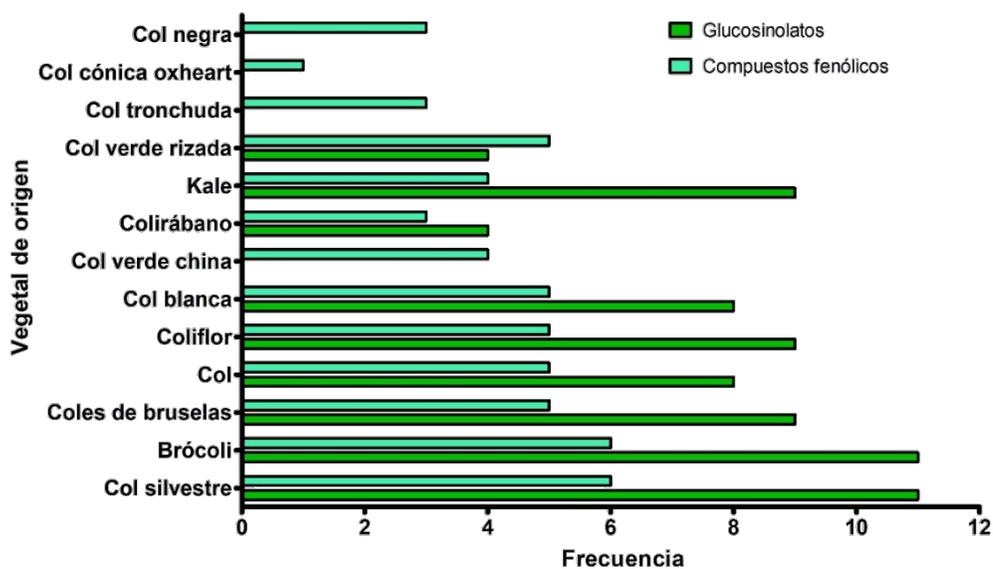


Gráfico 3.3 Vegetales cruciferos con mayor cantidad de glucosinolatos y polifenoles.

3.2.12 Propiedades fisicoquímicas

Al igual que en el caso de los isotiocianatos el perfil de propiedades fisicoquímicas de los glucosinolatos y polifenoles se realizó con: Molinspiration, SwissADME y DataWarrior calculandose las ocho propiedades moleculares: #A, PM, DPH, APH, clogP, ER, ASP y RM.

A continuación, se discuten los resultados calculados con DataWarrior para los glucosinolatos y compuestos fenólicos.

Los resultados de los descriptores químicos de los glucosinolatos y los compuestos fenólicos se representaron como histogramas de proporción que revelaron un desplazamiento a la izquierda con respecto a todos los descriptores químicos de los conjuntos de datos analizados.

En el caso de los glucosinolatos el perfil fisicoquímico calculado indica que el 54.5 % de los glucosinolatos se encuentran en un rango de 420 a 440 Da de PM, 81.8 % con clogP entre -3.5 y -1.5; el 54.5 % de los Glucosinolatos poseen alrededor de 25 a 27 átomos pesados, el 63,7 % tienen alrededor de 7 a 8 ER, 90.9 % tienen 10-11 APH. 72.7 % no tienen 4 DPH y 28.3 % tiene 5 DPH, estos compuestos organosulfurados tienen un ASP de 205 a 250 Å. Finalmente, el 63.3 % de los glucosinolatos tienen un valor de refractividad molar de 80 a 95 (Figura 3.8).

Para los compuestos fenólicos el perfil fisicoquímico indica que si rango de peso molecular se encuentra de 180 a 300 Da, su clogP es de entre 0.7 a 1.9, Este grupo de compuestos posee entre 13 a 22 átomos pesados, de 1 a 4 enlaces rotables, de 4 a 7 aceptores de enlace de hidrógeno y de 2 a 5 donadores de enlace de hidrógeno. El ASP para los compuestos fenólicos está en un rango de 70 a 130 Å y su refractividad molar es de 50 a 80 (Figura 3.9).

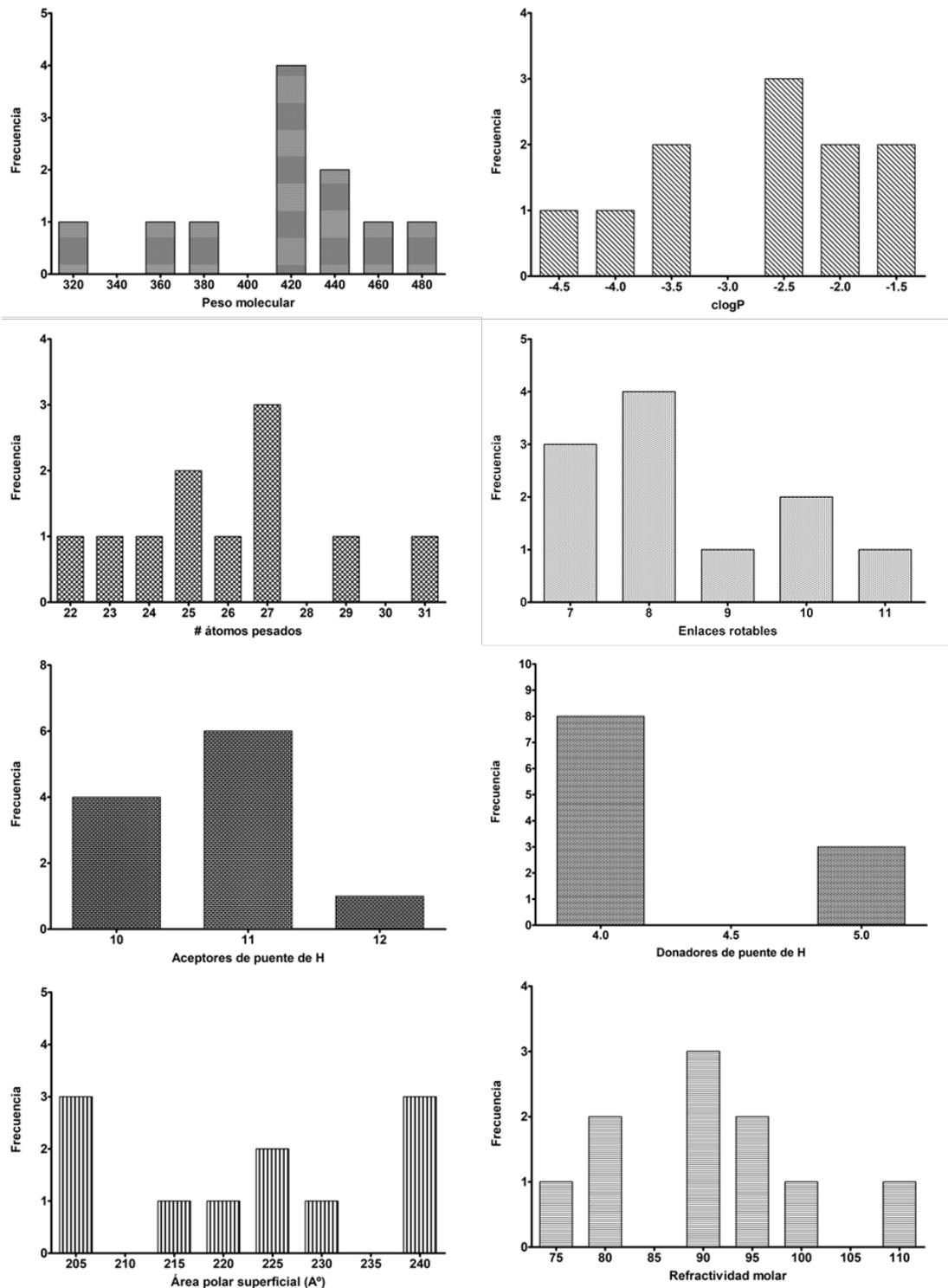


Figura 3.8 Distribución de los ocho descriptores químicos de relevancia farmacéutica calculados de los glucosinolatos.

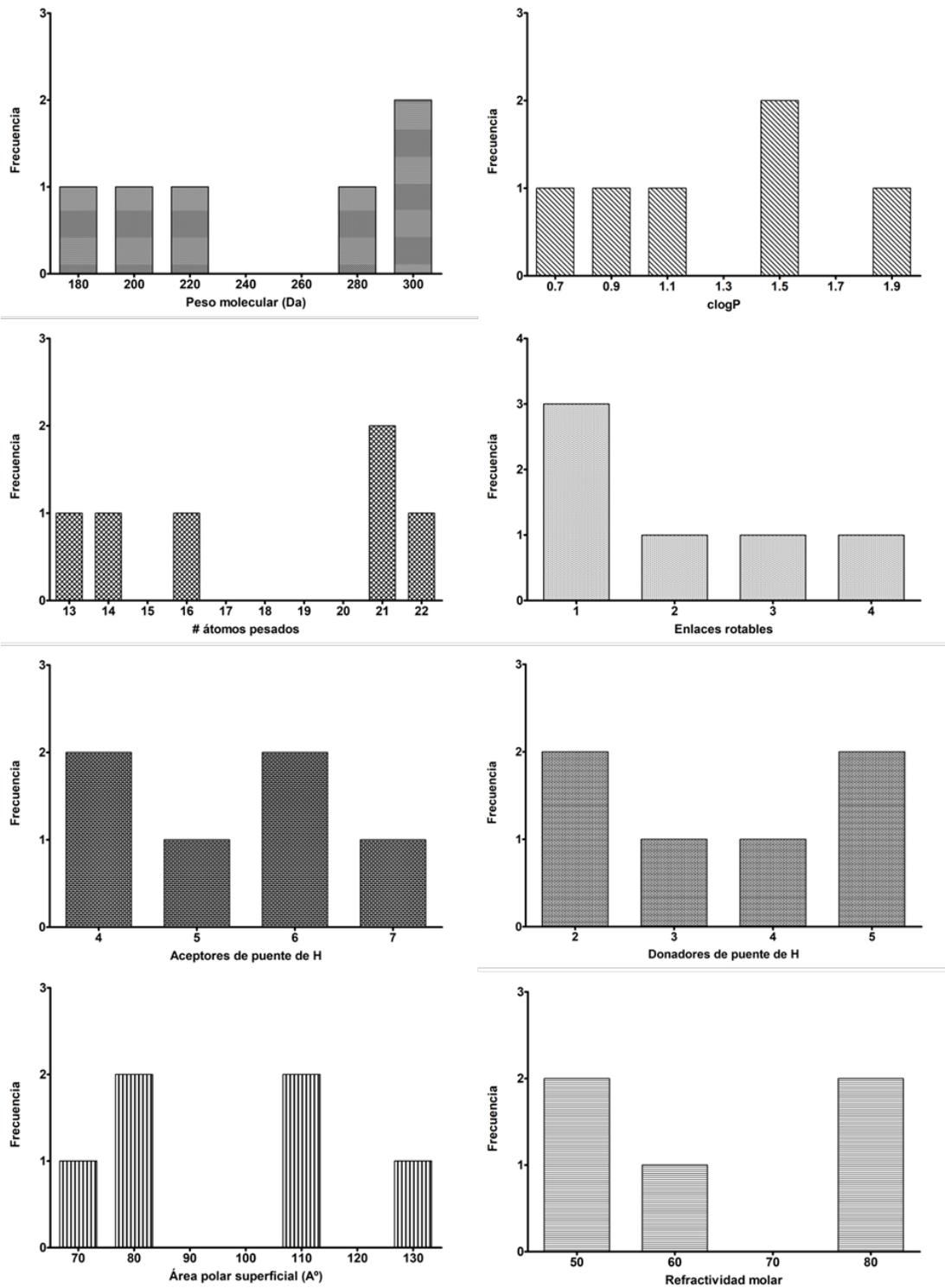


Figura 3.9 Distribución de los ocho descriptores químicos de relevancia farmacéutica calculados de los compuestos fenólicos.

Se llevó a cabo la evaluación preliminar del potencial de los glucosinolatos y polifenoles como fármacos por absorción oral y difusión pasiva mediante la comparación de la Regla de 5 de Lipinsky, además de considerarse también los criterios promedio de Ghose y Oprea esto sin olvidar que cumplir o no estos criterios no es una garantía de que un compuesto sea o no candidato a fármaco.

Podemos observar que el 100 % de los glucosinolatos analizados cumplen con los valores establecidos por Lipinski para PM, clog P y donantes de enlace de hidrógeno, mientras que solo el 36.4% de estos, cumplen con el número de aceptores de enlace de hidrógeno. Teniendo en cuenta los criterios complementarios de Ghose y Oprea, encontramos que el 100 % de los glucosinolatos se encuentran en los rangos de PM, número de átomos y refractividad molar, y el 63.6% cumple con el criterio de enlaces rotables, sin embargo, no cumplen con los valores de clogP y ni de área de superficie polar, en esta última los valores son muy altos lo que nos indica que de acuerdo a este parámetro los glucosinolatos no son candidatos a fármacos por vía oral y tampoco tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica ([Gráfico 3.4](#) y [Gráfico 3.5](#)).

En el caso de los compuestos fenólicos, el análisis drug-like nos indica que el 100% cumple con los valores establecidos por Lipinsky para el peso molecular, el clogP y el número de donadores de enlaces de hidrógeno, pero solo el 50 % cumple con los valores de aceptores de enlaces de hidrógeno. Por otro lado, en los criterios de Ghose y Oprea, se encontró que el 100% cumple con lo establecido para peso molecular, clogP y refractividad molar, el 50 % cumple con los valores de número de átomos y de enlaces rotables. Finalmente, se encontró que el 50% que corresponde a los ácidos fenólicos, tienen potencial como candidatos a fármacos por vía oral, mientras que el otro 50 % que corresponde a los flavonoides tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, esto debido a sus valores de ASP ([Gráfico 3.4](#) y [Gráfico 3.5](#)).

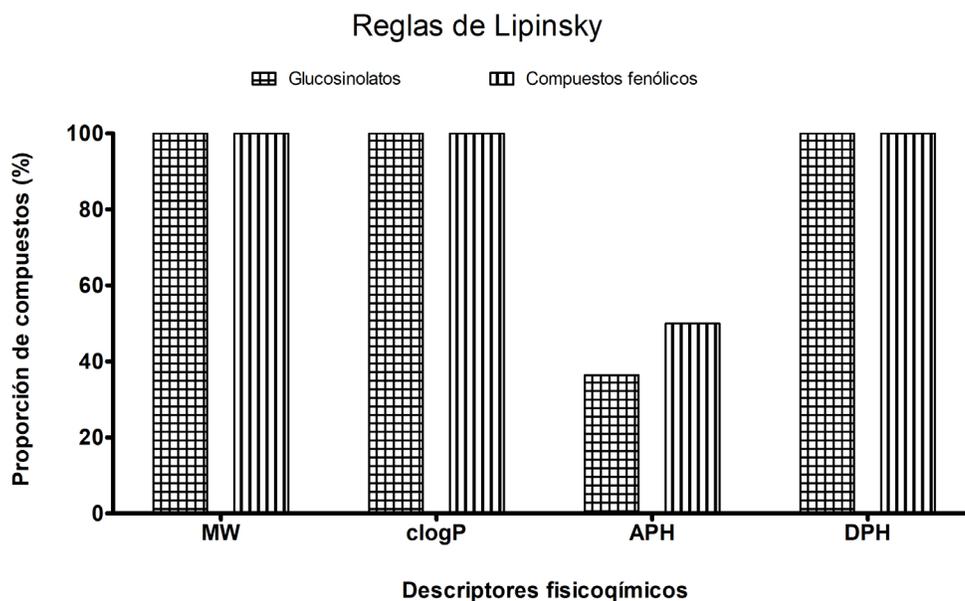


Gráfico 3.4 Análisis drug-like de acuerdo con los criterios de Lipinsky.

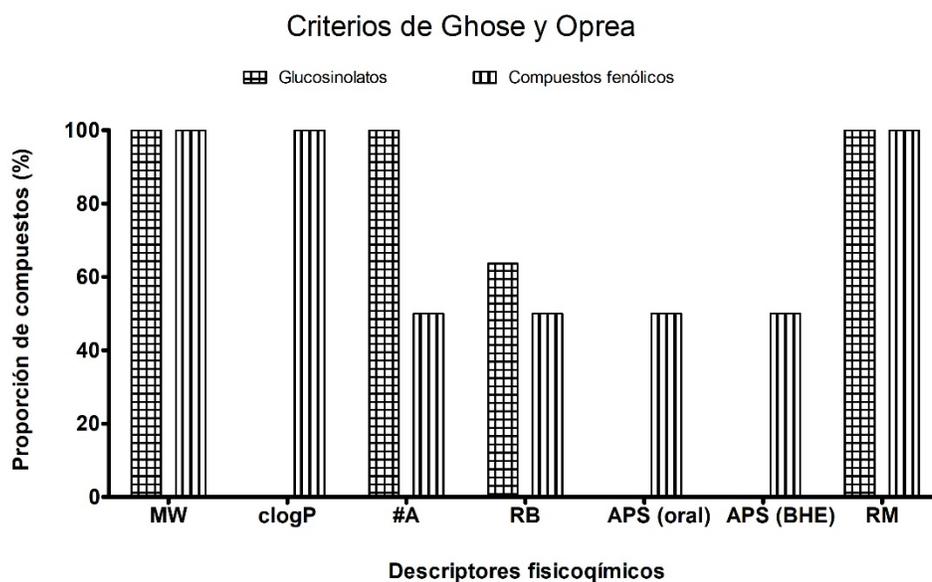


Gráfico 3.5 Análisis drug-like de acuerdo con los criterios de Ghose y Oprea.

