

34  
203



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
DE QUIMICA  
DESARROLLO DE UN METODO GENERAL PARA  
DETERMINAR EL CONTENIDO TOTAL DE  
GLUCOSINOLATOS EN CRUCIFERAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

MA<sup>RIA</sup> DE LOS ANGELES ESPINOSA DIAZ



MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA:**

Presidente	Prof. Angela Sotelo López
Vocal	Prof. Pedro Valle Vega
Secretario	Prof. Bernardo Lucas Florentino
1er. suplente	Prof. Ma. Elena Arteaga Cruz
2do. suplente	Prof. Amanda Galvez Mariscal

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema



---

M. en C. Bernardo Lucas Florentino

Sustentante



---

María de los Angeles Espinosa Díaz

## INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
<b>GENERALIDADES</b>	
Revisión histórica	3
Características de los glucosinolatos	
Estructura	5
Presencia de los glucosinolatos en la naturaleza	8
Factores que afectan el contenido de los glucosinolatos	11
Catabolismo	13
Toxicidad	
General	18
Glucosinolatos intactos	19
Productos de hidrólisis	20
Relación entre los glucosinolatos y el bocio humano	24
Características de la tioglucosidasa	25
Métodos analíticos	
Glucosinolatos totales	27
Glucosinolatos individuales	28
Productos de hidrólisis	29
Métodos y estándares internacionales de referencia	30
Importancia del estudio de los glucosinolatos	31
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
Material vegetal utilizado	34
Método general de trabajo	36
Métodos para la determinación de glucosa y bisulfato	
Determinación de glucosa	38
Determinación de bisulfato	40
Elección y tratamiento de las muestras	41

Curva de actividad de la tioglucosidasa comercial	42
Obtención de un extracto semipurificado con actividad de tioglucosidasa	45
Comparación de la enzima comercial con el extracto semipurificado	49
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
Métodos para la determinación de glucosa y bisulfato	51
Inactivación de la enzima endógena	54
Curva de actividad de la tioglucosidasa comercial	55
Obtención de un extracto semipurificado con actividad de tioglucosidasa	60
Desarrollo del método para determinar el contenido total de glucosinolatos	65
Aplicación del método en las muestras	68
Comparación de la enzima comercial con el extracto semipurificado	69
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>72</b>

## INTRODUCCIÓN

Los glucosinolatos son un grupo de sustancias químicas que se presentan principalmente en la familia de las crucíferas y especialmente en el género *Brassica*, por ejemplo la mostaza negra (*B. nigra*), la col (*B. oleracea*) y el rábano (*B. campestris*), entre otras. A este tipo de compuestos se les ha asociado un efecto bociogénico por la liberación de isotiocianatos orgánicos o tiocianatos y, en la actualidad, se les responsabiliza de un carácter más tóxico por la liberación de nitrilos como resultado de su hidrólisis. Esta hidrólisis es catalizada por una enzima llamada tioglucosidasa, presente también en la planta.

Es por esto que la cuantificación de glucosinolatos toma importancia, y se requieren técnicas sencillas y relativamente poco costosas, para poder trabajar con un número relativamente grande de muestras. En esta tesis se propone una metodología que pretende cubrir estos requisitos.

Durante la hidrólisis de los glucosinolatos se producen estequiométricamente glucosa y bisulfato, que pueden ser utilizados para cuantificar a los glucosinolatos totales.

Precisamente en la liberación de estos dos compuestos está basada la metodología desarrollada en esta tesis. A la vez, la glucosa se consideró más confiable para su determinación en muestras vegetales.

El método propuesto consiste en llevar a cabo la hidrólisis de los glucosinolatos presentes en las muestras, y cuantificar la glucosa liberada.

Como es muy importante la adición de enzima exógena en el proceso de hidrólisis, se obtuvo un extracto semipurificado con actividad de tioglucosidasa a partir de mostaza negra, ya que, generalmente, el costo de las enzimas comerciales es muy elevado.

Finalmente, se hizo una comparación de la actividad del extracto semipurificado obtenido con la de una enzima purificada comercial.

## OBJETIVOS

Desarrollar una metodología relativamente sencilla y rápida para determinar el contenido total de glucosinolatos, que sea general para muestras vegetales. Además, tratar de obtener un extracto semipurificado con actividad de tioglucosidasa

## GENERALIDADES

### REVISIÓN HISTÓRICA

La naturaleza pungente del rábano picante y de la semilla de mostaza se conoce desde hace varios siglos, pero no fue sino hasta 1831 que se estableció una relación entre los productos que producían esta pungencia y sus precursores no volátiles, solubles en agua, ahora llamados glucosinolatos. El primer glucosinolato (subsecuentemente llamado sinigrina) fue aislado de la mostaza negra por Bussy en 1840, y en 1868 Hofmann estableció la estructura del producto derivado de la sinigrina como el 2-propenil-(o alil-) isotiocianato (1). Antes de la primera guerra mundial sólo dos glucosinolatos adicionales fueron aislados; estos son sinalbina, de la semilla de la mostaza blanca, y glucoqueirolina, de la semilla de alheli (2). La primera síntesis de un glucosinolato (sinigrina) fue llevada a cabo en 1957 por Ettlínger y Lundeen (3). Estos mismos investigadores propusieron la estructura general de los glucosinolatos que todavía se acepta en la actualidad.

Los nombres triviales de sinigrina y sinalbina fueron usados mucho antes de conocer la química de los glucosinolatos. En un sistema de nomenclatura posterior, el prefijo gluco fue ligado a una parte del nombre latino de la especie de la cual el compuesto fue aislado por primera vez. Glucoqueirolina es un ejemplo de esta nomenclatura. Un sistema más reciente se relaciona con la estructura química. En este sistema, todos los miembros de la clase son llamados glucosinolatos, al cual se le añade el prefijo que describe químicamente la parte

variable de la molécula, por ej., metilglucosinolato (metil-GS) o bencil-GS; en la tabla 1 se tienen más ejemplos.

El número de glucosinolatos provenientes de plantas identificados es más de 70. De aproximadamente 1500 especies de crucíferas conocidas, 300 ya examinadas contienen todas de uno a siete glucosinolatos. Se ha encontrado que casi todas las especies de familias relacionadas, Capparidaceae, Moringaceae, Tovariaceae, y Resedaceae, así como algunas especies de familias de plantas no relacionadas, contienen glucosinolatos.

Los glucosinolatos están siempre acompañados por un sistema enzimático capaz de hidrolizarlos, pero hay amplia evidencia de que la enzima está separada de su sustrato en la planta intacta. En un principio la enzima fue llamada mirosina o mirosinasa. Posteriormente se le dio el nombre de glucosinolasa para asemejar al nombre de glucosinolato. Sin embargo, el término recomendado por la Unión Internacional de Bioquímica es el de tioglucosidasa (tioglucósido glucohidrolasa EC 3.2.3.1)(1,2).

## CARACTERÍSTICAS DE LOS GLUCOSINOLATOS

### Estructura

Los glucosinolatos son un grupo de glucósidos en los que la molécula de glucosa está unida al aglucón por medio de un átomo de azufre. La fórmula general de los glucosinolatos es la que se presenta en la figura 1.

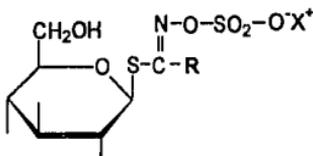


Fig. 1. Fórmula general de los glucosinolatos

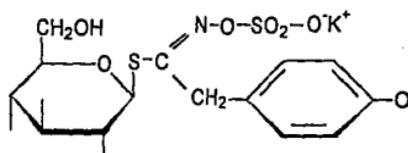
Los glucosinolatos se encuentran naturalmente en forma de sales, generalmente de potasio ( $\text{X}^+=\text{K}^+$ ) (4).

Se conocen más de cien glucosinolatos diferentes, que difieren solamente en la naturaleza de la cadena lateral R, la cual puede ser alifática o parcialmente aromática. En la mayoría de los glucosinolatos, la cadena lateral es similar a un aminoácido, con alguna pequeña modificación química, y, en algunos casos, puede ser incluso idéntica (5).

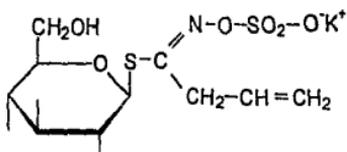
La tabla 1 incluye los glucosinolatos más comunes, con su nombre trivial (1) y en la fig. 2 se muestran las fórmulas estructurales de tres glucosinolatos muy comunes en la familia de las crucíferas.

Tabla 1. Glucosinolatos más comunes

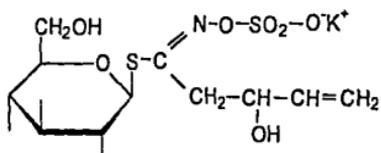
ESTRUCTURA DEL GRUPO R	NOMBRE TRIVIAL
2-Propenil	Sinigrina
3-Butenil	Gluconapina
4-Pentenil	Glucobrassicinapina
2(R)-Hidroxi-3-butenil	Progoitrina
2(S)-Hidroxi-3-butenil	<i>epi</i> -Progoitrina
2-Hidroxi-4-pentenil	Glunapoleiferina
3-Metiltiopropil	Glucoiberberina
3-Metilsulfonilpropil	Glucoiberina
3-Metilsulfonilpropil	Glucoqueirolina
4-Metiltiobutil	Glucoerucina
4-Metilsulfonilbutil	Glucoarafanina
4-Metilsulfonil-3-butenil	Glucoarafenina
4-Metilsulfonilbutil	Glucoerisolina
5-Metiltiopentil	Glucoberteroina
5-Metilsulfonilpentil	Glucoalissina
Bencil	Gluco tropaeolina
<i>p</i> -Hidroxibencil	Sinalbina
2-Feniletil	Gluconasturtiina
3-Indolilmetil	Gluco brassicina
1-Metoxi-3-indolilmetil	Neogluco brassicina



SINALBINA



SINIGRINA



PROGOITRINA

Fig. 2. Fórmulas estructurales de algunos glucosinolatos

## **Presencia de los Glucosinolatos en la Naturaleza**

Los glucosinolatos se encuentran predominantemente en la familia Cruciferae, principalmente en el género *Brassica*, así como en los géneros *Armoracia*, *Eruca*, *Lepidium* y *Raphanus*. De esta familia, muchas especies son consumidas por el hombre, ya sea como hortalizas (col, coles de bruselas, brócoli), ensaladas (rábano, berros) o como condimentos (rábano picante, mostaza) (5). En la tabla 2 se muestra el contenido de glucosinolatos en algunas plantas. Según datos de la UK Household Food Consumption and Expenditure tables, un promedio de 17.6g/persona/día de col son consumidas en el Reino Unido, además de 10.2g/persona/día de coliflor y 7.5g/persona/día de coles de bruselas (6). Esto indica que en algunas regiones, el consumo de vegetales con contenido de glucosinolatos puede tener cierta importancia. Además, algunas especies también son utilizadas ampliamente como forraje (colza, col rizada, nabo) y en alimentos balanceados para ganado (tortas residuales) provenientes de oleaginosas desengrasadas (colza, mostaza). Es importante mencionar que, de acuerdo con estudios realizados en los alimentos para ganado a base de semillas de crucíferas desengrasadas, se sabe que éstos contienen una alta calidad nutricional por los aminoácidos que componen a las proteínas que contienen, pero al tener un alto contenido de glucosinolatos, su uso puede estar limitado (7).

Tabla 2. Contenido de glucosinolatos en algunas Crucíferas

PLANTA	PARTE DE LA PLANTA	CONTENIDO DE GLUCOSINOLATOS (µg/g)*
<b>Alimentos:</b>		
Nabo ( <i>B. campestris</i> L.)	Raíz	461
Colinabo ( <i>B. campestris</i> L.)	Tallo	357
Col ( <i>B. oleracea</i> L.)	Hojas	213-1997
Col china ( <i>B. campestris</i> ssp <i>Pekinensis</i> )	Hojas, tallo	129-1511
Papaya ( <i>Carica papaya</i> L.)	Pulpa (inmadura)	650
<b>Condimentos:</b>		
Rábano picante ( <i>Armoracia lapathifolia</i> )	Raíz	5000
Mostaza blanca ( <i>Sinapis alba</i> )	Semilla	57,000-74,000
<b>Para ganado:</b>		
Colza ( <i>B. napus</i> L.)	Alimento de semilla	28,000-72,000
Crambe ( <i>Crambe abyssinica</i> )	Alimento de semilla (desengrasado)	80,000-97,000

\* µg de glucosinolatos totales por g de muestra fresca

Vegetales pertenecientes a otras familias (p. ej. Capparidaceae y Resedaceae), también pueden contener glucosinolatos como es el caso de los champiñones, cebolla y cocoa. Por ejemplo, en un estudio se encontró que champiñones (*Agaricus bisporus*) contenían bencil-glucosinato, y que este compuesto le daba al vegetal características deseables en el aroma, pero también producía algunas características indeseables como lacrimogenicidad (8).

