

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“CUANTIFICACIÓN DE SULFORAFANO PROCEDENTE DE
GLUCORAFANINA EN RETOÑOS DE
Brassica oleracea var. italica por Cromatografía Líquida de Alta
Resolución”**

ROSA PATRICIA NAVAS NÁJERA

QUÍMICO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

**“CUANTIFICACIÓN DE SULFORAFANO PROCEDENTE DE
GLUCORAFANINA EN RETOÑOS DE
Brassica oleracea var. italica por Cromatografía Líquida de Alta
Resolución”**

ROSA PATRICIA NAVAS NÁJERA
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2004

**JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO:	M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
SECRETARIO:	Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona
VOCAL I:	Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo
VOCAL II:	Lic. Juan Francisco Pérez Sabino
VOCAL III:	Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez
VOCAL IV:	Br. Roberto José Garnica Marroquín
VOCAL V:	Br. Rodrigo José Vargas Rosales

¡Oh, si me dieras tu bendición y ensancharas mi territorio, y si tu mano estuviera conmigo y me libraras del mal, para que no me dañe! Y le otorgo Dios lo que le pidió

1ª. Crónicas 4:10

Agradecimientos

A Dios:

Por su amor incomparable, al conceder las peticiones de mi corazón.

A mi papito:

Abel Francisco Navas García (†)

Porque en el corto tiempo que estuviste a mi lado me amaste y me enseñaste a esforzarme para alcanzar mis metas, nunca lo olvidaré.

A mi mamita:

Sara Eluvia Nájera de Navas

Por ser la bendición más grande en mi vida y el mayor ejemplo a seguir, sin tu apoyo mamita no estaría aquí.

A mis hermanos:

Abel Francisco, Mario David, Josué Fernando, Jorge Estuardo y Tomas.
Por estar siempre conmigo y hacer la vida tan alegre.

A mis amigos:

Bagda Isvetia Santisteban Paz

Iván Enrique Aragón Ruano

Por su apoyo y ánimo.

A mis compañeros:

Claudia, Sofía, Gabriela, Mirza, Germán, Emilio, Edgar, Annabella, Catalina, Carmela, Luis, Marta, Pedro, Walter F. y Walter B.

Por compartir los momentos más alegres y también los más difíciles de esta carrera.

A mis profesores:

M.Sc. Adolfo León Gross

Licda. Diana Pinagel

Lic. Igor Slowin

Ph.D. Oscar Cobar

Ph.D. Alfredo Gálvez

Por sus sabias enseñanzas.

A RGH.:

Por facilitar las instalaciones, el equipo y los reactivos para la realización de esta investigación.

A usted:

Por su presencia.

Dedicatoria

A Dios quién es dueño de todo, a mi mamita, a mi papito
y a todos los niños y niñas con cáncer...

INDICE

1.	Resumen.....	12
2.	Introducción.....	13
3.	Antecedentes.....	14
3.1.	Descripción Botánica del Brócoli.....	14
3.2.	Fenología del crecimiento.....	14
3.2.1.	Fase juvenil.....	14
3.2.2.	Fase de inducción floral.....	14
3.2.3.	Fase de formación de cogollos o fase de retoño.....	15
3.2.4.	Fase de polinización y de fructificación.....	15
3.3.	Compuestos presentes en <i>Brassica oleracea italica</i> (brócoli).....	15
3.3.1.	Tabla No. 1 Compuestos presentes en <i>Brassica oleracea</i> <i>var italica</i> (brócoli).....	16
3.4.	Investigaciones previas	17
3.4.1.	Brócoli como anticancerígeno.....	17
3.4.2.	Presencia del Sulforafano en brócoli.....	18
3.4.3.	Cantidad presente de glucorafanina (precursor del Sulforafano) en brócoli.....	15
3.4.4.	Isotiocianatos presentes en <i>Brassica oleracea var italica</i> (brócoli).....	19
3.4.5.	Tabla No. 2 Isotiocianatos presentes en <i>Brassica oleracea var italica</i> (brócoli).....	20
4.	Justificación.....	21
5.	Objetivos.....	21
6.	Hipótesis.....	23
7.	Materiales y métodos.....	24
7.1.	Universo.....	24
7.2.	Muestra.....	24
7.3.	Recursos.....	24
7.3.1.	Humanos.....	24
7.3.2.	Materiales.....	24
7.3.2.1.	Recursos Institucionales.....	24
7.3.2.2.	Equipo.....	24

