



*UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO*

*FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN*

**“Obtención del 3,3´-diindolilmetano en extractos de Col de
Bruselas (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*) y Brócoli
(*Brassica oleracea italica*)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A:

JOSÉ ALEJANDRO LEÓN MARTÍNEZ

Asesor

Dr. José Guillermo Penieres Carrillo

Coasesor

Dr. Benjamín Velasco Bejarano

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 2016



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

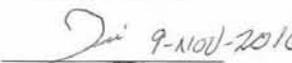
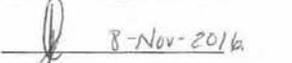
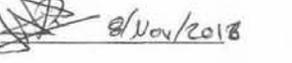
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, autoriza al alumno:
José Alejandro León Martínez
Con número de cuenta: **308131226** a presentar el: **Trabajo de Tesis**

Obtención del 3,3'-diindolimetano en extractos de Col de Bruselas (*Brassica oleracea* var. *Gemmifera*) y
Brócoli (*Brassica oleracea* italica).

Bajo la asesoría del: **Dr. José Guillermo Penieres Carrillo**
Para obtener el título de la carrera: **Licenciatura en Química**

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA Y FECHA
PRESIDENTE	Dr. René Miranda Ruvalcaba	 9-NOV-2016
VOCAL	Dr. José Guillermo Penieres Carrillo	 8-NOV-16
SECRETARIO	Dra. Yolanda Marina Vargas Rodríguez	 8-Nov-2016
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enríquez	 8-Nov-2016
2do. SUPLENTE	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	 8/Nov/2016

Atentamente notificamos su participación en la revisión y evaluación del trabajo para que en un plazo no mayor a 30 días hábiles emita su VOTO APROBATORIO.

UNAM
ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Noviembre de 2016.

I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
JEFA DEL DEPARTAMENTO

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga

AGRADECIMIENTOS

A Dios

A Dios por darme la fortaleza, amor y el carácter necesario para enfrentar las dificultades que se me presentaron y así tener un logro como éste, por darme a mi hermosa familia, por conocer a estas grandes amistades, por permitirme conocer a la persona que me ha dado muchas alegrías, por enseñarme el buen camino.

A mis padres José Luis y Guadalupe

Por su amor incondicional, que me demuestran día con día, por sus consejos, por su esfuerzo, porque gracias a su trabajo y sacrificios pude terminar la carrera de Químico, por enseñarme a luchar. Este trabajo es para ustedes.

A mis hermanos Luis, Jesús, Blanca y Eduardo

Por apoyarme a culminar esta etapa, por estar conmigo siempre y por haberme hecho pasar grandiosos momentos en mi vida.

A Luz María

Que a lo largo de mi carrera y de este tiempo juntos me has escuchado, comprendido y apoyado. Por tus “si se puede”, por tu confianza, por lo que me has brindado, por ser un pilar en mi vida.

A mis amigos

A mis amigas Carmen, Vanesa, Cinthya, Karla, Julieta y Teresa por su amistad, los momentos de diversión y pláticas interminables. A mis amigos Rafael, Francisco, Iván, Hilarión y Alan por su apoyo, su tiempo, por los momentos de diversión, por compartir conmigo su amistad. A mis compañeros de la carrera de Química (38) que juntos enfrentamos la situación académica.

A mis compañeros del L-121 Paul, Adrián, Xóchitl, Francisco, Javier, Ángeles e Isabel por sus enseñanzas, por las risas, por el tiempo compartido, por su amistad y por ser más ameno el trabajo de laboratorio.

A la Dr. Noelia

Por su apoyo en la realización de este proyecto, por su tiempo, por su amistad y por ser un ejemplo a seguir.

A mis asesores Dr. José Guillermo Penieres Carrillo y al

Dr. Benjamín Velasco Bejarano

Por su tiempo, por sus enseñanzas, por su paciencia, por las herramientas que me proporcionaron, por creer en mi para la realización de este proyecto.

A cada una de esas personas que me estuvieron acompañando durante el camino.

Y por último un gran agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por haberme brindado la mejor preparación.

Gracias.

Índice

Introducción	1
Hipótesis	2
OBJETIVOS	3
Capítulo I. Generalidades	4
1.1 Química Verde.....	4
1.2 Los 12 principios de la Química Verde.....	4
1.3 Bentonita	6
1.4 Espectro electromagnético	11
1.4.1 Radiación infrarroja	12
Capítulo II. Antecedentes	14
2.1 Síntesis de 3,3'-diindolilmetano con enfoque en la Química Verde	14
2.2 Brócoli y col de Bruselas	15
2.3 Glucosinolatos	16
2.3.1 Glucobrasicina	19
2.4 Obtención de 3,3'-diindolilmetanos a partir de plantas de la familia Brassicaceae (Cruciferae)	22
Capítulo III. Parte experimental	25
3.1 Material y equipo	25

3.2 Obtención de los extractos metanólicos de la col de Bruselas y el brócoli.....	25
3.3 Cambio de pH de la bentonita	26
3.4 Procedimiento General.....	27
Capítulo IV. Resultados y discusión	29
Conclusiones.....	45
Referencias.....	47
Anexo	52

Abreviaturas y acrónimos

BF	Brócoli fresco
CF	Col fresca
CG	Cromatografía de gases
ccf	Cromatografía en capa fina
DIM	3,3'-diindolimetano
cm	Centímetro
°C	Grados Celsius
g	Gramos
Gsl	Glucosinolatos
Gbs	Glucobrasicina
h	Horas
EMIE	Espectrometría de masas por Impacto electrónico
EtOH	Etanol
Kg	Kilogramo
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
min	Minuto
µg	Microgramos
µL	Microlitros
m	Metro
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
tr	Tiempo de retención
IR	Radiación infrarroja

Introducción

En general, los vegetales nos proporcionan una serie de nutrientes a nuestro organismo que son benéficos para nuestra salud, éste es el caso de los vegetales de la familia *Brassicaceae* (o *Cruciferae*), que contienen muchas sustancias como vitaminas, compuestos fenólicos, minerales esenciales y glucosinolatos, estos últimos de una gran importancia para esta familia de los vegetales. La glucobrasicina es un glucosinolato que se encuentra en los vegetales como la col de Bruselas (*Brassica oleracea var. gemmifera*) y el brócoli (*Brassica oleracea italica*), entre otros.

La glucobrasicina es un compuesto muy importante para el presente estudio, debido a que contiene un núcleo indólico sin sustituyentes, en este tipo de vegetales los representa la glucobrasicina, que es muy abundante en plantas de la familia *Brassicaceae*, que en el ambiente ácido del estómago da lugar a la formación del indol-3-carbinol y posteriormente se convierte en su dímero 3,3'-diindolilmetano (DIM).

El DIM es un compuesto que se ha obtenido a través de síntesis de laboratorio a partir del indol y el formaldehído, mediante una reacción de sustitución electrofílica aromática; la transformación se ha llevado empleando irradiación infrarroja como fuente de activación y bentonita como catalizador, en ausencia de disolventes, pero no se ha llegado a reportar la obtención de este compuesto a partir de extractos de los vegetales como son el brócoli o la col de Bruselas, usando bentonita y la radiación infrarroja.

Ante este panorama, el presente trabajo busca desarrollar una nueva alternativa para la obtención del DIM mediante un proceso químico, utilizando extractos de las hojas de la col de Bruselas y la inflorescencia del brócoli, con el empleo de una arcilla bentonítica como catalizador y medio de reacción, en ausencia de disolventes y energía de infrarrojo como fuente para la activación de las reacciones.

Hipótesis

Al contener la glucobrasicina un núcleo indólico, a partir de los extractos metanólicos del brócoli y la col de Bruselas, al ser irradiados con energía infrarroja como fuente de activación y en presencia de una bentonita como catalizador y medio de reacción, siguiendo principios de la Química Verde, será posible la generación del 3,3'-diindolilmetano como un nuevo método par su obtención.

OBJETIVOS

Objetivo general

Diseñar un nuevo método para la obtención del 3,3'-diindolilmetano, a partir de extractos de hojas de la col de Bruselas (*Brassica oleracea var, gemmifera*) y la inflorescencia del brócoli (*Brassica oleracea italica*), dentro del contexto de la Química Verde

Objetivos particulares

- Obtener los extractos metanólicos de las hojas de col de Bruselas y la inflorescencia del brócoli.
- Utilizar energía infrarroja como fuente de activación en las reacciones.
- Evaluar el uso de una arcilla bentonítica a pH ácido, neutro y básico, como catalizador y medio de reacción (en ausencia de disolventes en las mezclas de reacción).
- Purificar y caracterizar los productos obtenidos empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)
- Comparar la obtención del 3,3'-diindolilmetano y compuestos con núcleo indólico obtenidos de los extractos de las hojas de col de Bruselas y el brócoli, bajo las diferentes condiciones de reacción empleadas.

Capítulo I. Generalidades

1.1 Química verde

En la actualidad la industria en general se ve inmersa en un ritmo creciente de producción para abastecer las necesidades de una población mundial en continuo crecimiento. La química es una de las ciencias que contribuye en gran medida a la mejora de la calidad y al bienestar de la humanidad aportando ideas y soluciones en diferentes campos como la salud, nuevos materiales, la vida cotidiana, etc., sin embargo, los beneficios que produce no deben realizarse a expensas del medio ambiente.

Como consecuencia de esta preocupación surgió la denominada Química Verde o Química Sostenible, con el fin de minimizar la contaminación y desarrollar nuevos métodos químicos menos agresivos con el medio ambiente.

En la actualidad muchas organizaciones internacionales aplican los principios de la Química Verde, entre ellas: *Green Chemistry Enviroment* (Estados Unidos), *Royal Society Chemistry* (Reino Unido) *Japanese Chemical Innovation Institute* (Japón), que la promueven a través de la publicación de su revista *Green Chemistry*, entre otras actividades. (Cabildo, 2006).

1.2 Los 12 principios de la Química Verde

El diseño de productos y procesos benignos con el medioambiente debe de regirse por los 12 Principios de la Química Verde, propuestos por P.T. Anastas y J.C. Warner en su obra *Green Chemistry: Theory and Practice*, (Manahan, 2007) que son:

1. *Prevención de residuos*: Es mejor evitar la producción de residuos que tratar de eliminarlos después de su formación.

2. *Economía atómica*: Los métodos de síntesis deben diseñarse de manera que el producto final incorpore al máximo todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.
3. *Metodologías de síntesis de toxicidad reducida*: Los métodos de síntesis deben diseñarse para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para la especie humana como para el medio ambiente.
4. *Diseño de compuestos químicos más seguros*: Los productos químicos deben ser diseñados de manera que mantengan la eficacia de su función a la vez que presenten una escasa toxicidad.
5. *Disminución del uso de sustancias auxiliares*: Se evitará emplear sustancias que no sean imprescindibles y, en el caso de que se utilicen, deben ser inocuas (disolventes, procesos cromatográficos, etc.).
6. *Eficiencia energética*: Los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose en lo posible. Se intentará llevar a cabo los métodos de síntesis a presión y temperatura ambiente.
7. *Utilización de materias primas renovables*: Las materias primas deben ser preferiblemente renovables, en lugar de agotables, siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. *Reducción de derivados*: Se debe evitar en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).
9. *Potencialización de la catálisis*: Se deben emplear catalizadores reutilizables (lo más selectivos posibles), en lugar de reactivos estequiométricos.
10. *Diseño de productos biodegradables*: Los productos químicos se deben diseñar de tal manera que, al finalizar su función, no persistan en el medio ambiente, sino que se transformen en productos de degradación inocuos.

11. *Desarrollo de técnicas para análisis en tiempo real:* seguimiento y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. *Minimizar el potencial de accidentes químicos:* Se deben elegir sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

1.3 Bentonita

La bentonita es una arcilla de origen natural, compuesto principalmente de montmorillonita, por lo que la estructura de la bentonita puede describirse en términos de la montmorillonita. La estructura básica de la montmorillonita se compone de dos láminas tetraédricas de sílice con una lámina octaédrica de aluminio intermedia de tipo estructural 2:1 (tetraédrico-octaédrico-tetraédrico, "tot", Figura 1). La carga entre la capa octaédrica y las capas tetraédricas no está equilibrada debido a la sustitución isomorfa de Al^{3+} por Si^{4+} en las láminas tetraédricas y Mg^{2+} y Al^{3+} en las hojas octaédricas. La sustitución de estos iones de valencia inferior induce una carga negativa permanente en la estructura reticular. La carga negativa se equilibra mediante cationes tales como protones, sodio, calcio y magnesio, generalmente. Estos cationes son intercambiables, y en función del catión intercambiable la bentonita se nombra como de sodio o de calcio (Mishra, 2015).

Las fuerzas que asocian los constituyentes de las capas (cationes, oxígenos e hidroxilos) son de naturaleza iónica-covalente, de manera que el conjunto es muy estable. Por el contrario, las fuerzas intermoleculares que unen capas sucesivas son mucho menos intensas (fuerzas de Van der Waals y puentes de hidrógeno), lo que permite entender a las diferentes capas como láminas superpuestas.

Las capas se encuentran separadas por cationes débilmente hidratados (fundamentalmente Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^{1+} u otros cationes de transición, producto de otros minerales u óxidos presentes en la bentonita), que compensan las cargas negativas

resultantes de las sustituciones isomórficas, tanto tetraédricas como octaédricas, de cationes por otros con valencias diferentes. (Membrillo, 2006).