Los glucosinolatos no se encuentran en una parte específica de la planta, sino que pueden estar en semillas, hojas, tallo o raíces, aunque generalmente se encuentran más concentrados en la semilla (9). Los glucosinolatos distribuidos en la planta se encuentran principalmente en la corteza y, en el caso de las semillas, se acumulan en el tejido embrionario (4). Normalmente, más de un glucosinolato es encontrado (hasta nueve diferentes) y la cantidad absoluta o relativa varía de acuerdo con la parte examinada de la planta y su edad fisiológica. Generalmente, en la misma planta, un glucosinolato domina sobre los demás.

El contenido de glucosinolatos varía de especie a especie, y aunque las cuentas totales sean similares, las cuentas relativas, es decir la cantidad de un glucosinolato específico con respecto a otro glucosinolato en la misma muestra, pueden ser muy variadas. Por ejemplo, dos variedades de col china (*Brassica pekinensis*) contienen aproximadamente la misma cantidad de glucosinolatos totales, 161mg/kg de peso en fresco en el caso de la variedad Mingko y 149mg/kg en el caso de la variedad Monument. Sin embargo, en el caso de los glucosinolatos individuales hay notables diferencias, como es el caso de la glucobrassicinapina, que representa el 25% de los glucosinolatos totales presentes en la variedad Mingko, mientras que en la variedad Monument, el mismo glucosinolato representa sólo un 6% del total (10). Diferencias similares se han encontrado en variedades de coliflor y coles de bruselas, entre otros (11, 12).

Es importante considerar los diferentes glucosinolatos individualmente, ya que dependiendo del contenido de cada uno de ellos en la planta, será el tipo de toxicidad que provoque.

Los glucosinolatos coexisten en la planta con su respectiva enzima, tioglucosidasa, la cual media el rompimiento de estos glucósidos en productos de considerable importancia fisiológica. Mientras algunos de estos productos pueden contribuir a sabores y aromas deseables de las hortalizas, otros son amargos, tóxicos o bociogénicos (s). Así pues, los glucosinolatos presentes en plantas cultivadas son responsables del sabor pungente de los condimentos de rábano picante y mostaza y contribuyen a las características de sabor del nabo, col y hortalizas relacionadas. En algunas de las plantas crucíferas, los glucosinolatos han sido asociados con el bocio endémico (hipotiroidismo con agrandamiento de la glándula tiroides). También se ha visto que los glucosinolatos le dan resistencia a la planta por las características antimicrobianas e insecticidas de algunos de sus productos de hidrólisis, que la protegen de los depredadores.

### **Factores que Afectan el Contenido de Glucosinolatos**

Como ya se mencionó, en diferentes variedades de una misma especie puede haber variaciones en el contenido de glucosinolatos totales, así como en el de glucosinolatos individuales.

Por otro lado, se ha mostrado que cuentas totales de glucosinolatos dentro de un cultivo particular de coles de bruselas, col y coliflor, son comparativamente estables, sin considerar otros factores que influyen el desarrollo del cultivo, pero los niveles absolutos de glucosinolatos particulares puede variar considerablemente. Esta variación ha mostrado estar influenciada por factores genéticos, el estado ontogenético de la planta y la parte de la planta examinada. Factores externos durante el crecimiento pueden también afectar los niveles de glucosinolatos. La aplicación de sulfato puede incrementar el contenido de glucosinolatos, mientras que el nitrato puede reducirlo. Los niveles también pueden estar influenciados por la naturaleza del suelo. Factores de estrés, sequía y densidad de plantas también afectan a los glucosinolatos, generalmente incrementando los niveles en respuesta a estos factores de estrés.

También se han encontrado diferencias en el contenido de glucosinolatos en especies de Brassicas silvestres con respecto a las especies cultivadas, encontrándose un mayor contenido de glucosinolatos en las primeras que en las segundas. Se observa que los glucosinolatos le dan mayor resistencia a la planta, aunque también pueden reducir la palatabilidad de la misma. En la tabla 3 se presentan algunos datos publicados (13).

Tabla 3. Contenido total de glucosinolatos en algunas especies silvestres y cultivadas de *Brassicas*

MUESTRA	GLUCOSINOLATOS TOTALES ( $\mu\text{g/g}$ de muestra fresca)
<b>Silvestres:</b>	
<i>B. oleracea</i>	
Muestra 1 (UK)	9.08
Muestra 2 (UK)	9.07
<i>B. incana</i>	
Muestra 1 (Sicilia)	11.27
Muestra 2 (Italia)	4.37
<b>Cultivadas:</b>	
<i>B. oleracea</i>	
Var. <i>italica</i>	1.56
Var. <i>botrytis</i>	0.47
Var. <i>alboglabra</i>	1.44

Cualquier proceso que dañe la integridad de las células de la planta afecta el contenido de glucosinolatos, por la iniciación de la degradación enzimática. Otros procesos como el escaldado o el cocinado, causan una pérdida de glucosinolatos por la lixiviación en el agua.

### Catabolismo

Los glucosinolatos son hidrolizados por la tioglucosidasa para producir glucosa, bisulfato y uno o varios aglucones (fig. 3). Se considera que la glucosa y el bisulfato son formados estequiométricamente, lo cual puede ser útil en el análisis cuantitativo. Los aglucones formados pueden ser tiocianatos, nitrilos o, mediante un rearrreglo de Lössen, isotiocianatos. Las condiciones de hidrólisis y

el tratamiento previo que sufre el material vegetal, así como los glucosinolatos que contiene, determinan cuál de estos productos predomina, aunque regularmente una mezcla de ellos es formada (2).

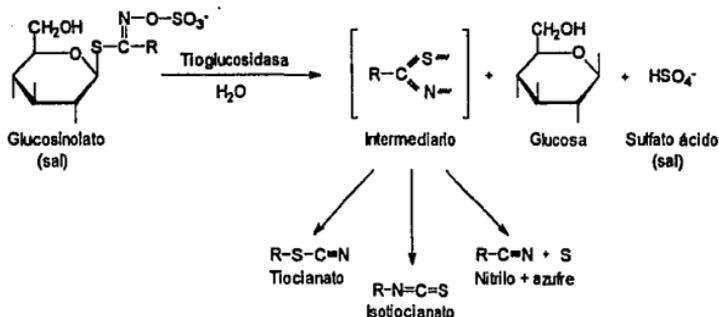


Fig. 3. Reacción general de hidrólisis de los glucosinolatos por acción de la tioglucosidasa

Basándose en los productos formados después de la hidrólisis con tioglucosidasa, los glucosinolatos pueden dividirse en tres tipos. Primeramente, representando el grupo más grande, están los glucosinolatos cuyo radical R es metil, alil, 3-butenil, 4-pentenil, 3-metilpropil, 4-metilbutil, 2-pentil, bencil o *m*-metoxibencil, que forman isotiocianatos volátiles que son compuestos pungentes. Los isotiocianatos son producidos casi exclusivamente a pH 5-7, y a

menor pH (aprox. 3) los nitrilos adquieren mayor importancia (14). Esta tendencia también es notada en el segundo grupo de glucosinolatos, que contiene un grupo hidroxilo en las posiciones  $\beta$  o  $\gamma$  en la cadena lateral. Estos forman un compuesto inestable que se cicla espontáneamente (15). Cuando disminuye el pH, se favorece la formación de hidroxinitrilos. El tercer grupo de glucosinolatos contiene un indol en la cadena lateral y cuando se lleva a cabo la hidrólisis a pH 7 se forma el 3-carbinol, el cual reacciona consigo mismo para dar lugar a diindolimetano, o si reacciona con ácido ascórbico, forma un ascorbígeno (fig. 4). Bajo condiciones más ácidas, nuevamente se favorecen los nitrilos.

La formación de nitrilos parece ser reducida por calentamiento, mientras que puede ser favorecida por la autólisis del alimento proveniente de semillas no tratadas, recientemente endurecidas, y humedecidas para la formación de una pasta a temperatura ambiente. La presencia del ion ferroso también favorece la formación del nitrilo (fig. 5).

También se ha reportado la formación de otros productos como tiocianatos orgánicos, alcoholes y epithioalcanos como productos de la hidrólisis de glucosinolatos (9).

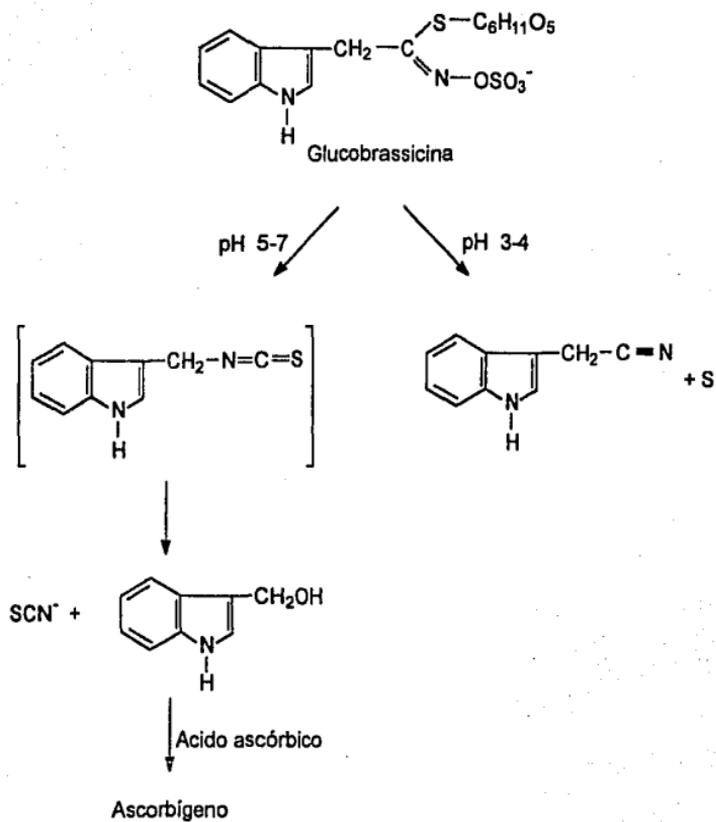


Fig. 4. Formación de un nitrilo o un ascorbígeno dependiendo del pH a partir de Glucobrassicina

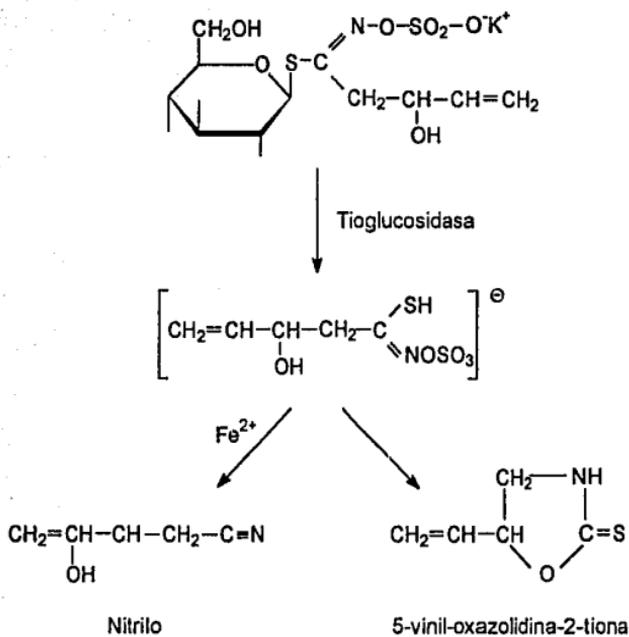


Fig. 5. Formación de dos productos de hidrólisis a partir de un mismo glucosinolato, con y sin ion ferroso

## **Toxicidad**

### **a) General**

Se han hecho varios estudios en los que se alimentaron animales como ratas, ratones, aves de corral, cerdos y rumiantes con forraje de crucíferas y oleaginosas, en los que se observaron las propiedades tóxicas y antinutricionales de los glucosinolatos.