7.3.2.3.	Cristalería.....	25
7.3.2.4.	Reactivos.....	26
7.3.3.	Métodos.....	26
7.3.3.1.	Resumen de metodología.....	26
7.3.3.2.	Cultivo de brócoli.....	26
7.3.3.3.	Aislamiento de Sulforafano.....	27
7.3.3.4.	Separación de Sulforafano en columna sephadex..	28
7.3.3.5.	Identificación y cuantificación por HPLC de Sulforafano.....	29
7.4.	Diseño estadístico.....	30
8.	Resultados	31
8.1.	Tabla No. 3 Condiciones de cultivo desde siembra de pilones hasta su cosecha.....	31
8.2.	Tabla No. 4 Obtención de extracto a partir de retoños de brócoli.....	31
8.3.	Tabla No. 5 Cuantificación de Sulforafano procedente de extractos de retoños de brócoli.....	32
8.4.	Tabla No. 6 Ensayo de repetibilidad y linealidad de Sulforafano.....	32
9.	Discusión de resultados.....	33
9.1.	Cultivo de brócoli	33
9.2.	Extracción de Sulforafano.....	33
9.3.	Determinación y Cuantificación del Sulforafano.....	34
9.3.1.	Evaluación de ruido.....	34
9.3.2.	Evaluación de columna.....	34
9.3.3.	Ensayos para la determinación y cuantificación del Sulforafano.....	34
9.3.3.1.	Determinación de longitud de onda.....	34
9.3.3.2.	Purificación del extracto de retoños de brócoli por Cromatografía líquida de alta resolución	35
9.3.3.3.	Cuantificación de Sulforafano presente en retoños de brócoli.....	35
9.3.3.4.	Ensayo de repetibilidad.....	36
9.3.3.5.	Ensayo de linealidad.....	37
10.	Conclusiones.....	38
11.	Recomendaciones.....	39

12.	Referencias	40
13.	Anexos.....	44
1.	Fotografías de Brócoli.....	45
2.	Estructuras de compuestos presentes en Brócoli.....	50
3.	Diagramas de flujo.....	53
3.1.	Diagrama de flujo general.....	53
3.2.	Diagramas de flujo específicos.....	54
4.	Tablas.....	57
5.	Curva de linealidad.....	61
6.	Cromatogramas.....	62
7.	Cálculos.....	83

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

1. Fotografía No. 1 “Planta de Brócoli”	45
2. Fotografía No. 2 “Brócoli con 15 días de germinación (pilonos)”	45
3. Fotografía No. 3 “Brócoli con 21 días de germinación 6 días de cultivo”	45
4. Fotografía No. 4 “Brócoli en fase juvenil”	46
5. Fotografía No. 5 “Brócoli en fase de inducción floral”	46
6. Fotografía No. 6 “Formación de cogollos en el Brócoli”	46
7. Fotografía No. 7 “Brócoli en Fase de Retoño Día 1”	46
8. Fotografía No. 8 “Brócoli en Fase de Retoño Día 2”	46
9. Fotografía No. 9 “Brócoli en Fase de Retoño Día 3”	47
10. Fotografía No. 10 “Brócoli en Fase de Retoño Día 4”	47
11. Fotografía No. 11 “Brócoli en Fase de Retoño Día 5”	47
12. Fotografía No. 12 “Cosecha de retoños de Brócoli”	47
13. Fotografía No. 13 “Comparación de Brócoli maduro y Brócoli en retoño”	47
14. Fotografía No. 14 “Retoños de Brócoli para licuar”	48
15. Fotografía No. 15 “Retoños de Brócoli licuados muestra húmeda”	48
16. Fotografía No. 16 “Extracciones realizadas con diclorometano”	48
17. Fotografía No. 17 “Extracto obtenido de retoños de Brócoli”	48
18. Fotografía No. 18 “Cromatografo para Cromatografía Líquida de alta Resolución utilizado para los ensayos”	49

ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla No. 1 “Compuestos y elementos presentes en <i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> (bócoli)”.....	16
2. Tabla No. 2 “Isotiocianatos presentes en <i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i> (brócoli)”.....	20
3. Tabla No. 3 “Condiciones de cultivo desde siembra de pilones hasta su cosecha”.....	31
4. Tabla No. 4 “Obtención de extracto a partir de retoños de brócoli”.....	31
5. Tabla No. 5 “Cuantificación de Sulforafano procedente de extractos de retoño de brócoli”.....	32
6. Tabla No. 6 “Ensayo de repetibilidad y linealidad del Sulforafano”.....	32
7. Tabla No. 7 “Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la evaluación de la columna”	57
8. Tabla No. 8 “Evaluación de columna LiChrospher Rp-18”	57
9. Tabla No. 9 “Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución en la determinación de la longitud de onda”	58
Tabla No. 10 “Determinación de la longitud de onda para la cuantificación de Sulforafano”	58
10. Tabla No. 11 “Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución en la purificación de extracto”	58
11. Tabla No. 12 “Proceso de purificación de Sulforafano en extracto procedente de retoños de Brócoli”	59
12. Tabla No. 13 “Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de Sulforafano en el extracto de retoños de Brócoli”	59
13. Tabla No. 14 “Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el ensayo de Repetibilidad”	59
14. Tabla No. 15 “Ensayo de Repetibilidad”	60
15. Tabla No. 16 “Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el ensayo de linealidad”	60
16. Tabla No. 17 “Ensayo de linealidad para Sulforafano”	60