3.2.13 Potencial mutagénico y Tumorigénico

El potencial mutagénico y tumorigénico fue determinado utilizando el software DataWarrior, el 90.9 % de los glucosinolatos no tienen potencial mutagénico y tumorigénico, en cuanto a los compuestos fenólicos, el 66.6 % tiene alto potencial mutagénico y el 33.3% restante no tienen potencial mutagénico. Por otro lado, el potencial tumorigénico para el 50 % de los compuestos es nulo y para el otro 50 % alto (Gráfico 3.6)

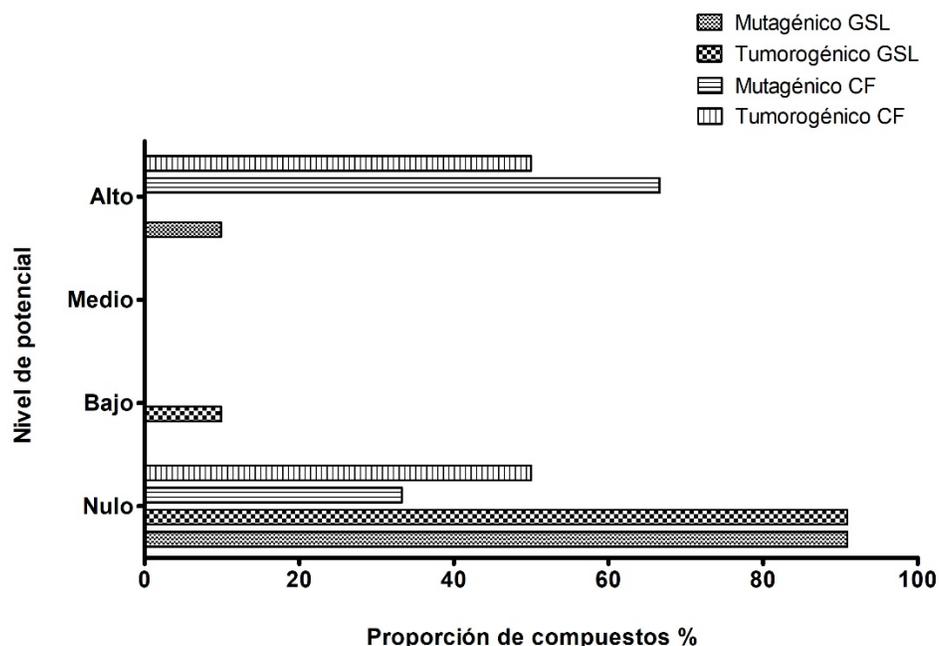


Gráfico 3.6 Potencial mutagénico y tumorigénico de glucosinolatos y compuestos fenólicos.

3.2.14 Objetivos biomoleculares de los glucosinolatos y compuestos fenólicos

Se realizaron las predicciones en los softwares libres Passonline, SwiisTargetPrediction, ChEMBL, y Epigenetic target profiler. En SwiisTargetPrediction no se obtuvo predicción de actividad para los glucosinolatos, sin embargo, para los compuestos fenólicos se encontraron 71 dianas moleculares las cuales fueron clasificadas en 4 categorías, genes (2), receptores (2) y

transportadores (4) y enzimas siendo esta última la de mayor población, con 50 diferentes enzimas. En este screening se encontró que el 50 % de estos tienen actividad sobre diversas enzimas involucradas en procesos inflamatorios, tumorales y del desarrollo del sistema nervioso central, como las anhidrasas carbónicas las cuales son blancos de los fármacos diuréticos (**Floréz et al., 2014**) y se ha demostrado de manera in vitro que su inhibición es un prospecto a tratamiento de cánceres como leucemia, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de colon, cáncer de los sistemas nervioso central, renal; así como cáncer de próstata y cáncer de mama (**Supuran et al., 2001; Supuran, 2007; Korhonen et al., 2009**) y el Citocromo P4501B1. Además se identificó que el 33% de los compuestos fenólicos pueden actuar sobre receptores como el receptor de tirosina-proteína quinasa UFO que suele sobre expresarse en diversas neoplasias hematológicas y epiteliales, su inducción en las células tumorales promueve predominantemente la supervivencia, la quimiorresistencia, por lo que inhibirlo podría estimular la inmunidad antitumoral, reducir la supervivencia de las células tumorales, mejorar la quimiosensibilidad y disminuir el potencial metastásico (**Graham et al., 2014**); y el receptor de dopamina D4 por parte del ácido ferúlico, kaempferol y quercetina este receptor se considera de interés ya que media una amplia gama de cascadas de transducción de señales neuronales y el mal funcionamiento de estos mecanismos puede contribuir a la fisiopatología de los trastornos neuropsiquiátricos como el trastorno por déficit de atención con hiperactividad y su modificación es la base de las acciones de muchos fármacos psicotrópicos por lo que se considera en el tratamiento de daños causados por adicciones a cocaína y alcohol (**Tazari et al., 2004, Ptáček et al., 2011**). Por otro lado, los resultados muestran que el 16 % de los compuestos fenólicos tienen actividad sobre los genes CaMKII β el cual se considera un gen de interés, ya que estudios han revelado que la perturbación de la expresión de CaMKII β se ha asociado con múltiples enfermedades neuropsiquiátricas y del neurodesarrollo, esto debido a que se encuentra involucrado en el desarrollo y la plasticidad neuronal (**Nicole & Pacary, 2020**); Así como el gen PIK3R1 el cual juega un papel importante

en las acciones metabólicas de la insulina y una mutación en este gen se ha asociado con la resistencia a la insulina (**Thauvin-Robinet et al., 2013**), además de que también se han relacionado sus mutaciones somáticas con malformaciones vasculares y linfáticas, además de macromictilia y crecimiento excesivo del tejido blando o hueso (**Cottrell et al., 2021**). (Figura 3.10 A). De acuerdo con PassOnline los compuestos de tipo glucosinolato no podrían poseer actividad biológica, pero los compuestos fenólicos podrían actuar como agonistas de la integridad de la membrana, inhibidores de feruloil esterasa, inhibidores de peroxidasa, inhibidores de la expresión de HIF1A, inhibidores de la clordecona reductasa, inhibidores de 2-deshidropantoato 2-reductasa, inhibidores de aril alcohol deshidrogenasa (NADP +), inhibidores de quinasa, inhibidores de la P-benzoquinona reductasa (NADPH), inhibidores de la permeabilidad de la membrana, inhibidores de la quercetina 2,3-dioxigenasa, potenciadores de la expresión HMOX1, inductores CYP1A, protectores mucomembranosos y potenciadores de expresión TP53 (Figura 3.10 B).

La búsqueda en ChEMBL mostró que los compuestos fenólicos poseen el 90% de posibilidad de tener actividad sobre enzimas, receptores nucleares y de membrana, con un umbral de actividad de 6.5 a 7. Al igual que en el caso de los glucosinolatos, se encontró que los compuestos fenólicos poseen actividad sobre dianas moleculares involucradas en procesos inflamatorios, y tumorigenicos, además de enfermedades cardiovasculares y la diabetes. El 100% de los compuestos fenólicos tienen actividad sobre el receptor colinérgico muscarínico 1 (CHRM1) el cual ya se ha mencionado influye en muchos de los efectos de la acetilcolina en el sistema nervioso central, por lo que suele estar relacionado con trastornos del sistema nervioso como la discinesia tardía (**Boiko et al., 2019**), y además se ha demostrado que la señalización colinérgica por receptores muscarínicos suprime la tumorigénesis y la derivación al cáncer (**Renz et al., 2018**), por otro lado el 100% también tuvo actividad sobre el protooncogén ROS1, un importante regulador del crecimiento celular. Aunado a estos, los compuestos fenólicos también mostraron actividad sobre la Integrina alfa-4, la cual está involucrada en una vía de señalización proliferación e inflamación celular (**Fujita et al., 2014**) y el receptor de

adenosina A2b que se sabe se sobre expresa en condiciones de inflamación o hipoxia relacionadas a tumoración, participando en diferentes eventos, como la angiogénesis y la metástasis, además de ejercer efectos inmunomoduladores que protegen las células tumorales (**Sepulveda et al., 2016**) por lo tanto, el receptor de adenosina A2b podría una diana terapéutica interesante para el tratamiento del cáncer. (**Figura 3.10 C**). Adicionalmente, se realizó un análisis para identificar dianas epigenéticas en Epigenetc target profiler, la mayoría de los compuestos se encuentran en el criterio Q4 el cual es el más bajo de la escala de confiabilidad o fuera de esta.



Figura 3.10 Predicción de dianas moleculares y actividades biológicas.

Por otro lado se utilizó la base de datos PDB para identificar a los blancos moleculares que han sido reportados en la literatura, en esta base de datos se encontró un reporte del glucosinolato sinigrina co-cristalizado con Sulfotransferasa-18 la cual forma parte de un gran grupo de enzimas que catalizan la transferencia

de un grupo sulfurilo de 3'-fosfoadenosina 5'- fosfosulfato (PAPS) a una amplia gama de metabolitos secundarios, y que en plantas suelen estar muy relacionadas con la biosíntesis de los glucosinolatos (**Negishi et al., 2001**). Para los compuestos fenólicos se encontraron 61 resultados de proteínas co-cristalizadas con estos, destacando, la interacción entre el ácido cafeico (con el Factor de inhibición de macrófagos MIF el cual ya se ha mencionado que tiene gran relevancia en enfermedades de interés, así como la unión inhibitoria de quercetina con el Protooncogén serina/treonina-proteína quinasa PIM-1 la cual es es una quinasa oncogénica sobreexpresada en una serie de cánceres como el de póstata, además de estar implicada en el desarrollo de leucemias y linfomas (**Holder et al., 2007**). Varios estudios demostraron que la inhibición de la actividad de PIM1 es una estrategia atractiva para combatir los cánceres de sobreexpresión, ya que las distintas características estructurales del bolsillo de unión de ATP hacen de PIM-1 un objetivo atractivo para el diseño de inhibidores selectivos (**Bogusz 2017**). Actualmente se sabe que los flavonoides como quercetina son ligandos ATP competitivos tanto para la tirosina como para la serina-treonina quinasa, así como para otras enzimas de unión a ATP, por lo que son un recurso de oportunidad inhibitoria (**Mayr et al., 2005; Lee et al., 2002**).

3.3 Conclusión

Se realizó un análisis quimioinformático de compuestos de interés farmacológico de *Brassica oleracea* L., utilizando softwares libres y de código abierto. Se recopilaron 154 isotiocianatos (ITCs) de cuatro grandes bases de datos públicas los cuales se clasificaron según su estructura química: en acíclicas 44.8%, policíclicas 26.6%, 11.7% tipo indólico, 9.1% poliaromáticos, 3.9% glicosilados y 1.9% cíclicos. Así como el análisis de 11 glucosinolatos, clasificados como, alifáticos (63.6 %), indólicos (18.2 %) y aromáticos (18.2 %) y 6 compuestos fenólicos (CF), clasificados como ac. fenólicos (50 %) y flavonoides (50 %), todos ellos reportados en la literatura para ambos vegetales.

Por otro lado, en este estudio se observó que las principales fuentes de ITCs y glucosinolatos reportados en la base de datos FooDB son las verduras crucíferas de *Brassica oleracea* L.

El estudio del potencial mutagénico y tumorigénico mostró que alrededor del 80 % de los ITCs tienen baja mutagenicidad y tumorigenicidad. Por otro lado, el 33.3% y el 50% de los compuestos fenólicos no son mutagénicos ni tumorigénicos, respectivamente, y el 90.9 % de los glucosinolatos no presentan ninguno de los dos efectos.

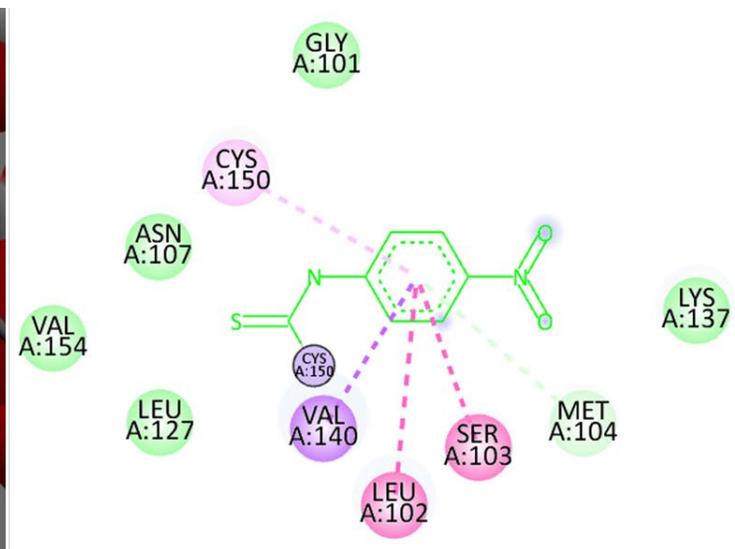
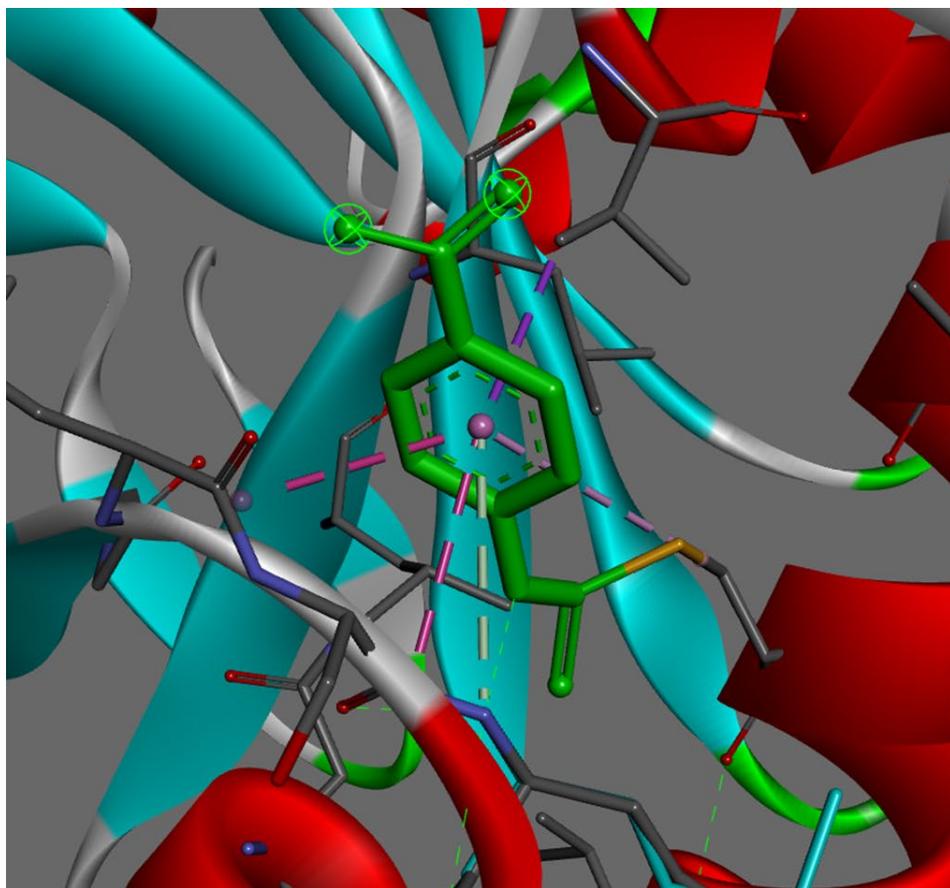
También se identificaron nueve ITCs (bencil isotiocianato, AITC, PEITC, PITC, iberina, etil isotiocianato, entre otros) como los principales candidatos a poseer actividades farmacológicas prometedoras en nueve objetivos moleculares, incluidos ROS1, CHRM1, EP4R y MIF, siendo esta último una citocina pleiotrópica proinflamatoria de importancia por la unión covalente que se puede establecer con los ITCs.

Por otro lado, el análisis *drug-like*, a través de los valores de clogP y APS muestra a los CF como candidatos a fármacos por absorción por vía oral (ác. fenólicos) y para atravesar la BHE (flavonoides). En cuanto a los ITCs, el 11 % serían adecuados para absorción por vía oral y el 48 % podrían permear la BHE. Tanto los

CF como los ITCs, pueden actuar como agonistas de la apoptosis y quimioprotectores, además de presentar actividad sobre dianas involucradas en patologías inflamatorias, sensoriales, cardiovasculares, diabetes y cáncer.

Este trabajo ejemplificó la importancia de la quimioinformática en la química de los alimentos y productos naturales, contribuyendo así al desarrollo de estrategias informáticas aplicadas a de vegetales crucíferos y su posible aplicación farmacológica (antioxidante, anticancerígena y antiinflamatoria) de compuestos presentes en *Brassica oleracea* L.