La presencia de glucosinolatos en la dieta de animales no rumiantes ha sido ligada a un pobre crecimiento y desarrollo en cerdos y a una variedad de desórdenes en aves de corral, incluyendo poco peso en pollos, baja eficiencia en las gallinas para poner huevos, huevos de poca talla, agrandamiento de órganos, hemorragias en hígado y huevos contaminados. El bajo consumo de alimentos (que por sí mismo puede causar desórdenes fisiológicos) es un problema reducido en los rumiantes, por lo que la mayor parte de este forraje está destinado a la alimentación de ganado vacuno (1). Ocasionalmente, han sido reportados problemas de contaminación en carne y leche. Evidencias de hipotiroidismo en los becerros de vacas alimentadas con forraje que contiene colza ha sido atribuido a la presencia de compuestos bociogénicos en la leche. El hecho de que el problema pueda ser disminuido por una suplementación con yodo, sugiere que el tiocianato es el factor principal. Se observa que el valor biológico de los alimentos con alto contenido de glucosinolatos disminuye, aunque la digestibilidad no se afecta mas que en algunos casos.

Algunos expertos consideran que el contenido de glucosinolatos en colza debe ser de menor a 5mg/g de alimento desengrasado si se desea que el desarrollo del animal sea equivalente al del alimentado con soya tratada.

Se han hecho ensayos con ratas y ratones alimentados con alimentos de oleaginosas, extractos y componentes purificados. Aunque la respuesta de estos animales no puede ser extrapolada a otras especies, es en esta área donde se han elaborado los estudios toxicológicos más detallados. Se ha encontrado toxicidad en alimentos de Crambe y colza y sus extractos, especialmente aquellos que contienen nitrilos.

En cuanto a la dieta humana, Mulin y Sahasrabudhe calcularon el consumo diario promedio de glucosinolatos de 7.9mg, aunque se considera que es aún más alto. Además, algunos grupos étnicos pueden tener mayores consumos. Por ejemplo, se estimó que el 5% de la población de la Gran Bretaña puede consumir regularmente hasta 300 mg diariamente (6).

## **b) Glucosinolatos intactos**

En estudios sobre los efectos bociogénicos de varios alimentos en el hombre, resultó aparente que el efecto antitiroideo de hortalizas como el nabo eran debidos a un compuesto liberado, a partir de un precursor presente en la planta, por la hidrólisis enzimática llevada a cabo cuando las células se fraccionaban, pero que de otra forma no estaban presentes. Aunque estas plantas presentaban un efecto inhibitorio en el aprovechamiento del yodo radioactivo en el hombre, este efecto no se presentaba cuando las hortalizas eran

previamente cocinadas (16). De esta manera se encontró que la toxicidad de los glucosinolatos no es provocada por el compuesto intacto, sino por sus productos de hidrólisis.

Sin embargo, se ha demostrado que la tioglucosidasa es producida por bacterias del tracto intestinal de ratas y humanos. Algunos investigadores encontraron, *In Vivo*, a un lactobacillus (LEM 220) con actividad similar a la tioglucosidasa (17). La hidrólisis llevada a cabo por la microflora es mucho más lenta que por la tioglucosidasa de plantas. En aves de corral, la actividad de la flora intestinal se incrementa cuando los animales son alimentados con productos de colza libres de tioglucosidasa.

De aquí se deduce que los glucosinolatos pueden ser también tóxicos cuando son consumidos directamente y que su toxicidad es debida a las reacciones de hidrólisis que pueden llegar a sufrir en el tracto intestinal.

### **c) Productos de hidrólisis**

#### **Isotiocianatos**

Los isotiocianatos volátiles exhiben una gama de actividades antimicrobiana, antibacteriana y antifúngica, que han sido atribuidas a su fácil reacción con proteínas y, en particular, con los grupos sulfhidrilo biológicamente activos. También se han encontrado isotiocianatos con propiedades insecticidas y citotóxicas (1).

Aunque los isotiocianatos son irritantes y actúan como vesicantes e incluso como lacrimógenos a altas concentraciones, es difícil que, cantidades lo

suficientemente grandes para causar malfunción en la tiroides, puedan ser consumidas. Sin embargo, si son consumidos como su precursor, glucosinolato, y son lentamente formados en el tracto intestinal, pueden actuar como bociogénicos, especialmente si la dieta es baja en yodo, con respecto a los requerimientos óptimos.

Algunas plantas que producen isotiocianatos han encontrado aplicación como hortalizas, condimentos y remedios en medicina tradicional (4).

### Ion Tiocianato

Se sabe que el ion tiocianato es el factor responsable del "bocio de la col". Ya que tres precursores de este ion -glucosinolatos indólicos, isotiocianatos volátiles y nitrilos- están presentes en las brassicas, la alimentación con semillas, raíces y hojas de este grupo provocan el incremento de los niveles de tiocianato en plasma y puede causar bocio cuando el yodo en la dieta es limitado.

El ion tiocianato es mucho menos potente que otros bociógenos de las brassicas. Se requieren de 200-1000mg para inhibir el aprovechamiento de yodo radioactivo (1).

### Oxazolidina-2-tionas

Las propiedades de la oxazolidina-2-tiona de mayor significancia son aquellas relacionadas a su interferencia con la síntesis de hormonas tiroideas, cuyo efecto no se mejora con la suplementación con yodo. Se cree que las oxazolidinas-2-tionas actúan inhibiendo la incorporación de yodo en los

precursores de tiroxina e interfieren con la secreción de tiroxina (18). Esta actividad bociogénica se ha encontrado a través de la medición del reducido aprovechamiento del yodo radioactivo, o por la hiperplasia de la tiroides después de alimentar ratas con 5-viniloxazolidina-2-tiona y de otros derivados de la oxazolidina-2-tiona que presentan también esta característica, aunque con diferente fuerza.

Por otro lado, se ha visto que estos compuestos causan agrandamiento de hígado asociado con un incremento en el número de hepatocitos en la rata y se ha encontrado que la 5-viniloxazolidina-2-tiona es un potente inhibidor de la trimetilamino oxidasa hepática.

En el hombre, una sola dosis de 50-200µg de 5-viniloxazolidina-2-tiona causa la inhibición del yodo radioactivo aprovechado (un indicador relativamente poco sensible de la disfunción de la tiroides) en 24h (19). Otras oxazolidinas-2-tionas tienen actividad antitiroidea similar.

### Nitrilos

De los productos comunes de hidrólisis de los glucosinolatos, éstos son los más tóxicos (tienen hasta ocho veces la toxicidad aguda de la goitrina en ratones) (20), y causan lesiones patológicas en hígado y riñones, aunque no se presentan efectos tiroideos en ratas (2). Ratas alimentadas a niveles mayores a 300mg/kg de dieta por 90 días presentaron disminución en el peso de órganos y fueron notadas lesiones dosis-dependientes en hígado, páncreas y riñón. También se ha observado necrosis renal. Aún no se conoce bien el mecanismo que provoca

estos efectos, ya que pueden ser causados por los mismos nitrilos, sus productos de oxidación o un metabolito tóxico, como el cianuro. La gran toxicidad de algunas plantas puede ser atribuida a la gran producción de 1-ciano-2-hidroxi-3-buteno y epitionitrilos en el alimento crudo.

También se está buscando la relación entre los glucosinolatos y el problema de hemorragias en hígado que ha sido reportado en algunas razas de gallinas alimentadas con colza.

Algunos autores han atribuido el bajo desarrollo de animales alimentados con preparados de oleaginosas del género *brassica* a la presencia de nitrilos.

En cuanto al género humano, no han sido reportado estudios en los que se analicen estos efectos provenientes de crucíferas consumidas por el hombre bajo condiciones normales.

### Productos Indólicos

Los glucosinolatos indólicos están implicados en una enfermedad de las brassicas (clubroot), probablemente por la formación de auxinas (9).

Productos derivados de los glucosinolatos han mostrado que inhiben la germinación y que tienen una actividad antifúngica.

El consumo de col de bruselas y de col tiene un efecto en el metabolismo de algunos fármacos (antipirina y fenacetina) en humanos y se sugiere que la dieta puede tener un efecto importante en la variabilidad de la respuesta a los fármacos.

La formación de ascorbígenos a partir de glucosinolatos indólicos (fig. 4) es un factor antinutricional por la competencia que se establece por el ácido ascórbico, ya que esto provoca un menor aprovechamiento de este nutriente.

#### **d) Relación entre los Glucosinolatos y el Bocio Humano**

Del bocio humano, sólo aproximadamente el 4% puede ser debido a causas diferentes a la deficiencia en yodo. Estas otras causas son generalmente una serie de factores que interactúan para dar lugar a la enfermedad y que varían caso con caso. En algunas áreas del mundo, las crucíferas consumidas como parte de la dieta pueden ser uno de estos factores. Los únicos tipos de bocio relacionados a los glucosinolatos son aquellos asociados con hipotiroidismo.

Parece probable que el consumo de grandes cantidades de col u hortalizas relacionadas causen bocio. En particular, el consumo de estas hortalizas puede contribuir a la relativamente alta incidencia de esta enfermedad en áreas del mundo donde el contenido de yodo en la dieta es bajo (2).

Con todo esto se puede decir que el consumo de alimentos que contienen glucosinolatos no causa por sí mismo el bocio, sino que puede ser un factor que coadyuve a la incidencia de esta enfermedad, considerando otros factores, principalmente la deficiencia en yodo en la dieta.

Los estudios llevados a cabo para determinar la relación entre el consumo de crucíferas y el bocio se han desarrollado en animales como ratas y pollos, pero, como la respuesta antitiroidea varía con las especies y no es fácil llevar a cabo una extrapolación, las pruebas deben llevarse a cabo también en humanos.

## CARACTERÍSTICAS DE LA TIOLUCOSIDASA

Hasta donde se sabe, todas las plantas que contienen glucosinolatos también contienen tioglucosidasa, aunque la enzima y el sustrato están separadas en el tejido intacto, y sólo se ponen en contacto después de la ruptura celular.

Aunque se ha propuesto lo contrario, ahora se sabe que la tioglucosidasa actúa sola. Enzimas de varias especies de plantas han sido examinadas y se han encontrado de múltiples formas (isoenzimas). La actividad de la tioglucosidasa ha sido detectada en todas las partes de las plantas que contienen glucosinolatos. Aunque se ha encontrado que la enzima está localizada en células específicas (idioblastos), otros estudios parecen indicar que la presencia de estas células no es esencial para la actividad de la tioglucosidasa.

Las enzimas que han sido caracterizadas son glicoproteínas con un grupo sulfhidrilo en el sitio activo. Se han encontrado variaciones en los pesos moleculares de las tioglucosidasas aisladas de diferentes especies, siendo el más alto el de la *Wasabia japonica* (580 000) y los más bajos los de la mostaza (120 000-150 000) (21) y colza (135 000).

Se ha encontrado que la enzima consta de dos cadenas peptídicas de aproximadamente el mismo peso molecular. En el caso de la tioglucosidasa de la colza, cada cadena tiene un peso molecular de 65,000 con un contenido de carbohidratos del 14% (22). En otros estudios de la tioglucosidasa de la colza se

determinó que el peso molecular era de 154,000 y el de cada subunidad de 77,000, con un contenido de carbohidratos que variaba del 9.6 al 18.9 % (23).

Las dos unidades que componen a la tioglucosidasa son una glucosidasa y una tiosulfatasa. Ambas unidades empiezan a actuar en el sustrato al mismo tiempo (24).

El pH óptimo de la enzima puede ser de 5.2-5.5 en el caso de la tioglucosidasa de la colza, mientras que el de la tioglucosidasa del rábano está entre 6.5 y 7.0. La temperatura óptima es de 37-38°C. Los iones de cobre y mercurio inhiben significativamente la actividad enzimática, pero el ácido ascórbico la mejora (25).