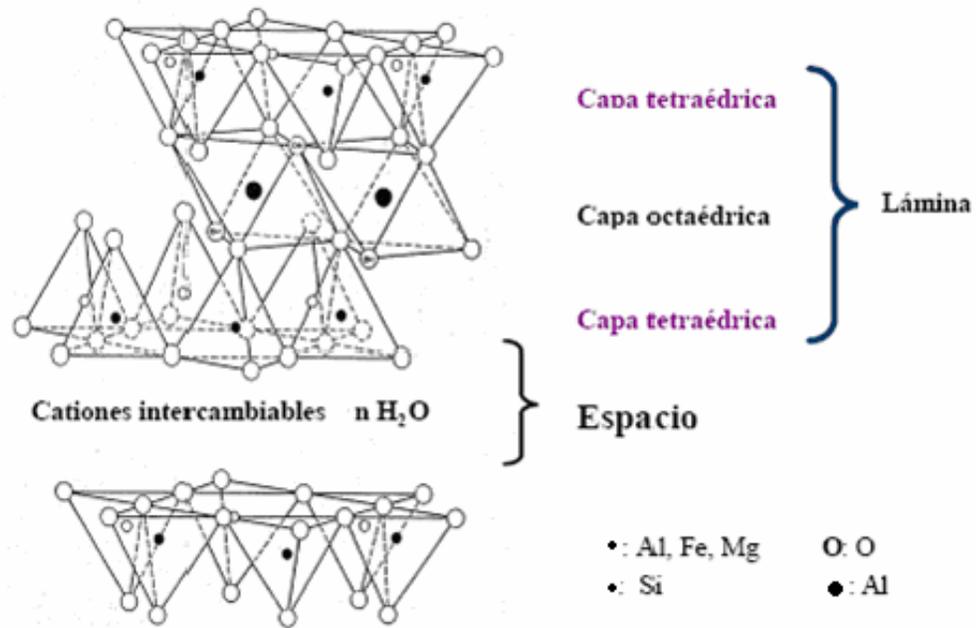


Figura 1. Estructura de la montmorillonita

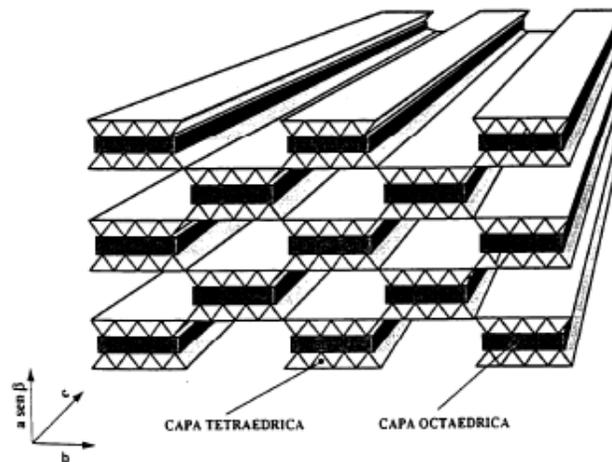


Figura 2. Conjunto de unidades "tot" que forman un conglomerado de láminas y múltiples espacios intercapa

Características de la arcilla

Las principales características de la bentonita (Vargas, 2013) son las siguientes:

- a) Tamaño de partícula: Está en el orden de micras (cuatro o menor de cuatro micras)
- b) Capacidad de intercambio iónico: Se define como la capacidad de intercambiar fácilmente iones fijados en la superficie exterior de los cristales, en los espacios interlaminares o en otros espacios de las estructuras, por otros existentes en las soluciones acuosas envolventes. Los átomos de aluminio en la estructura octaédrica, podrían ser reemplazados por otros como magnesio, cromo, manganeso, hierro, entre otros. Dado que solo se trata de especies catiónicas, esto suele llamarse como la “capacidad de intercambio catiónico”, la que, de manera más específica, se define como la suma de todos los cationes de intercambio que un mineral puede absorber a un determinado pH, que es equivalente a la medida del total de cargas negativas del mineral.
- c) Superficie específica: Se define como el área de la superficie externa más el área de la superficie interna de las partículas constituyentes por unidad de masa expresada en m²/g. En general, esta arcilla posee una elevada superficie específica.
- d) Capacidad de adsorción: Algunas arcillas encuentran su principal campo de aplicación en el sector de adsorbentes, esto debido a que la intercapa es capaz de aumentar su espesor de 1 a 20-40 nm.
- e) Puede tener diferentes clasificaciones. Una de ellas en función de su capacidad de hinchamiento en agua (misma que se deposita en la intercapa):
 - Altamente hinchables o sódicas
 - Poco hinchables o cálcicas
 - Moderadamente hinchables o intermedias

Usos y aplicaciones

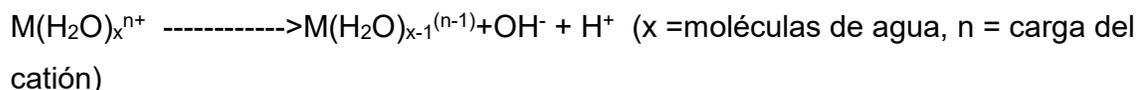
Las características de la arcilla, descritas en el apartado anterior, le han dado un lugar en muchos procesos y actividades humanas (Baños, 2011; Fernández, 2010). Algunos de los usos y aplicaciones se describen a continuación:

- a) Arenas de moldeo: Están compuestas por arena y arcilla, generalmente bentonita que proporciona cohesión y plasticidad a la mezcla, facilitando su moldeo y dándole resistencia suficiente para mantener la forma adquirida después de retirar el modelo y mientras se vierte el material fundido.
- b) Adsorbentes: Generalmente, se usa en la decoloración y clarificación de vinos, sidras, cervezas, aceites comestibles, entre otros. Tienen gran importancia en los procesos industriales de purificación de aguas que contienen diferentes tipos de aceites industriales y contaminantes orgánicos. También suele utilizarse como soporte de productos químicos como herbicidas, pesticidas e insecticidas.
- c) Ingeniería Civil: Los usos en este campo se pueden resumir en:
- Creación de membranas impermeables en torno a barreras en el suelo o como soporte de excavaciones.
 - Prevención de hundimientos, utilizando lechadas de bentonita en las paredes.
 - Protección de tuberías, al lubricar y rellenar grietas.
 - En cementos, trabajando la plasticidad y capacidad de manejo del mismo.
 - En túneles, como estabilizante y soporte.
- d) Catalizador: Son muchas las aplicaciones de las arcillas como catalizadores o soporte de catalizadores en diferentes procesos químicos, como en la desulfuración de gasolina, isomerización de terpenos, polimerización de olefinas, cracking de petróleo, entre otras. Las propiedades catalíticas de las bentonitas son resultado directo de la elevada superficie específica y centros activos ácidos de Broensted-Lowry y de Lewis.
- e) Industria farmacéutica: Se usa como excipiente en la industria farmacéutica, debido a que no es tóxica ni asimilable por el cuerpo humano. Generalmente se requiere en pequeñas cantidades, que van desde 1.5–2 % cuando se usa como adsorbente.

- f) Agricultura: Se utiliza para mejorar las propiedades de suelos arenosos o ácidos.
- g) Industria cosmética: Para la elaboración de cremas, jabones y maquillaje.
- h) Industria de los detergentes: Se usa como emulsionante. Su capacidad de intercambio iónico le da la cualidad de “ablandar” el agua.
- i) Para la fabricación de pinturas, grasas, lubricantes y plásticos.
- j) Industria alimentaria animal: Se utiliza en la peletización de alimentos, ya que su uso ha logrado grandes beneficios para los animales alimentados por este medio.
- k) Lodos de perforación: A pesar de que la formulación de los lodos de perforación en la industria petrolera o de construcción ha variado a lo largo del tiempo, la bentonita sigue siendo uno de los componentes a usar.

Actividad catalítica

La montmorillonita presenta en su estructura sitios ácidos de Lewis y de Bronsted-Lowry. Los sitios ácidos de Lewis pueden encontrarse en la superficie de la estructura, en donde el catión está expuesto y disponible para aceptar la donación de electrones provenientes de un ligante. Los sitios ácidos de Brönsted-Lowry son producto de los iones H⁺ ubicados en la zona de intercapas o por la disociación del agua, producto de los cationes metálicos intercambiables, de acuerdo al siguiente equilibrio:



El grado de acidez que proveen estos cationes metálicos depende en gran parte del radio del mismo. A mayor radio de carga del ión, éste estará más hidratado y, por lo tanto, se tendrá un ácido más fuerte. Por lo tanto, una arcilla con Al⁺³ como ion intercambiable es más fuerte como ácido de Brönsted que una arcilla con Na⁺.

Como se ha visto, el contenido de agua modifica la acidez de Bronsted-Lowry, pero también es un factor que modifica la acidez de Lewis. En función de la acidez que se desee prevalezca en la arcilla, pueden o no eliminarse las moléculas de agua previo a la utilización de la arcilla (Jiménez, 2014).

1.4. Espectro electromagnético

La naturaleza de la luz ha sido estudiada desde hace muchos años por científicos notables como Newton y Max Plank y ha sido interpretada de diversas maneras, hasta que finalmente de Broglie en 1942 unifica la teoría electromagnética y la de los “cuantos” (descrita por Maxwell y Plank), demostrando la doble naturaleza de la luz.

Las cargas eléctricas estacionarias producen campos eléctricos, las cargas eléctricas en movimiento producen campos eléctricos y magnéticos. Los cambios cíclicos en estos campos producen radiación electromagnética y de esta manera la radiación electromagnética consiste en una oscilación perpendicular de un campo eléctrico y magnético. La radiación electromagnética transporta energía de un punto a otro, esta radiación se mueve a la velocidad de la luz (siendo la luz un tipo de radiación electromagnética).

Las ondas de radiación electromagnéticas se componen de crestas y valles (convencionalmente las primeras hacia arriba y las segundas hacia abajo). La distancia entre dos crestas o valles se denominan longitud de onda (λ). La frecuencia de la onda está determinada por las veces que ella corta la línea de base en la unidad de tiempo; esta frecuencia es tan importante que las propiedades de la radiación dependen de ella y está dada en Hertz. La amplitud de onda está definida por la distancia que separa el pico de la cresta o valle de la línea de base. La energía que transporta es proporcional al cuadrado de la amplitud. La unidad de medida para expresar distancias tan pequeñas es el nanómetro (10^{-9} metros)

La luz visible, es decir, las ondas electromagnéticas para la cual el ojo humano está adaptado, se encuentra entre longitudes de onda entre los 400 nm (violeta) y 700 nm

(rojo). Como lo predijeron las ecuaciones de Maxwell, existen longitudes de onda por encima y por debajo de estos límites.

Estas formas de “luz invisible” se han encontrado y organizado de acuerdo a sus longitudes de onda en el espectro electromagnético, Figura 3.

Si las ondas electromagnéticas se organizan en un continuo, de acuerdo a sus longitudes de onda, obtenemos el espectro electromagnético en donde las ondas más largas (longitudes desde metros a kilómetros se encuentran en un extremo (ondas de radio) y las más cortas en el otro (longitudes de onda de una billonésima de metros, rayos gamma).

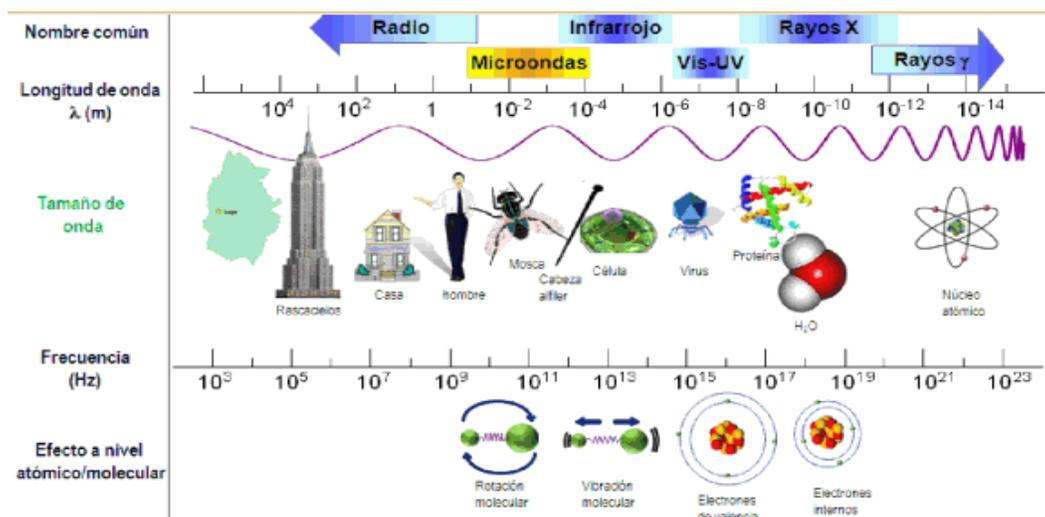


Figura 3. Espectro electromagnético, donde se resalta el lugar de las microondas.

1.4.1 Radiación infrarroja

Se sabe que la energía puede generarse de diferentes maneras; la obtención de calor ha interesado al hombre desde hace mucho tiempo, desde la creación del fuego, hasta las complejas fuentes de energía modernas. Dentro de las fuentes de energía alternas a la térmica convencional utilizadas en síntesis orgánica, se encuentra la energía infrarroja.

La radiación infrarroja del espectro electromagnético se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano, medio y lejano, así nombrados por su relación con el espectro

visible. El infrarrojo lejano (aproximadamente $400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$) se encuentra adyacente a la región de microondas, posee una baja energía y puede ser usado en espectroscopia rotacional. El infrarrojo medio (aproximadamente $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) puede ser usado para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional vibracional (espectroscopia de infrarrojo), mientras que el infrarrojo cercano ($1400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) puede excitar vibraciones armónicas (Vargas, 2013).

La radiación infrarroja es capaz de generar varios tipos de movimientos internos cuando a ella se exponen moléculas de origen orgánico. De estos movimientos, se puede hacer una clasificación en extensiones y flexiones, entendiéndose por la primera al cambio continuo en la distancia interatómica a lo largo de los ejes de enlace, pero sin presentar cambios dentro de los ángulos.

Las vibraciones dadas por flexión se caracterizan por presentar cambios en los ángulos de los enlaces y se pueden clasificar básicamente en cuatro tipos: oscilaciones en el plano, tijereteo, sacudida y torsión (figura 4). Lo anterior se traduce en un incremento energético dentro de los sistemas, lo cual favorece la ruptura y formación de enlaces, además de la producción de calor y, por consiguiente, la elevación de la temperatura de los sistemas expuestos a la energía infrarroja (Gutiérrez, 2000).

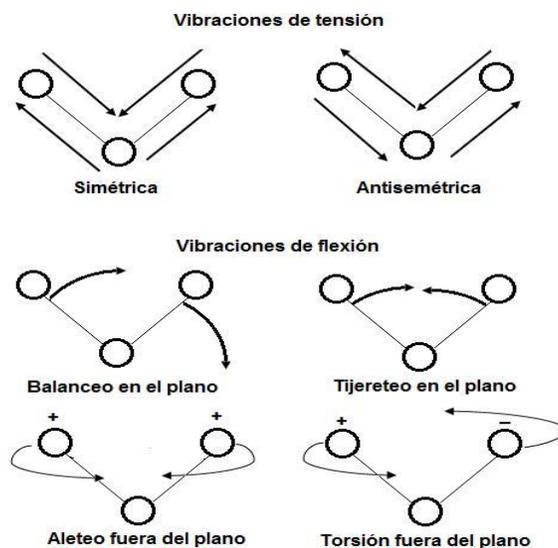


Figura 4. Movimientos de extensión y flexión en las moléculas

Capítulo II. Antecedentes

2.1 Síntesis de 3,3'-diindolilmetano con enfoque en la Química Verde

Se ha establecido anteriormente una ruta alternativa y ambientalmente benigna para la síntesis selectiva de varios aril-3,3'-diindolilmetanos, a partir del indol y de una serie de aldehídos aromáticos (Penieres, 2003). Las correspondientes reacciones de sustitución electrofílica aromática procedieron con buenos rendimientos y en tiempos de reacción cortos, empleando irradiación infrarroja como fuente de activación y bentonita como catalizador, en ausencia de disolvente (figura 5).

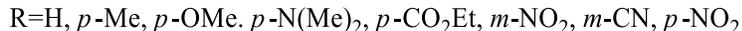
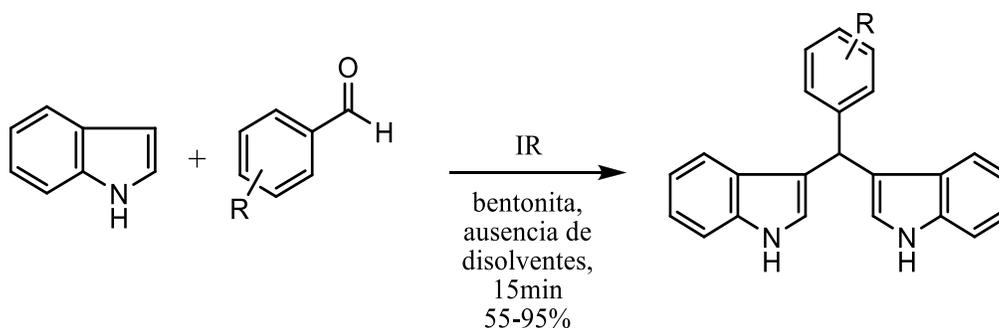


Figura 5. Síntesis de diindolilmetanos

Los resultados obtenidos mediante esta metodología y considerando también el antecedente de que el diindolilmetano más sencillo (figura 6) es un compuesto que se ha obtenido a través de síntesis a partir del indol y el formaldehído (la reacción de sustitución electrofílica aromática se ha llevado empleando irradiación infrarroja como fuente de activación y bentonita como catalizador, en ausencia de disolventes), se sabe también que éste presenta actividad anticancerígena importante, especialmente contra cáncer de próstata, de mama y cervical.