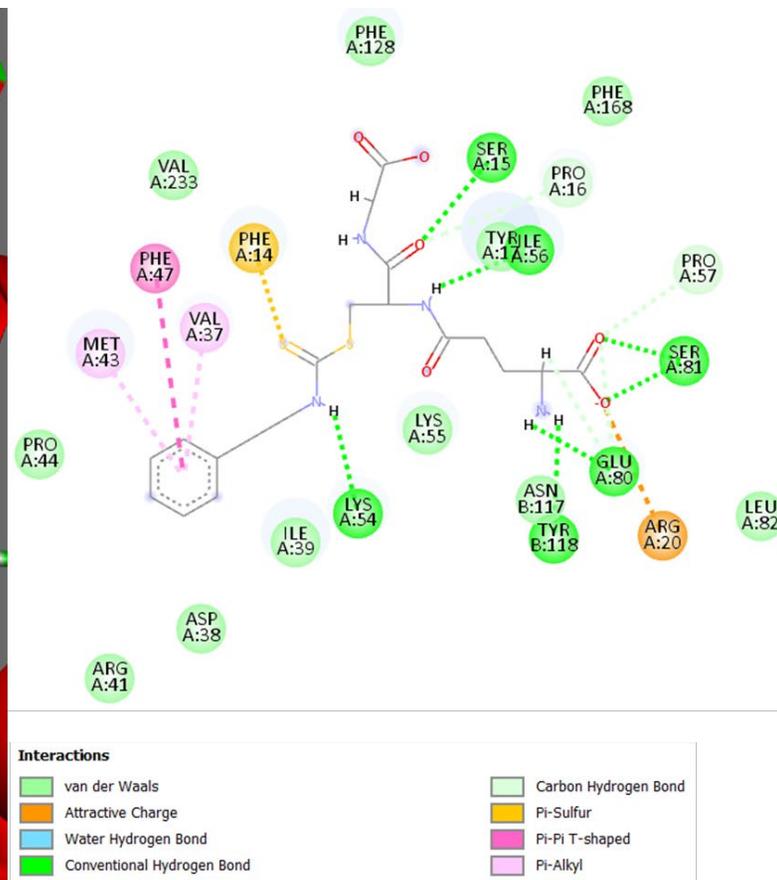
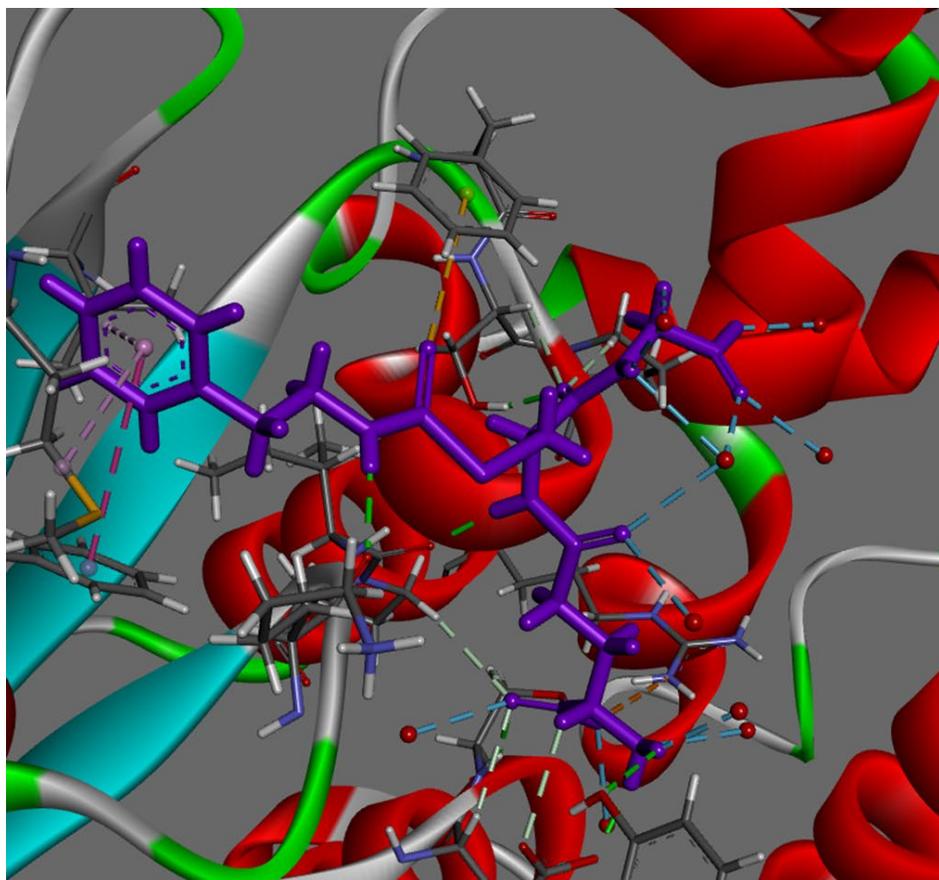
3.4 Anexos capítulo III



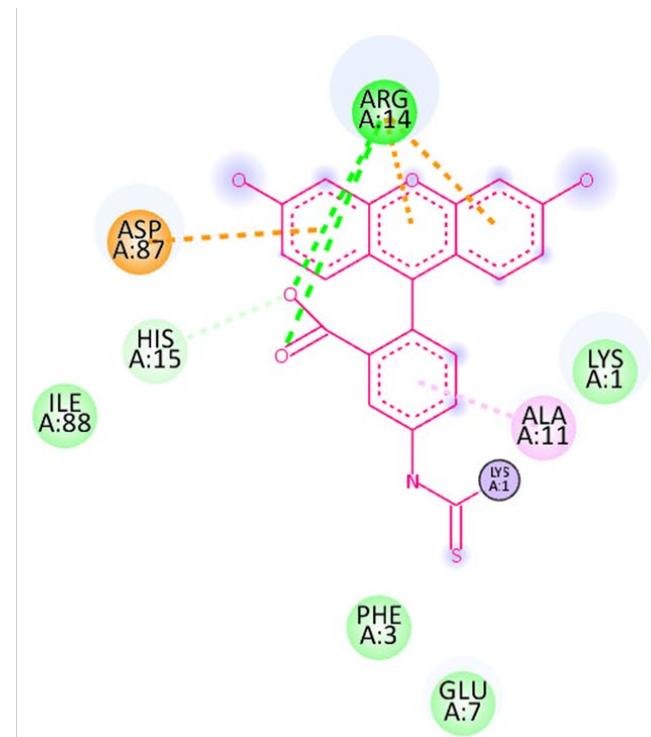
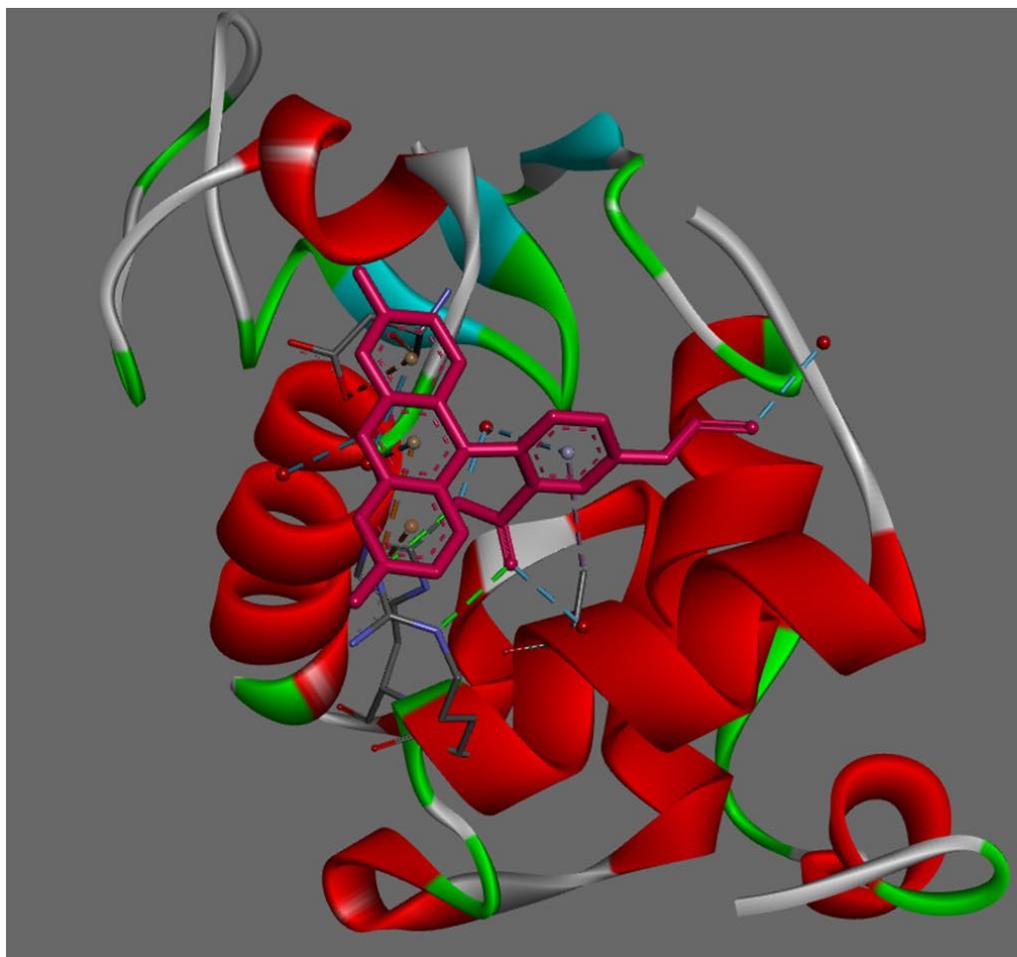
Interactions

- van der Waals
- Pi-Donor Hydrogen Bond
- Pi-Sigma
- Amide-Pi Stacked
- Pi-Alkyl
- Covalent bond

Anexo 1: Interacciones moleculares entre dihidroorotato deshidrogenasa e isotiocianato de 4-nitrofenilo. Estructura co-cristalizada 4EF9 base de datos PDB.



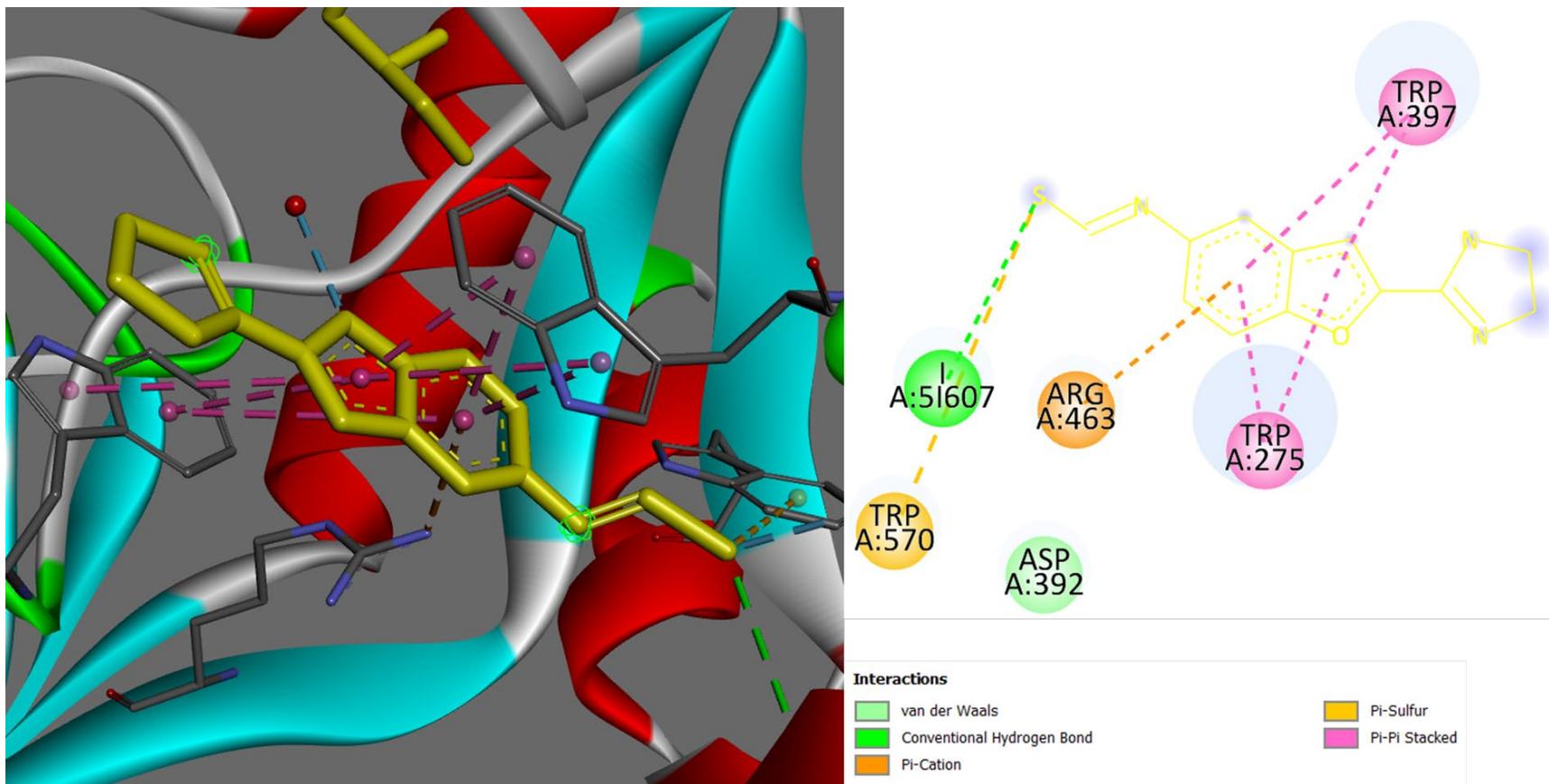
Anexo 2: Interacciones moleculares entre glutatión transferasa Omega 3S e isotiocianato de fenitilo. Estructura co-cristalizada 6HPE base de datos PDB.



Interactions

 van der Waals	 Pi-Anion
 Conventional Hydrogen Bond	 Pi-Alkyl
 Carbon Hydrogen Bond	 Covalent bond
 Pi-Cation	

Anexo 3: Interacciones moleculares entre lisozima C e isotiocianato de fluoresceína. Estructura co-cristalizada 6FVE base de datos PDB.



Anexo 4: Interacciones moleculares entre quitinasa A y 2-(imidazolin-2-il)-5-isotiocianatobenzofurano. Estructura co-cristalizada 3ARZ base de datos PDB.

3.5 Referencias

- Ahmed, W. S., Geethakumari, A. M. y Biswas, K. H. 2021. Fosfodiesterasa 5 (PDE5): Regulación de la función estructural y aplicaciones terapéuticas de los inhibidores. *Biomed. Pharmacother*; 134, 1-8.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. y Bourne, P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*; 28, 235-242.
- Bianchini, F. y Vainio, H. 2004. Isothiocyanates in cancer prevention. *Drug Metab Rev.*; 36, 655-667.
- Bilsborrow, J. B., Doherty, E., Tilstam, P. V. y Bucala, R. 2019. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Expert Opin. Ther. Targets*; 23, 733-744.
- Bogusz, J., Zrubek, K., Rembacz, K. P. 2017. Structural analysis of PIM1 kinase complexes with ATP-competitive inhibitors. *Sci Rep.*; 7, 13399
- Boiko, A. S., Ivanova SA, Pozhidaev IV, Freidin MB, Osmanova DZ, Fedorenko OY, Semke AV, Bokhan NA, Wilffert B, Loonen AJM. 2020. Pharmacogenetics of tardive dyskinesia in schizophrenia: The role of CHRM1 and CHRM2 muscarinic receptors. *World J Biol Psychiatry.*; 21, 72-77.
- Brown, K. K., Blaikie, F. H., Smith, R. A. J., Tyndall, J. D. A., Lue, H. Bernhagen, J., Winterbourn, C. C. y Hampton, M. B. 2009. Direct Modification of the Proinflammatory Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor by Dietary Isothiocyanates. *J. Biol. Chem.*; 284, 32425–32433.
- Burger-Kentischer, A., Goebel, H., Seiler, R., Fraedrich, G., Schaefer, H. E., Dimmeler, S., Kleemann, R., Bernhagen, J. y Ihling, C. 2002. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis. *Circulation*; 105, 1561-1566.
- Cabrera, G., Rodríguez, M. y Tesorero, Z. 2016. Correlación estructura-LD50 de quinolinas sustituidas utilizando teoría del funcional de la densidad (DFT). Universidad de los Andes; *Avances en Química*; 11, 25-33.
- Calandra, T. y Roger, T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*; 3, 791-800.
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P. y Velasco, P. 2010. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*; 16, 251-280.
- Cheung, K. L., y Kong, A. N. 2010. Molecular Targets of Dietary Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane for Cancer Chemoprevention. *The AAPS Journal*; 12, 87-97
- Clarke, J. D., Dashwood, R. H. y Ho, E. 2008. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett*; 8, 291-304.
- Coelho, A. R. y Oliveira, P. J. 2020. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitors in SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Clin. Invest*; 50, 1-5.

-
- Cottrell, C. E, Bender, N. R., Zimmermann, M. T., Heusel, J. W., Corliss, M., Evenson, M.J, Magrini, V., Corsmeier, D. J., Avenarius, M., Dudley, J. N., Johnston, J. J., Lindhurst, M. J., Vigh-Conrad, K., Davies, O. M. T., Coughlin, C. C., Frieden, I. J., Tollefson, M., Zaenglein, A. L., Ciliberto, H., Tosi, L. L., Semple, R. K., Biesecker, L. G. y Drolet, B. A. 2021. Somatic PIK3R1 variation as a cause of vascular malformations and overgrowth. *Genet Med.*; 23, 1882-1888.
- Crichlow, G. V., Fan, C., Keeler, C., Hodsdon, M. y Lolis, E. J. 2012. Structural Interactions Dictate the Kinetics of Macrophage Migration Inhibitory Factor Inhibition by Different Cancer-Preventive Isothiocyanates. *Biochemistry*; 51, 7506-7514.
- Davies, M., Nowotka, M., Papadatos, G., Dedman, N., Gaulton, A., Atkinson, F., Bellis, L. y Overington, J. P. 2015. ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic Acids Res.*; 43, 612-620.
- Dayalan, S. N., Suzuki, T., Yamamoto, M., Fahey, J. W. y Dinkova-Kostova, A. T. 2018. Phenethyl Isothiocyanate, a Dual Activator of Transcription Factors NRF2 and HSF1. *Mol. Nutr. Food Res.*; 62, 1-28.
- Dayalan, S.N., Brodziak-Jarosz, L., Gerhäuser, C. y Dinkova-Kostova, A. T. 2020. The Chemopreventive Power of Isothiocyanates. *Natural Products for Cancer Chemoprevention*; Vol. 1 (Eds: Pezzuto, J. M., & Vang, O.) Springer, Switzerland; 271-310.
- Dong, S. C., Sha, H. H., Xu, X. Y., Hu, T. M., Lou, R., Li, H., Wu, J. Z., Dan, C. y Feng, J. 2018. Glutathione S-transferase π : a potential role in antitumor therapy. *Drug Des. Devel. Ther.*; 23, 3535-3547.
- Feng, R. M. 2002. Assessment of blood-brain barrier penetration: in silico, in vitro and in vivo. *Curr Drug Metab* 3, 647–657.
- Figueiredo, S. M., Filho, S. A.V., Nogueira-Machado, J. A. y Caligorne, R. B. 2013. The anti-oxidant properties of isothiocyanates: a review. *Recent Pat. Endocr., Metab. Immune Drug Discovery*; 7, 213-225.
- Filimonov, D. A., Lagunin, A. A., Glorizova, T. A., Rudik, A. V., Druzhilovskii, D.S., Pogodin, P. V. y Poroikov, V.V. 2014. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*; 50, 444-457.
- Fimognari, C., Turrini, E., Ferruzzi, L., Lenzi, M. y Hrelia, P. 2012. Natural isothiocyanates: genotoxic potential versus chemoprevention. *Mutat. Res.*; 750, 107-131.
- Flórez, J., Armijo, J. A. y Mediavilla, A. 2008. Farmacología humana. *Ed. Elsevier*; 6ª Edición. Barcelona. 1481.
- FoodB. Web site <http://www.foodb.ca>. (15 de marzo 2021).
- Fujita, M., Takada, Y. K., Izumiya, Y. y Takada, Y. 2014. The Binding of Monomeric C-Reactive Protein (mCRP) to Integrins $\alpha\beta3$ and $\alpha4\beta1$ Is Related to Its Pro-Inflammatory Action. *PLoS ONE*; 9, 93738.
- Graham, D. K., DeRyckere, D., Davies, K. D., Earp, H. S. 2014. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat Rev Cancer*; 14, 769–785.
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N. y Wendoloski, J. J. 1999. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J. Comb. Chem.*; 1, 55-68.