Considerando el efecto de la tioglucosidasa en el catabolismo de los glucosinolatos, es necesario distinguir entre la tioglucosidasa exógena (generalmente aislada de *Sinapis alba* y adicionada a los extractos de plantas a los que se les ha inactivado la enzima nativa) y la enzima endógena. Esta última puede actuar en conjunto con una variedad de cofactores naturales y algunos de los productos de hidrólisis. La tioglucosidasa exógena es utilizada en una variedad de métodos para la cuantificación de glucosinolatos vía la estimación de los productos formados como pueden ser la glucosa, bisulfato, isotiocianatos u oxazolidina-2-tionas (1).

Para la detección de la tioglucosidasa hay métodos histoquímicos que permiten análisis rápidos de un gran número de especies. Cromatografía de intercambio iónico, separación electroforética, columnas de celulosa y otros métodos han sido empleados para la detección de la enzima (4).

## MÉTODOS ANALÍTICOS

### Glucosinolatos Totales

Para determinar el contenido de glucosinolatos totales en un producto natural se puede cuantificar el ion sulfato o la glucosa formados a partir de la hidrólisis con tioglucosidasa. Hasta donde se conoce, la formación del sulfato y la glucosa son cuantitativas e independientes de las condiciones bajo las cuales el glucosinolato es hidrolizado por la tioglucosidasa.

La glucosa formada puede ser medida colorimétricamente, enzimáticamente, o, incluso, por cromatografía de gases (5). Se han utilizado sistemas basados en ensayos combinados, con hexocinasa/ATP y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa/NAD<sup>+</sup>, así como sistemas glucosa-oxidasa/peroxidasa/cromógeno (1). También se han desarrollado microprocedimientos en los cuales la cantidad de glucosa de glucosinolatos es determinada por glucosa oxidasa. Este procedimiento puede ser aplicado a muestras tan pequeñas como media semilla y puede ser útil en el desarrollo de nuevos cultivos. Otros procedimientos similares, pero para muestras más grandes de semillas, han sido desarrollados y dependen del carbón activado para remover sustancias que puedan interferir, pero no son aplicables a muestras vegetales con un alto contenido de glucosa libre. La glucosa libre puede ser separada de los glucosinolatos por retención de los glucosinolatos en una columna de intercambio iónico. Mientras están retenidos en la resina, los glucosinolatos son hidrolizados enzimáticamente en un buffer acuoso adicionado

de cloruro de metileno. La separación de las fases acuosas y de cloruro de metileno permite la determinación simultánea de glucosa y de los productos aglucón.

Otro método para cuantificar a los glucosinolatos a partir de la medición de glucosa utiliza papeles de pruebas (26).

Los glucosinolatos totales también pueden ser medidos por la titulación del  $\text{HSO}_4^-$  formado por la hidrólisis con la tioglucosidasa. Esta técnica tiene un valor restringido en el análisis de glucosinolatos por los buffers que están comúnmente presentes en mezclas aisladas a partir de plantas. El ion sulfato también puede ser cuantificado por precipitación con bario.

Otro método consiste en llevar a cabo un balance de azufre, considerando el azufre proveniente de aminoácidos azufrados (27).

Hay otros métodos como el de Thies, basado en el desarrollo de color con tetracloropaladato (1).

La cuantificación de los glucosinolatos puede ser facilitada mediante la inmovilización de la tioglucosidasa para llevar a cabo la reacción de hidrólisis (28).

### **Glucosinolatos Individuales**

Los métodos utilizados para cuantificar a los glucosinolatos individuales pueden ser divididos en aquellos que usan cromatografía de gases (CG) y los que utilizan cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El fundamento de la CG fue la observación de que los glucosinolatos pueden separarse por CG en sus

derivados trimetilsilil (15), ya que, aunque algunos han sido cristalizados (p.ej. sinalbina, sinigrina, glucocapparina, glucoiberina), en general, los glucosinolatos son difícilmente cristalizables (4). Desarrollos posteriores han involucrado la desulfación enzimática y programación de temperatura (9), el último de los cuales es necesario si se quieren separar y medir los glucosinolatos indólicos. No se han reportado métodos para el análisis de mezclas de glucosinolatos no hidrolizados. La determinación de glucosinolatos totales, sumando los glucosinolatos individuales, es comparable con la estimada por la glucosa formada. Se han encontrado problemas con la separación de los glucosinolatos indólicos durante la derivatización, y esta es una de las razones por las que presentan interés los métodos basados en HPLC.

### **Productos de hidrólisis**

Los principales productos de hidrólisis de los glucosinolatos son los isotiocianatos y las oxazolidina-2-tionas. Los primeros pueden ser medidos por CG, mientras que los últimos pueden ser analizados por HPLC (29) o por espectrofotometría (UV) (30), pero, ni la CG ni la espectrofotometría detectan los glucosinolatos indólicos.

Los glucosinolatos indólicos pueden ser determinados indirectamente midiendo el ion tiocianato formado después del tratamiento con tioglucosidasa. Los nitrilos e hidroxinitrilos son directamente analizados por CG. Los productos

de la descomposición de los glucosinolatos indólicos pueden ser monitoreados por HPLC, utilizando detección UV o fluorescencia.

Alternativamente, los isotiocianatos volátiles pueden ser destilados en amoníaco, y las tioureas resultantes pueden ser medidas por titulación con plata (argentometría). Los isotiocianatos no volátiles pueden medirse por extracción de los productos aglucón con éter, antes de ser convertidos en tioureas. La medición con UV puede ser utilizada para determinar las oxazolidina-2-tionas en la misma muestra utilizada para la determinación de isotiocianato.

Los nitrilos e hidroxinitrilos pueden ser directamente analizados por CG (31). El infrarrojo también puede ser útil en la determinación de nitrilos.

### **Métodos y Estándares Internacionales de Referencia**

Hasta el momento no hay un método internacional aceptado para la determinación de los glucosinolatos. A su vez, hay un número limitado de glucosinolatos de referencia de fuentes comerciales, aunque existen las técnicas de aislamiento de algunos glucosinolatos.

## IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS GLUCOSINOLATOS

Generalmente, se hace mayor énfasis en los posibles efectos tóxicos de los glucosinolatos sobre el agrandamiento de la tiroides asociado con tiocianatos, isotiocianatos y 5-vinil-oxazolidina-2-tiona. Sin embargo, se ha demostrado que algunos de los productos, como son los nitrilos, son tóxicos para el hígado y riñón. Los glucosinolatos deben ser estudiados tanto como bociogénicos que como fuentes de tóxicos para otros órganos. Los efectos del tipo de proceso que sufre el alimento necesitan ser evaluados porque el calentamiento u otros tratamientos dados pueden determinar qué tipo de producto aglucón es consumido (18).

Se espera el desarrollo de mejores variedades de los vegetales que contienen glucosinolatos; de hecho, ya ha sido desarrollada una colza baja tanto en ácido erúxico como en glucosinolatos.

Antes de poder juzgar los posibles efectos tóxicos derivados del uso de hortalizas de crucíferas en la dieta humana, se deben considerar los resultados de los experimentos con animales alimentados con colza o semillas relacionadas. El nivel de glucosinolatos de estos alimentos dados a los animales son generalmente varias órdenes de magnitud mayores que los vegetales comúnmente utilizados como alimentos para el hombre. Sin embargo, los condimentos sí se podrían comparar un poco más. Los experimentos en los que se alimentan animales con variedades de colza bajas en glucosinolatos deben ser

evaluadas cuidadosamente para los signos de toxicidad atribuibles a los glucosinolatos.

Se requiere conocer la composición exacta del producto alimenticio para la alimentación animal, para establecer los niveles de consumo a los cuales aparecen los efectos dañinos. También debe ser considerado el método de preparación del alimento, ya que de él pueden depender los productos de hidrólisis formados.

Las regulaciones propuestas por la FDA de nuevas variedades de vegetales que difieren significativamente en el contenido de tóxicos naturales con respecto a las variedades anteriores hacen que sea importante conocer exactamente la forma en que afectan los productos aglucón a los animales (18).

Se necesita mayor información sobre la naturaleza del sistema enzimático de la tioglucosidasa y su relación con la hidrólisis de los glucosinolatos en las diferentes especies de *Brassica*. Los productos aglucón formados por las enzimas microbianas en el tracto digestivo de animales monogástricos han sido estudiados relativamente poco, y se requieren más datos para definir los productos aglucón que se van a formar. En vista de la aparente tolerancia de los rumiantes hacia los glucosinolatos, el efecto del rumen sobre los glucosinolatos, requiere mayor investigación.

La evaluación de los productos aglucón de los glucosinolatos y sus posibles efectos crónicos y tóxicos es deseable. Si unos son potencialmente más dañinos que otros, se deben desarrollar variedades que contengan menos de los

componentes más tóxicos. En vista de la variación en el contenido de glucosinolatos de planta a planta y en las diferentes partes de la planta, se requieren considerables trabajos analíticos para establecer una línea base en el cultivo selectivo.

## PARTE EXPERIMENTAL

### MATERIAL VEGETAL UTILIZADO

Se eligieron las semillas de mostaza blanca, mostaza negra y colza como muestras vegetales (tabla 4). La semillas de mostaza negra y blanca fueron adquiridas en el mercado de Sonora, D.F. y las semillas de colza fueron donadas por la Universidad de Chapingo.

Tabla 4. Material Vegetal Utilizado y su Glucosinolato Principal

MUESTRA	NOMBRE CIENTÍFICO	GLUCOSINOLATO PRINCIPAL (2)	PM
MOSTAZA BLANCA	<i>Sinapis alba</i>	Sinalbina	463.0
MOSTAZA NEGRA	<i>Brassica nigra</i>	Sinigrina	397.0
COLZA	<i>Brassica napus</i>	Progoitrina	427.1

Cada una de las tres semillas utilizadas como muestras presenta un glucosinolato principal diferente, ya que uno de los objetivos del método es que sea general. Además, la estructura química del glucosinolato principal de cada una de las muestras es de diferente naturaleza (fig. 2): La sinalbina es un hidroxibencil, la sinigrina es un propenil y la progoitrina es un hidroxibutenil. Así pues, mientras la sinalbina tiene un residuo lateral parcialmente cíclico, los de los otros dos son alifáticos, con la diferencia de que la progoitrina tiene un grupo

hidroxilo en la posición 2 de la cadena y la sinigrina no. Al tener residuos diferentes, los productos de hidrólisis también los son.

Por otro lado, al utilizar semillas se tiene un contenido de humedad relativamente bajo, lo que permite su conservación en forma de harinas y una mejor homogeneización de la muestra, ya que muestras frescas como col, rábano, etc., presentan el problema de una baja estabilidad.

## MÉTODO GENERAL DE TRABAJO

En la fig. 6 se presenta el diagrama general de trabajo, en el que se muestran ocho bloques.

Como se muestra en el diagrama, primeramente se llevó a cabo una revisión bibliográfica, la cual fue de retroalimentación durante el desarrollo de la parte experimental de la tesis.

Ya que uno de los objetivos de la tesis es determinar el contenido total de glucosinolatos, sin importar un tipo especial de estructura química, los métodos analíticos están enfocados a determinar cuantitativamente tanto al anión bisulfato como a la glucosa, que se sabe que se liberan estequiométricamente de la hidrólisis enzimática de los glucosinolatos. Para esto se montaron metodologías relativamente rápidas y sencillas, para la cuantificación de estos dos compuestos.

Por otro lado, las muestras vegetales seleccionadas se eligieron buscando que fueran representativas en cuanto a la cantidad y tipo de glucosinolatos.

En las muestras vegetales se llevaron a cabo procesos de inactivación de la enzima endógena, ya que los productos de liberación enzimática, en los que está basada la cuantificación de glucosinolatos, pueden estar presentes en forma libre antes de que se lleve a cabo la hidrólisis, lo cual definitivamente es un problema serio en la cuantificación de glucosinolatos.

Dentro de los objetivos de la tesis está la obtención de un extracto semipurificado con actividad de tioglucosidasa, y fue necesario elaborar primero una curva de actividad de dicha enzima. Después de la obtención del extracto semipurificado, se le determinó la actividad a éste.

Finalmente, se realizó la determinación de glucosinolatos en las diferentes muestras vegetales, utilizando por un lado la enzima comercial, y por otro lado el extracto semipurificado.