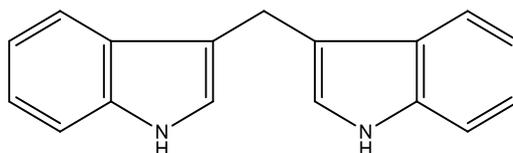


Figura 6. Estructura del DIM

2.2 Brócoli y col de Bruselas

Las variedades más antiguas del brócoli ya se cultivaron en la época Romana, por este motivo el brócoli también se llama *Brassica oleracea italica*. Desde Italia, esta variedad de las crucíferas se ha distribuido por todo el mundo con mucho éxito. Es una hortaliza muy sabrosa y además está en el punto de atención científico porque todas las variedades de este género contienen la concentración más elevada de sustancias azufradas con una función terapéutica potente: los glucosinolatos y sus derivados (isotiocianatos, sulforafano, índoles, entre otros).

Las coles de Bruselas (*Brassica oleracea var. gemmifera*) son variedades de coles pertenece a la familia de las *Brassicaceae*, e incluye también a la col, col lombarda, col rizada, col china, brécol, brócoli, coliflor, col, rábano y nabo, aunque las coles de Bruselas se diferencian por tener más vitamina A, mucho potasio y calcio, fósforo, sodio y magnesio.

El brócoli es un miembro de la familia de las brassicas, ahora llamadas crucíferas, que se cultivó hace ya 6000 años, así que probablemente es la hortaliza más antiguamente cultivada. El brócoli, como lo conocemos hoy en día, se distribuyó durante el siglo XIX y XX desde Italia al resto del mundo. El nombre es procedente de la palabra italiana “brocco” que significa “brote” (del latino “*brachium*”, rama), que refiere a la forma típica de las flores que están unidas con pequeñas ramas al tronco compacto.

Las investigaciones epidemiológicas confirman que el consumo de las brassicas y sobre todo de la col de Bruselas, se asocian con una disminución del riesgo de varios tipos de cáncer, mucho más que el consumo de las verduras o la fruta en general. A la familia de la *Brassicaceae* pertenecen todas las variedades de la col, la mostaza, colza y el nabo (Figura 7). De esta familia, el brócoli atrae más la atención científica.



Figura 7. Vegetales del género *Brassica*

Los efectos saludables de estos vegetales se suelen atribuir a la alta concentración de glucosinolatos, que son una familia de compuestos azufrados, y también a sus derivados, en donde los más importantes son los indoles y los isotiocianatos (Nutrición evolutiva, 2017).

2.3 Glucosinolatos

Los glucosinolatos son la clase principal de metabolitos secundarios que se encuentran en los cultivos de crucíferas. Cada vez que comemos vegetales y ensalada de los cultivos de crucíferas, éstos se degradan inmediatamente después de daño tisular, debido a la acción de tioglucosidasas endógenas (principalmente la mirosinasa), para liberar productos responsables de los sabores picantes y calientes característicos de las crucíferas.

La estructura y bioquímica de la diversidad de glucosinolatos, es debido a su biosíntesis, la cual es a partir de precursores aminoácidos.

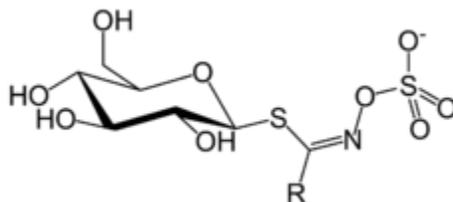


Figura 8. Estructura química general de los glucosinolatos.

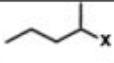
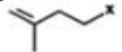
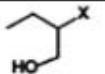
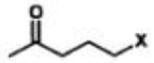
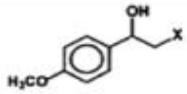
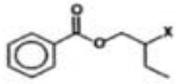
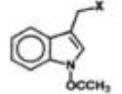
Los glucosinolatos son aniones orgánicos solubles en agua, que incluyen aproximadamente 120 compuestos (se ha encontrado que solo 6 contienen un núcleo

indólico), cuya estructura química corresponde a ésteres N-hidroxisulfatos de β -tioglucosilo o ésteres (Z)-N-hidroximinosulfatos o tiohidroximatos de S-glucopiranosilo. Poseen un átomo de azufre unido a una β -D-glucopiranososa y una cadena lateral (R) unida al carbono del grupo imino, como se observa en la figura 8 (Suzuki, 2006). La cadena lateral los clasifica en glucosinolatos alifáticos, aromáticos e indólicos, dependiendo de su precursor biosintético, según sea metionina, fenilalanina o triptofano, respectivamente (Brown, 1995; Visentin, 1992; Li, 2004), y a la vez determina las diferencias en las propiedades químicas, la actividad biológica y los productos de degradación (Gimsing, 2005). Las cadenas laterales se caracterizan por una gama amplia de estructuras químicas, resumida en la tabla 1.

Los productos de hidrólisis más comunes, los isotiocianatos, se forman por un reordenamiento de Lossen, que involucra la migración de la cadena lateral desde el carbono de la oxima hasta el nitrógeno adyacente. Cuando la cadena lateral del glucosinolato porta un grupo hidroxilo en el C-2, los isotiocianatos formados son inestables y se ciclan a oxazolidin-2-tiona, una clase de sustancias conocidas por causar efecto goitrogénico (afectan la glándula tiroides). En otras plantas, los principales productos de la hidrólisis son nitrilos; la formación *in vitro* de éstos es favorecida por un pH menor a tres o en la presencia de iones Fe^{2+} (Michajlovskij, 1968, 1974).

En el análisis de glucosinolatos un factor determinante es la preparación de la muestra, en la cual se debe evitar su degradación ya sea por contacto con la mirosinasa o por degradación térmica, la cual se alcanza a temperaturas superiores a $125^{\circ}C$. Por lo tanto, cuando se va a realizar la determinación de los glucosinolatos, el material vegetal debe conservarse intacto. Las plantas trituradas liofilizadas deben ser mantenidas a $-20^{\circ}C$ hasta su uso. En el caso de plantas completas, para prevenir las pérdidas y reducir la actividad de la enzima mirosinasa, el material debe ser congelado con nitrógeno líquido o dióxido de carbono sólido (Śmiechowska, 2010). Generalmente la extracción se lleva a cabo en agua o en una mezcla de metanol y agua. Para prevenir la degradación enzimática, el material a ser extraído primero se trata a $100^{\circ}C$. Otros autores han realizado la extracción a temperaturas, entre $70-100^{\circ}C$, para inactivar la mirosinasa. (Gimsing, 2005; Mohn, 2007).

Tabla 1. Clasificación de los glucosinolatos (Gsl) de acuerdo con la cadena lateral

Estructura	Clase	N° de Gsl	Ejemplo de la estructura
Cadenas laterales que contienen azufre	A	25	
Cadenas laterales alifáticas lineales	B	6	
Cadena alifática ramificada	C	8	
Cadena olefínica ramificada y lineal	D	10	
Cadena alifática ramificada con alcoholes	E	12	
Cadena alifática con cetona	F	4	
Aromáticos	G	17	
ω-hidroalquil benzoatos	H	8	
Indólicos	I	6	
Multi-glicosilado y otros	J	6	

La separación eficiente de los glucosinolatos es difícil debido a la elevada polaridad de las moléculas, por lo que ésta depende de sutiles diferencias de polaridad en la cadena lateral. Los métodos para la separación incluyen cromatografía en capa fina preparativa o papel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta eficiencia. La cromatografía de gases (GC) no puede ser usada para la determinación de glucosinolatos intactos, debido a la naturaleza iónica de los mismos; sin embargo, la conversión a derivados volátiles tales como los desulfoglucosinolatos permite su uso (Arias, 2011).

2.3.1 Glucobrasicina

Linser (1939) informó que los vegetales del género *Brassica* contenían altos niveles de compuestos indólicos. Henbest aisló el indol-3-acetonitrilo de la col y demostró que tenía menor actividad como agente de crecimiento que el ácido indolacético. En 1961 y 1962, se realizó el aislamiento y la identificación de los dos primeros glucosinolatos de indol: la glucobrasicina, figuras 9 y 10(a) (Gmelin, 1961), y la neoglucobrasicina, figura 10(b), y la constatación de que los productos observados fueron resultado de su hidrólisis enzimática. Además de éstas, la 1-sulfonatoglucobrasicina (c) también se caracterizó. Este producto natural único se ha estudiado hasta ahora muy poco, principalmente debido a la falta de métodos satisfactorios para su aislamiento y análisis. También, se publicó el descubrimiento de dos glucobrasicinas con anillo oxigenado (d) y (e), además de la presencia de acetil-1-glucobrasicina (f) (figura10).

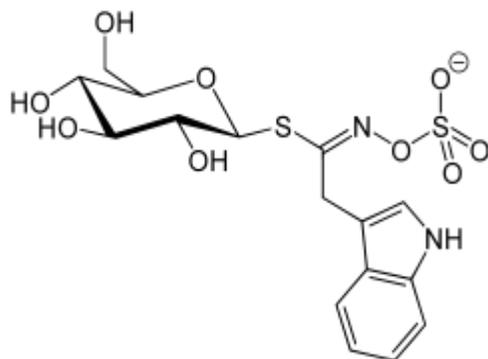


Figura 9. Glucobrasicina

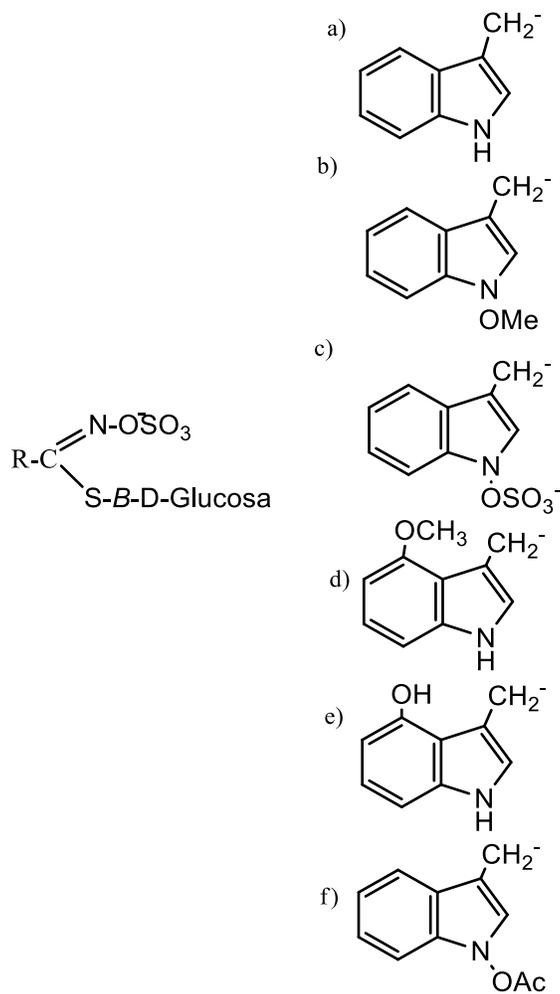


Figura10. Estructura de glucosinatos indólicos. R = (a) glucobrasicina; (b) neoglucobrasicina; (c) 1-sulfonatoglucobrasicina; (d) y (e) de anillo oxigenado; (f) 1-acetilglucobrasicina

Algunas variedades de col rizada, coles de Bruselas y coliflor son fuentes especialmente ricas en glucosinatos. Como con otros glucosinatos, los factores agronómicos y ambientales ejercen un control considerable sobre los niveles de estos compuestos (Heaney, 1983). Las hojas y la inflorescencia son particularmente ricos en glucobrasicina. En la col, los niveles de glucosinatos indólicos son generalmente del orden de 4500 a 9000 ppm, tales niveles pueden representar menos del 40% del contenido total de glucosinatos (McGregor, 1978). Las determinaciones de glucosinatos individuales contenidos en crucíferas son menos comunes. (Tabla 2)

Tabla 2. Contenido de glucosinolatos indólicos en brócoli y col de Bruselas ($\mu\text{mol g}^{-1}$)

Glucosinolatos-indólicos	Brócoli	Col de Bruselas
Glucobrasicina	1.1 \pm 0.4	3.2 \pm 0.2
4-Hidroxiglucobrasicina	0.2 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1
4-Metoxiglucobrasicina	0.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.2
Neoglucobrasicina	0.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1

Mosbah y colaboradores (1999) evaluaron los glucosinolatos en 5 grupos y 65 adquisiciones de *Brassica oleracea* (50 brócoli, 4 coles de Bruselas, 6 repollo, 3 coliflor y 2 coles rizadas) cultivadas en condiciones culturales uniformes. Los glucosinolatos y sus concentraciones variaron entre los diferentes grupos y dentro de cada grupo. Los glucosinolatos predominantes en el brócoli fueron glucorafanina, gluconapina, y glucosinato-3-indolilmetilo (glucobrasicina). Las concentraciones de los otros glucosinolatos en el brócoli variaron de manera similar en un amplio intervalo. En coles de Bruselas, repollo, coliflor y col rizada, uno de los glucosinolatos predominantes fue la glucobrasicina (3.2, 0.9, 1.3 y 1.2 $\mu\text{mol g}^{-1}$, respectivamente).

2.4 Obtención de 3,3'-diindolilmetanos a partir de plantas de la familia Brassicaceae

La glucobrasicina da lugar a una variedad de productos de la hidrólisis enzimática, por la mirosinasa, a pH 7 (Fenwick, 1983); ésta proporcionaría en primer lugar un producto inestable que posteriormente se somete a un reordenamiento tipo Lossen, para producir escatol e isotiocianatos (II), aunque parece ser que el isotiocianato, si es que se forma, produce inmediatamente ion tiocianato e indol-3-carbinol (III). El último se auto-condensa eliminando formaldehído, para dar 3,3'-diindolilmetano (IV), figura 11. El ácido ascórbico, si está presente, reacciona preferentemente con indol-3-carbinol para producir ascorbígeno. A pH 3-4, una vía diferente ocurre produciendo azufre elemental, sulfuro de hidrógeno e indol-3-acetonitrilo (V). En el intervalo de pH 3-7 se forman diversas cantidades de todos los productos anteriores del indol.