-
- Gupta, P., Kim, B., Kim, S. H. y Srivastava, S. K. 2014. Molecular targets of isothiocyanates in cancer: recent advances. *Mol. Nutr. Food Res.*; 58, 1685-1707.
- Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H. y Gerhäuser, C. 2001. Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J Biol Chem.*; 24, 32008-32015.
- Herder, C., Kolb, H., Koenig, W., Haastert, B., Müller-Scholze, S., Rathmann, W., Holle, R., Thorand, B. y Wichmann, H. E. 2006. Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg, Survey 4 (KORA S4). *Diabetes Care*; 29, 368-371.
- Holder, S., Zemskova, M., Zhang, C., Tabrizizad, M., Bremer, R., Neidigh, J. W. y Lilly, M. B. 2007. Characterization of a potent and selective small-molecule inhibitor of the PIM1 kinase. *Mol Cancer Ther.*; 6,163-72.
- Ishii, M. y Kurachi, Y. 2006. Receptores muscarínicos de acetilcolina. *Curr. Pharm. Des.*; 12, 3573-3581.
- Jovani, M. y Chan, A. T. 2019. Are Phosphodiesterase-5 Inhibitors a New Frontier for Prevention of Colorectal Cancer? *Gastroenterology*; 157, 602-604.
- Kaboli, P., Khoshkbejari, M., Mohammadi, M., Abiri, A., Mokhtarian, R., Vazifemand, R., Amanollahi, S., Sani, S., Li, M., Zhao, Y., Wu, X., Shen, J., Cho, C. y Xiao, Z. 2019. *Biomed. Pharmacother.*; 121, 1-17.
- Kntayya, S. B., Ibrahim, M. D., Mohd Ain, N. Iori, R., Ioannides, C., Razis, A. y Faizal, A. 2018. Induction of Apoptosis and Cytotoxicity by Isothiocyanate Sulforaphene in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Nutrients*; 10, 1-15.
- Konya, V., Marsche, G., Schuligoi, R. y Heinemann, A. 2013. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy. *Pharmacol Ther.*; 138, 485-502.
- Korhonen, K., Parkkila, A. K. y Helen, P. 2009. Carbonic anhydrases in meningiomas: association of endothelial carbonic anhydrase II with aggressive tumor features. *J Neurosurg.*; 111, 472-477.
- Lee, L. T., Huang, Y. T., Hwang, J. J. 2002. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res.*; 22, 1615-27.
- Lee, H., Rhee, H., Kang, H. J., Kim, H. S., Min, B. S., Kim, N. K. y Kim, H. 2008. Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am. J. Clin. Pathol.*; 129, 772-779.
- Li, S.H., Fu, J., Watkins, D. N., Srivastava, R. K. y Shankar, S. 2013. Sulforaphane regulates self-renewal of pancreatic cancer stem cells through the modulation of Sonic hedgehog-GLI pathway. *Mol Cell Biochem.*; 373, 217-227.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. y Feeney, P. J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv. Rev.*; 46, 3-26.

-
- Lipinski, C. A. 2003. Chris Lipinski discusses life and chemistry after the Rule of Five. *Drug Discov Today*; 1, 12-16.
- Liu, B. N., Yan, H. Q., Wu, X., Pan, Z. H., Zhu, Y., Meng, Z. W., Zhou, Q. H. y Xu, K. 2013. Dietary agents for prevention and treatment of lung cancer. *Cell Biochem.*; 66, 81-92.
- Lozano, M., Ayuso, M. C., Bernalte, M. J., García, M. I., Hernández, M. T., Vidal, M. C., González, J. A., García, J. y García, R. M. 2007. Las brassicas, del cultivo tradicional hacia los nuevos retos. *Vida Rural*; 242, 44-47.
- Madak, J. T., Bankhead, A., Cuthbertson, C. R., Showalter, H. D. y Neamati, N. 2019. Revisiting the role of dihydroorotate dehydrogenase as a therapeutic target for cancer. *Pharmacol. Ther.*; 195, 111-131.
- Martinez-Mayorga, K. y Medina-Franco, J.L. (eds.). 2014. FoodInformatics: Applications of Chemical Information to Food Chemistry, *Springer*, New York.
- Mas, S., Crescenti, A., Gassó, P., Deulofeu, R., Molina, R., Ballesta, A., Kensler, T. W. y Lafuente, A. 2007. Induction of Apoptosis in HT-29 Cells by Extracts from Isothiocyanates-rich Varieties of Brassica Oleracea. *Nutr Cancer*; 58, 107-114.
- Mayr, G. W., Windhorst, S. y Hillemeier, K.. 2005. Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *J Biol Chem.*; 280, 13229–40.
- Meents, E. J., Ciotu, C. I. y Fischer, M. J. M .2019. TRPA1: a molecular view. *J Neurophysiol*; 1, 427-443.
- Miao, Z., Yu, F., Ren, Y. y Yang, J. 2017. d,l-Sulforaphane Induces ROS-Dependent Apoptosis in Human Gliomablastoma Cells by Inactivating STAT3 Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.*; 18, 1-14.
- Molinspiration Cheminformatics free web services. Web site <http://www.molinspiration.com>. (21 de marzo de 2021).
- Munday, R. y Munday, C. M. 2004. Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J. Agric. Food Chem.*; 52, 1867-1871.
- Negishi, M., Pedersen, L. G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y. y Pedersen, L. C. 2001. Structure and function of sulfotransferases. *Arch Biochem Biophys.*; 390, 149-57.
- Nicole, O. y Pacary, E. 2020. CaMKII β in Neuronal Development and Plasticity: An Emerging Candidate in Brain Diseases. *Int J Mol Sci.*; 1, 7272.
- Oprea, T. I. 2000. Property distribution of drug-related chemical databases. *J Comput. -Aided Mol Des.*; 14, 251-264.
- Pajouhesh, H. y Lenz, G. R. 2005. Propiedades químicas medicinales de fármacos exitosos para el sistema nervioso central. *NeuroRX*; 2, 541–553.
- Ptáček, R., Kuzelová, H. y Stefano, G. B. Dopamine D4 receptor gene DRD4 and its association with psychiatric disorders. *Med Sci Monit.*; 17, 215-20.

-
- Qin, C. Z., Zhang, X., Wu, L. X., Wen, C., Hu, L. Lv, Q. L., Shen, D. Y. y Zhou, H. H. 2015. Phenethyl isothiocyanate induces DNA damage-associated G2/M arrest and subsequent apoptosis in oral cancer cells with varying p53 mutations. *J. Agric. Food Chem.*; 63, 3311-3322.
- Reis, R. A. G., Calil, F. A., Feliciano, P. R., Pinheiro, M. P. y Nonato, M. C. 2017. The dihydroorotate dehydrogenases: Past and present. *Arch. Biochem. Biophys.*; 15, 175-191.
- Renz, B., W., Tanaka, T., Sunagawa, M., Takahashi, R., Jiang, Z., Macchini, M., Dantes, Z., Valenti, G., White, R. A., Middelhoff, M. A., Ilmer M., Oberstein, P. E., Angele, M. K., Deng, H., Hayakawa, Y., Westphalen, C. B., Werner, J., Remotti, H., Reichert, M., Taylor, Y. H., Nagar, K., Friedman, R. A., Iuga, A. C., Olive, K. P. y Wang, T. C. 2018. Cholinergic Signaling via Muscarinic Receptors Directly and Indirectly Suppresses Pancreatic Tumorigenesis and Cancer Stemness. *Cancer Discov.*; 8, 1458-1473.
- Sánchez-Cruz, N. y Medina-Franco, J. L. 2021. Epigenetic Target Fishing with Accurate Machine Learning Models. *J Med Chem.*; 64, 8208-8220.
- Sánchez-Cruz, N., Medina-Franco, J. L. 2021. Epigenetic Target Profiler: A Web Server to Predict Epigenetic Targets of Small Molecules. *J. Chem. Inf. Model*; 61, 1550-1554.
- Sander, T., Freyss, J., Modest. Von Korff, y Rufener, C. 2015. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and análisis. *J. Chem. Inf. Model*; 55, 460-473.
- Sepúlveda, C., Palomo, I. y Fuentes, E. 2016. Role of adenosine A2b receptor overexpression in tumor progression. *Life Sci.*; 166, 92-99.
- SIB, Swiss Institute of Bioinformatics. Web site <http://www.swisstargetprediction.ch>. (23 de marzo de 2021).
- Sokolov, A.V., Dadinova, L.A., Petoukhov, M.V., Bourenkov, G., Dubova, K.M., Amarantov, S.V., Volkov, V.V., Kostevich, V.A., Gorbunov, N.P., Grudinina, N.A., Vasilyev, V.B. y Samygina, V.R. 2018. Structural Study of the Complex Formed by Ceruloplasmin and Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Biochemistry (Mosc)*; 83, 701-707.
- Sorokina, M., Merseburger, P., Rajan, K., Yirik, M. y Steinbeck, C. 2021. COCONUT online: Collection of Open Natural Products database. *J. Cheminform.*; 13, 2-17.
- Spencer, E. S., Dale, E. J., Gommans, A. L., Rutledge, M. T., Vo, C. T., Nakatani, Y., Gamble, A. B., Smith, R. A. J., Wilbanks, S. M., Hampton, M. B. y Tyndall, J. D.A. 2015. Multiple binding modes of isothiocyanates that inhibit macrophage migration inhibitory factor. *Eur. J. Med. Chem.*; 26, 501-510.
- Supuran, C. T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidan, W. R. y Scozzafava, A. 2001. Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides as antitumor agents? *Bioorg Med Chem.*; 9, 703-14.
- Supuran, C. T. 2007. Carbonic anhydrases as drug targets--an overview. *Curr Top Med Chem.*; 7, 825-33.
- Tarazi, F. I., Zhang, K., and Baldessarini, R. J. 2004. Dopamine D4 receptors: beyond schizophrenia. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*; 24, 131-147.
- Thauvin-Robinet, C., Auclair M., Duplomb, L., Caron-Debarle, M., Avila, M., St-Onge, J., Le Merrer, M., Le Luyer, B., Héron, D., Mathieu-Dramard, M., Bitoun, P., Petit, J. M., Odent, S., Amiel, J., Picot, D., Carmignac,

V., Thevenon, J., Callier, P., Laville, M., Reznik, Y., Fagour, C., Nunes, M. L., Capeau, J., Lascols, O., Huet, F., Faivre, L., Vigouroux, C. y Rivière, J. B. 2013. PIK3R1 mutations cause syndromic insulin resistance with lipoatrophy. *Am J Hum Genet.*; 93, 141-9.

Tomiyasu, M., Yoshino, I., Suemitsu, R., Okamoto, T. y Sugimachi, K. 2002. Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin. Cancer. Res.*; 8, 3755-3760.

Vecchiarelli, S. y Bennati, C. 2018. Oncogene addicted non-small-cell lung cancer: current standard and hot topics. *Future Oncol.*; 14, 3-17.

Weininger, D. 1988 SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*; 28, 31-36.

Wess, J. 2004. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 44, 423-450.

Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Sayeeda, C. Li, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C. y Wilson, M. 2018. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.*; 46, 1074-1082.

Xie, B., Nagalingam, A., Kuppusamy, P., Muniraj, N., Langford, P., Gyórfy, B., Saxena, N. K. y Sharma, D. 2017. Benzyl Isothiocyanate potentiates p53 signaling and antitumor effects against breast cancer through activation of p53-LKB1 and p73-LKB1 axes. *Sci. Rep.*; 7, 1-14.

Zhang, Y. y Daaka, Y. 2011. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA γ pathway. *Blood*; 118, 5355-5364.

CAPÍTULO IV

“La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más”.

<George Bernard Shaw>

4.1 Conclusiones generales

En el presente trabajo se realizó el estudio de material vegetal fresco y de biomasa que suele ser de residuo, tal es el caso de la hoja y el bagazo, los vegetales brócoli y kale, y a partir de los extractos obtenidos de estos se logró la obtención de 3 compuestos de interés citotóxico sobre la línea celular de cáncer cervicouterino HeLa, 2 de ellos de tipo cianoindólico (caulilexina C Cl_{50} = 125.97 μ M e indol-3-acetonitrilo Cl_{50} = 215.71 μ M) y uno de ellos de tipo éster de ácido cinámico (sinapato de metilo Cl_{50} = 178.27 μ M). Se ha observado que caulilexina C posee un efecto citotóxico mayor a indol-3-acetonitrilo lo cual sugiere que la presencia de un grupo metoxi en la posición 1 es la responsable. Por otro lado, sinapato de metilo presentó un mayor efecto citotóxico respecto a su precursor el ácido sinápico de acuerdo con lo reportado en la literatura, lo que indicaría que el grupo éster es el responsable de esta mejoría en el efecto.

Así mismo, se aisló un glucósido esteroideo identificado como β -sitosterol-3-O- β -D-glucósido, el cual no había sido previamente reportado para la especie *Brassica olerace* L.

El estudio quimioinformático realizado a los compuestos representativos de la especie *Brassica oleracea*, indica que de un estudio de 154 isotiocianatos el 48% tienen la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y el 11 % podría ser candidato a fármaco por vía oral. En particular los glucosinolatos evaluados no presentaron potencial farmacológico sin embargo los 3 flavonoides (Kaempferol, Catequina y Quercetina) tienen la capacidad de atravesar la BHE. Y los 3 ácidos fenólicos (ácidos cafeico, sinápico y ferúlico) pueden ser candidatos a fármacos por absorción por vía oral.

A partir de este estudio quimioinformático, se identificó que los isotiocianatos y compuestos fenólicos pueden actuar como agonistas de la apoptosis, quimioprotectores, además de presentar posible actividad sobre dianas involucradas en patologías inflamatorias, sensoriales, cardiovasculares, diabetes y cáncer.

Finalmente, al ser la dieta un factor importante en la prevención y tratamiento de enfermedades, principalmente las crónicas degenerativas y ser las verduras crucíferas reconocidas como alimentos funcionales por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y quimiopreventivas.

El presente trabajo contribuye al estudio fitoquímico y citotóxico de las crucíferas de *Brassica oleracea* L. brócoli y kale, proponiendo compuestos fitoalexínicos como posibles agentes terapéuticos contra cáncer, así mismo contribuye a la química de alimentos a través del estudio quimioinformático de constituyentes representativos con áreas de oportunidad en el tratamiento de diferentes enfermedades incluyendo cáncer.

4.2 Perspectivas

Sobre el perfil fitoquímico:

Continuar con el estudio fitoquímico de kale y a partir de extractos nuevos, provenientes del vegetal en diferentes condiciones de cultivo, para encontrar nuevos compuestos bioactivos.

Actividades farmacológicas de compuestos puros

Con base a los resultados obtenidos en el ensayo de citotoxicidad de los compuestos **10**, **11** y **12** sobre la línea celular HeLa (VPH18) se propone, realizar la evaluación citotóxica de estos compuestos sobre otras líneas de cáncer cervicouterino como CaSki y SiHa (VPH16), a fin de analizar su efectividad sobre cáncer cervical de diferentes orígenes.

Además, se propone identificar el mecanismo de acción de los compuestos **10**, **11** y **12** determinando el arresto celular y tipo de muerte.

Aunado a esto y tomando en cuenta lo que se ha reportado en la literatura para compuestos del mismo tipo, se propone realizar el ensayo de citotoxicidad de los compuestos **10**, **11** y **12** sobre líneas celulares de otros tipos de cánceres humanos, por ejemplo: hepático (Hep3B, HepG2), próstata (PC3), renal (786-0, mama (MCF-7), glioblastoma (U251), HCT116(colon).

Actividades biológicas adicionales:

Debido a la actividad citotóxica de los compuestos **10** y **11** sobre la línea celular HeLa, se propone, además, realizar estudios antivirales a de estos compuestos cianoindólicos sobre el virus de papiloma humano.

Teniendo como precedente que en nuestro grupo de trabajo ya se ha realizado un estudio epigenético de otros derivados de ácidos cinámicos, es de interés evaluar la actividad sobre dianas epigenéticas del sinapato de metilo (**12**).

Así mismo, se propone evaluar la actividad antioxidante de los extractos y compuestos puros con los métodos químicos DPPH y ABTS así como en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Dada la similitud de los compuestos **10** y **11** con neurotransmisores como la serotonina se considera de interés, realizar estudios a nivel sistema nervioso central de estos compuestos.

Estudios *in silico*:

Se propone realizar estudios de acoplamiento molecular de los compuestos **10**, **11** y **12** sobre la proteína MIF la cual se encuentra relacionada con enfermedades de interés social entre ellas el cáncer.

Realizar estudios de estructura actividad (QSAR) de compuestos indólicos con variaciones en las posiciones 1 y 3 del anillo de pirrol preferente y/o en el anillo aromático.

Brócoli y kale como nutracéutico

Evaluar la actividad prebiótica sobre cepas de lactobacilos de ambos vegetales.