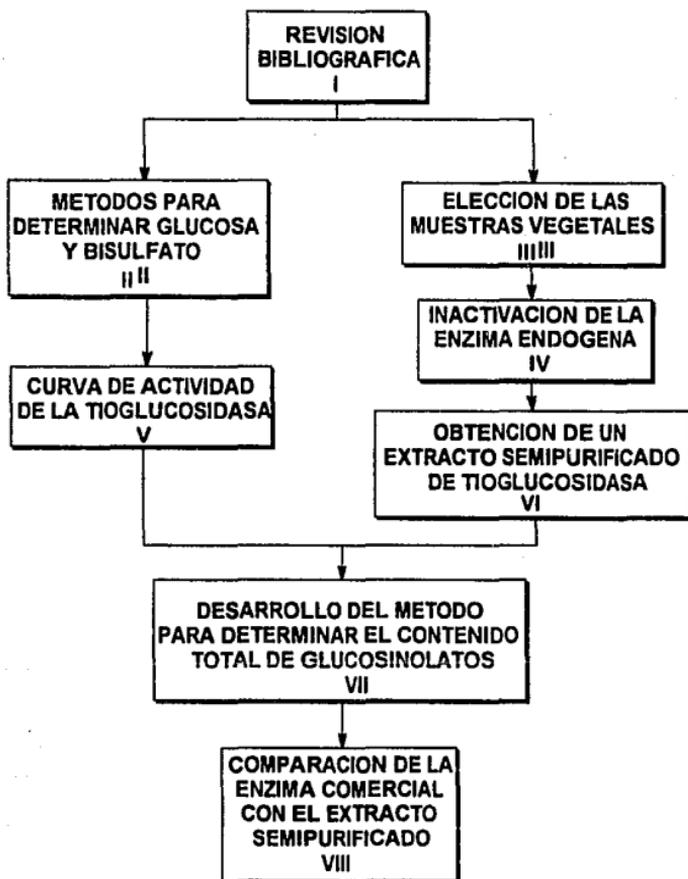


Figura 6 Diagrama General de Trabajo

## MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y BISULFATO

### Determinación de Glucosa

**Fundamento:** Una disolución de *o*-toluidina en ácido acético glacial cuando se calienta con la glucosa produce un producto coloreado con un máximo de absorción a 630nm. El grupo aldehído de la glucosa se condensa con el reactivo para formar primero glucosilamina y posteriormente un producto coloreado denominado genéricamente base de Schiff.

El método de la *o*-toluidina ha sido establecido como el más específico de los métodos no enzimáticos para la determinación de la glucosa. El método es simple, rápido y sensible a causa del color intenso que desarrolla (32).

#### **Equipo y material especial:**

Digestor TECATOR Mod. AB-20/40

Espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER Mod. 340

Tubos de rosca PYREX Mod. 9825

Tapones de rosca con cubierta de teflón

Pipeta automática LABSYSTEMS de 200-1000 $\mu$ l

#### **Reactivos\* y soluciones:**

Solución de ácido benzoico (a)

Patrón de reserva de glucosa (b)

Patrones de trabajo de glucosa (c)

Reactivo de *o*-toluidina (d)

#### Preparación de soluciones:

(a) Solución de ácido benzoico: Disolver 1.4g de ácido benzoico en 800ml de agua desionizada con calentamiento. Dejar enfriar y aforar a 1000ml.

(b) Patrón de reserva de glucosa: Disolver 1g de glucosa en 80ml de disolución de ácido benzoico y aforar a 100ml con la misma disolución.

(c) Patrones de trabajo de glucosa: Tomar alícuotas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50ml del patrón de reserva de glucosa, y aforar cada una a 50ml con ácido benzoico.

(d) Reactivo de o-toluidina: Disolver 1.5g de tiourea en alrededor de 900ml de ácido acético. Adicionar 60ml de o-toluidina y aforar a 1000ml con el ácido. Dejar el reactivo en reposo por lo menos 24 horas. Almacenar en frasco ámbar a temperatura ambiente.

\* Todos los reactivos utilizados en todos los métodos son grado analítico (R.A.).

**Procedimiento:** Se pipetea 3ml de reactivo de o-toluidina en una serie de tubos de vidrio, preferentemente con tapas roscadas forradas de teflón. Con micropipetas se añaden a los tubos 500 $\mu$ l de muestra. Para el blanco se adicionan 500 $\mu$ l de solución de ácido benzoico en vez de la muestra. Se mezcla el contenido de cada tubo, se tapan y se calientan en un digestor a 100°C durante 13 minutos. Se retiran al cabo de este tiempo y se enfrían en baño de agua helada hasta que alcancen la temperatura ambiente. Se lee la absorbancia del contenido de cada tubo frente al blanco a 630nm.

Para la elaboración de la curva patrón, se sigue el mismo procedimiento, utilizando como muestras los diferentes patrones de trabajo de glucosa y graficando concentración de glucosa contra absorbancia.

### Determinación de Bisulfato

**Fundamento:** La determinación de bisulfato se basa en las variaciones en el pH a las diferentes concentraciones de bisulfato. Al aumentar la concentración de bisulfato en la solución, aumenta la concentración del ion hidronio ( $H^+$ ), con lo cual el pH disminuye.

#### **Equipo:**

Potenciómetro CORNING Mod. 10

#### **Soluciones:**

Patrón de reserva de bisulfato (e)

Patrones de trabajo de bisulfato (f)

#### Preparación:

(e) Patrón de reserva de bisulfato: Disolver 3.78g de bisulfato de potasio en agua desionizada y aforar a 1000ml.

(f) Patrones de trabajo de bisulfato: Tomar alícuotas de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50ml del patrón de reserva de bisulfato, y aforar cada una a 50ml con agua desionizada.

**Procedimiento:** Leer el pH de cada muestra (con centésimas) en un potenciómetro previamente calibrado en escala expandida.

La curva patrón se elabora midiendo el pH de cada una de las soluciones de trabajo de bisulfato y graficando la concentración de bisulfato contra pH.

## ELECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Como ya se mencionó, las muestras se eligieron considerando que cada una contiene un glucosinolato principal diferente.

Cada una de las muestras fue primeramente molida en el molino THOMAS-WILEY con la malla de 1mm de diámetro. Posteriormente, cada muestra fue desengrasada por el método de Soxhlet (33), pesando aproximadamente 15g de muestra y utilizando hexano como disolvente. Se prefirió utilizar hexano en lugar de éter porque su manejo es más seguro sin importar que la temperatura de ebullición inactivara la enzima endógena, ya que para la determinación de glucosinolatos, va a ser necesaria la adición de enzima exógena. Por último, las muestras desengrasadas fueron molidas nuevamente, pero esta vez en el molino WEBER BROS & WHITE Mod. 5-500, utilizando la malla 024, para obtener el menor tamaño de partícula posible y, de esta manera tener un material más homogéneo.

A cada muestra se le determinó la grasa cruda durante el proceso de desengrasado, y, tanto a las muestras integrales como a las desengrasadas, se les determinó humedad por el método reportado en el AOAC (33).

## CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TIOGLUCOSIDASA COMERCIAL

**Fundamento:** La hidrólisis de sinigrina por acción de la tioglucosidasa da como resultado la liberación estequiométrica de glucosa, la cual puede ser cuantificada por diferentes métodos, que en este caso fue por reacción con o-toluidina. Dentro de un cierto rango, a mayor tiempo de reacción, mayor liberación de glucosa, teniendo un control sobre concentración de sustrato y enzima, así como del pH y temperatura.

La actividad se expresa en unidades de actividad. Una unidad internacional equivale a la cantidad de enzima capaz de catalizar la transformación de  $1\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto, bajo condiciones bien definidas. Las unidades estarán dadas en ml de solución o en mg de producto, según el estado físico. La actividad específica se expresa en unidades de enzima / mg de proteína (34); sin embargo en esta tesis se presenta la actividad específica expresada en unidades de enzima / g de proteína, con el objetivo de facilitar el manejo de datos.

### **Equipo y material especial:**

Baño de agua con reóstato GRANT

Vortex LAB-LINE Mod. 5

Pipeta automática LABSYSTEMS de 200-1000 $\mu\text{l}$

Cronómetro

### **Reactivos y soluciones:**

Acido acético glacial

Sinigrina monohidratada (SIGMA Cat. S-1647)

Tioglucosidasa (SIGMA Cat. T-4528)

Buffer de fosfatos pH 7.0 (i)

Solución de sinigrina (j)

Solución de tioglucosidasa comercial(k)

Preparación de soluciones:

(i) Buffer de fosfatos pH 7.0: Mezclar 39.0ml de una solución 0.2M de fosfato monobásico de sodio (27.8g en 1000ml) con 61ml de una solución 0.2M de fosfato dibásico de sodio (53.65g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  o 71.7g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  en 1000ml) y aforar a 200ml.

(j) Solución de sinigrina: Se pesan 20mg de sinigrina y se aforan a 20ml con buffer de fosfatos pH 7.0.

(k) Solución de tioglucosidasa comercial: Se pesan 20mg de tioglucosidasa y se aforan a 10ml con buffer de fosfatos pH 7.0.

**Procedimiento:** Con micropipeta, se adicionan 0.5ml de solución de tioglucosidasa en una serie de ocho tubos de ensaye. Se colocan los tubos en un baño de agua a 37°C. Al primer tubo se le adicionan 0.5ml de ácido acético concentrado, y posteriormente 1.0ml de solución de sinigrina; esto con el objetivo de que se inactive la enzima antes de entrar en contacto con el sustrato. Este tubo corresponde al tiempo cero de reacción.

Al segundo tubo se le adiciona 1.0ml de solución de sinigrina, midiendo con cronómetro el tiempo de reacción. A los 4 minutos exactos se para la

reacción adicionando 0.5ml de ácido acético concentrado, se saca el tubo del baño y se mezcla perfectamente el contenido del tubo utilizando un vortex.

Se sigue el mismo procedimiento del segundo tubo con los seis restantes, pero deteniendo la reacción a los 6, 8, 10, 12, 14 y 16 minutos, respectivamente.

Finalmente, de cada tubo se toma una alícuota de 0.5ml, a la cual se le determina glucosa por el método de la o-toluidina (descrito en la pág. 38).

## OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO SEMIPURIFICADO CON ACTIVIDAD DE TIOGLUCOSIDASA

Utilizando semillas de mostaza negra (*B. nigra*) como materia prima, se llevó a cabo el siguiente proceso (fig. 7), basándose en un método de purificación publicado, con algunas modificaciones (35).

La harina integral se desengrasó en un sistema de extracción Soxhlet, pesando aproximadamente 100g de muestra y utilizando como disolvente éter etílico, ya que éste tiene un punto de ebullición que asegura que no se inactiven las proteínas térmicamente, especialmente la tioglucosidasa. Se siguió el procedimiento del AOAC para llevar a cabo el desengrasado y la cuantificación de grasa cruda (33).

En seguida se llevó a cabo la extracción de la fracción de glicoproteínas, utilizando como base un método reportado (36), para lo cual se pesó la harina desengrasada del proceso anterior y se le adicionaron 400ml de solución salina de cloruro de sodio al 2.5%. Se homogeneizó a 500 r.p.m. durante 12 horas a una temperatura de 3°C.

Posteriormente se centrifugó a 3,600 r.p.m. durante 30 minutos. El residuo se lavó con la solución salina y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Ambos sobrenadantes se unieron, y el volumen total se dividió en dos fracciones. La primera fracción, de 30ml, se liofilizó a -50°C con una presión de 25mtorr. El resto del sobrenadante (300ml) se dializó en una membrana de celulosa (con capacidad para retener moléculas de PM = 12.000 o mayor (SIGMA Cat. D-9402))

contra agua desionizada, en una relación de 300ml de sobrenadante/4000ml de agua, con un recambio cada 2 horas durante 12 horas.

A continuación se centrifugó el dializado a 3,600 r.p.m. durante 30 minutos; el residuo se lavó con la solución salina y se volvió a centrifugar. Se eliminó el residuo, se unieron los sobrenadantes y el volumen final se dividió en dos partes: 60ml se liofilizaron y 300ml fueron de nuevo dializados en el mismo tipo de membrana, pero esta vez contra un buffer tris-HCl pH 7.4 más 0.5M NaCl (I). La relación fue también de 300/4000, con un recambio cada 2 horas, durante 12 horas.

Finalmente, el dializado obtenido fue liofilizado.

(I) Preparación del buffer Tris-HCl pH 7.4: Mezclar 50ml de una solución 0.2M de Tris (hidroximetil) aminometano (24.2g en 1000ml) con 41.4ml de HCl 0.2M y aforar a 200ml.