INDICE DE CROMATOGRAMAS

1. Ensayo “Evaluación de Ruido”	62
1.1. Cromatograma No. 1 “Evaluación de ruido”	62
2. Ensayo “Evaluación de Columna”	63
2.1. Cromatograma No. 2 “Inyección No. 1 de Hidrocarburos para la evaluación de columna”	63
2.2. Cromatograma No. 3 “Inyección No. 2 de Hidrocarburos para la evaluación de columna”	64
2.3. Cromatograma No. 4 “Inyección No. 3 de Hidrocarburos para la evaluación de columna”	65
3. Ensayo “Determinación de Longitud de Onda”	66
3.1. Cromatograma No. 5 “Sulforafano a 215nm 70.80 µg/ml”	66
3.2. Cromatograma No. 6 “Sulforafano 215nm 35.4 µg/ml”	67
3.3. Cromatograma No. 7 “Sulforafano a 236 nm 70.80 µg/ml”	68
3.4. Cromatograma No. 8 “Sulforafano a 260 nm 70.80 µg/ml”	69
4. Ensayo “Purificación de extracto de Retoños de Brócoli”	70
4.1. Cromatograma No. 9 “Extracto sin purificar 2 mg/ml”	70
4.2. Cromatograma No. 10 Muestra purificada por columna cromatografica de Sephadex”	71
4.3. Cromatograma No. 11 “Muestra purificada por placa cromatografica de Sílica gel”	72
5. Ensayo “Cuantificación de Sulforafano”	73
5.1. Cromatograma No. 12 “Sulforafano tratado por columna cromatografica”	73
5.2. Cromatograma No. 13 “Muestra cuantificada”	74
6. Ensayo “Repetibilidad”	75
6.1. Cromatograma No. 14 “Inyección No. 1 de 75µg/ml de Sulforafano”	75
6.2. Cromatograma No. 15 “Inyección No. 2 de 75µg/ml de Sulforafano”	76
6.3. Cromatograma No. 16 “Inyección No. 3 de 75µg/ml de Sulforafano”	77

7. Ensayo "Linealidad"	78
7.1. Cromatograma No. 17 "Inyección de Sulforafano 18.75µg/ml"	78
7.2. Cromatograma No. 18 "Inyección de Sulforafano 37.50µg/ml"	79
7.3. Cromatograma No. 19 "Inyección de Sulforafano 75.00µg/ml"	80
7.4. Cromatograma No. 20 "Inyección de Sulforafano 112.50µg/ml"	81
7.5. Cromatograma No. 21 "Inyección de Sulforafano 150.00µg/ml"	82

1. RESUMEN

Se determinó la presencia de 4.76 mg/g (0.476 % P/P) de Sulforafano de la muestra de retoños de brócoli que se cultivó bajo un sistema controlado (Tabla No. 3), temperatura 18-22 °C, pH 6.5, fotoperíodo de 11-13 horas de luz, humedad relativa intermedia a baja, además el brócoli fue cortado al 5º. día de retoño (Anexo No. 1, Fotografías No. 1-13), para la obtención de óptimos resultados. Bajo este proceso se obtuvieron 16 retoños de brócoli (ver anexo No. 1, fotografía No. 12), con lo que se procedió a la fase de extracción.

En el proceso de extracción se realizó una hidrólisis con una solución de ácido clorhídrico a pH 3 con lo que la glucorafanina se transforma a Sulforafano. Posteriormente se realizaron extracciones líquido-líquido usando como solvente diclorometano quedando un gel de color café (Anexo No. 1, Fotografías No. 14-17).

Se separó el Sulforafano presente de los otros compuestos contaminantes usando cromatografía por exclusión de tamaño (Sephadex) y una placa cromatográfica de sílica gel preparativa, identificando y cuantificando de esta manera el Sulforafano presente en el extracto por Cromatografía líquida de Alta Resolución con detector de luz ultravioleta - visible (UV-Vis).