Formular y caracterizar vehículos de encapsulación de los vegetales y determinar su biodisponibilidad en un sistema gastro intestinal *in vitro*.

doi.org/10.1002/minf.202100172

Chemoinformatic Analysis of Isothiocyanates: Their Impact in Nature and Medicine

Araceli Guerrero-Alonso,^[a] Mayra Antunez-Mojica,^{*,[b]} and José L. Medina-Franco^{*,[c]}

Abstract: Isothiocyanates (ITCs) have a significant impact on food and natural product chemistry. Several dietary components and food chemicals contain the isothiocyanate moiety. In addition, many ITCs interact with macromolecules of biological relevance, making these compounds relevant for potential therapeutic applications and disease prevention. However, there is a lack of systematic analysis of ITCs in chemical and biological databases. Herein, we conducted a comprehensive analysis of ITCs present in public domain databases, including natural products, food chemicals, macromolecular targets of drugs, and the Protein Data Bank. A total of 154 ITCs were found, which can be

classified into seven categories: acyclic, cyclic, polycyclic, aromatic, polyaromatic, indolic, and glycosylated. 24 ITCs were reported in 18 vegetable sources, mainly in cruciferous vegetables (*Brassica oleracea* L.). Calculated properties of pharmaceutical relevance indicated that 11% of the 154 ITCs would be suitable to be orally absorbed and 48% permeate the blood-brain-barrier. It was also found that seven molecular targets have been co-crystallized with ITCs and the most frequent is the macrophage migration inhibitory factor. It is expected that this work will contribute to the sub-disciplines of natural products and food informatics.

Keywords: chemoinformatics · databases · food chemistry · isothiocyanates · natural products

1 Introduction

Historically, chemoinformatics has had a significant development in drug discovery, supporting many critical steps from hit discovery to lead optimization and development.^[1] However, chemoinformatics is making important contributions to different areas of chemistry including, but not limited to organic synthesis, analytical chemistry, material sciences, natural products, and food chemistry. The development of each application has led to the emergence and maturation of sub-disciplines such as natural products informatics and food informatics.^[2] One of the key contributions of chemoinformatics in the latter two areas is given by the increasing availability and development of compound databases in the public domain.^[3]

Isothiocyanates (ITCs) are organosulfur compounds constituted by R–N=C=S functionality, R can be an alkyl, alkenyl, thioalkyl, thioalkenyl, aryl, arylalkyl or indolyl moiety.^[4] These compounds have three reactive centers which confer pharmacological properties, such as antioxidant,^[5] antimicrobial,^[6] anticancer,^[7] and chemopreventive action.^[8] The main source of ITCs is by extraction mainly from *Brassica* vegetables giving the characteristic pungent aroma to these vegetables.^[9] They are derived from the hydrolysis of glucosinolates by myrosinase enzyme and can be classified according to the amino acid precursor into aliphatic, aromatic and indolic ITCs. For instance, glucoraphanin hydrolysis gives sulforaphane, gluconasturtiin gives phenethyl isothiocyanate and neoglucobrassicin gives 3-(Isothiocyanatomethyl)-1-methoxyindole^[10] (Figure 1). Also, due to their biological importance, ITCs can

also be synthesized by multicomponent and miscellaneous reactions.^[11]

Despite the importance of ITCs in nature and food chemistry, there are no systematic studies of the frequency of these compounds in large public chemical and biological databases. Also, it is unknown the profile of their physicochemical properties and potential to bind to macromolecular targets with biological interest. To fill this gap, herein we report a comprehensive and systematic chemoinformatic analysis of chemical compounds containing ITC in large compound databases. To our knowledge, this is the first comprehensive study of ITCs in natural products and food chemical databases. We anticipate that this work will

[a] A. Guerrero-Alonso
Centro de Investigaciones Químicas IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Cuernavaca, MOR, 62209, México

[b] M. Antunez-Mojica
CONACYT-Centro de Investigaciones Químicas-IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, 62209, Morelos, México
phone: (777)3297900 ext. 6010
E-mail: myam@uaem.mx

[c] J. L. Medina-Franco
DIFACQUIM Research Group, Department of Pharmacy, School of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico
phone: +5255-5622-3899 ext. 44458
E-mail: medinajl@unam.mx

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/minf.202100172>

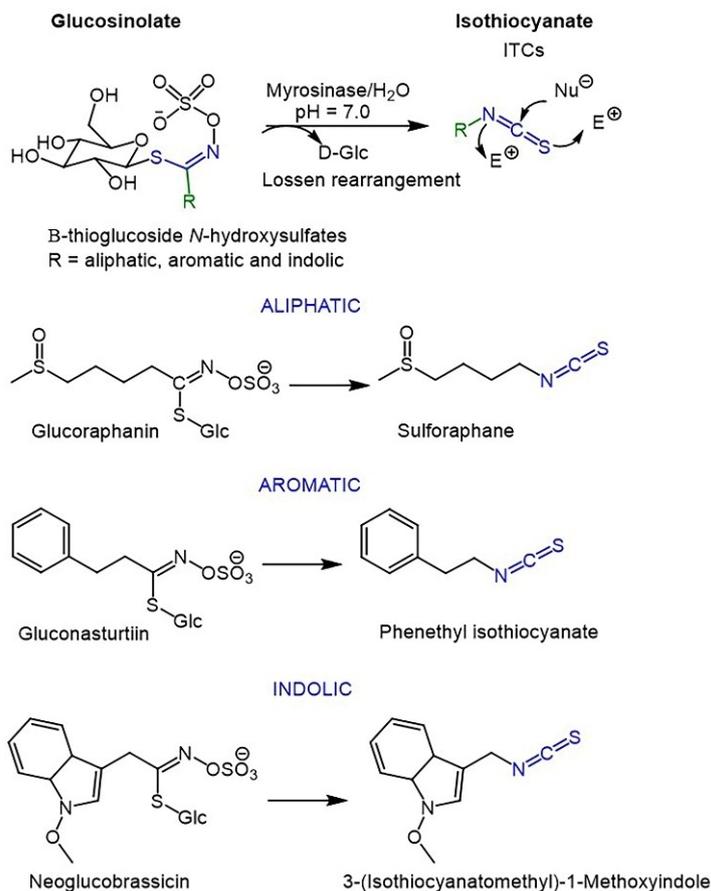


Figure 1. Hydrolysis of glucosinolates to its isothiocyanates via myrosinase enzyme, aliphatic ITC, aromatic ITC, and indolic ITC.

contribute to further advance the research field of food informatics.

2 Methods

2.1 Data Sets

The chemical structures containing the ITC moiety were searched in the open-access databases COCONUT (Collection of Open Natural Products, CNT),^[3] FooDB, version 1.0 (FDB),^[12] Protein Data Bank (PDB),^[13] and DrugBank, version 5.1.8 (DB).^[14] The results were compared to each other, and the duplicate and unique compounds present in each database were selected. Additionally, the compounds obtained were classified according to their chemical structural characteristics.

2.2 Physicochemical Properties Profile of Isothiocyanates in Compound Databases

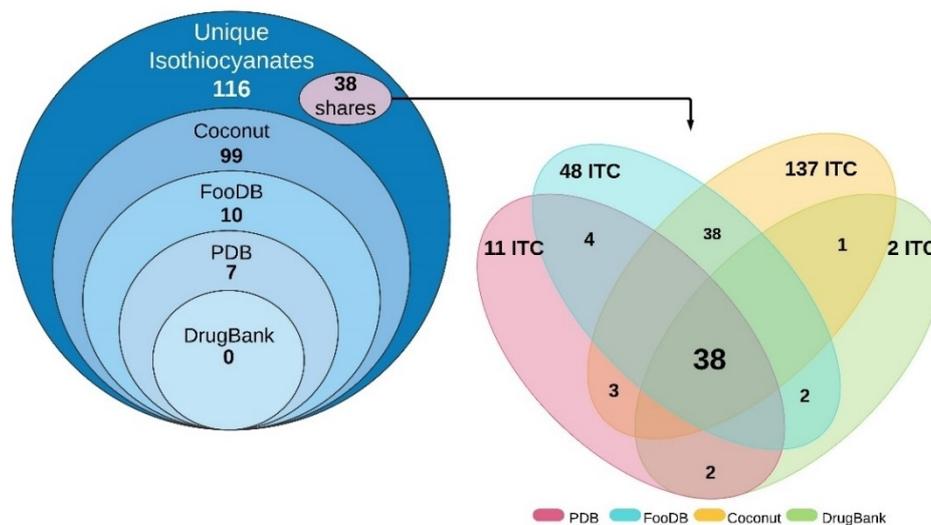
We began the ITC compound's profiling with calculated physicochemical properties related to oral absorption of potential drug candidates. The chemoinformatic analysis of the ITCs reported in the CNT, FDB, PDB, and DB databases was carried out using the free applications Molinspiration,^[15] SwissADME,^[16] and DataWarrior, version v05.02.01.^[17] Eight molecular properties of pharmaceutical interest were computed namely, number of heavy atoms (A) molecular weight (MW), hydrogen bond donors (HBD), hydrogen-bond acceptors (HBA), partition coefficient octanol/water (clogP), number of rotatable bonds (RB), polar surface area (PSA), and molar refractivity (MR).

2.3 Target Profiling and Prediction of Activity Type of Isothiocyanates

The simplified molecular-input line-entry system (SMILES) representation^[18] of the 154 isothiocyanates was used as a basis to predict the biological activity for each of them with

Table 1. Number of compounds with the isothiocyanate structure reported in four databases.

Database	Size	Source
Collection of Open Natural Products (CNT)	137	https://coconut.naturalproducts.net
Food Database (FDB)	48	https://foodb.ca
Protein Data Bank (PDB)	11	https://www.rcsb.org
Drug Bank (DB)	2	https://go.drugbank.com

**Figure 2.** Unique and overlapping isothiocyanates extracted from four databases: COCONUT (CNT), FooDB (FDB), Protein Data Bank (PDB), and DrugBank (DB).

a cut-off condition of $P_a \geq 0.5$ in SwissTargetPrediction, confidence at 90% and activity threshold ≥ 6.5 in ChEMBL^[19] and $P_a \geq 0.9$ in PASS Online.^[20] Also, molecular targets co-crystallized with isothiocyanates reported in PDB were identified. In addition, we predicted the level of the mutagenic and tumorigenic potential of ITCs with Data-Warrior, version v05.02.01.

3 Results and Discussion

A total of 198 molecules were obtained from the surveyed databases with the ITC substructure. The databases had in common 38 chemical structures and 154 were unique compounds (Table S1 in the Supporting Information). The contents of each database are summarized in Table 1 and the number of compounds that overlap in the different databases are shown in Figure 2.

3.1 Food Source of Isothiocyanates Reported in FooDB

FooDB is a public database of food constituents, their chemistry, and biology. It also provides information about macronutrients and micronutrients, such as the constituents that give foods their flavor, color, taste, texture, aroma, as

well as compounds nomenclature, description, structure information, chemical class, physicochemical data, and food sources. The current version of FooDB reports 48 ITCs, of which only 25 have their natural source reported. Three of these compounds ((*R*)-iberin, allyl isothiocyanate, and (*E*)-raphasatin) are reported in animal food sources, such as meat and milk. In addition, 24 ITCs were identified in 18 vegetable sources (Figure 3).

Moreover, we analyzed the ITCs plant sources according to their family, gender, and species. Table 2 shows *Amaryllidaceae*, *Poaceae* and *Brassicaceae* and 10 genera (*Brassica*, *Rorippa*, *Lepidium*, *Eruca*, *Wasabia*, *Raphanus*, *Armoracia*, *Allium*, *Zea*, *Avena*) such as the prominent plants containing ITCs. *Brassica* genus is the main source of these organo-sulfur compounds.

14 of 25 ITCs (Figure 4A) were reported in the cruciferous vegetables (*Brassica oleracea* L.): broccoli, cauliflower, cabbage, kohlrabi, white cabbage, and Brussel sprouts. Figure 4B shows these vegetables from the wild plant and the ITCs reported in this species such as, sulforaphane (SFN), allyl isothiocyanate (AITC), iberiverin (IBV), and phenethyl isothiocyanate (PEITC).

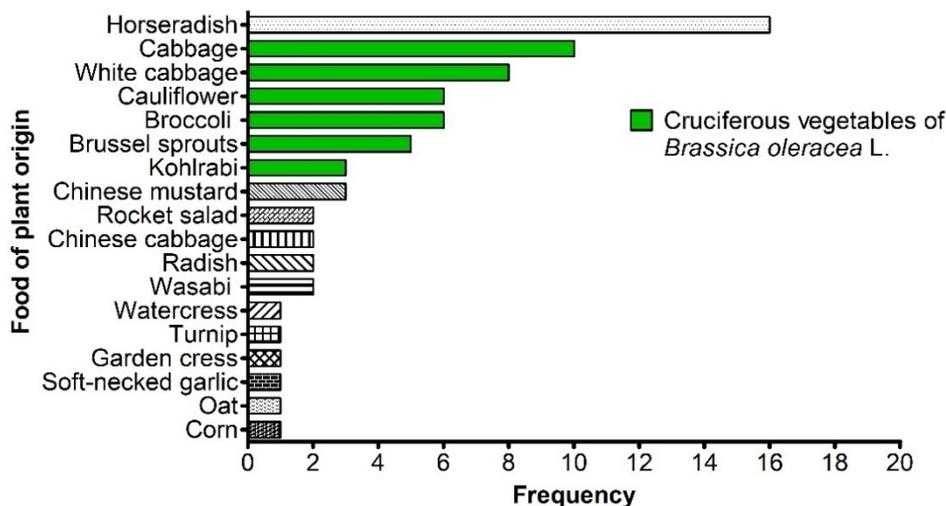


Figure 3. Principal food source of isothiocyanates reported in FooDB.

Table 2. Taxonomic classification of vegetables reported in FooDB with isothiocyanates content.

Family	Genus	Scientific name	Name	
Brassicaceae	<i>Brassica</i>	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>	Cabbage	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>Botrytis</i>	Cauliflower	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gemnifera</i>	Brussel sprouts	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>gongylodes</i>	Kohlrabi	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>italica</i>	Broccoli	
		<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC.	White cabbage	
	<i>Brassica juncea</i>	Chinese mustard		
	<i>Brassica rapa</i> var. <i>rapa</i>	Turnip		
	<i>Brassica rapa</i> var. <i>pekinensis</i>	Chinese cabbage		
	<i>Rorippa</i>	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i>	Watercress	
	<i>Lepidium</i>	<i>Lepidium sativum</i>	Garden cress	
	<i>Eruca</i>	<i>Eruca vesicaria</i> ssp. <i>sativa</i>	Rocket salad	
	<i>Wasabia</i>	<i>Wasabia japonica</i>	Wasabi	
	<i>Raphanus</i>	<i>Raphanus sativus</i>	Radish	
	<i>Armoracia</i>	<i>Armoracia rusticana</i>	Horseradish	
	Amaryllidaceae	<i>Allium</i>	<i>Allium sativum</i> L. var. <i>sativum</i>	Soft-necked garlic
	Poaceae	<i>Zea</i>	<i>Zea mays</i>	Corn
<i>Avena</i>		<i>Avena sativa</i>	Oat	

3.2 Substructure Classification

The 154 ITC with unique chemical structures obtained from the four databases were classified according to their chemical main structure into seven categories (Figure S2 in the Supporting Information): acyclic (69 molecules), cyclic (3), polycyclic (41), aromatic (14), polyaromatic (3), indolic (18) and glycosylated (6) (Figure 5A). Also, the chemical structures of representative ITCs of each category are shown in Figure 5B.

Acyclic, cyclic, and aromatic isothiocyanates such as SFN, benzyl and phenethyl isothiocyanates are reported as common secondary metabolites present in the cruciferous vegetables of *Brassica oleracea* L. They have been exten-

sively described in previous studies as chemopreventive agents,^[22,23] apoptosis inducers,^[24] as well as antiproliferative for cancer cell lines of breast, colon, lung, pancreas, among others,^[25–28] and could be involved in the anti-inflammatory mechanism.^[29] For instance, the acyclic ITC SFN is the most well-known component of dietary cruciferous vegetables and has been recognized as a chemopreventive nutraceutical due to its antiproliferative activity.^[30]

3.3 Physicochemical Properties

As described in the Methods section, the physicochemical properties profile of the 154 ITCs reported in public

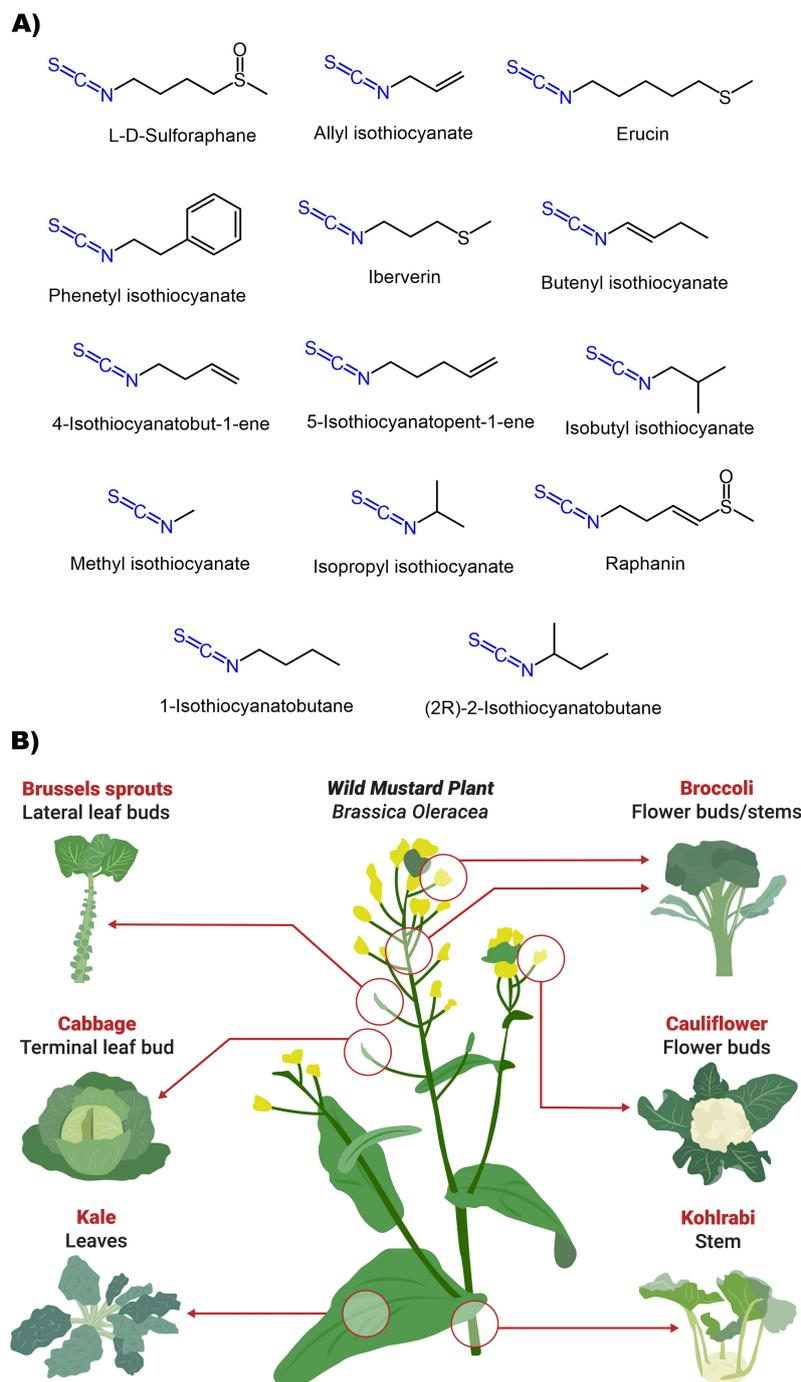


Figure 4. A) Chemical structures of isothiocyanates reported in cruciferous vegetables of *Brassica oleracea* L. by FooDB. B) Schematic illustration of the vegetables from the wild mustard plant.^[21]

databases was carried out with: Molinspiration, SwissADME and DataWarrior. The eight molecular properties were computed: A, MW, HBD, HBA, clogP, RB, PSA, and MR. These properties are of pharmaceutical interest and provide a quantitative estimation of the drug-likeness of small-molecules.