Se hicieron determinaciones de actividad, tanto a la harina integral y a la harina desengrasada como a todos los liofilizados, con el fin de verificar si había o no mejoría en la actividad de la tioglucosidasa presente. También se les hizo determinación de proteína para poder calcular la actividad específica de cada muestra.

Las determinaciones de proteína se hicieron por el método de MicroKjeldahl (33), y las de actividad se hicieron de la misma manera que para la tioglucosidasa comercial, utilizando como tiempo de reacción 5min. Para sustituir

a la solución de tioglucosidasa comercial en la determinación de actividad se hicieron las siguiente soluciones:

En el caso de la mostaza integral y desengrasada, se utilizaron 25mg en 0.5ml de buffer de fosfatos pH 7.0, y en el caso de los sobrenadantes se tomaron directamente 0.5ml o su equivalente en forma de liofilizado disuelto en buffer de fosfatos pH 7.0.

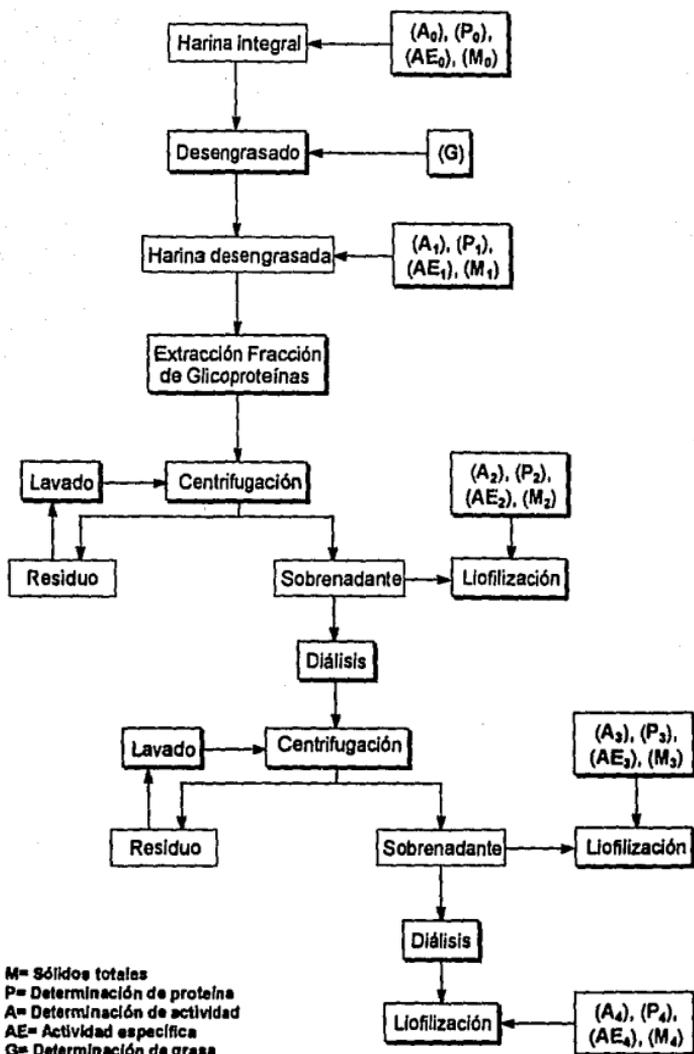


Fig. 7. Diagrama de flujo para la obtención de un extracto semipurificado con actividad de tioglucosidasa

## COMPARACION DE LA ENZIMA COMERCIAL CON EL EXTRACTO SEMIPURIFICADO

Se desarrolló la metodología para la determinación de glucosinolatos y se aplicó a las tres muestras seleccionadas, utilizando primero la solución de tioglucosidasa comercial y después el liofilizado de la primera diálisis como fuente de enzima.

La concentración del liofilizado fue la misma que en la determinación de actividad de cada una de las fracciones en la obtención del extracto semipurificado, y el tiempo de reacción fue de 15 minutos.

Finalmente se hicieron dos nuevas determinaciones de glucosinolatos en dos de las muestras. Una, aumentando el tiempo de reacción a 20 minutos y la otra, aumentando la concentración de la solución de liofilizado al equivalente en actividad específica a la solución de tioglucosidasa comercial.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan los resultados experimentales, con su respectiva discusión.

Los resultados presentados en las tablas corresponden a datos promedio, ya que todos los experimentos fueron llevados a cabo mínimo por triplicado.

Para el análisis de los datos se hicieron las pruebas estadísticas convenientes con un 95% de confianza ( $p = 0.05$ ), con ayuda del software "Statgraphics" versión 5.0; sin embargo, sólo se presenta la discusión de estos análisis en los casos en los que se juzgó necesario.

## MÉTODOS PARA DETERMINAR GLUCOSA Y BISULFATO

En primera instancia se presentan los resultados de los métodos para la determinación de glucosa y bisulfato. Las tablas 5 y 6 son los datos finales de cada uno de los métodos propuestos para la determinación de estos dos productos de hidrólisis de los glucosinolatos, donde se fijaron ciertos parámetros, como el rango de concentración de la cantidad por detectar. Las gráficas correspondientes se presentan en las figuras 8 y 9.

En la curva de calibración de glucosa se obtuvo un coeficiente de correlación lineal bastante aceptable ( $r = 0.9992$ ), mientras que para el caso del bisulfato, fue de  $-0.9471$ . Como se puede ver, la correlación lineal del método de la glucosa es bastante buena, lo mismo que su rango de detección (25-250 $\mu$ g).

Por otro lado, la determinación de bisulfato puede mostrar mayores interferencias, por la presencia de sustancias amortiguadoras en el material vegetal, como pueden ser proteínas, ácidos orgánicos, etc. Se decidió entonces utilizar la glucosa en la determinación de glucosinolatos, porque además de presentar menos interferencias, es un método rápido, sencillo y sensible, y presenta un buen coeficiente de correlación lineal en un rango relativamente amplio.

Tabla 5. Curva de calibración de glucosa

$\mu\text{g}$ de Glucosa	Absorbancia
0	0.0000
25	0.1103
50	0.2183
75	0.3000
100	0.3867
125	0.4950
150	0.6297
175	0.7163
200	0.7970
225	0.9083
250	0.9860

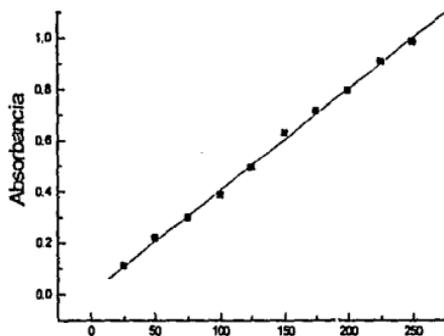


Fig. 8. Curva de calibración de glucosa

Tabla 6. Curva de calibración de bisulfato

KHSO <sub>4</sub> (mmol/l)	pH
2.78	4.39
5.56	4.07
8.34	3.83
11.12	3.72
13.90	3.56
16.68	3.50
19.46	3.44
22.24	3.37
25.02	3.31
27.80	3.27

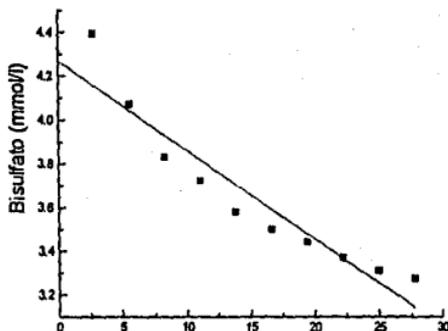


Fig. 9. Curva de calibración de bisulfato

## INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA ENDÓGENA

Como prácticamente cualquier muestra vegetal tiene glucosa libre, fue necesaria su cuantificación, para lo cual se debió inactivar a la tioglucosidasa endógena.

Entonces, se llevó a cabo un tratamiento térmico, en autoclave a 121°C durante 15 minutos, y se determinó el contenido de glucosa en las muestras. También se determinó la glucosa en las muestras sin llevar a cabo la inactivación. Los resultados se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Glucosa libre y glucosa total

Muestra*	Glucosa libre (µg/mg)	Glucosa total (µg/mg)	% Glucosa libre
Mostaza negra	19.87 ± 1.90	30.7 ± 1.31	64.72
Mostaza blanca	19.32 ± 0.90	35.91 ± 3.21	53.80
Colza	14.98 ± 1.33	23.22 ± 2.32	64.51

\*Harinas desengrasadas

Como se puede ver en la tabla 7, el contenido de glucosa libre es muy significativa, ya que representa, en todos los casos, más del 50% del total. Por esto es necesario determinar siempre la glucosa libre si se quiere determinar el contenido total de glucosinolatos a partir de la liberación de glucosa

## CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TIOGLUCOSIDASA COMERCIAL

Como no se contaba con una metodología ajustada a las condiciones de trabajo para la determinación de actividad de la tioglucosidasa comercial, fue necesario desarrollar el método de la siguiente manera:

Se mezcló una solución de sinigrina con una de tioglucosidasa, bajo ciertas condiciones de concentración, pH y temperatura a diferentes tiempos de reacción. Para establecer las condiciones se siguieron los siguientes pasos:

- Conociendo el rango de detección de la curva de calibración de la glucosa (25-250 µg de glucosa), se determinó que la concentración de sinigrina en el sistema de reacción fuera tal, que al llevarse a cabo la hidrólisis, se liberara una cantidad de glucosa equivalente a la que se detecta aproximadamente a la mitad de la curva. Entonces, se partió de una concentración de sinigrina en el sistema de 0.5mg/ml, porque para la determinación de glucosa se toma una alícuota de 0.5ml. De esta forma, si la reacción se llevara a cabo en un 100%, se tendrían:

$$250\mu\text{g Sinigrina} \times \frac{1\mu\text{mol}}{415.5\mu\text{g Sinigrina}} \times \frac{180.16\mu\text{g Glucosa}}{1\mu\text{mol}} = 108.4\mu\text{g Glucosa}$$

- Se utilizó la misma concentración de enzima que de sustrato.
- De acuerdo con lo reportado en la bibliografía, se decidió llevar a cabo la reacción a una temperatura de 37°C y a un pH de 7.0 (25).
- Para detener la reacción se adicionó ácido acético concentrado, porque se sabe que las proteínas se desnaturalizan a pH bajo, y porque además, en la

determinación de glucosa se utiliza ácido acético como reactivo, por lo que no se espera que haya interferencias.

- Para determinar el tiempo de reacción, se hicieron varias determinaciones "gruesas", encontrándose los datos de la tabla 8.

Tabla 8. Determinación del tiempo de hidrólisis de Sinigrina

TIEMPO	% HIDRÓLISIS
4 horas	100
1 hora	100
15 minutos	98
5 minutos	35

Primero, se llevó a cabo la reacción en 4 horas y como se vió que la hidrólisis de sinigrina era completa, se disminuyó el tiempo a una hora. También en este tiempo la hidrólisis de sinigrina es del 100%. Entonces, se redujo el tiempo de reacción a 15 minutos, tiempo en el cual se obtuvo, en promedio, un 98% de hidrólisis. Al disminuir el tiempo, se encontró que a los 5 minutos de reacción, la hidrólisis de sinigrina se lleva a cabo en aproximadamente un 35%. Teniendo en cuenta estos resultados, se hicieron las determinaciones en los tiempos de 4 a 16 minutos, en intervalos de dos minutos cada uno. De esto se obtuvo la curva de hidrólisis de la sinigrina (fig. 10), cuyos datos se encuentran en la tabla 9.

Tabla 9. Hidrólisis de Sinigrina por acción de la Tioglucosidasa comercial

TIEMPO (min)	% HIDRÓLISIS
0	0
4	36.24
6	51.50
8	67.52
10	79.04
12	91.65
14	97.92
16	99.46

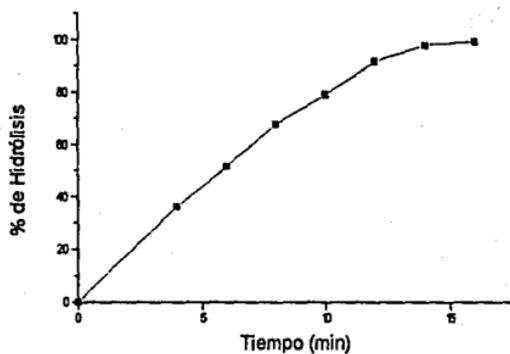


Fig. 10 Hidrólisis de Sinigrina por acción de la Tioglucosidasa comercial

Esta curva presentó un adecuado coeficiente de correlación lineal (0.97), pero por la tendencia de la curva se realizó la prueba de ajuste logarítmica, en el cual se mejoró el coeficiente de correlación (0.99).