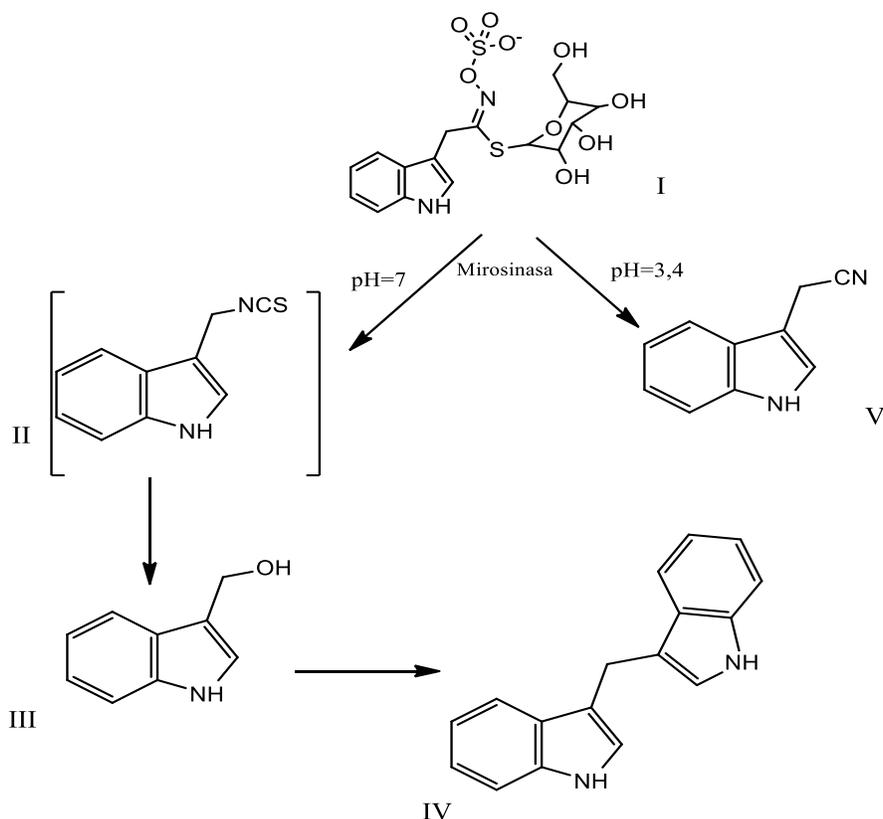


Figura 11. Descomposición enzimática de la glucobrasicina: I glucobrasicina; II isotiocianato de 3-metilindol; III indol-3 carbinol; IV 3,3'-diindolilmetano; V indol-3-acetonitrilo.

Por otro lado, la descomposición química de glucobrasicina se resume en la figura 12. Proceso A: ocurre la vía habitual de la descomposición de un ácido tiohidroxámico, que inicialmente produce indol-3-acetonitrilo (no mostrado) que genera indol-3-acetamida y el ácido indol-3-acético. Además, productos menores, como indol, escatol, indol-3-carboxaldehído, también pueden ser producidos.

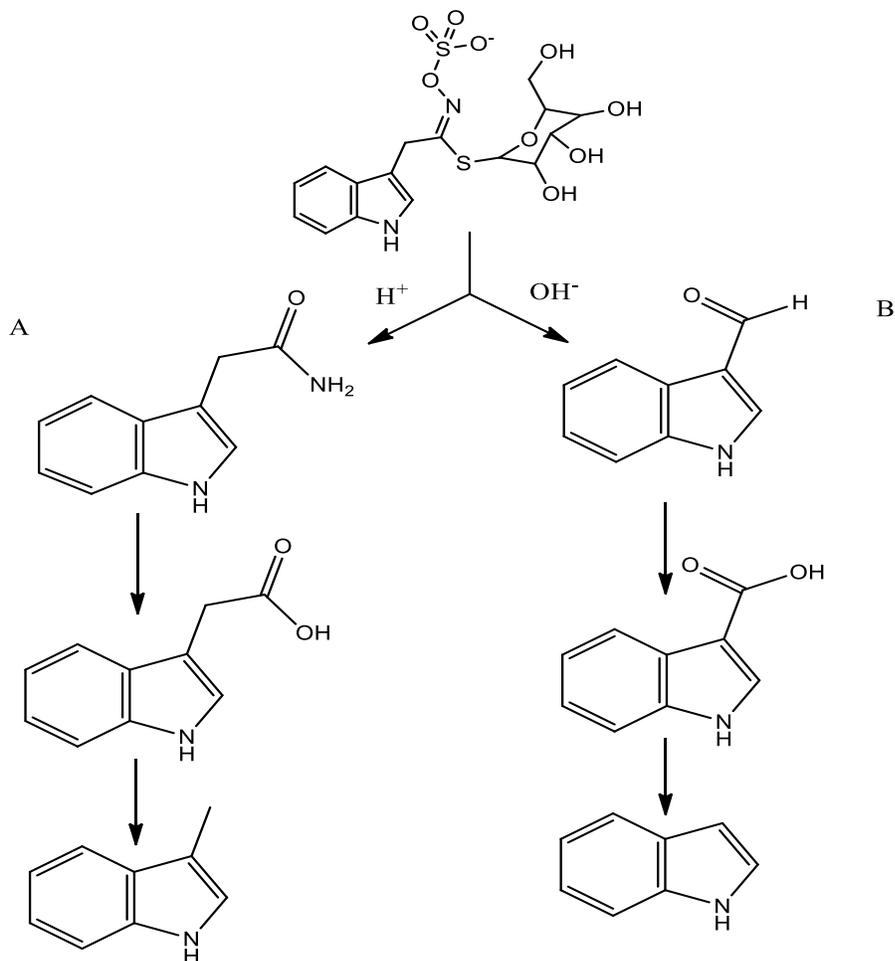


Figura 12. Descomposición química de glucobrasicina: La ruta A, la principal vía de degradación, da lugar a indol-3-acetamida, ácido indol-3-acético y escatol (un producto de menor importancia). La ruta B da indol-3-carboxaldehído, ácido indol-3-carboxílico e indol.

La degradación térmica de glucosinolatos del indol se analizó en detalle por Campbell (1989). Se observó que el tratamiento térmico dio como resultado una descomposición sustancial de glucosinolatos indólicos con iones tiocianato e indol-

acetonitrilos como productos, mientras que la autólisis (tejido macerado) dio indol-acetonitrilos en baja concentración, pero altos niveles de iones tiocianato y carbinoles. Un producto de degradación interesante usando metilglucosinolato de indol-3-ilo sintético es el 2-(3'-indolilmetil)glucosinolato (figura 13). Esto se produjo usando un sistema por ebullición por 1 h en agua pura (Chevolleau, 1997). Sin embargo, este compuesto aún no ha sido identificado en las verduras cocidas.

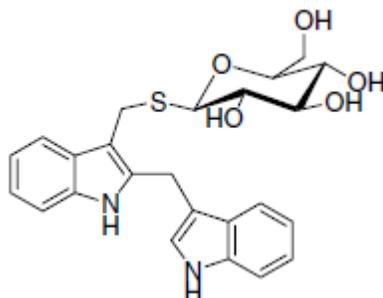


Figura 13. Estructura del 2-(3'-indolilmetil)glucosinolato.

Según N. Michajlovskij (1968) la degradación de la glucobrasicina también puede darse empleando irradiación de luz ultravioleta durante 45 minutos, obteniéndose el indol-3-carbinol y el DIM. Además, se ha encontrado que, en el ambiente ácido del estómago, el indol-3-carbinol, en contacto con los jugos gástricos se convierte en el dímero 3,3'-diindolilmetano (McDanell, 1987)

También, se ha publicado el efecto del proceso de ebullición en el contenido de ascorbígeno, indol-3-carbinol, indol-3-acetonitrilo y 3,3'-diindolilmetano en la col fermentada (Ciska, 2009). La col se hirvió durante 5 a 60 minutos, lo que resultó en una disminución del contenido total de los compuestos analizados. Uno de los productos de degradación era indol-3-carbinol; la disminución en el contenido de ascorbígeno fue acompañada por un aumento drástico en el contenido de DIM, como producto de condensación de indol-3-carbinol. Después de 40 y 50 min de la ebullición, el contenido total del DIM en la col y la cocción del agua fue de aproximadamente 0.2 mol / 100 g.

Capítulo III Parte experimental

Material y equipo

La arcilla bentonítica utilizada es marca Tonsil Actisil FF® de Tonsil Mexicana, S.A. de C.V., Previo a su utilización se activó mediante secado en estufa a una temperatura de 110-180 °C durante una hora.

Para el seguimiento por cromatografía en capa fina (ccf) se emplearon cromatofolios Alugram® Sil G/UV₂₅₄ y gradientes de una mezcla de hexano /acetato de etilo 70:30 como fase móvil.

Para la fuente de irradiación de infrarrojo se utilizó una lámpara marca OSRAM de 250W conectado a un reóstato, que se manejó al 70% de su capacidad, alcanzando un intervalo de temperatura de 72 a 92 °C.

Para la cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM) se empleó un cromatógrafo de gases (Modelo G3440A) y un detector selectivo de masas (modelo G3172A) ambos de marca Agilent Technologies, con una columna Agilent 1909 1B-101 de 12 m x 200 µm x 0.33 µm, usando como gas acarreador helio a una velocidad constante 1.9264 mL/min, la temperatura del inyector fue de 280 °C, la temperatura inicial del horno fue de 90 °C, con una rampa de calentamiento de 20 °C/min hasta 300°C y se mantiene durante 4 minutos, empleando el modo SPLIT con un ratio 10:1, un volumen de inyección 3 µL, las condiciones de espectrómetro de masa fueron a una energía de ionización de 70 eV, temperatura de la fuente 230 °C y la temperatura del cuadrupolo de 150 °C.

Obtención de los extractos metanólicos de col de Bruselas y brócoli

Se adquirieron 100 g de hojas de col de Bruselas fresca y 100 g de inflorescencia del brócoli fresco; éstas fueron picadas por separado en trozos pequeños y fueron molidas con un mortero; posteriormente se administró 200 mL de metanol a cada una y se dejó reposando durante 3 días en matraces Erlenmeyer tapados. Posteriormente

se separó el material vegetal usado del disolvente, filtrando a gravedad, se les agregó carbón activado y se dejó agitando durante un periodo de 10 minutos, se filtra y se recupera el metanol por medio del rotavapor marca Buchí a una temperatura de 40 °C a 90 rpm, el concentrado de la muestra es filtrado en cartuchos Wáter Oasis HLB (previamente acondicionados) para eliminar la clorofila, se deja en una campana de extracción a vacío hasta eliminar el disolvente remanente; una vez que el disolvente fue eliminado de los extractos, se obtiene de 5 a 8 g de extracto y se almacenan en un congelador a una temperatura de -24 °C para su posterior uso.

Los cartuchos Wáter Oasis HLB se acondicionaron de la siguiente manera: Se aplica y succiona 1 mL de metanol a través del cartucho, posteriormente se aplica y succiona 1 mL de agua a través del cartucho, al finalizar este proceso se aplica y succiona la muestra y se lava con metanol.

De igual forma se adquirieron 100 g de hojas de col de Bruselas y 100 g de inflorescencia de brócoli, se dejaron secar y se siguió el mismo procedimiento no obteniéndose resultados para la generación del DIM.

Cambio de pH de la bentonita

A 9 g de la arcilla bentonítica se le agrega 1 g de NaHCO_3 o Na_2CO_3 y 90 mL de agua destilada. Las mezclas se agitaron magnéticamente durante 10 minutos y posteriormente se determinó el valor de pH a cada una (tiras de pH), se filtró y se dejó a sequedad y posteriormente se colocaron en una estufa a un intervalo de temperatura de 110-180 °C. (Penieres, 1999)

Tabla 3. Valores de pH de suspensión acuosa base-arcilla.

Suspensión base-arcilla	pH
Ninguna	3
NaHCO_3	7
Na_2CO_3	9

Procedimiento General

Obtención del DIM

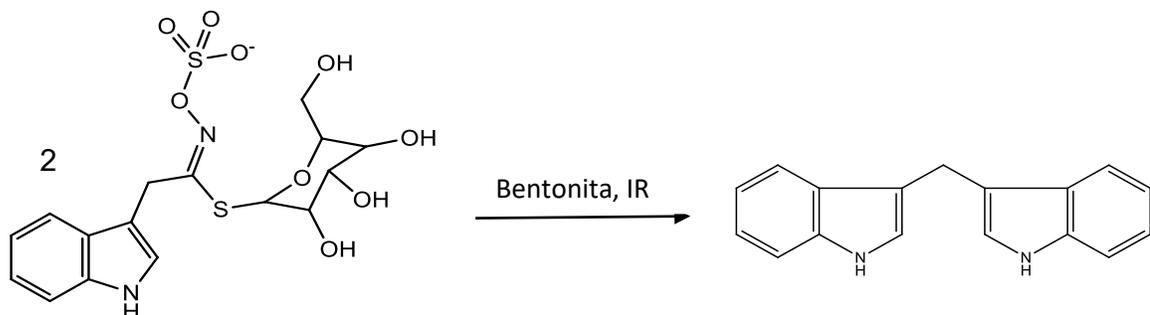


Figura 14. Esquema general para la obtención del 3,3'-diindolilmetano

Para los extractos de brócoli y col de Bruselas.

Se pesaron 0.5 g de extracto de brócoli y 1 g de la correspondiente arcilla bentonítica previamente activada en la estufa durante 1 hora. Se colocó la mezcla de reacción en un reactor de vidrio tubular se coloca a reflujo y se irradia con luz infrarroja.

Se pesaron 0.5 g de extracto de brócoli y 1 g de la correspondiente arcilla bentonítica previamente activada en la estufa durante 1 hora. Se colocó la mezcla de reacción en un reactor en un matraz se coloca a reflujo con energía convencional no se obtuvieron resultados para la generación del DIM.

El producto obtenido en todas las reacciones se compara con una referencia sintetizada previamente del 3,3'-diindolilmetano por ccf, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo en una relación 7:3, respectivamente, y revela un color rosado rojizo bajo luz ultravioleta y a la vista. (García, 2005)

Las mezclas de reacción se extraen con aproximadamente 30 mL de etanol, se filtra y el disolvente se recupera con ayuda de un rotavapor, se concentra y se almacena en el refrigerador a una temperatura de -24°C.