For the discussion hereunder, we will discuss the results calculated with DataWarrior and SwissADME. The results of the chemical descriptors of all isothiocyanates belonging to tested datasets were plotted as proportion histograms revealing a left shift regarding all the chemical descriptors for the tested datasets (Figure 6).

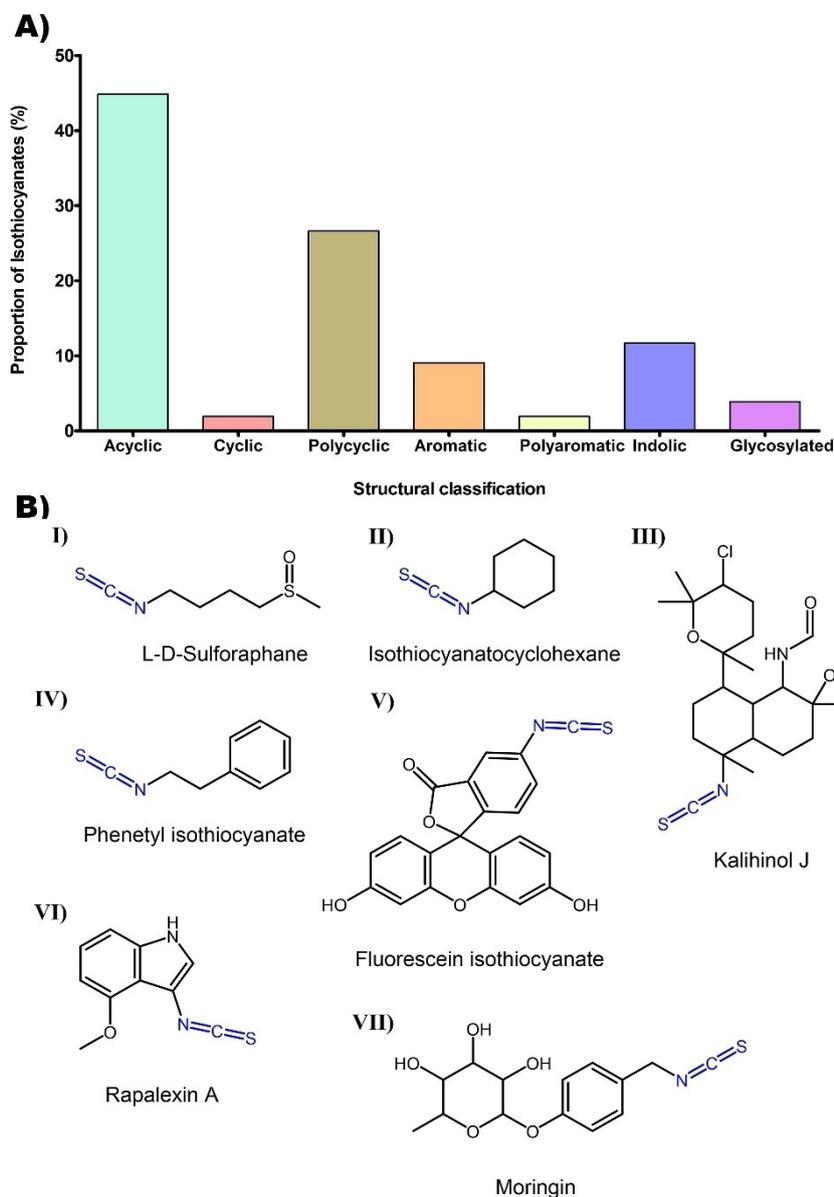


Figure 5. A) Proportion of isothiocyanates identified in this according to their chemical structure. B) Representative isothiocyanates of each structural group. I) acyclic, II) cyclic, III) polycyclic, IV) aromatic, VI) polyaromatic, V) indolic, VI) glycosylated.

The calculated physicochemical profile indicates that 95.5% of ITCs are in a range of 100 to 450 Da of MW, 86.7% with clogP between 1 to 6; most of the ITCs include around 18 heavy atoms (16.9%), 64.9% have around 2 to 4 RB, 67.5% have 1–2 HBA. In contrast, 70.1% do not have HBD and 29.9% have 1–4 HBD, 81.8% have a PSA from 40 to 120 Å. Finally, 15.6% of ITCs have a molar refractivity value of 80.

In this study, preliminary assessment of the ITCs' potential as drugs by oral absorption and passive diffusion was carried out through comparison of the Lipinski's Rule of 5,^[31] which describes that a drug candidate compound will have permeability or passive diffusion problems if it violates

two or more of the four established criteria, that is, if it presents: More than 5 hydrogen-bond donors, molecular weight ≤ 500 g/mol (MW), $\text{clogP} \leq 5$, as well as more than ten hydrogen-bond acceptors. This empirical rule was supported by the range established by Ghose^[32] and Oprea^[33] that shown below: MW = 160–480 g/mol; $\text{clogP} = -0.4$ –5.6; A = 20–70; RB = 2–8; PSA = 100–150 Å for oral absorption or 60–90 for Blood-brain barrier (BBB) permeability and MR from 40 to 130. However, meeting these criteria is not a guarantee that a compound is like a drug. Likewise, outside of the Lipinski's Rule of 5, compounds should not be excluded from consideration as potential drugs.^[34]

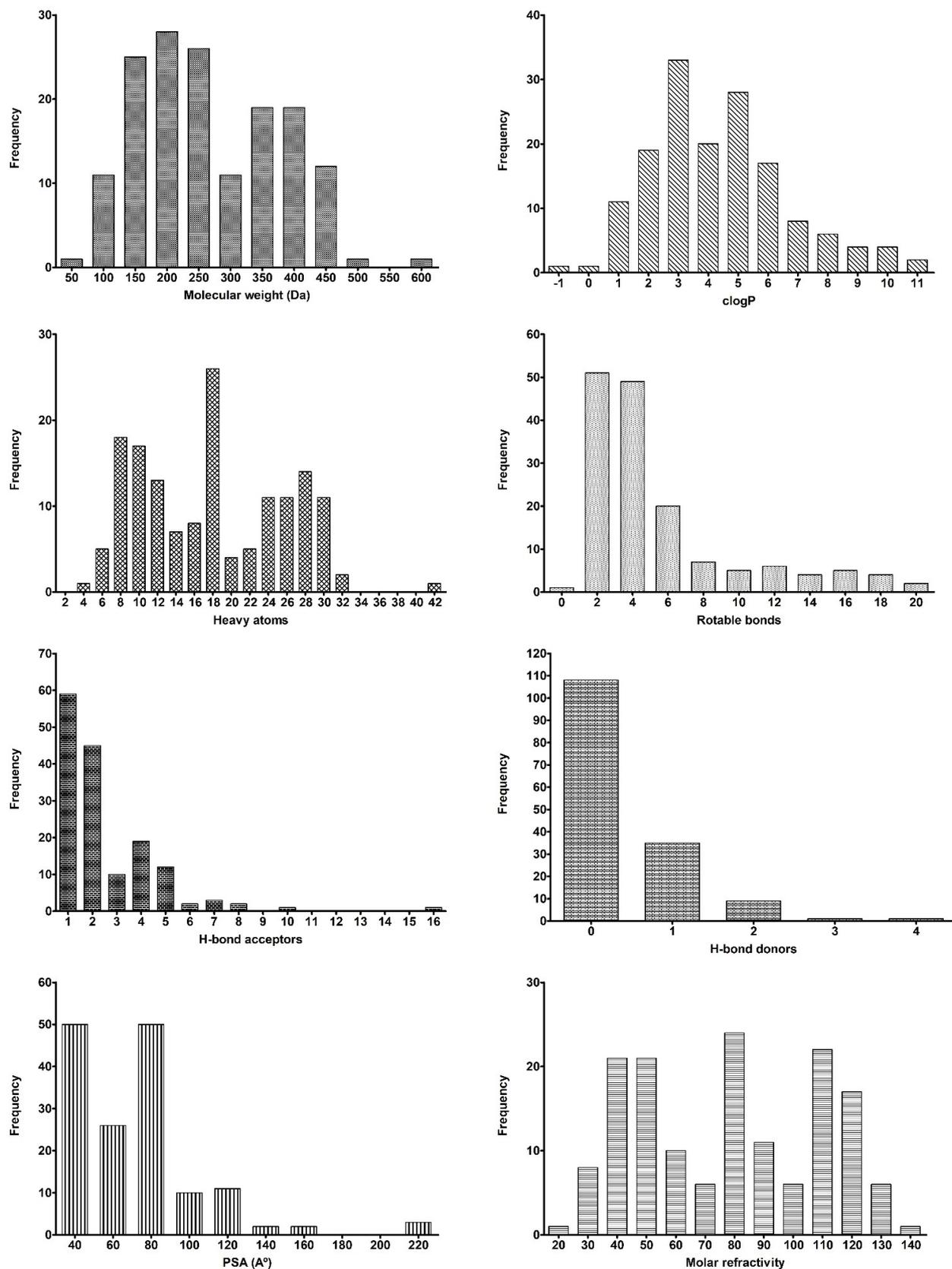


Figure 6. Distribution of the eight calculated chemical descriptors of pharmaceutical relevance of the 154 compounds databases studied in this work, as calculated with Datawarrior.

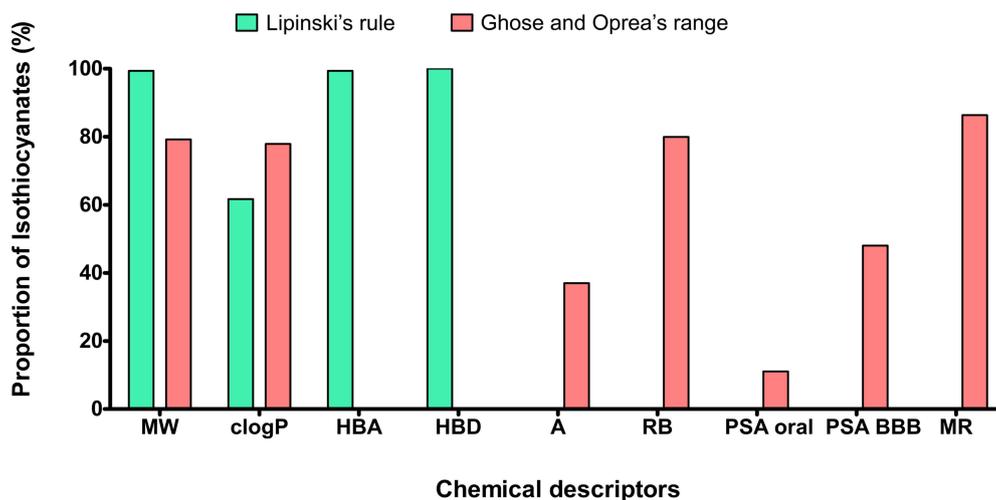


Figure 7. Proportion of isothiocyanates meeting empirical drug-like criteria. MW: molecular weight; clogP: partition coefficient octanol/water; HBA: hydrogen-bond acceptors; HBD: hydrogen bond donors; A: number of heavy atoms; RB: number of rotatable bonds; PSA: polar surface area; MR: molar refractivity.

We may observe that 99.5% of ITCs analysed in this work are below Lipinski's values for MW and hydrogen-bond donors and acceptors, while 61.7% of these are in the clogP range ≥ 5 . Considering the complementary criteria of Ghose and Oprea we find that around 77.7% of compounds are into the ranges for MW, clogP and RB established, 37% of these contain 20 to 70 heavy atoms, 83.4% are between the values of 5–60 proposed for MR. Molecular polar surface area (PSA) is a very useful parameter for drug transport properties prediction. This parameter has been shown to correlate very well with the human intestinal absorption, and BBB penetration. According to our results, 11% of ITCs would be suitable to be orally absorbed, and 48% for permeability of BBB (Figure 7). The authors acknowledge the importance of considering MW and clogP: 79.2% and 61.7% of the ITCs meet these criteria, respectively for these rules.

3.4 Calculation of Mutagenic and Tumorigenic Potential

DataWarrior was used to estimate the mutagenic and tumorigenic potential of the 154 ITCs. 81.2% of the compounds have low mutagenic potential and 83.7% have low tumorigenic potential. In addition, 8.1% of ITCs have none mutagenic and/or tumorigenic potential, while 10.6% and 8.1% are considered high mutagenic and tumorigenic, respectively (Figure S3 in Supporting Information).

Considering the diversity of the chemical structure of ITCs, this difference is not unexpected since factors involved in the complexity of the molecule, such as size, type of bond and even its other substituents, play an important role in the determination of toxicity. Therefore, it is

considered that a difference in a toxicological profile determined the potential threats associated with their ingestion. Previous reports indicate a toxicologic potential in concentrations higher than those normally found in cruciferous vegetables of the most well-known isothiocyanate-like compounds.^[35] Thus, it is important to consider the dose-response relationship for these compounds, because ITCs such as AITC, PEITC, SFN IBV and BITC (*vide supra*), are also widely recognized as antioxidant,^[36] cytotoxic, apoptosis inducers,^[37–39] chemoprotective^[40,41] and chemopreventive agents.^[42,43]

3.5 Epigenetic Target Profiler

In this section, the prediction of the epigenetic target of each isothiocyanate was carried out using the web server recently developed, Epigenetic Target Profiler.^[44] This web application predicts the bioactivity profile over a panel of 55 different epigenetic targets. The parameters related to the reliability of the predictions are the identification of small molecules with potential epigenetic activity.^[45] In the epigenetic target fishing was found that ITCs-type compounds are outside the reliability criteria for epigenetic targets (e.g., quartile 4), which is the lowest level of commitment proposed by this server. This suggests that they have a mealy probability of activity or there are no similar compounds reported to make a reliable structural comparison.

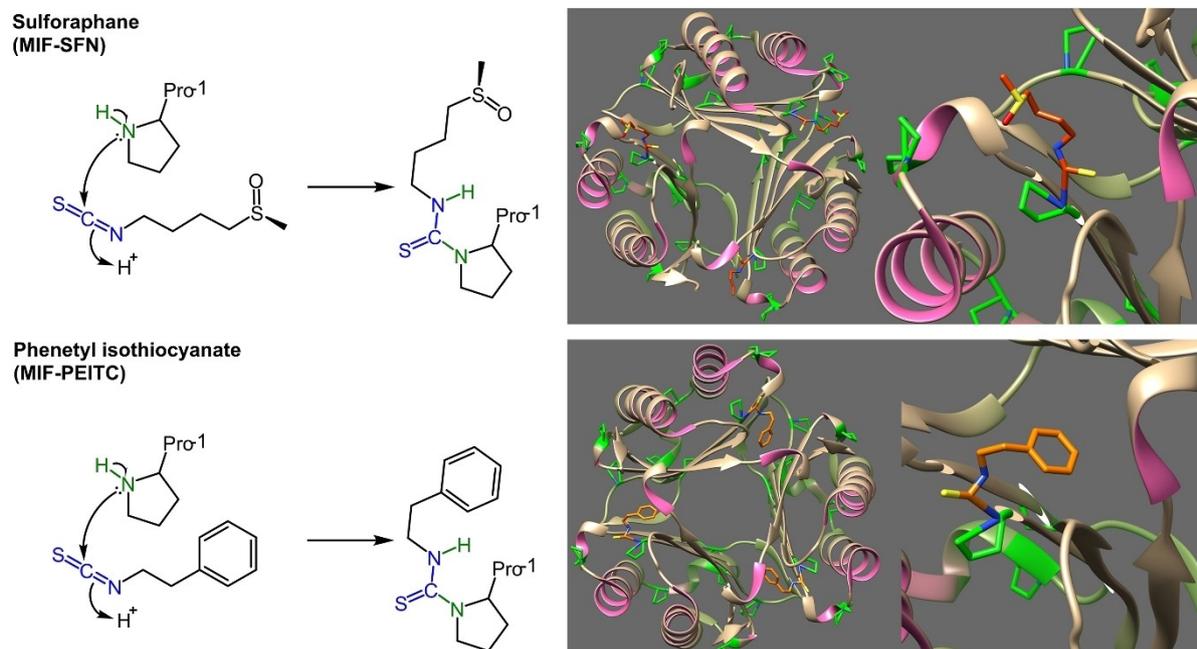


Figure 8. Macrophage Migration Inhibitory Factor reactivity with A) sulforaphane, and B) phenethyl isothiocyanate covalently linked with *N*-terminal proline. The images were obtained from the structures obtained from the Protein Data Bank (PDB ID: 3SMB and 3SMC, respectively, and rendered with the program Chimera).