Se puede ver, entonces, que hay una tendencia lineal hasta aproximadamente los 12 minutos de reacción, pero que a partir de este tiempo la curva tiende a presentar una asíntota.

También se calculó la actividad específica de la tioglucosidasa comercial. Los datos se presentan en la tabla 10 y la gráfica en la fig. 11.

Como se puede ver en la curva de actividad específica, ésta va disminuyendo con respecto al tiempo de reacción, encontrándose la mayor actividad específica (teórica), al tiempo cero, de 242.3. Este dato se obtiene por extrapolación de la recta, considerando que el coeficiente de correlación lineal es relativamente bueno ( $r = -0.98$ ).

Tabla 10. Actividad Específica de la Tioglucosidasa comercial

TIEMPO (min)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de proteína)
4	218.0
6	206.6
8	203.2
10	190.2
12	183.8
14	168.4
16	149.6

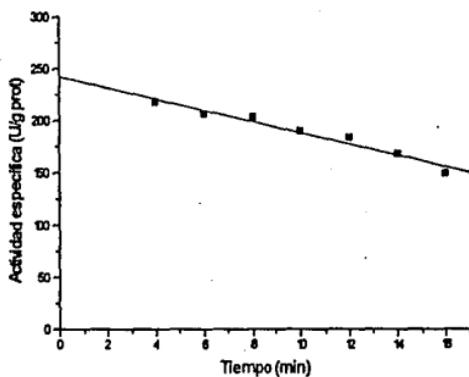


Fig. 11. Actividad Específica de la Tioglucosidasa comercial

## OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO SEMIPURIFICADO DE TIOGLUCOSIDASA

Como se puede ver en el diagrama para la obtención del extracto semipurificado de tioglucosidasa (fig. 7), se obtienen las harinas de mostaza negra, integral y desengrasada, además de tres liofilizados diferentes.

Realizando el balance de materia de las cinco fracciones del proceso, se obtuvieron los rendimientos (en base seca) que se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Rendimiento en la obtención del extracto con actividad de tioglucosidasa

	PESO (g)	RENDIMIENTO (%)
Harina Integral	98.24	100
H. Desengrasada	55.33	56.32
Liofilizado 1 (L <sub>1</sub> )	28.49	29.00
L <sub>2</sub>	7.19	7.32
L <sub>3</sub>	18.75	19.09

Como se puede ver en la tabla 11, el rendimiento va disminuyendo conforme se avanza en el proceso de purificación, hasta el liofilizado 2. Esto es lógico, porque se eliminan diferentes sólidos en cada uno de los procesos llevados a cabo. En el desengrasado se elimina la fracción lipídica de la muestra, junto con toda la materia soluble en el éter etílico utilizado como disolvente. El primer liofilizado corresponde a la extracción de glicoproteínas, y durante este procedimiento hay una disminución sensible del rendimiento porque sólo se extraen los componentes solubles en solución salina presentes en la muestra. En el liofilizado 2 disminuyó nuevamente el rendimiento por la eliminación de las moléculas de bajo peso molecular durante la primera diálisis.

Sin embargo, en el liofilizado 3 hay un aumento en el rendimiento. Esto probablemente es debido a que la segunda diálisis se llevó a cabo contra una solución Tris-HCl + NaCl, que, al contener moléculas de bajo peso molecular, produjo el incremento de sólidos totales en el interior de la membrana, por la incorporación de estas moléculas.

A estas cinco muestras se les determinó también proteína, con la finalidad de poder cuantificar la actividad de tioglucosidasa en términos de actividad específica; a la vez se pudo obtener el rendimiento del proceso en base a proteína (base seca), que se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. Determinación de proteína con su rendimiento.

	PROTEÍNA (g)	RENDIMIENTO (%)
H. Integral	24.02 ± 1.25	100
H. Desengrasada	23.92 ± 1.46	99.58
L <sub>1</sub>	12.06 ± 0.04	50.21
L <sub>2</sub>	5.35 ± 0.04	22.27
L <sub>3</sub>	5.35 ± 0.11	22.27

Según los datos presentados en esta tabla, el rendimiento de proteína se mantiene en prácticamente el 100% después del desengrasado (no hay diferencia significativa según la prueba de t de student independiente, con un 95% de confianza). En el liofilizado que corresponde al extracto (L<sub>1</sub>), hay una disminución en el contenido de proteína, llegando casi al 50%. Esto se debe a que la extracción con solución salina es relativamente selectiva, eliminándose la fracción de proteínas no solubles en esta fase.

En cuanto al liofilizado 2, también se nota una disminución en la concentración de proteínas porque se eliminan compuestos de bajo peso molecular en la diálisis, entre los cuales se encuentran algunas proteínas o polipéptidos de peso molecular menor a 12,000 (especificación de la membrana), aminoácidos libres, o compuestos nitrogenados (tomando en cuenta que la determinación de proteínas por microkjeldhal está basada en la determinación de nitrógeno), además de que se obtiene un precipitado que se elimina.

No hay variación en el contenido de proteínas entre L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub>, porque la segunda diálisis se lleva a cabo en el mismo tipo de membrana, además de que no hubo formación de ningún precipitado.

Otra determinación llevada a cabo, es la de actividad, y teniendo los datos de proteína, se determinó la actividad específica. Los datos de esta última están en la tabla 13.

Tabla 13. Actividad específica

	Actividad específica (U/g proteína)
H. Integral	2.98 ± 0.70
H. Desengrasada	5.80 ± 2.55
L <sub>1</sub>	1.48 ± 0.78
L <sub>2</sub>	16.22 ± 3.17
L <sub>3</sub>	10.85 ± 0.58

La determinación de actividad en las fracciones se llevó a cabo deteniendo la reacción a los cinco minutos, porque, como se puede ver en la fig. 11, a los cinco minutos hay una buena actividad, además de que de acuerdo con la gráfica de la fig. 10, el porcentaje de hidrólisis del glucosinolato es aproximadamente del

40%. Esto permite que pueda llevarse a cabo la determinación de glucosa dentro del rango de detección del método, considerando la glucosa libre.

De acuerdo con los datos de la tabla 13, la actividad específica aumenta después del desengrasado. Esto se puede deber a que, durante la extracción de grasa con el éter etílico, se eliminan compuestos que puedan inhibir la acción de la tioglucosidasa, o que al separar la fracción lipídica se vuelva más eficiente la reacción.

En el caso de L<sub>1</sub>, hay una sensible disminución en la actividad específica. Esto se debe a que en la extracción con solución salina, también se disuelven otros compuestos además de las glicoproteínas. Entre estos compuestos está uno muy importante -la glucosa- que, al estar en altas concentraciones, puede provocar la inhibición de la tioglucosidasa por exceso de producto.

En L<sub>2</sub>, aumenta nuevamente la actividad específica. Por un lado, se eliminó una gran proporción de la glucosa durante la diálisis, y por otro lado, hubo una semipurificación de las proteínas presentes (tabla 12).

En lo que respecta a L<sub>3</sub>, la actividad específica disminuye. En esta fracción, se mantiene constante la cantidad de proteína con respecto a L<sub>2</sub> (tabla 12), pero la cantidad de sólidos totales aumentó (tabla 11). Esto puede indicar que los componentes que se incorporan en la segunda diálisis inhiben la actividad de la tioglucosidasa.

Considerando el análisis previo de las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de obtención del extracto semipurificado con actividad de

tioglucosidasa, se decidió utilizar el liofilizado 2 (L<sub>2</sub>), correspondiente a la fracción posterior a la primera diálisis. Las características de este liofilizado se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Características del liofilizado 2

Rendimiento de peso (%)	7.32
Rendimiento de proteína (%)	22.27
Actividad específica (U/g prot)	16.22 ± 3.17

El rendimiento en peso es de 7.32. Esto indica que para obtener 7.32g de liofilizado, se tienen que pesar 100g de harina de mostaza integral y seca. En cuanto al rendimiento de proteína, se ve que sí hay un cierto grado de purificación, lo cual se ve reflejado en un aumento en la actividad específica, con respecto a las fracciones anteriores.

## DESARROLLO DEL MÉTODO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO TOTAL DE GLUCOSINOLATOS

A continuación se presenta el método propuesto para la determinación de glucosinolatos.

Glucosa total:

- 1.-Pesar de 12.5 a 25mg de muestra (harina desengrasada y finamente molida) en un tubo de ensaye y disolverla en 1ml de buffer de fosfatos pH 7.0.
- 2.-Colocar el tubo en un baño de agua a 37°C. Adicionar 0.5ml de solución de tioglucosidasa y dejar actuar a la enzima durante 15min, midiendo el tiempo con cronómetro.
- 3.-Pasado este tiempo, detener la reacción adicionando 0.5ml de ácido acético concentrado. Mezclar perfectamente utilizando un vortex.
- 4.-Tomar una alícuota de 0.5ml y adicionarlos a un tubo con tapa roscada forrada de teflón que contenga 3.0ml de reactivo de o-toluidina.
- 5.-Colocar este tubo en un digestor precalentado a 100°C y dejarlo durante 13 minutos.
- 6.-Una vez transcurrido este tiempo, sacar el tubo y enfriarlo al chorro de agua fría hasta temperatura ambiente.
- 7.-Leer absorbancia a 630nm.

### Glucosa libre

1.-Pesar de 12.5 a 25mg de muestra (harina desengrasada y finamente molida) en un tubo de ensaye y se adicionar 0.5ml de ácido acético. Mezclar perfectamente con la ayuda de un vortex.

2.-Adicionar 1ml de buffer de fosfatos pH 7.0 y 0.5ml de solución de tioglucosidasa. Homogeneizar nuevamente con el vortex.

3.-Tomar una alícuota de 0.5ml y proceder de la misma manera que para la determinación de glucosa total (pasos 4-7).

### Glucosa liberada:

La glucosa liberada se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$G.L. = \frac{G_t - G_o}{M}$$

En donde:

G.L. es la glucosa liberada en  $\mu\text{g}/\text{mg}$

$G_t$  es la glucosa total en  $\mu\text{g}$

$G_o$  es la glucosa libre en  $\mu\text{g}$

M es el peso de la muestra en mg.

Finalmente, se calcula el contenido total de glucosinolatos conforme a la fórmula siguiente:

$$\%Gs.T. = G.L. \times \frac{PM_{GsP}}{180.16} \times \frac{100}{1000}$$

En donde:

%Gs.T. es el porcentaje de glucosinolatos totales

G.L. es la glucosa liberada en  $\mu\text{g}/\text{mg}$

$PM_{GsP}$  es el peso molecular del glucosinolato principal de la muestra en g/mol

La determinación de glucosinolatos se lleva a cabo con un tiempo de reacción de 15 minutos, porque de acuerdo con la gráfica de la fig. 10, se considera que a este tiempo ya se llevó a cabo la hidrólisis del glucosinolato en más de un 98%.

## APLICACIÓN DEL MÉTODO EN LAS MUESTRAS

Se llevó a cabo la determinación de glucosinolatos totales en las tres muestras seleccionadas, conforme al método propuesto de donde se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 15. En esta misma tabla se presentan los datos reportados en la bibliografía

Tabla 15. Contenido de glucosinolatos en las muestras.  
Datos experimentales y datos teóricos

MUESTRA	Gs.T. (Experimentales) (%)	Gs.T. (Reportados) (%)
Mostaza negra	$0.69 \pm 0.18$	<sup>1</sup>
Mostaza blanca	$5.60 \pm 0.45$	$5.7-7.4$ <sup>2</sup>
Colza	$1.27 \pm 0.15$	$0.82-7.2$ <sup>3</sup>

<sup>1</sup> No se encontraron datos reportados

<sup>2</sup> (18, 26)

<sup>3</sup> (17, 18, 26, 28)

Comparando los resultados experimentales con los reportados en la bibliografía, se observa que la determinación de glucosinolatos en mostaza blanca está ligeramente abajo del rango reportado. Esto se puede deber a que no se conoce exactamente la variedad utilizada, y, como se vió en las generalidades, hay muchos factores que determinan el contenido total de glucosinolatos en las muestras. En cuanto al contenido de glucosinolatos en colza, el valor obtenido sí cae dentro del rango reportado, aunque también en el límite inferior.