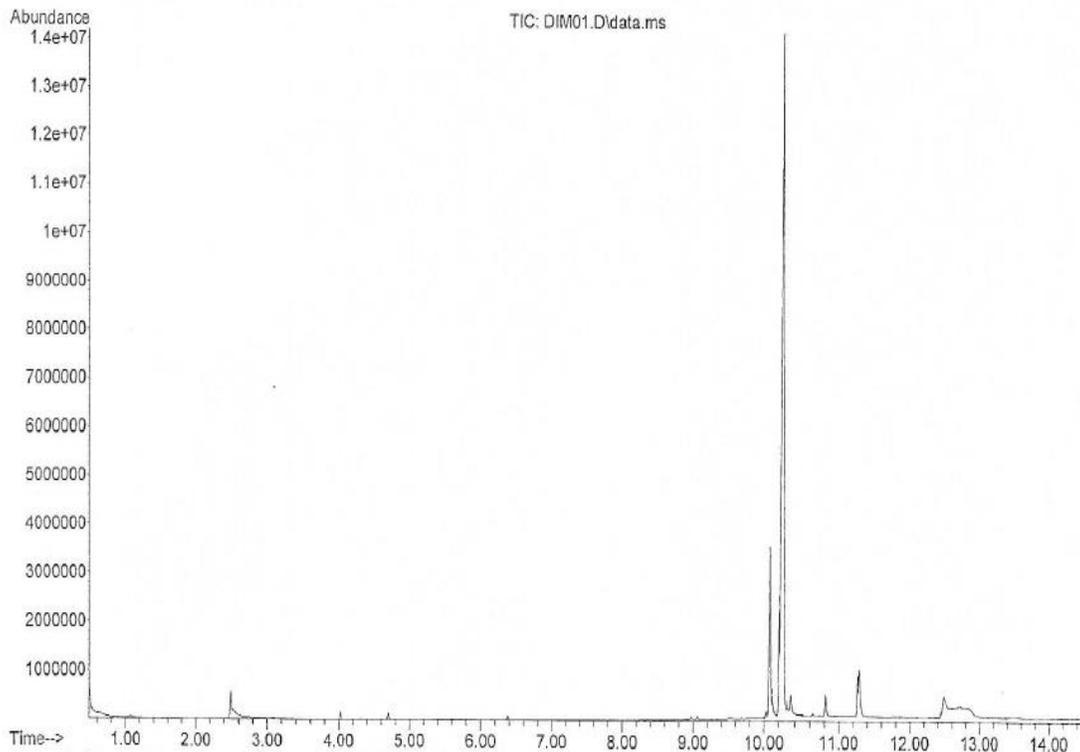
Para el análisis de CG-EM, 0.5-0.8g extracto obtenido para cada reacción se disuelve con 300 μL y de etanol se toman 50 μL de etanol la que se inyecta al cromatógrafo a las condiciones ya antes mencionadas

El 3,3'-diindolilmetano sintetizado como referencia, se evalúa utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (CG-EM)

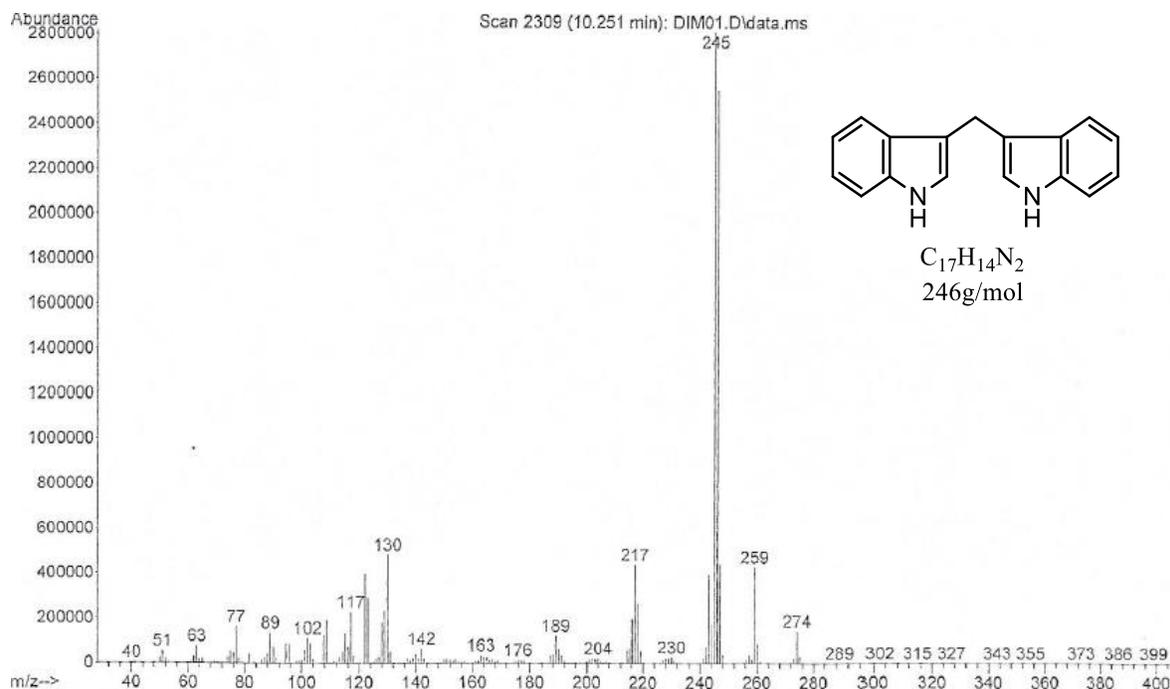
Para el cálculo del porcentaje de los compuestos contenidos en los extractos, se tomó solo las áreas de los picos con el núcleo indólico para cada cromatograma, detectados por su espectro de la técnica de espectrometría de masas, se sumaron y se consideró este aspecto el 100%, después se sacó el porcentaje para cada compuesto indólico de interés.

Capítulo IV. Resultados y discusión

Se obtuvo el cromatograma para el 3,3'-diindolimetano (Cromatograma 1), obtenido mediante síntesis en el laboratorio (el producto no fue purificado por lo cual aparece con ciertas impurezas y materia prima como el indol en un tiempo de retención 2.495 minutos, cabe destacar que por reacciones anteriores se conoce que el DIM es el compuesto mayoritario), para conocer el tiempo de retención y el patrón de fragmentación de este compuesto y poder identificarlo en los extractos de col de Bruselas y brócoli, así como su respectivo patrón de fragmentación en el espectro 1. El patrón de fragmentación molecular propuesto de este compuesto se encuentra en la figura 14, su respectivo tiempo de retención para este compuesto fue de 10.251 minutos estos parámetros cualitativos sirven de base para la posterior localización e identificación de este compuesto en los extractos respectivos de col y brócoli.



Cromatograma 1. CG del DIM sintetizado



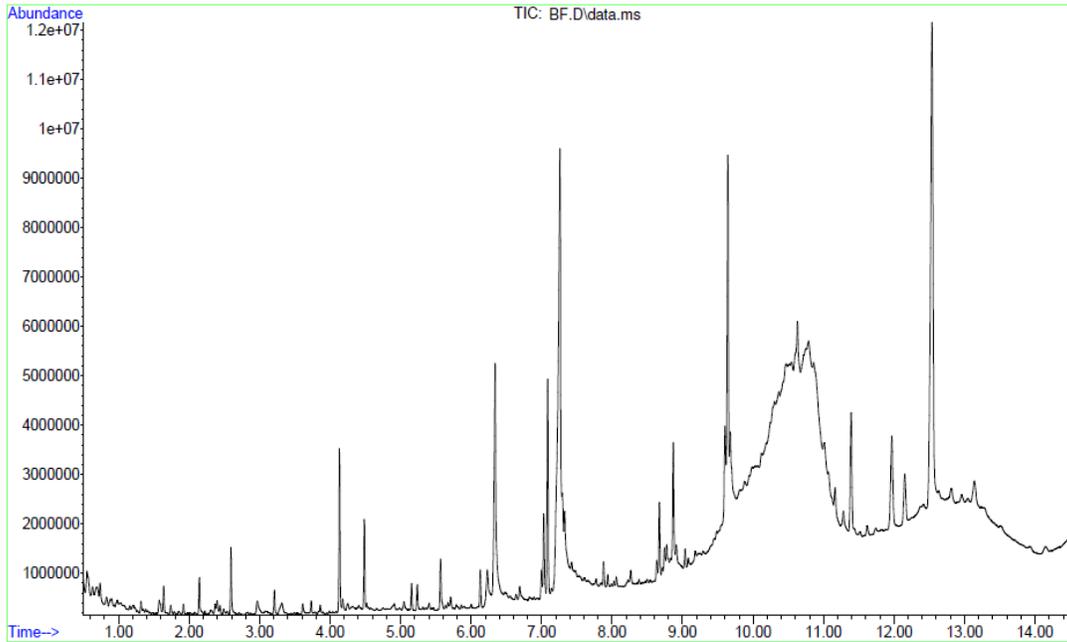
Espectro 1. EMIE para el DIM sintetizado.

Blancos de la col de Bruselas y el brócoli

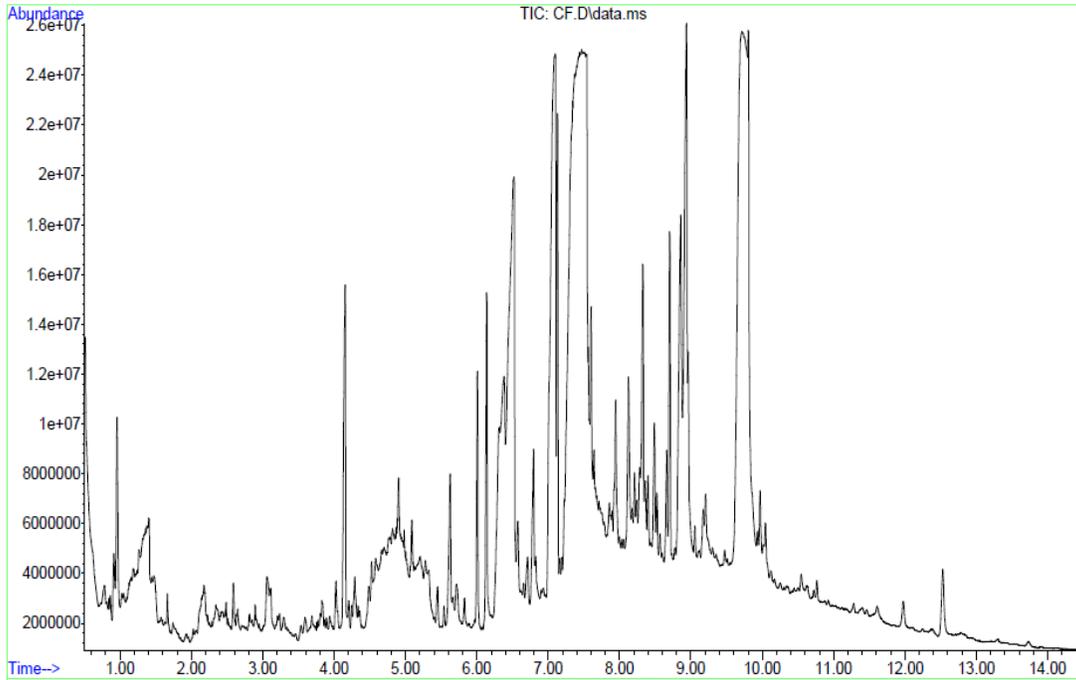
En los cromatogramas 2 y 3 se presentan los extractos de brócoli y col de Bruselas como blancos donde se demuestra que en ningún de los extractos anteriores se presenta el 3,3'-diindolilmetano solo se presentan compuestos como el indol-3-acetonitrilo e indol que son importantes ya que contienen un núcleo indólico y que se producen a partir de la glucobrasicina. Los tiempos de retención se muestran en la tabla 4. En los tiempos de retención donde se localizó anteriormente el DIM no se encuentran este compuesto en ninguna de esta muestra, no hay un pico o patrón de fragmentación que determine la presencia de este compuesto.

Tabla 4. Blancos de col y brócoli, contenido de sus componentes con núcleo indólico

Compuestos	Tiempo de retención promedio (minutos)	Porcentaje	
		Col %	Brócoli %
indol-3-acetonitrilo	5.565	89.36	90.5
Indol	2.485	10.64	9.5



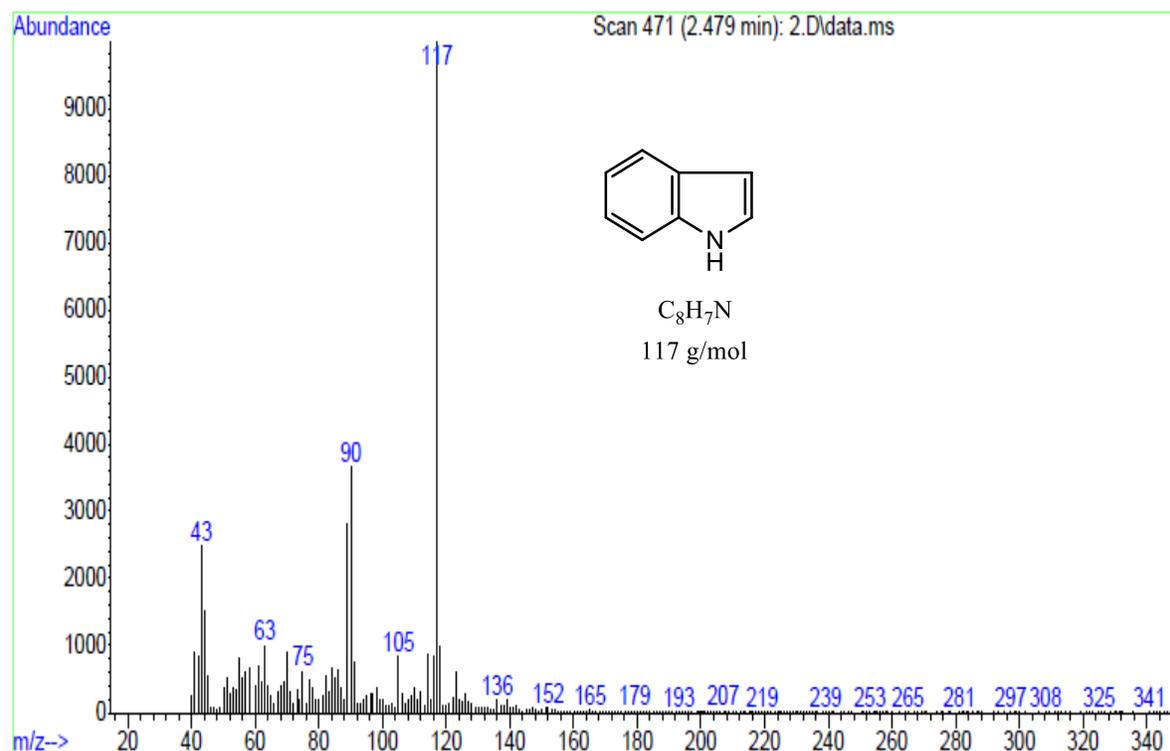
Cromatograma 2. Extracto de brócoli



Cromatograma 3. Extracto de col de Bruselas

El espectro 2 fue obtenido para el indol para el extracto de brócoli y col de Bruselas

Como se puede observar en el espectro, éste corresponde al tiempo de retención de 2.495 min, por tanto, se llegó a identificar el compuesto indólico (en la figura 15 se puede observar el patrón de fragmentación propuesto para este compuesto) que se produce en la biosíntesis (Brown, 1995); o en la degradación de la glucobrasicina y se observa que siempre está en porcentajes muy bajos.