3.6 Biomolecular Targets of Isothiocyanates

PDB provides access to 3D structure data for biological molecules, by opening access to the accumulating knowledge of crystallized structure, function, and evolution of biological macromolecules. The results for this work identified seven targets for the eleven ITCs collected from public compound databases reported in PDB. 92.85 % of ITCs have not been co-crystallized with biomacromolecules. Seven molecular targets have been co-crystallized with ITCs: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) (4.65 %), dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) (1.3 %), chitinase A (chiA) (0.65 %), adenyl cyclase (ADCY10) (0.65 %), glutathione transferase omega 3S (GST3S) (0.65 %), lysozyme C (LYZ) (0.65 %), glutation *S*-transferasa A1 (GSTA1) (0.65 %). In general, these targets are related with anticancer and anti-inflammatory activities.

MIF is a pleiotropic inflammatory cytokine important in the upstream regulation of both innate and adaptive immunological responses and has been implicated in the pathogenesis of autoimmune, sepsis, inflammatory diseases as rheumatoid arthritis,^[46,47] cardiovascular disease,^[48] diabetes^[49] and it has also been found to be overexpressed in numerous tumor types including breast cancer and melanoma.^[50,51] MIF possesses two distinct catalytic activities: thiol protein oxidoreductase activity and catalyzed a tautomerase reaction. Some of the proinflammatory activities of MIF are impaired by mutations that affect enzymatic activity.^[52]

Crichlow *et al.*, reported the MIF activity of two isothiocyanates, PEITC and SFN. PEITC formed a covalent bond in the hydrophobic active site cleft of MIF, forming a *cis* thiopeptide bond. The aromatic ring within the active site requires a conformational change in *N*-terminal proline (Pro-1) residue to make a covalent bond with PEITC. In contrast, SFN extends the aliphatic chain out of the binding site at the surface of the protein but also a covalently bound to MIF, these unions are shown in Figure 8. This would suggest a lower affinity for the active site cleft of the aliphatic side chain of sulforaphane relative to that of the aromatic side chain of PEITC.^[53] Also, an analysis was carried out by Sokolov *et al.* compared the importance of the ligands size. In the case of MIF-PEITC, the inhibitor is located deep inside the active center due to its small size, on the contrary being the size of fluorescein isothiocyanate (FITC) so large, the inhibitor goes beyond the active center and stands above the surface of the molecule.^[54]

Spencer *et al.*, explored 15 benzyl and phenethyl isothiocyanates that could inhibit MIF, they calculated the IC₅₀ of MIF and Jurkat T-lymphoma cells. The presence of either a 4-methoxy or 4-sulfonamide substituent enhances the activity to submicromolar (0.7 μM). The crystallized ITC covalently bound to rhMIF can adopt one of two distinct binding modes: a) "downward", occupying a deep, restricted, hydrophobic pocket, and b) "upward", occupying a more open cleft exposed to solvent.^[55]

However, it has been shown that ITC does not directly react with any of these thiols, and the *N*-terminal proline has been identified as the binding site of ITCs (Figure 8)

because the increased nucleophilicity of the *N*-terminal proline allows it to function as a general base catalyst in the tautomerase reaction and favors reactivity with electrophiles such as isothiocyanates. Therefore, the binding of ITCs to proline inhibited the tautomerase activity permitting the MIF with interactions with receptors or binding proteins, such as CD74, CXCR2, and CXCR4.^[52,55]

It was also found that 4-nitrophenyl isothiocyanate and phenyl isothiocyanate (PITC) covalently linked with dihydroorotate dehydrogenase enzyme (DHODH). This enzyme is responsible for catalyzing the synthesis of *de novo* pyrimidine and oxidizing dihydroorotate to orotate processes. This process is involved in cancer cell metabolism^[56] and also is associated with the treatment of cancer,^[57] autoimmune diseases, parasitic diseases, bacterial or viral infections such as that produced by SARS-CoV-2.^[58]

3.7 Target Profiling and Prediction of Activity Type of Isothiocyanates

Different molecular targets as implemented in the web-servers were used to determine the possible biological activity of 154 ITCs (Figure 9). In agreement with the experimental information in PDB, SwissTargetPrediction showed MIF as a possible molecular target, in this case for 5.89% of ITC; 12.99% of these have activity on transient receptor potential cation channel subfamily A member 1 (TRPA1). This ion channel is a major target for anti-inflammatory and analgesic therapies because it is expressed in pain-sensing neurons and other tissues.^[59] As shown in Figure 9A, 82.5% of ITCs were not predicted bioactive with SwissTargetPrediction.

Target prediction with ChEMBL (Figure 9B) showed that the principal molecular targets of ITCs are enzymatic type (31.17%). For example, phosphodiesterase 5A (PDE5A), an enzyme of pharmacological interest since its inhibition has several therapeutic applications including erectile dysfunction and pulmonary arterial hypertension. Furthermore, phosphodiesterase five inhibitors have been associated with a lower risk of developing colorectal cancer.^[60,61] Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS (ROS1), an enzyme synthesized by a gene ROS1, that is involved in sending signals in cells and cell growth, so its inhibition can counteract tumoral development.^[62] Others ITCs predicted targets are dihydrofolate reductase, coagulation factor X, serine/threonine-protein kinase pknB, and serine-protein kinase ATM. Membrane receptor is another classification highly reported as a molecular target for ITC-type compounds (30.52%). The following membrane receptors stand out by incidence: muscarinic acetylcholine receptor M1 (CHRM1) and prostanoid EP4 receptor (EP4R). CHRM1 belongs to the muscarinic acetylcholine receptors, which play key roles in regulating the activity of the central and peripheral nervous system's important functions and have been considered as an important therapeutic target for

various diseases, including dry mouth, incontinence, and chronic obstructive pulmonary disease.^[63,64] EP4R is one of the receptors responsible for modulating the biological functions of prostaglandin (PG) E2, it is involved in the process of angiogenesis and tumor development; however, anti-inflammatory, anti-thrombotic, and vasoprotective effects have been proposed for this receptor of PGE2.^[65,66] Other membrane receptors of lower incidence predicted for ITCs are alpha-2b/2c adrenergic receptors, prostanoid EP3 receptor, and cannabinoid CB2 receptor.

Complementary to SwissTargetPrediction and ChEMBL PASS Online is a web resource designed to predict biological activity spectra, pharmacological effects, mechanisms of action, toxic and adverse effects, etc., of organic compounds based on their chemical structures. For this study, predictions showed that the ITCs reported in the databases covered in this work may have activity as a cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) inhibitor, can be apoptosis agonist and they can act like substrate of glutathione *S*-transferase (GST), an enzyme involved in cellular detoxification. Overexpression of GST is associated with tumor appearances and with resistance to cytostatic agents. Specifically the abnormal expression of the π -class of GST has been linked to the occurrence of tumor resistance to chemotherapy drugs^[67] (Figure 9C). The prediction results for each ITCs are shown in Tables S3–S6 in the Supporting Information.

3.8 Promising Isothiocyanates from Pharmacological Activity Analysis

According to the analysis of the results obtained from the experimental databases, as well as the predictions, the ITCs, benzyl isothiocyanate, allyl isothiocyanate, phenetyl isothiocyanate, phenyl isothiocyanate, 4-isothiocyanatobut-1-ene, 5-isothiocyanatopent-1-ene, 7-isothiocyanatohept-1-ene, iberin, and ethyl isothiocyanate (Figure 10) are the compounds found with the largest diversity of molecular targets and biological activity spectrum (about 6 or 5 predictions). For these nine ITCs, activity on membrane receptor EP4R and enzyme ROS1 is reported; benzyl isothiocyanate, phenetyl isothiocyanate, phenyl isothiocyanate, 4-isothiocyanatobut-1-ene, 7-isothiocyanatohept-1-ene, iberin and ethyl isothiocyanate share the affinity for the muscarinic acetylcholine receptor CHRM1. In addition, six of these ITCs have activity on transient receptor potential cation channel TRPA1. Table 3 shows the type of activity and the molecular targets identified for the nine ITCs whose chemical structures are in Figure 10.

4 Conclusions

Herein we report a comprehensive analysis of ITCs, a major class of compounds with importance in natural products

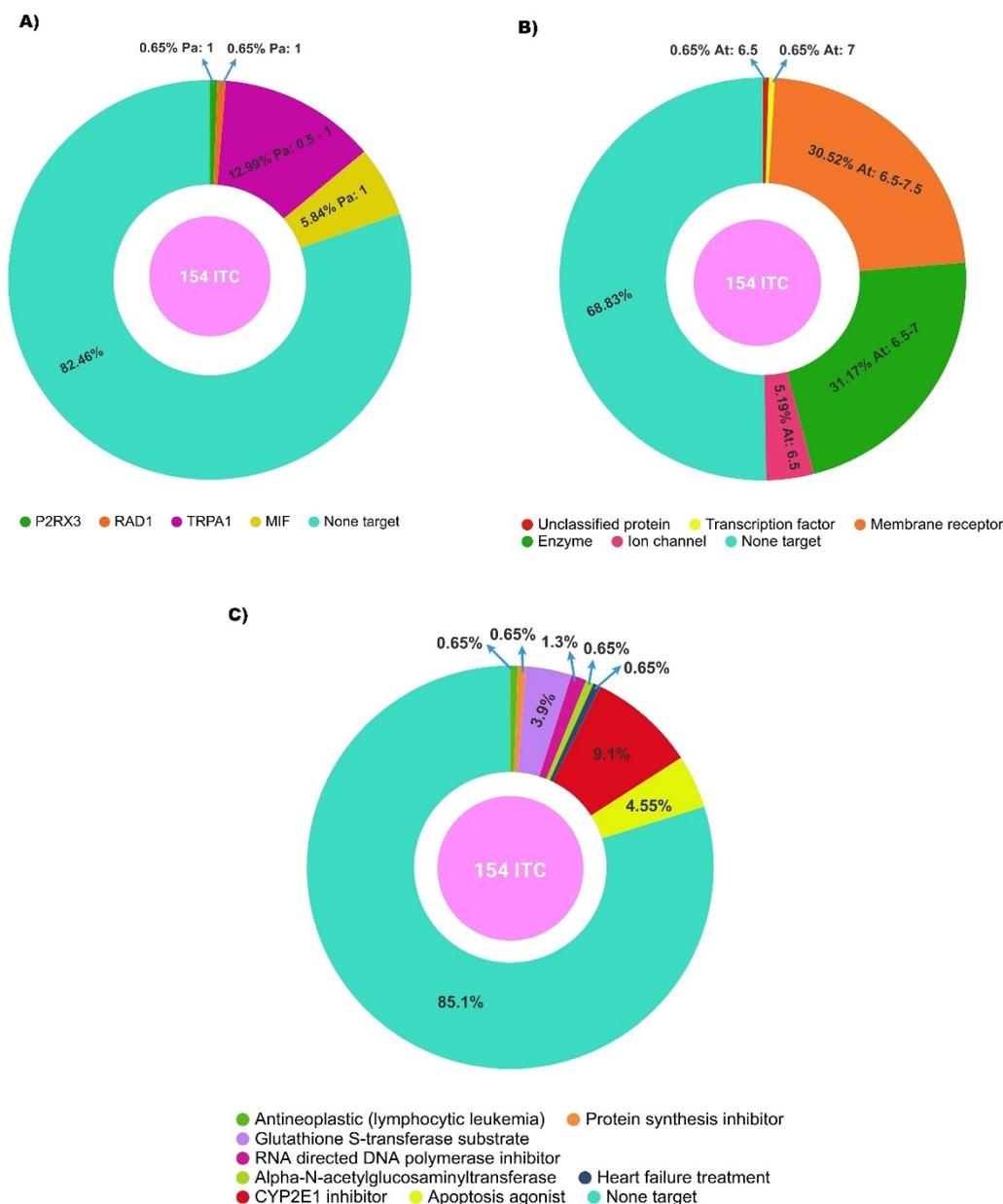


Figure 9. Target prediction of isothiocyanates analyzed in this work. A) Targets reported in SwissTargetPrediction. P2RX3: P2X purinoceptor 3; RAD1: cell cycle checkpoint protein RAD1; TRPA1: Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1; MIF: Macrophage migration inhibitory factor. B) Protein target classification reported in ChEMBL, version 28. C) Spectral activity prediction in PASS Online.

and food chemistry. The chemoinformatic characterization and analysis were done using open source and free software. 154 ITCs were collected from four large public databases and classified according to their chemical structure: most were acyclic and polycyclic with 44.8% and 26.6% respectively; 11.7% were indolic type, 9.1% poliaromatic, 3.9% glycosylated, and 1.9% cyclic.

In this study, we observed that the principal sources of ITCs reported in FooDB database are cruciferous vegetables of *Brassica oleracea* L., which have been widely recognized due to their nutritional relevance,^[68] they are considered

superfoods, due to their high content of nutrients and phytochemicals.^[69] Therefore, it is important to highlight that of the 154 compounds we studied, 81.2% and 83.7% of ITCs have a low mutagenic and tumorigenic potential, respectively.

We also identified nine ITCs (benzyl isothiocyanate, AITC, PEITC, PITC, iberin, ethyl isothiocyanate, among others) as the principal candidates to possess promising pharmacological activities on nine molecular targets, including ROS1, CHRM1, EP4R and MIF. It is also reported the mechanism of inhibition of MIF by PEITC and SFN with

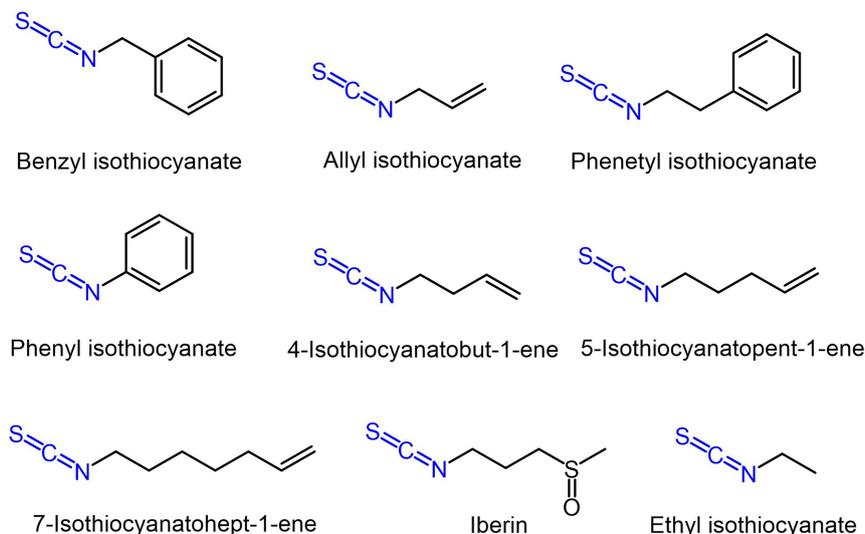


Figure 10. Promising isothiocyanates from pharmacological activity analysis.

Table 3. Isothiocyanates with the highest number of molecular targets and bioactive potentials reported.

Isothiocyanates	MIF	DHODH	TRPA1	PDE5 A	ROS1	CHRM1	EP4R	Apoptosis agonist	CYP2E1 inhibitor
Benzyl isothiocyanate	x		x	x	x	x	x		
Allyl isothiocyanate	x		x		x		x	x	
Phenethyl isothiocyanate	x		x	x	x	x	x		
Phenyl isothiocyanate		x		x	x	x	x		
4-Isothiocyanatobut-1-Ene			x		x	x	x		x
5-Isothiocyanatopent-1-ene			x		x		x	x	x
7-Isothiocyanatohept-1-ene			x		x	x	x		x
Iberin					x	x	x	x	x
Ethyl isothiocyanate				x	x	x	x	x	

MIF: Macrophage migration inhibitory factor; DHODH: Dihydroorotate dehydrogenase; TRPA1: Transient receptor potential cation channel subfamily A member 1; PDE5A: Phosphodiesterase 5A; ROS1: Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS; CHRM1: Muscarinic acetylcholine receptor M1; EP4R: Prostanoid EP4 receptor.

a covalent linked in *N*-terminal Pro-1, having the isothiocyanate moiety an important electrophilic character for the covalent union with the inflammatory cytokine MIF. This work also exemplified the applications of chemoinformatics to food chemistry thus contributing to the development of *foodinformatics*.^[70]

Supporting Information

Isothiocyanates compiled of public databases (Table S1); Chemical structures of reported isothiocyanates (Compendium S1); Proportion of isothiocyanates according to their chemical skeleton by database (Figure S1); Classification of isothiocyanates according to their structure (Figure S2); Molecular properties and classification of ITCs (Table S2); Proportion of isothiocyanates according to their mutagenic and tumorigenic potential (Figure S3); Molecular targets of isothiocyanates reported by Protein Data Bank (Table S3);

Molecular targets of isothiocyanates reported by SwissTargetPrediction (Table S4); Molecular targets of isothiocyanates reported by ChEMBL (Table S5); Spectral activity prediction in PASSonline (Table S6). SMILES structures of reported isothiocyanates (SMILES_ITC.xls).

Data Availability Statement

The data that supports the findings of this study are available in the supplementary material of this article.

Acknowledgements

A.G.A is grateful to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (Mexico) for proving the PhD fellowship No. 731739.

Conflict of Interest

None declared.