## COMPARACIÓN DE LA ENZIMA COMERCIAL CON EL EXTRACTO SEMIPURIFICADO

De la determinación de glucosinolatos en las muestras, utilizando el extracto semipurificado obtenido en vez de la solución de tioglucosidasa comercial, se obtuvieron los datos de la tabla 16, incluyendo el aumento en la concentración del extracto y el aumento en el tiempo de reacción.

Tabla 16. Determinación de glucosinolatos en diferentes condiciones.

MUESTRA <sup>a</sup>	Glucosinolatos Totales (%)			
	Proceso 1 <sup>b</sup>	Proceso 2 <sup>c</sup>	Proceso 3 <sup>d</sup>	Proceso 4 <sup>e</sup>
Mostaza negra	1.20 ± 0.31	1.38 ± 0.34		
Mostaza blanca	7.54 ± 0.61	6.73 ± 0.69	6.64 ± 0.67	6.68 ± 0.34
Colza	2.05 ± 0.24	1.47 ± 0.11	1.46 ± 0.20	1.30 ± 0.42

<sup>a</sup> Harinas desengrasadas

<sup>b</sup> Proceso 1: determinación de glucosinolatos utilizando enzima comercial

<sup>c</sup> Proceso 2: determinación de glucosinolatos, utilizando el extracto semipurificado en lugar de la enzima comercial

<sup>d</sup> Proceso 3: igual que el proceso 2, pero aumentando la concentración de extracto

<sup>e</sup> Proceso 4: igual que el proceso 2, pero aumentando el tiempo de reacción con el extracto

<sup>f</sup> No se determinó

Como se puede ver en los datos presentados en la tabla 16, la determinación de glucosinolatos en mostaza negra, utilizando la enzima comercial o utilizando el extracto, da los mismos resultados (de acuerdo con el análisis estadístico por la prueba de t de student independiente, con un 95% de confianza), obteniéndose un por ciento de recuperación del 100% (considerando

la determinación de glucosinolatos totales utilizando tioglucosidasa comercial como referencia).

Sin embargo, en el caso de la mostaza blanca y la colza, sí hay diferencia significativa. El porcentaje de recuperación fue del 89% en el caso de la mostaza blanca y del 72% en el caso de la colza.

Esperando elevar el porcentaje de recuperación en la mostaza blanca y en la colza, se aumentó por un lado la concentración del extracto (proceso 3) y por otro lado, el tiempo de reacción (proceso 4). Sin embargo, los datos obtenidos no presentaron mejoría.

Es probable que el extracto requiera una mayor purificación, ya que los componentes presentes, posiblemente interfieren en la reacción. En el caso de la mostaza negra no hubo diferencia, quizás debido a que el extracto se obtuvo de la misma muestra y por lo tanto contiene la enzima específica para el sustrato, en particular del tipo de glucosinolatos (principalmente sinigrina).

## CONCLUSIONES

No obstante que la cuantificación de glucosa presenta menos interferencias que la de bisulfato (por lo cual se utilizó a la glucosa en la determinación de los glucosinolatos), las muestras vegetales seleccionadas presentaron un alto contenido de glucosa libre, cuya cuantificación es muy importante.

Fue necesario desarrollar el método de detección de actividad de la tioglucosidasa, ya que algunos parámetros no estaban bien definidos para las condiciones de trabajo, dentro de los que destaca el tiempo de reacción. Se vió que con 15 minutos fue suficiente para la casi completa hidrólisis del sustrato.

También se tuvieron que redefinir las unidades de actividad específica a unidades / g de proteína.

Se logró el objetivo de la obtención de un extracto con actividad de tioglucosidasa, con un rendimiento del 22% en base a proteína. Sin embargo, este extracto presentó una baja actividad específica, por lo que se recomienda proseguir con el proceso de purificación, para mejorarla. Lo anterior cobra relevancia, ya que al comparar el extracto con la enzima comercial, sólo en una muestra se obtuvo una recuperación aceptable.

El método propuesto reúne los objetivos de ser rápido y sencillo, con una adecuada variabilidad; sin embargo, para eliminar la interferencia del material lipóide, es conveniente trabajar con muestras desengrasadas. También se recomienda un tamaño de partícula de 0.4mm, ya que se requieren mg de muestra para la determinación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Heaney R.K., Fenwick G.R.; Identifying toxins and their effects: Glucosinolates. In: NATURAL TOXICANTS IN FOOD; Watson, D.H. (Editor). Ellis Horwood Ltd.; p.p. 76-109; Chichester, England (1987).
2. VanEtten C.M., Wolff J.A.; Natural sulfur compounds. In: TOXICANTS OCCURRING NATURALLY IN FOOD. Committee on Food Protection (Editors). National Academy of Sciences; p.p. 210-234; Washington, D.C. (1973).
3. Ettlinger M.G., Lundeen A.J.; First synthesis of a mustard oil glucoside. The enzymatic Lössen rearrangement; J. Am. Chem. Soc., 79, 1764-1765, (1957).
4. Miller, L.P.; Glycosides. In: PHYTOCHEMISTRY, Miller L.P. (Editor); Van Nostrand Reynold Co. Vol. II; p.p. 297-375; N.Y. (1973).
5. Heaney R.K., Fenwick G.R.; Glucosinolates. In: METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS; Bergmeyer, H. U. (Editor); Vol. VI; Verlag Chemie; p.p. 208-219; Deerfield Beach, Florida (1988).
6. Sones K., Heaney R.K., Fenwick G.R.; An Estimate of the mean daily intake of glucosinolates from Cruciferous vegetables in the UK; J. Sci. Food Agric., 35, 712-720, (1984).
7. Miller R.W., VanEtten C.H., McGrew C., Wolff I.A., Jones Q.; Aminoacid composition of seed meals from forty-one species of Cruciferae; J. Agric. Food Chem., 10, 426-432, (1962).
8. MacLeod A.J., Panchasara S.D.; Volatile aroma components, particularly glucosinolate products, of cooked edible mushroom (*Agaricus bisporus*) and cooked dried mushroom; Phytochemistry, 22(3), 705-709, (1983).
9. Heaney R. K., Fenwick G. R.; The analysis of glucosinolates in *Brassica* species using gas chromatography. Direct determination of the thiocyanate ion precursors, glucobrassicin and neoglucobrassicin; J. Sci. Food Agric., 31, 593-599, (1980).

10. Lewis J., Fenwick R.; Glucosinolate content of *Brassica* vegetables-chinese cabbages Pe-t'ai (*Brassica pekinensis*) and Pak-choi (*Brassica chinensis*); *J. Sci. Food Agric.*, 45, 379-386, (1988).
11. Sones K., Heaney R.K., Fenwick G.R.; Glucosinolates in *Brassica* vegetables. Analysis of twenty-seven cauliflower cultivars (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* subvar. *cauliflora* DC); *J. Sci. Food Agric.*, 35, 762-766, (1984).
12. Heaney R.K., Fenwick G.R.; Glucosinolates in *Brassica* vegetables. Analysis of 22 varieties of brussels sprout (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*); *J. Sci. Food Agric.*, 31, 785-793. (1980).
13. Mithen R.F., Lewis B.G., Heaney R.K., Fenwick G.R.; Glucosinolates of wild and cultivated *Brassica* species; *Phytochemistry*, 26(7), 1969-1973, (1987).
14. Daxenbichler M.E., VanEtten C.H., Wolff I.A.; (S)- and (R)-1-Cyano-2-hydroxy-3-butene from myrosinase hydrolysis of *epi*-progoitrin and progoitrin; *Biochemistry*, 5(2), 692-697, (1966).
15. Underhill E.W., Kirkland D.F.; Gas chromatography of trimethylsilyl derivatives of glucosinolates; *J. Chromatogr.*, 57, 47-54, (1971).
16. Greer M.A.; Isolation from rutabaga seed of progoitrin, the precursor of the naturally occurring antithyroid compound, goitrin (L-5-vinyl-2-thiooxazolidone); *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1260-1261, (1956).
17. Nugon-Baudon L., Rabot S., Wal J.M., Szylit O.; Interactions of the intestinal microflora with glucosinolates in rapeseed meal toxicity. First evidence of an intestinal *Lactobacillus* possessing myrosinase-like activity *In Vivo*; *J. Sci. Food Agric.*, 52, 547-559, (1990).
18. Tookey H.L., VanEtten C.H., Daxenbichler M.E.; Glucosinolates. In: TOXIC CONSTITUENTS OF PLANT FOODSTUFFS. Liener I.E. (Editor); Academic Press; p.p. 103-142; N. Y. (1980).
19. Astwood E.B., Greer M.A., Ettlinger, M.G.; L-5-vinyl-2-thiooxazolidone, an antithyroid compound from yellow turnip and from *Brassica* seeds; *J. Biol. Chem.*, 181, 121-130, (1949).

20. VanEtten C.H., Daxenbichler M.E., Wolff I.A.; Natural glucosinolates (thioglucosides) in foods and feeds; *J. Agric. Food Chem.*, 17, 483-488, (1969).
21. Pessina A., Thomas R.M., Palmieri S., Luisi P.L.; An improved method for the purification of myrosinase and its physicochemical characterization; *Arch. Biochem. Biophys.*, 280(2), 383-389, (1990).
22. Lonnerdal B., Janson J.C.; Myrosinases. II. Purification and characterization of a myrosinase from rapeseed (*Brassica napus*); *Biochim. Biophys. Acta*, 315(2), 421-429, (1973).
23. Bones A., Slupphaug G.; Purification, characterization and partial amino acid sequencing of  $\beta$ -thioglucosidase from *Brassica napus* L.; *J. Plant Physiol.*, 134(6), 722-729, (1989).
24. Sandberg M., Holly O.M.; Note of myrosin; *J. Biol. Chem.*, 96, 443-447, (1932).
25. Shim K.H., Kang K.S., Seo K.I.; Purification and enzymatic characteristics of myrosinase from radish; *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*, 36(2), 86-92, (1993).
26. VanEtten C.H., McGrew C.E., Daxenbichler M.E.; Glucosinolate determination in Cruciferous seeds and meals by measurement of enzymatically released glucose; *J. Agric. Food Chem.*, 22(3), 483-487, (1974).
27. McGhee J.E., Kirk L.D., Mustakas G.C.; Methods for determining thioglucosides in *Crambe abyssinica*; *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 42, 889-891, (1965).
28. Leoni O., Iori R., Palmieri S.; Immobilization of myrosinase on membrane for determining the glucosinolate content of Cruciferous material; *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2322-2326, (1991).
29. Maheshwari P.N., Stanley D.W., Gray J.I., Van de Voort, F.R.; An HPLC method for simultaneous quantitation of individual isothiocyanates and oxazolidinethiones in myrosinase digests of rapeseed meal; *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 56, 837-841, (1979).

30. Youngs C.G., Wetter L.R.; Microdetermination of the major individual isothiocyanates and oxazolidinethione in rapeseed; J. Amer. Oil Chem. Soc., 44, 551-554, (1967).
31. Daxenbichler M.E., VanElten C.H., Spencer G.F.; Glucosinolates and derived products in Cruciferous vegetables. Identification of organic nitriles from cabbage; J. Agric. Food Chem., 25, 121-124, (1977).
32. Bauer J.D.; ANÁLISIS CLÍNICOS: Métodos e interpretación; Ed. Reverté, S.A.; págs. 518-519; Barcelona (1986).
33. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists published by AOAC, Inc. Herlich, K. (Editor). 15th edition vol. I & II. Arlington 1990. p.p. 17-18, 40-62, 69-83, 1012; Arlington (1990).
34. López-Munguía C.A., Quintero R.R.; TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA. Aplicaciones en alimentos y medicina; UNAM; pág. 29-35; México, D.F. (1987).
35. Palmieri S., Iori R., Leoni O.; Myrosinase from *Sinapis alba* L.: A new method of purification for glucosinolate analysis; J. Agric. Food Chem., -34, 138-140, (1986).
36. Jaffe W., Hannig K.; Fractionation of proteins from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*); Archives of Biochemistry and Biophysics, 109, 80-91, (1965).