Espectro 2. EMIE para el 1H-indol en extractos metanólicos

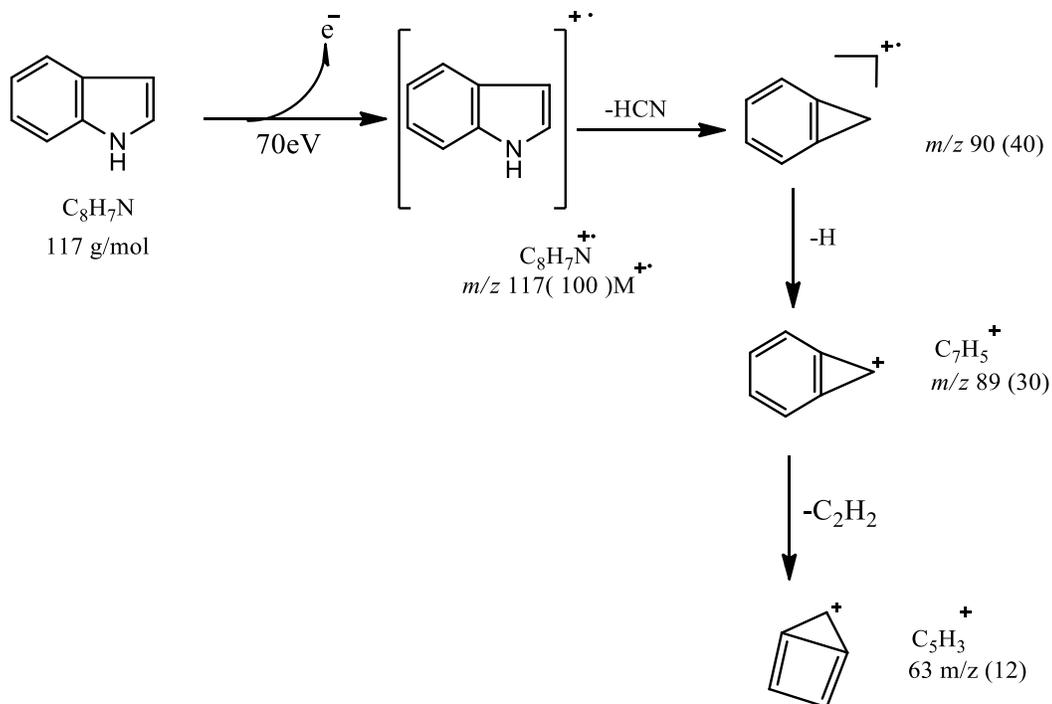
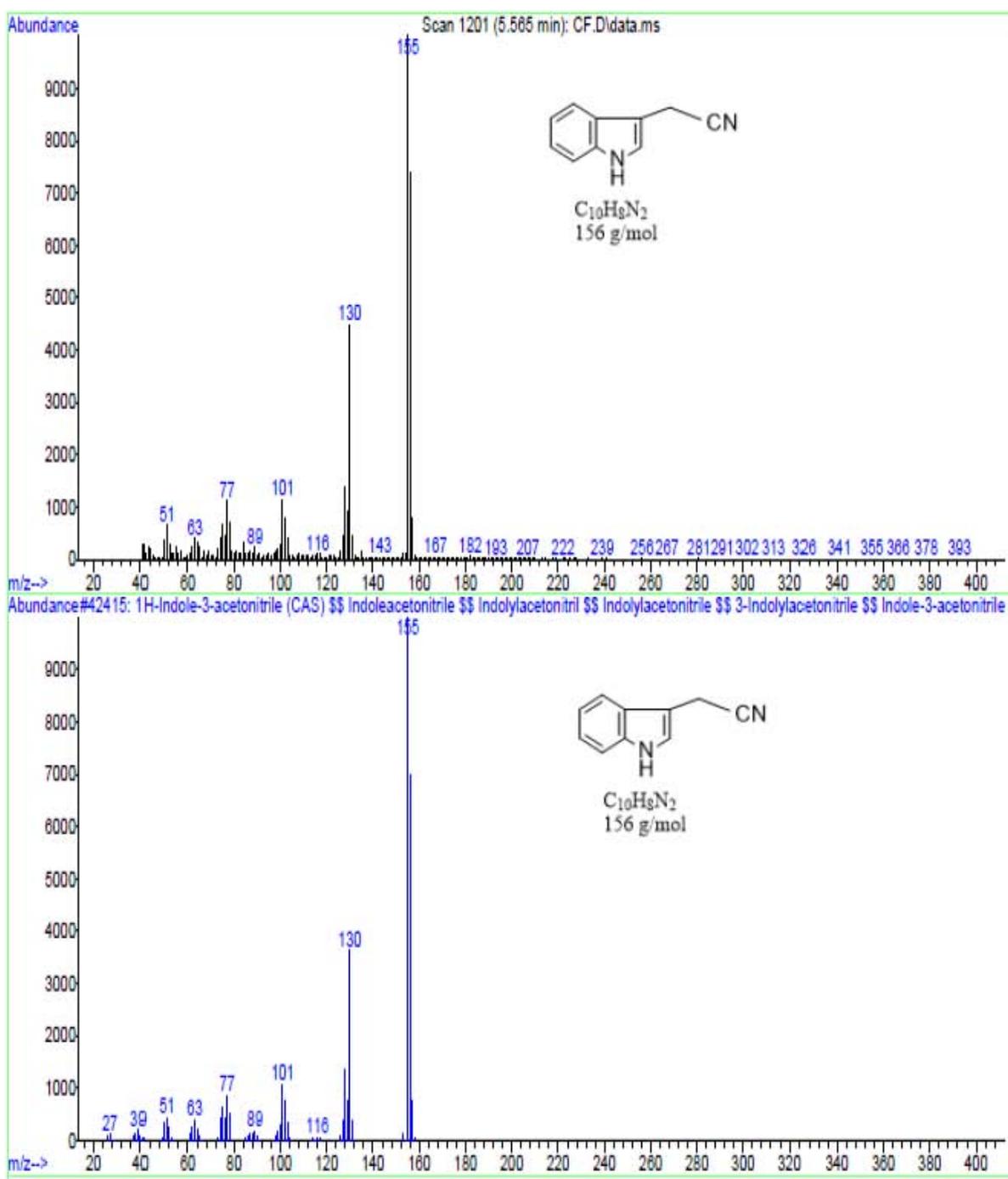


Figura15. Patrón de fragmentación propuesto para el 1*H*-indol

El espectro 3 corresponde al indol-3-acetonitrilo para el extracto del brócoli y la col de Bruselas (en la parte superior para el extracto de brócoli y en la parte inferior se muestra el espectro de referencia).

Como se puede observar el espectro corresponde al patrón de referencia por tanto se llegó a identificar el compuesto indol-3-acetonitrilo que se produce a partir de una descomposición enzimática a pH ácido; si bien no es característico de las condiciones manejadas, se puede producir bajo el proceso biológico normal de la planta y por ende se puede encontrar en el extracto.

Los tiempos de retención se encuentran en la tabla 4 que sirven como una base cualitativa para la posterior localización de estos compuestos en los cromatogramas obtenidos para los extractos en diferentes condiciones.



Espectro 3. EMIE para el -1H-indol-3-acetonitrilo en el extracto metanólico y el espectro referencia

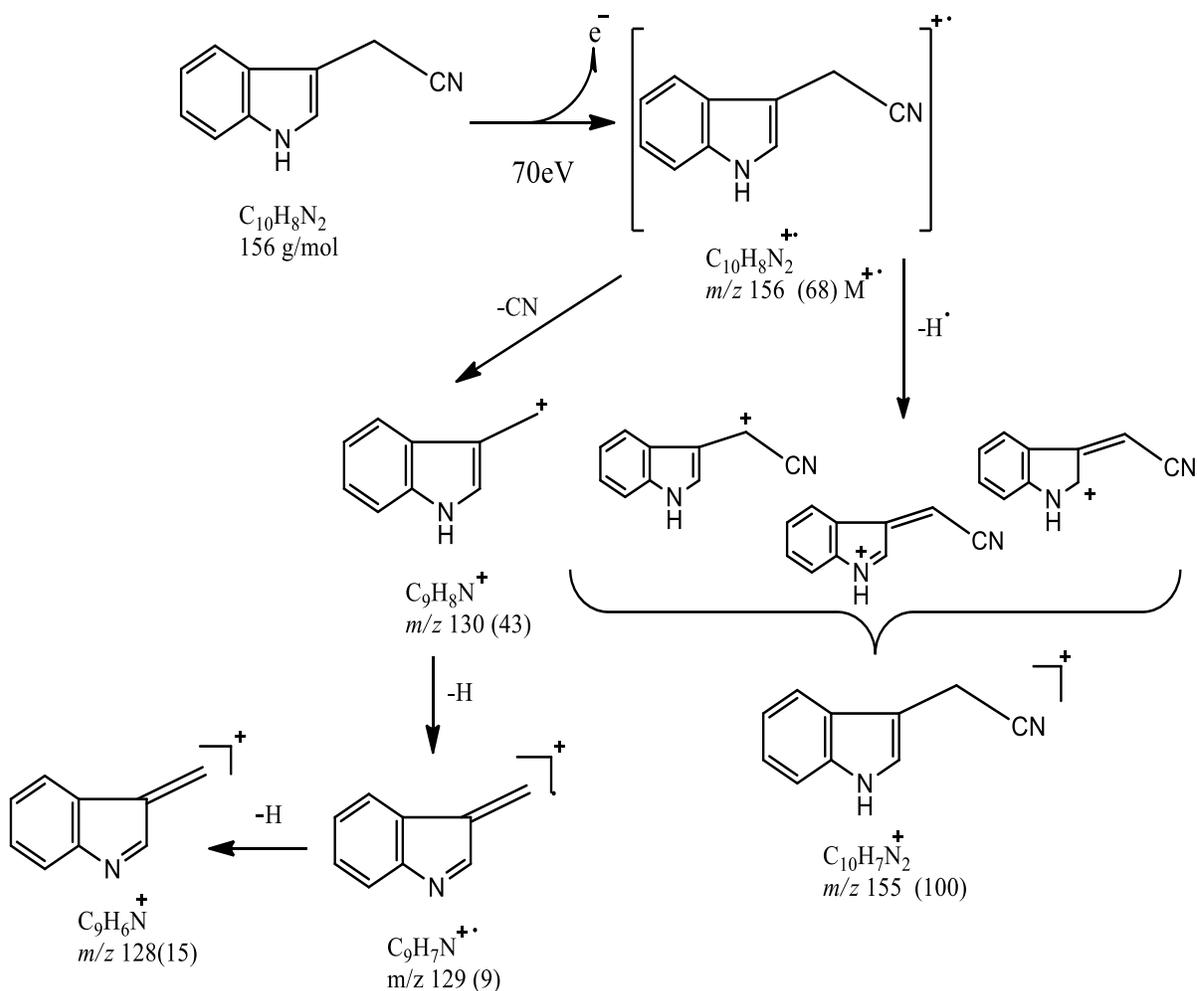


Figura 16. Patrón de fragmentación propuesto para el indol-3-acetonitrilo

Obtención del DIM a partir de extractos de col de Bruselas y brócoli

Bentonita a pH 3

Todas las reacciones se siguieron en cromatografía en capa fina, los extractos que presentaban la aparición del DIM, fueron analizados posteriormente por CG-MS, algunas de las reacciones que se analizaron con este método fueron para comparar la formación de los compuestos indólicos presentes en las reacciones.

Para la obtención del DIM se utilizó energía infrarroja en ausencia de bentonita pero bajo estas condiciones no se llegó a la formación de este producto por lo cual los resultados no se presentan en este trabajo y que la bentonita es indispensable como catalizador para las diferentes reacciones.

Se utilizaron extractos secos con las diferentes técnicas y no se llegó a la obtención del DIM posiblemente a la degradación de la GBS mientras estos productos se estaban secando, con lo cual no se llegó a la generación del compuesto prioritario.

En la tabla 5 se puede observar los resultados con las arcillas a pH 3 y los diferentes extractos que fueron empleados para la obtención del 3,3'-diindolilmetano. Como se puede observar, bajo estas condiciones no hay formación DIM, ya que no se aprecia mediante ccf ni mediante CG-EM, pero si se pueden apreciar otros grupos de interés como son el indol-3-acetonitrilo y el indol los cuales se aprecian en los extractos de brócoli y col de Bruselas.

En los espectros 2 y 3 se muestra el patrón de fragmentación para el indol y el indol-3-acetonitrilo, estos compuestos también se dieron a pH 3, 7 y 10, ya que generaron el mismo tiempo de retención y espectro mediante la técnica de CG-EM empleada.

Con bentonita a pH ácido no se llegó a encontrar el DIM, por lo cual es un método que se descarta para la obtención de este compuesto en extractos metanólicos, ya que solo se formaron otros compuestos como el indol o en mayor proporción el indol-3-acetonitrilo.

Tabla 5. Arcilla bentonítica a pH ácido con lo diferentes extractos

Reacción	Bentonita	Tiempo de irradiación	Condiciones	INDOL %	INDOL-3-ACETONITRILO %	DIM %
Extracto de brócoli	1g	25 min	70% IR	3	97	---
Extracto de col de Bruselas		30 min	70%IR	---	100	---

Bentonita a pH 7

En la tabla 6 se puede observar el comportamiento de la arcilla bentonítica a pH 7 con los diferentes extractos que fueron empleados para la obtención del DIM. En este caso si hay formación del 3,3'-diindolimetano para el extracto de col de Bruselas pero

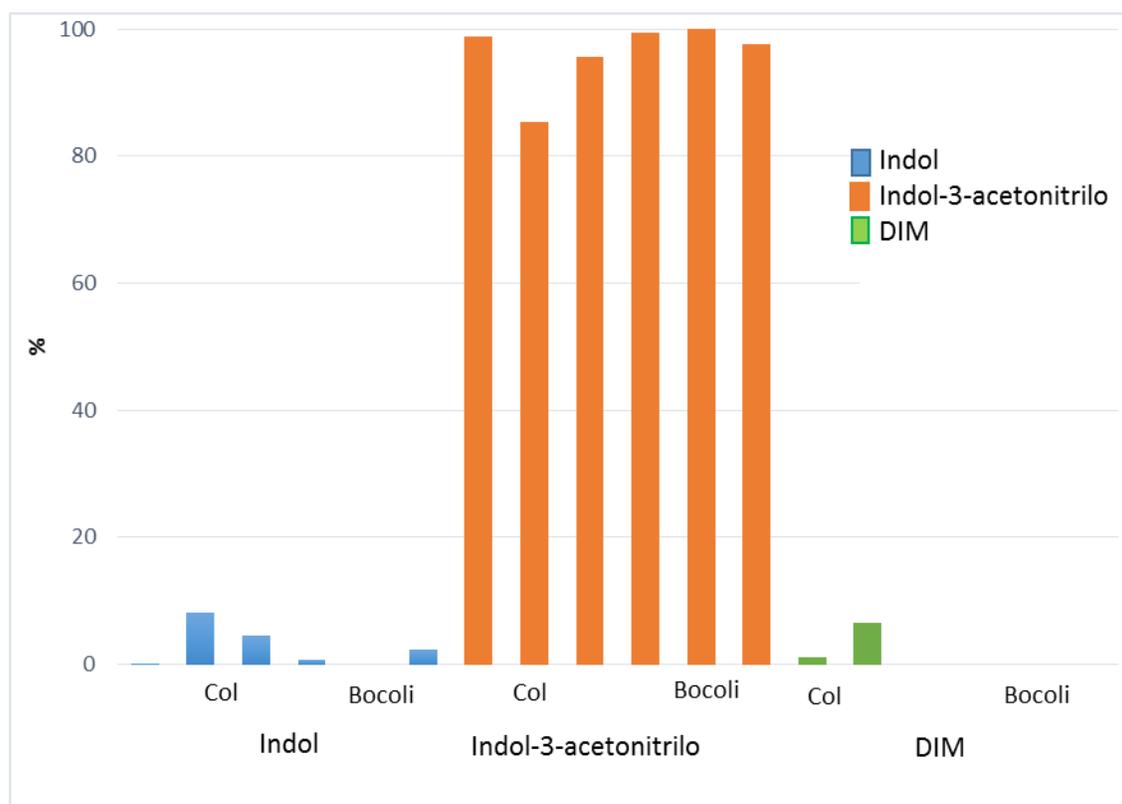
no se da la formación de éste en extractos de brócoli; en ambos extractos se aprecian la formación del indol-3-acetonitrilo y el indol, es importante aclarar que en los extractos de brócoli también se encuentra la glucobrasicina, en menor concentraciones (Mosbah, 1999), la formación del nitrilo en este extracto podría indicar, que la GBS se había degradado con anterioridad al nitrilo o que en la planta había una considerable concentración de Fe^{2+} , lo que propicia a que la GBS se degrade a indol-3-acetonitrilo (Michajlovskij, 1968, 1974). Aunque cabe resaltar que esta degradación también se forma a pH ácidos.