References

- [1] K. Martinez-Mayorga, A. Madarriaga-Mazon, J. L. Medina-Franco, G. Maggiora, *Expert Opin. Drug Discovery* **2020**, *15*, 293–306.
- [2] E. López-López, J. Bajorath, J. L. Medina-Franco, *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *25*, 26–35.
- [3] M. Sorokina, P. Merseburger, K. Rajan, M. Yirik, C. Steinbeck, *J. Cheminf.* **2021**, *13*, 2.
- [4] M. W. Farnham, K. K. Stephenson, J. W. Fahey, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2000**, *125*, 482–488.
- [5] H. Yuan, S. Yao, Y. You, G. Xiao, Q. You, *Chin. J. Chem. Eng.* **2010**, *18*, 312–321.
- [6] B. Shofran, S. T. Purrington, F. Breidt, H. P. Fleming, *J. Food Sci.* **2006**, *63*, 621–624.
- [7] D. Kalpana Deepa Priya, R. Gayathri, G. R. Gunassekaran, S. Murugan, D. Sakthisekaran, *Pharm. Biol.* **2013**, *51*, 621–628.
- [8] W. S. Jeong, I. W. Kim, R. Hu, A. N. Kong, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 661–670.
- [9] J. K. Parker, J. S. Elmore, L. Methven, D. P. Balagiannis in *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages* Vol. 273 (Eds: J. K. Parker, J. S. Elmore, L. Methven), Woodhead Publishing, Kidlington **2015**, pp. 21.
- [10] R. Kissen, T. Gigolashvili, N. C. Bisht, in *Glucosinolates: Regulation of Biosynthesis and Hydrolysis* Vol. 11 (Eds: R. Kissen, T. Gigolashvili, N. C. Bisht) *Frontiers in Plant Science*, Lausanne **2021**, pp. 24–85.
- [11] K. G. Bedane, G. Singh, *Arkivoc.* **2015**, *6*, 206–245.
- [12] FoodDB. Web site <http://www.fooddb.ca>. Accessed: June 2021.
- [13] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [14] D. S. Wishart, Y. D. Feunang, A. C. Guo, E. J. Lo, A. Marcu, J. R. Grant, T. Sajed, D. Johnson, C. Li, Z. Sayeeda, N. Assempour, I. Iynkkaran, Y. Liu, A. Maciejewski, N. Gale, A. Wilson, L. Chin, R. Cummings, D. Le, A. Pon, C. Knox, M. Wilson, *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 1074–1082.
- [15] Molinspiration Cheminformatics free web services. Web site <http://www.molinspiration.com>. Accessed: June 2021.
- [16] SIB, Swiss Institute of Bioinformatics. Web site <http://www.swisstargetprediction.ch>. Accessed: June 2021.
- [17] T. Sander, J. Freyss, M. Von Korff, C. Rufener, *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 460–473.
- [18] D. Weininger, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1988**, *28*, 31–36.
- [19] M. Davies, M. Nowotka, G. Papadatos, N. Dedman, A. Gaulton, F. Atkinson, L. Bellis, J. P. Overington, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 612–620.
- [20] D. A. Filimonov, A. A. Lagunin, T. A. Glorizova, A. V. Rudik, D. S. Druzhilovskii, P. V. Pogodin, V. V. Poroikov, *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, *50*, 444–457.
- [21] ChileBio. Web site <https://www.chilebio.cl/>. Accessed: June 2021.
- [22] K. L. Cheung, A. N. Kong, *AAPS J.* **2010**, *12*, 87–97.
- [23] J. D. Clarke, R. H. Dashwood, E. Ho, *Cancer Lett.* **2008**, *8*, 291–304.
- [24] B. N. Liu, H. Q. Yan, X. Wu, Z. H. Pan, Y. Zhu, Z. W. Meng, Q. H. Zhou, K. Xu, *Cell Biochem. Biophys.* **2013**, *66*, 81–92.
- [25] C. Z. Qin, X. Zhang, L. X. Wu, C. Wen, L. Hu, Q. L. Lv, D. Y. Shen, H. H. Zhou, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3311–3322.
- [26] P. Gupta, B. Kim, S. H. Kim, S. K. Srivastava, *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1685–1707.
- [27] B. Xie, A. Nagalingam, P. Kuppusamy, N. Muniraj, P. Langford, B. Gyórfy, N. K. Saxena, D. Sharma, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–14.
- [28] S. H. Li, J. Fu, D. N. Watkins, R. K. Srivastava, S. Shankar, *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, *373*, 217–227.
- [29] E. Heiss, C. Herhaus, K. Klimo, H. Bartsch, C. Gerhäuser, *J. Biol. Chem.* **2001**, *24*, 32008–32015.
- [30] P. Kaboli, M. Khoshkbejari, M. Mohammadi, A. Abiri, R. Mokhtarian, R. Vazifemand, S. Amanollahi, S. Sani, M. Li, Y. Zhao, X. Wu, J. Shen, C. Cho, Z. Xiao, *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *121*, 1–17.
- [31] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [32] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68.
- [33] T. I. Oprea, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 251–264.
- [34] C. A. Lipinski, *Drug Discovery Today* **2003**, *1*, 12–16.
- [35] C. Fimognari, E. Turrini, L. Ferruzzi, M. Lenzi, P. Hrelia, *Mutat. Res.* **2012**, *750*, 107–131.
- [36] S. M. Figueiredo, S. A. V. Filho, J. A. Nogueira-Machado, R. B. Caligiorne, *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune Drug Discovery* **2013**, *7*, 213–225.
- [37] Z. Miao, F. Yu, Y. Ren, J. Yang, *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1–14.
- [38] S. B. Kntayya, M. D. Ibrahim, N. Mohd Ain, R. Iori, C. Ioannides, A. Razis, A. Faizal, *Nutrients* **2018**, *10*, 1–15.
- [39] S. Mas, A. Crescenti, P. Gassó, R. Deulofeu, R. Molina, A. Ballesta, T. W. Kensler, A. Lafuente, *Nutr. Cancer* **2007**, *58*, 107–114.
- [40] R. Munday, C. M. Munday, *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1867–1871.
- [41] S. N. Dayalan, T. Suzuki, M. Yamamoto, J. W. Fahey, A. T. Dinkova-Kostova, *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1–28.
- [42] F. Bianchini, H. Vainio, *Drug Metab. Rev.* **2004**, *36*, 655–667.
- [43] S. N. Dayalan, L. Brodziak-Jarosz, C. Gerhäuser, A. T. Dinkova-Kostova, in *Natural Products for Cancer Chemoprevention*. Vol. 1 (Eds: Pezzuto, J. M., & Vang, O.) Springer, Switzerland **2020**, pp. 271–310.
- [44] S. C. Dong, H. H. Sha, X. Y. Xu, T. M. Hu, R. Lou, H. Li, J. Z. Wu, C. Dan, J. Feng, *Drug Des. Dev. Ther.* **2018**, *23*, 3535–3547.
- [45] N. Sánchez-Cruz, J. L. Medina-Franco, *J. Chem. Inf. Model.* **2021**, *61*, 1550–1554.
- [46] J. B. Bilborrow, E. Doherty, P. V. Tilstam, R. Bucala, *Expert Opin. Ther. Targets.* **2019**, *23*, 733–744.
- [47] T. Calandra, T. Roger, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 791–800.
- [48] A. Burger-Kentischer, H. Goebel, R. Seiler, G. Fraedrich, H. E. Schaefer, S. Dimmeler, R. Kleemann, J. Bernhagen, C. Ihling, *Circulation.* **2002**, *105*, 1561–1566.
- [49] C. Herder, H. Kolb, W. Koenig, B. Haastert, S. Müller-Scholze, W. Rathmann, R. Holle, B. Thorand, H. E. Wichmann, *Diabetes Care.* **2006**, *29*, 368–371.
- [50] M. Tomiyasu, I. Yoshino, R. Suemitsu, T. Okamoto, K. Sugimachi, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 3755–3760.
- [51] H. Lee, H. Rhee, H. J. Kang, H. S. Kim, B. S. Min, N. K. Kim, H. Kim, *Am. J. Clin. Pathol.* **2008**, *129*, 772–779.
- [52] K. K. Brown, F. H. Blaikie, R. A. J. Smith, J. D. A. Tyndall, H. Lue, J. Bernhagen, C. C. Winterbourn, M. B. Hampton, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 32425–32433.
- [53] G. V. Crichlow, C. Fan, C. Keeler, M. Hodsdon, E. J. Lolis, *Biochemistry.* **2012**, *51*, 7506–7514.
- [54] A. V. Sokolov, L. A. Dadinova, M. V. Petoukhov, G. Bourenkov, K. M. Dubova, S. V. Amarantov, V. V. Volkov, V. A. Kostevich,

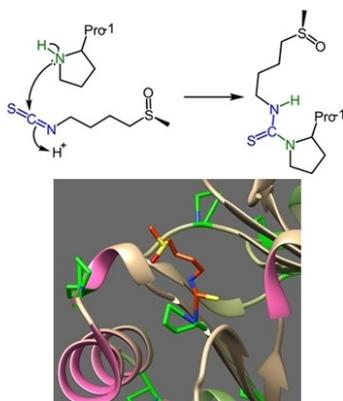
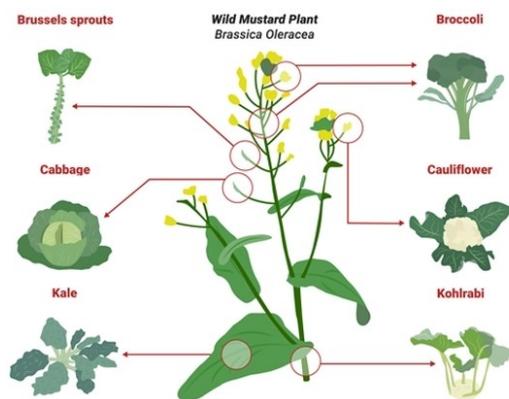
- N. P. Gorbunov, N. A. Grudinina, V. B. Vasilyev, V. R. Samygina, *Biochemistry (Mosc.)* **2018**, *83*, 701–707.
- [55] E. S. Spencer, E. J. Dale, A. L. Gommans, M. T. Rutledge, C. T. Vo, Y. Nakatani, A. B. Gamble, R. A. J. Smith, S. M. Wilbanks, M. B. Hampton, J. D. A. Tyndall, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *26*, 501–510.
- [56] R. A. G. Reis, F. A. Calil, P. R. Feliciano, M. P. Pinheiro, M. C. Nonato, *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *15*, 175–191.
- [57] J. T. Madak, A. Bankhead, C. R. Cuthbertson, H. D. Showalter, N. Neamati, *Pharmacol. Ther.* **2019**, *195*, 111–131.
- [58] A. R. Coelho, P. J. Oliveira, *Eur. J. Clin. Invest.* **2020**, *50*, 1–5.
- [59] E. J. Meents, C. I. Ciotu, M. J. M. Fischer, *J. Neurophysiol.* **2019**, *1*, 427–443.
- [60] W. S. Ahmed, A. M. Geethakumari, K. H. Biswas, *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *134*, 1–8.
- [61] M. Jovani, A. T. Chan, *Gastroenterology.* **2019**, *157*, 602–604.
- [62] S. Vecchiarelli, C. Bennati, *Future Oncol.* **2018**, *14*, 3–17.
- [63] J. Wess, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *44*, 423–450.
- [64] M. Ishii, Y. Kurachi, *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 3573–3581.
- [65] V. Konya, G. Marsche, R. Schuligoi, A. Heinemann, *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 485–502.
- [66] Y. Zhang, Y. Daaka, *Blood.* **2011**, *118*, 5355–5364.
- [67] N. Sánchez-Cruz, J. L. Medina-Franco, *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 8208–8220.
- [68] M. Lozano, M. C. Ayuso, M. J. Bernalte, M. I. García, M. T. Hernández, M. C. Vidal, J. A. González, J. García, R. M. García, *Vida Rural.* **2007**, *242*, 44–47.
- [69] M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas, P. Velasco, *Molecules.* **2010**, *16*, 251–280.
- [70] K. Martinez-Mayorga, J. L. Medina-Franco (eds.). *FoodInformatics: Applications of Chemical Information to Food Chemistry*, Springer, New York, 2014. DOI: 10.1007/978-3-319-10226-9.

Received: July 21, 2021

Accepted: July 22, 2021

Published online on ■■■, ■■■■

RESEARCH ARTICLE



A. Guerrero-Alonso, M. Antunez-Mojica*, J. L. Medina-Franco*

1 – 15

Cheminformatic Analysis of Isothiocyanates: Their Impact in Nature and Medicine



DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **Estudio químico, quimioinformático y actividad citotóxica de los vegetales crucíferos *Brassica oleracea* L. var. *italica* (brócoli) y var. *sabellica* (kale)**, que presenta la alumna **Araceli Guerrero Alonso (10024355)** para obtener el título de **Doctora en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber CIQ - UAEM	APROBADO	
Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez CIQ - UAEM	APROBADO	
Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz Fac. de Química - UAQ	APROBADO	
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez CIBIs - IMSS	APROBADO	
Dra. Leticia González Maya F. de Farmacia - UAEM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Said Razo Hernández CIDC - UAEM	APROBADO	
Dra. María Crystal Columba Palomares F. de Farmacia - UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

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

ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha:2023-05-08 23:07:12 | Firmante

HXvzne9+8V4TQuHOH6HmkpwCSRPIVj1B86dQt7HEYoxP7H9M7mAnjosg0lkl6y0MfaphXtZ7v0Z6/Hf6gls/5Haq2e9xEhij6pTLWqE0UUhPz050gxrlPc1WOXJa7BTBya2me agwaTrw3ZIEtSQqunOAJZkRtu2Fy9YXXzRN4ZMbPEcAAm4IFOnjkr3IG2XuzrfhgllGATcpiALppR+Hxz2nA5BzqYDZ97lchizuWPg1o48flylfjCjidP70h4O6anBAwhnS+zYhjR/7fX5n KA5o5epaoz4k0FwxWky2PH+s3GjllavzerwsrIEIAHOZK6V1301UcAZrmf0BjjiA==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2023-05-08 23:24:02 | Firmante

fV8lAwJeVQjtbTOVCkF75TMXdfJnUSsFcN1C2EvalYbPG6KxFeqOLrZUEyc7/M72WnQE9OsRKQfXxPah+Znp4P1ebUVWZ85iuYi/rK3scSrkaeMsUGA4ccsiQ6sZv0r7bEqkhvF2 Oe0lJtgzqZBZ8kWRtm+81heX8QAFUZLlO4jip4BGDhVhss0trYUaKGm0SCTk+qEuA+adFQaRKO3jEldDzQ4losFPnszBCinPIQwvFy3x2DIZUYVfEJbJQDirNLAJsOZ8pYD8XB FVICySdv5E1Gmqcob0p7dtp3RLx2ulo/dtedtb+xF0xNQNsnLF3xYwJTDnYGM0O6FQpu0Q==

LETICIA GONZALEZ MAYA | Fecha:2023-05-09 09:31:22 | Firmante

tT77r1j8AuPHrUirN1B5GDB1KytRflnAQAwzvuk9ID8q/ovL9/aVzGgYqJDGQqFhW5fa5iq8/ZEN29w4TCcj1fknuYJg602dQPKuMYH6iTKSdFUyJPimS7QQKogxTTJi20sncDE7 ODIMfOQtVR2W/cPbHVg7jRmLUPDAtd14YXnBrQQmsITQRKVq4scjmle33NkELA6obTgCylgLXx1xVEzf/RIU7fJ4rJYn7gi9aNPxktDO5cx5bDV2UV55xbiKbi7CRlaJkHI5gQlrdRd Yg3W2E68q0nROOqRm3KeyDhLEQmfg+Cku+/AqSUNC0zGjmU92aspo/rAleKRTpuKg==

MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha:2023-05-09 10:12:09 | Firmante

WRGtKblnF6ggI8tsQHCSbh2lwpVBlmizadsox7eiJPZxGN2znSLwxHoFNPDqu1FXgj4xSXMecoqFAqh7toH1uaTzycAJbTjgteGyBjTackWCIZ8puqjrlKnnU5wtVBjRLWcCIDsziNN RubBO0N3R9KoxhyoelyxDXG3L1xSfukxDhqvsvjKHV1dmjPPqALUKfQzXrCfrPdIPZP1sLhwRmhYb4mi/bCwEhqsWWNfNFvDLRjNWqX7dE6Kw/RiRfHf1SyQBQgJCxsAyeD wRVOWyxSzycmaZuchfTiUd2zw0YxUsSL5zarXuEexr1lxHEqR7U0OmAMhsxcwY/vHXgEAq==

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2023-05-09 10:33:33 | Firmante

MC/Bmr0jaNWZl5lls/7pUquyMWD9gLVVkwMwSjzjFw0iqfeElyikCOluPpaBlitCXve0zo7Hy02TDorA9K500yKNyba3MngyVLQG3SVEXs9RCIzXePjumxC/doEltVcztzTPUI4OsUh 84s3aYaZ7yAbxvUyL917PIkiP0yrdS1GCzKnOgIH+bNjzEOup73/raovFEEDczkZQANDkh56j6m7opunXrEebicq3JsD36bJU7KSBH5BOcnoXINEMgURoxY4UTWmvdS/7+nvU B53Jyx75+lxG79d+as/8sY3N1Si+ka6ZmiAULsAu2ZQFimMvNzCzHF7HbBzVooq5T5rw==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2023-05-09 13:35:57 | Firmante

m1yETTdQxj0hOzk59yZV1RbVvJdLl8plqG75PenyU3Vkwke2Kq0radiKUJ+D8D0V47tIKGBdu2e9dLHP+0Z71A6OsDYSRECEZ9Dn0PeNj2raP4qLbySspDStzxc5appBUuopZMKxd 5Oe/AaclhXUwkDwfJ8jpbVbQ4iEKloplEM9eWLi7d8ldBfN8ct47Oe+6aiVzU4skC9DaL9PTH5YkdW/7PN4RBP81+E+IP6tAu8v13qWQS7qpiEJuyY1Sbduri+xTMKVZkr5/TTdtBkR RL7WciGm3DcCqgRBTv2rYf76vvZsh869Ho32PlJ1FV7rb0A6rQ7mDuQroi+N8zrQBQ==

SANDRA OLIMPIA MENDOZA DÍAZ | Fecha:2023-05-15 17:34:11 | Firmante

a1pVOfUQNe1U0HJ3CRacXQJmLutQ6kR/KOVQx58LnC5gF3/hqq/dVvk62cNqtd5ck3n4LQ6HyllfCnfl1BAwxA+FgYU5sga0Xf4B2kf1c43RxnBwguxGchkh0gk9FSNiUSipvO67Cfo GibrlymkydOdcwo2dTt3S1Ot/obO4pTFzmjYHf4K8QD28nDYyjk1+/9RTuy3ShLG16j1NcudXd4n5kltpD1SXsll6ZMCFZHdEyajsZPp5aq72CUmmmwOiuJdDy7nNeA7TR7fYEW TUhJsyDc1ASGfCR3RisawRehnXK3iNMINohC7qx8Ssl3UbrExA+wPbqcDQcqtAlfG==

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



nOkFEsKQU

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HNO1YAPbIFZ59DsD7P3LgOtnHesf55nH>