Bajo estas condiciones de pH 7, para la col de Bruselas se aprecia la formación del compuesto de interés el DIM así como otros compuestos ya antes mencionados, aunque el DIM representa el 6.55 % de compuesto con núcleo indólico obtenido en todo el extracto que se pudieron identificar, se observa la aparición del compuesto, éste se llega a formar de manera natural a un pH 7 mediante la degradación enzimática, pero de forma química a un pH 7 no hay antecedentes en los que se encuentre la formación de este compuesto, aunque se trabajó con el extracto de la planta la enzima que produce dicha degradación, se desactivó o inhibió debido a que estos extractos se mantuvieron en el refrigerador a temperaturas $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, además que en los blancos de col de Bruselas no aparece este compuesto, no se pudo haber formado con anterioridad.

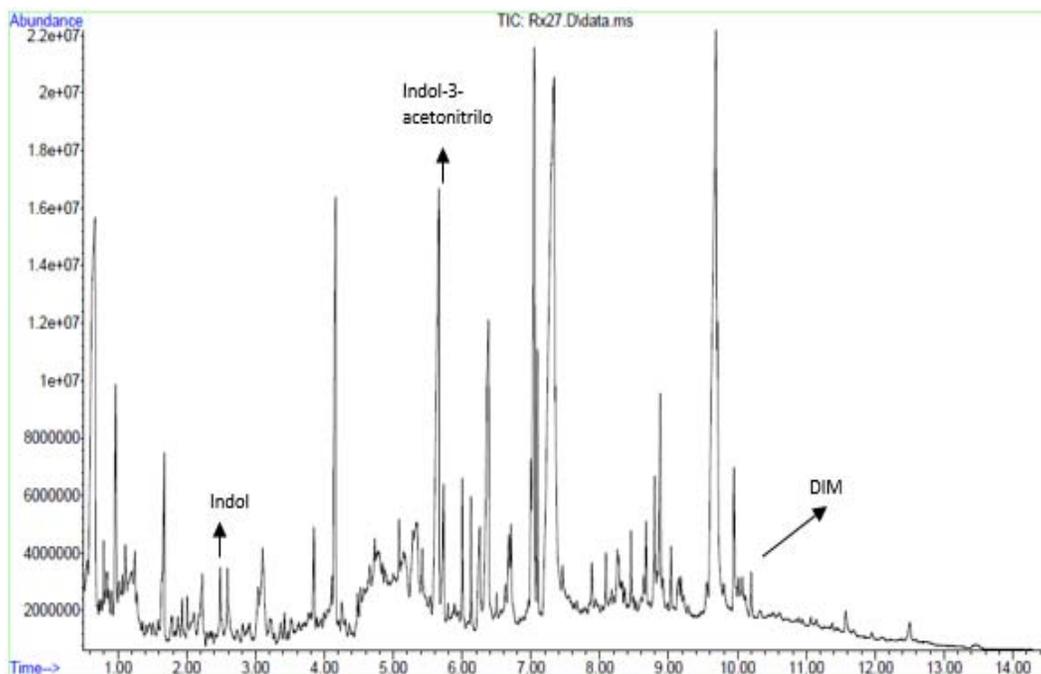
Tabla 6. Arcilla bentonítica a pH 7 con los diferentes extractos

	Bentonita pH 7	Tiempo de irradiación	INDOL %	INDOL-3- ACETONITRILO %	DIM %
Extracto de col de Bruselas	1g	30min	0.05	98.85	1.10
	1g, 3mL EtOH		8.15	85.30%	6.55%
	1g	1 h	4.47	95.53	---
	1g, 3mL EtOH		0.66	99.34	---
Extracto de brócoli	1g	30min	---	100%	---
	1g, 3 mL EtOH		2.33	97.67	---

Como se puede observar en la gráfica 1 el compuesto que se obtiene en mayor proporción es el indol-3-acetonitrilo, por lo que se puede deberse es que la GBS prefiere formar dicho compuesto o ya bien por la presencia de Fe^{2+} , lo que propicia la formación de este compuesto y no la del DIM a este pH el DIM alcanzo el 6.55 % de formación con respecto a los compuestos con núcleo indólico encontrados en el extracto cabe señalar que la condición óptima fue al agregándole etanol al llevar la reacción durante un periodo de 30 minutos.



Gráfica 1. Comparación de los compuestos con núcleo indólico obtenido a pH 7



Cromatograma 4. Reacción a pH 7 en extracto de col de Bruselas

pH 10

En la tabla 7 se puede observar el comportamiento de la arcilla bentonítica a pH 10 con los diferentes extractos que fueron empleados para la obtención del DIM. Como se puede observar en la tabla 7 a pH 10 hay formación del 3,3'-diindolimetano para el extracto de col de Bruselas, pero no se puede apreciar, la formación de éste en extractos de brócoli, en ambos extractos se aprecia la formación del indol-3-acetonitrilo y el indol.

A este pH de trabajo no hay referencias que indiquen, la formación de compuestos, como el nitrilo ni el DIM, aunque sí la del indol mediante una degradación básica (Fenwick, 1983), en los extractos a este pH de trabajo el compuesto apareció en bajas proporciones, pudiéndose deber que se forman los compuestos DIM e indol-3-acetonitrilo y no toman la ruta de degradación para obtener el indol, es poco el porcentaje que se forma consecuente a esta degradación aunque sí aumenta con respecto a los blancos de col y brócoli.

El porcentaje del indol-3-acetonitrilo en cada uno de los extractos es mayor al compuesto de interés DIM, se ha dicho con anterioridad que, aunque se encuentra en los blancos de extractos de col, aumenta su porcentaje en todas las reacciones,

pudiéndose deber a que es más fácil la degradación de la GBS para la formación de este compuesto y no para la formación del DIM, o por la concentración de iones Fe^{2+} que propician la formación del indol-3-acetonitrilo.

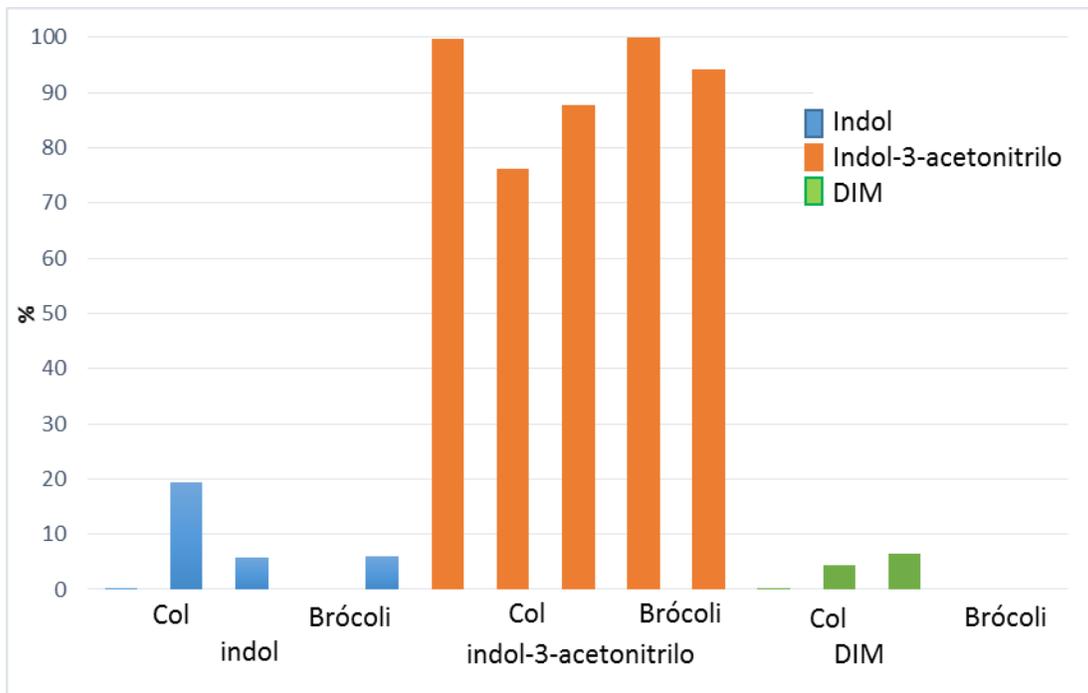
No hay referencias que indiquen la presencia del DIM a un pH 10 ya sea de forma química o enzimática, en comparación con los porcentajes de los extractos de col de Bruselas con bentonita a pH 7 y pH 10 no hay distinción ya que a estos pH el máximo porcentaje no rebasa el 7%, a condiciones a pH 10 la reacción con 1 hora de reacción y 0.5g de bentonita fue la óptima.

El DIM aunque no hay referencias que indiquen que a un pH 10 o a un pH 7 se pueda formar en condiciones químicas, si hay referencias que nos indican que al irradiar la glucobrasicina con una longitud de onda ultravioleta se ha obtenido dicho compuesto aunque no se trabajó a esos pH, por lo cual la irradiación a una longitud de onda infrarroja contribuyó a la formación de estos compuestos, cabe destacar que también se irradió con longitudes de onda de microondas los cuales tuvieron resultados negativos por lo cual no se presentan en este trabajo.

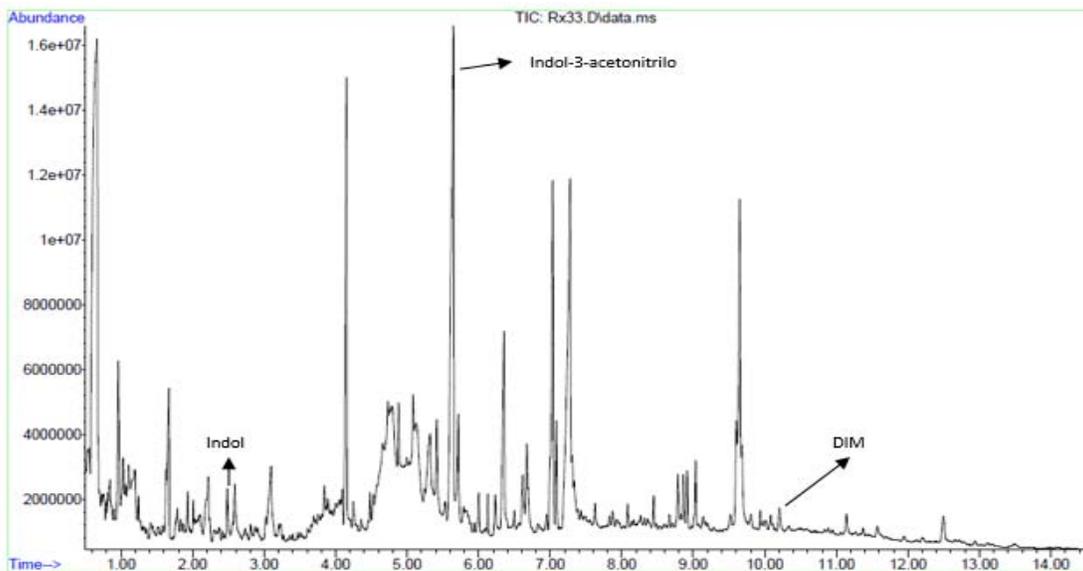
Tabla 7. Arcilla bentonítica a pH 10 con los diferentes extractos

Reacción	Bentonita pH 10	Tiempo de irradiación	INDOL %	INDOL-3- ACETONITRILLO %	DIM%
Extracto de col de Bruselas	1g	30min	0.1	99.64	0.26
	1g, 3mL EtOH		19.4	76.21	4.39
	1g	1 h	5.78	87.73	6.49
Extracto de brócoli	1g	30min	-----	100	-----
	1g, 3 mL EtOH		5.89	94.10	-----

De igual forma se puede observar en la gráfica 2 el mismo comportamiento con respecto a la proporción del indol-3-acetonitrilo, a valores de pH de 2, 7 y 10, en donde es el compuesto mayoritario con el núcleo indólico que se encontró en los extractos, en comparación con los demás compuestos indólico, como el DIM y el indol.

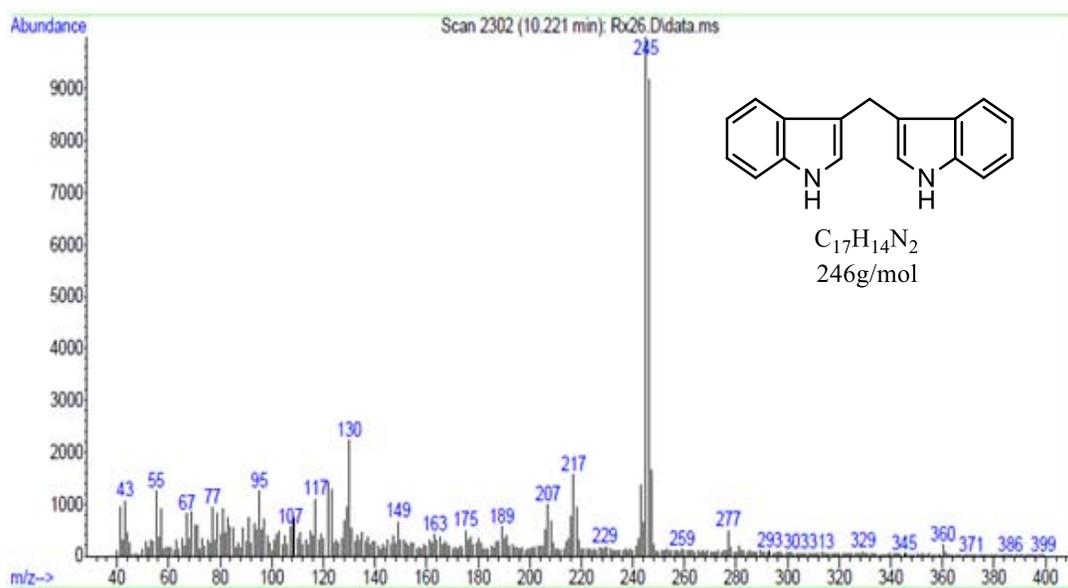


Gráfica 2. Comparación de los compuestos con núcleo indólico obtenido a pH 10



Cromatograma 5. Reacción a pH 10 en extracto de col de Bruselas

El espectro 4 se obtuvo de una de las reacciones con el extracto de col de Bruselas donde se aprecia, la aparición del DIM, en las demás reacciones donde se encontró el DIM se observa el mismo patrón de fragmentación, el patrón de fragmentación propuesto para este compuesto se muestra en la figura 17, este espectro corresponde con el sintetizado en el laboratorio (espectro 1) lo cual nos indica que sí está presente el DIM.



Espectro 4. EMIE para el 3,3'-diindolimetano que se obtuvo en la reacción 26.

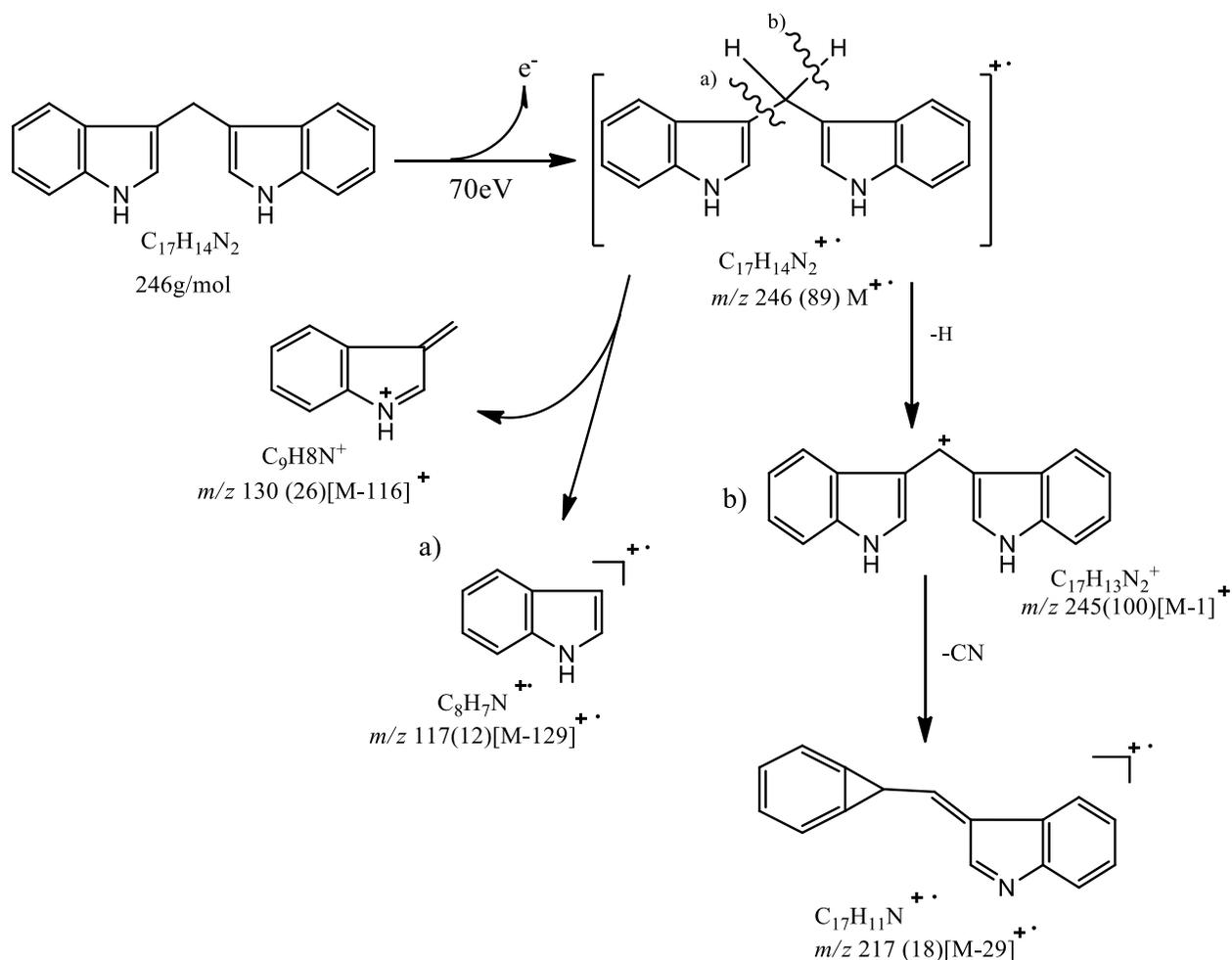


Figura 17. Patrón de fragmentación propuesto para el DIM obtenido en los extractos

Este trabajo se realizó dentro del contexto de la Química Verde debido a que cumple con los siguientes principios de la química verde:

- 1.- Prevención de residuos. Las reacciones se llevan en menor tiempo con el uso de luz infrarroja lo que contribuye a la reducción de gases invernadero al entorno ecológico.
- 2.- Economía atómica. No aplica.
- 3.- Metodología de síntesis de toxicidad reducida: Las sustancias que se usaron tienen poca o nula toxicidad, tanto para el medioambiente como para el ser humano.
- 4.-Diseño de compuestos químicos más seguros: Los compuestos químicos obtenidos tienen baja toxicidad e incluso el DIM tiene propiedades benéficas (anticancerígenas).

5.-Disminucion del uso de sustancias auxiliares: No se emplearon procesos cromatográficos para purificación ni disolventes nocivos en las mezclas de reacción.

6.- Eficacia energética: Las reacciones se llevan en menor tiempo con el uso de luz infrarroja lo que contribuye a la reducción de gases invernadero al entorno ecológico.

7.- Materias primas renovables: Los vegetales empleados son renovables y la arcilla bentonítica puede ser utilizable varias veces antes de perder su capacidad catalítica.

8.-Reduccion de derivados: No se emplearon grupos protectores, ni auxiliares extras para las transformaciones químicas.

9.-Potencializacion de catálisis: La bentonita resulto ser parte esencial del trabajo presentado, al fungir como catalizador en la transformación química.

10.-Degradabilidad: Los vegetales y los compuestos generados son biodegradables.

11.-No aplica.

12.-Minimizar accidentes: todos los procesos y sustancias utilizadas son de bajo riesgo y el procedimiento se llevó a cabo con las medidas de seguridad correspondientes.

Conclusiones

- Se generó un nuevo método de obtención del 3,3'-diindolilmetano, a partir de extractos de hojas de la col de Bruselas (*Brassica oleracea var. gemmifera*) en el contexto de la química verde
- No se llegó a la obtención del 3,3'-diindolilmetano en los extractos metanólicos de la inflorescencia del brócoli (*Brassica oleracea itálica*), probablemente debido a que el brócoli no contiene la suficiente cantidad de glucobrasicina.
- El empleo de irradiación infrarroja como fuente de energía alternativa para la activación da lugar a tiempos de reacción y a la formación de este compuesto.
- Se encontró que el empleo de la arcilla bentonítica a pH 7 y pH 10 fueron condiciones adecuadas para la obtención del 3,3'-diindolilmetano.
- La separación y caracterización de los productos obtenidos fue posible y exitosa utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
- Se encontró que la degradación de la glucobrasicina a estas condiciones produce una mayor cantidad del compuesto indol-3-acetonitrilo y a un pH 10 y pH 7 hay una similar cantidad del 3,3'-diindolilmetano.
- Es de importancia enfatizar que no existen publicaciones en donde se emplee los extractos de estos vegetales, ni bentonita, ni la irradiación infrarroja, para la obtención del 3,3'-diindolilmetano siendo este el primer trabajo con estas características.

Perspectivas

- Continuar con el estudio de los métodos de extracción en la col de Bruselas para generar una mejor obtención de la glucobrasicina y así haya una obtención mayor del 3,3'-diindolilmetano.
- Continuar con el estudio a utilización del brócoli en diferentes etapas de crecimiento para llegar a la obtención del 3,3'-diindolilmetano.
- Continuar con el estudio utilizando diversas fuentes de energía.

Referencias

1. Arias M.M., (2011) “Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora subterranea*”. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.
2. Baños, B.G., (2011). “Influencia de bentonita modificada en nanocompuestos de polietilentereftalato”, Tesis de Licenciatura, Química, FES-Cuautitlán, UNAM.
3. Bones, A.M., Rossiter, J.T. (2006) “The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. Review”. *Phytochemistry* 67, 1053–1067.
4. Brown, P. D., & Morra, M. J. (1995). “Glucosinolate-containing plant tissues as bioherbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 43(12), 3070-3074.
5. Cabildo M., Cornago M., Escolástico C., Esteban S., Farran M. A., Pérez M. y Sanz D., (2006). “Procesos orgánicos de bajo impacto ambiental. *Química Verde.*”; Librería UNED, Madrid. p.p 15-19.
6. Chevolleau, S., Gasc, N., Rollin, P., Tulliez, J., (1997). Enzymatic, chemical, and thermal breakdown of H-3-labeled glucobrassicin, the parent indole glucosinolate. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4290–4296
7. Espectro electromagnético . (3 de agosto de 2016) obtenida de *Espectro electromagnético*: www.fcq.uach.mx/index.php/docencia/columna-2/.../15-analisis-instrumental?..
8. Ewa Ciska, Ruud Verkerk, and Joanna Honke (2009). "Effect of Boiling on the Content of Ascorbigen, Indole-3-carbinol, Indole-3-acetonitrile, and

3,3'-Diindolylmethane in Fermented Cabbage". *J. Agric. Food Chem.* 57, 2334–2338

9. Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). "The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants." *Phytochemistry*, 56(1), 5-51.
10. Fenwick G.R, Heaney R. K, & Muller W.J., (1983). "Glucosinolates and Their Breakdown production in food and food pants". *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* 18, 123
11. Fernández, F.B.(2010). "Síntesis de difenilmetanos con arcillas modificadas con sales minerales, ácidos y súper ácidos", Tesis de Licenciatura, Química de Alimentos, Instituto de Química, UNAM.
12. García F.(2005) "síntesis de 3,3'-diindolilmetano empleando una arcilla bentonítica y diferentes fuentes de energía" Tesis de licenciatura en Química, UNAM, FES-C.
13. Gimsing, A. L., Kirkegaard, J. A., & Bruun Hansen, H. C. (2005). Extraction and Determination of Glucosinolates from Soil. *J. Agric. Food Chem.*, 53(25), 9663-9667.
14. Gutiérrez J. (2000). "Síntesis selectiva de diindolilmetanos", Tesis de licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo, FES-Cuautitlán, UNAM.
15. Hnbest H.B., Jones E. R. H . & Smith G. F. (1953) Isolation of a new plant growth hormone, 3-indolylacetonitrile. *J. Chem Soc* 3796

16. Jiménez E. (2014). "*Síntesis, purificación y caracterización de 2-aril-1-arilmetil-1H-benzimidazoles mediante el empleo de energía infrarroja*", Tesis de Licenciatura, Química, FES-Cuautitlán, UNAM.
17. Li, X., & Kushad, M. M. (2004). "*Correlation of Glucosinolate Content to Myrosinase Activity in Horseradish (Armoracia rusticana)*". *J. Agric. Food Chem.*, 52(23), 6950-6955.
18. Manahan, Stanley (2007). "*Introducción a la Química Ambiental*", Editorial Reverte, Madrid. p.p 9-10.
19. McDanell R. E., McLean A. E. M., Hanley A. B., Heaney R. K. & Fenwick G. R. (1987). "Differential induction of mixed-function oxidase (MFO) activity in rat liver and intestine by diets containing processed cabbage: correlation with cabbage levels of glucosinolates and glucosinolate hydrolysis products". *Food Chem. Toxicol.* 25, 363.
20. Mcdanell R. and Mclean A. E. M. (1988) "Chemical and biological properties of indole glucosinolates (glucobrassicins): a review", *Food Chem. Toxicol.*, vol. 26, no. 1, pp. 59 70,
21. Membrillo, M., (2006). "*Producción de nanocompuestos de alta densidad y arcillas modificadas por extrusión utilizando un cabezal mezclador estático*", Tesis de Licenciatura, Ingeniería Química, Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.
22. Michajlovskij N. (1968). "The effect of UV-irradiation on glucobrassicin and other glucosinolates (mustard oil glycosides)". *Experientia* 24, 223.
23. Mishra, Ajay Kumar (2015). "*Bentonite: characteristics, uses and implications for the environment*" Nova Science Publishers, New York. p.p. 153-154.

24. Mohn, T., CuTting, B., Ernst, B., & Hamburger, M. (2007). Extraction and analysis of intact glucosinolates--A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography-mass spectrometry protocol for *Isatis tinctoria*, and qualitative *spongospora subterranea* analysis of other cruciferous plants. *J. Chromatogr., A*, 1166(1-2), 142-151.
25. Mosbah M. Kushad, Allan F. Brown, Anne C. Kurilich, John A. Juvik, Barbara P. Klein, Mathew A. Wallig, and Elizabeth H. Jeffery (1999) "Variation of Glucosinolates in Vegetable Crops of *Brassica oleracea*". *J. Agric. Food Chem.*, 47 (4), 1541–1548
26. natura *FOUNDATION*. (25 de agosto de 2016). Obtenido de natura *FUNDATION*:
<http://www.naturafoundation.es/?objectID=45&action=pdf&id=41433>
27. Penieres G.(1999) "Síntesis de compuestos heterociclicos asistida por una arcilla bentonítica en ausencia de disolventes" Tesis de doctorado en química (química orgánica), UNAM, Facultad de química.
28. Penieres, G., García, J.G., Gutiérrez, J.L. y Álvarez, C. (2003), "Infrared assisted eco-friendly selective synthesis of diindolylmethanes", *Green Chem.*, 5, 337-339
29. Resnick, J. (2000). "*Física*". Editorial CECSA, México D.F. pp. 2-3, 11-3, 15
30. Slominski, B.A., Campbell, L.D., (1989) Formation of indole glucosinolate breakdown products in autolyzed, steamed and cooked brassica vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1297–1302.

31. Slominski, B.A., Campbell, L.D., (1989). Indoleacetonitriles—thermal degradation products of indole glucosinolates in commercial rapeseed (*Brassica napus*) meal. *J. Sci. Food Agric.* 47, 75–84.
32. Śmiechowska, A., Bartoszek, A., & Namieśnik, J. (2010). “*Determination of Glucosinolates and Their Decomposition Products—Indoles and Isothiocyanates in Cruciferous Vegetables*”. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 40(3), 202 - 216.
33. Suzuki, C., Ohnishi-Kameyama, M., Sasaki, K., Murata, T., & Yoshida, M. (2006). “*Behavior of Glucosinolates in Pickling Cruciferous Vegetables*. *J. Agric. Food Chem.*, 54(25), 9430-9436.
34. Vargas, H., (2013). “*Cristalización y mejora de propiedades físicas del ácido poli láctico por tratamiento térmico y por adición de nanoarcilla bentonítica*”, Tesis de Maestría, Licenciatura en Ciencias, Instituto de Ciencias Físicas, Campus Morelos, UNAM.
35. Visentin, M., Tava, A., Iori, R., & Palmieri, S. (1992). “*Isolation and identification for Trans-4-(methylthio)-3-butenyl glucosinolate from radish roots (Raphanus sativus L.)*”. *J. Agric. Food Chem.*, 40(9), 1687-1691.

Anexo 1

Tabla 8: Datos obtenidos para los extractos a diferentes valores de pH y tiempo de irradiación

	Tiempo de reacción y bentonita	INDOL			INDOL-3-ACETONITRILO			DIM		
		%	Tr	Área	%	Tr	área	%	tr	área
Extracto de col	30min pH 3	---	---	---	100	5.65	46295625	---	---	---
Extracto de brócoli		2.9	2.483	299127	97.1	5.591	9694712	---	---	---
Extracto de col	30min pH 7	0.05	2.479	127670	98.85	5.76	221855773	1.19	10.213	2433229
	30min pH 7 3ml EtOH	8.15	2.483	4363230	85.30	5.663	45724261	6.55	10.2	3514718
	1h pH 7 3ml EtOH	0.66	2.483	302069	99.34	5.65	44964096	---	---	---
	1h pH 7	4.47	2.512	3969497	95.53	5.718	84759660	---	---	---
Extracto de brócoli	30min pH 7 3ml EtOH	2.33	2.496	316846	97.67	5.612	13250881	---	---	---
	30min pH 7	---	---	---	100	5.604	17953759	---	---	---
Extracto de col	30min pH 10	0.1	2.483	2180653	99.64	5.781	208292699	0.26	10.217	5297049
	30min pH 10 3ml EtOH	19.40	2.479	3986748	76.21	5.616	15657070	4.39	10.192	900280
	1h pH 10 3ml EtOH		2.478	231602		5.663	63830180	---	---	---
	1h pH 10	5.78	2.483	2839133	87.73	5.646	43081982	6.48	10.204	3182270
Extracto de brócoli	30min pH 10	---	---	---	100	5.565	8695033	---	---	---
	30min pH 10 3ml EtOH	5.8	2.479	770124	94.2	5.587	12291172	---	---	---

Tabla 9. Resultados para extractos de brócoli y col de Bruselas sin reaccionar

Extractos	INDOL			INDOL-3-ACETONITRILO %		
	%	tr	área	%	Tr	área
brócoli	9.50%	2.491	158667	90.50%	5.565	1510508
col de Bruselas	10.64%	2.487	1787186	89.37%	5.625	14993978