2. INTRODUCCIÓN

Brassica oleracea var italica, conocida con el nombre común de brócoli, es una planta hortícola, una especie de col, muy afín taxonómicamente a la coliflor. El brócoli es una mata ramificada de unos 60 cm. de altura con capítulos verdes comestibles y tallos gruesos. Presenta flores carnosas de colores púrpura y blanco, también comestibles. La variedad pequeña o calabresa es conocida en algunos lugares como brócoli italiano (1,2).

La *Brassica oleracea var italica* es un alimento natural utilizado como protector del cáncer; en la última década se han realizado estudios demostrando el importante papel de esta crucífera en la prevención de un gran número de tumores, gracias a los isotiocianatos que posee en especial 1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano llamado también Sulforafano, proveniente de la glucorafanina presente en brócoli, este compuesto actúa como precursor de enzimático, estimulando las defensas anticancerígenos previniendo la formación y crecimiento de tumores cancerígenos (1,3).

Tomando en consideración lo anterior, se extrajo, identificó y cuantificó el Sulforafano [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil) butano], proveniente de glucorafanina como precursor, presente en *Brassica oleracea var italica*, (brócoli), en su estado fenológico de retoño, ya que durante esta etapa posee mayor cantidad (3).

El proceso se inicio con el cultivo de brócoli, seguido de una hidrólisis para la conversión de glucorafanina a Sulforafano y luego por extracción líquido-líquido para la obtención de Sulforafano, purificándolo por columna cromatográfica de Sephadex y placa cromatográfica preparativa de silica gel, y por último se identificó y cuantificó el Sulforafano por cromatografía líquida de alta resolución –HPLC- con detector ultravioleta-visible (UV-VIS).

3. ANTECEDENTES

3.1. Descripción Botánica del Brócoli:

Brassica oleracea var. italica o brócoli pertenece a las Brassicáceas, que son hierbas anuales o bianuales con cerca de 100 especies, algunas de estas son consideradas malezas y otras son utilizadas como alimento o condimento (1) (Anexo No. 1, Fotografía No. 1).

El brócoli, es considerado como una verdura y se han desarrollado varias variedades para su mejoramiento, cada una de estas tiene características especiales (1):

- Sultán: Variedad capaz de soportar el calor. La cabeza es llena y las flores son pequeñas (4).
- Mariner: Cabeza en forma de domo, flor pequeña y apariencia uniforme, color intenso (4).
- Barbados: Cabeza en forma de domo, color excelente y tallo robusto (4).
- Arcadia: Puede subsistir a varios climas, produce cabezas en forma de domo con ramificaciones robustas (4).

Se debe de cultivar en un clima frío, ya que para su óptimo desarrollo requiere temperatura alrededor de los 8 °C, aunque puede soportar temperaturas entre los 2°C y 25°C y un fotoperíodo de 11-13 horas luz y la humedad relativa intermedia a baja.

3.2. Fenología del crecimiento:

Se divide en varias fases hasta que es cosechado, el tiempo de la misma depende de la variedad que se esté utilizando:

3.2.1. Fase Juvenil: Se inicia con la germinación y se caracteriza porque en esta fase sólo se forman hojas (5).

3.2.2. Fase de Inducción Floral: Por la acción de las bajas temperaturas está en la aptitud para reproducirse y en la capacidad para formar un cogollo de yemas

hipertrofiadas y hojas. Para la formación de las flores además, se debe considerar la variedad y la edad de la planta, cuando inicia la floración termina la producción de hojas (5).

3.2.3. Fase de formación de cogollos o fase de retoño:

Las ramificaciones preflorales del cogollo inician un crecimiento en longitud, lo que ocasiona una descompactación de la inflorescencia. En esta fase es importante el clima y la humedad relativa. Para poder florecer, los cultivares necesitan frío (5). Esta es la fase de más importancia para la presente investigación, ya que según los estudios realizados por Fahey (1997, Maryland, Estados Unidos) se sabe que durante esta fase el brócoli presenta mayor cantidad de glucorafanina precursor del Sulforafano (3,5).

3.2.4. Fase de polinización y de fructificación:

Es cruzada y entomófila. Comercialmente el corte de las flores se realiza previa a que las flores se abran para poder ser polinizadas, debido a que la compactación de la cabeza se reduce y ocurre un cambio de coloración (5).

3.3. Compuestos presentes en *Brassica oleracea italica* (brócoli):

Brassica oleraceae var. italica, (brócoli) es una verdura muy utilizada ya que es una fuente concentrada de vitaminas, minerales, fibra y sustancias fitoquímicas no nutritivas, como por ejemplo compuestos azufrados, los cuales en un trabajo pionero de Wattenberg (1977) se identificaron en las crucíferas cuya aplicación es la protección contra el cáncer (6).

A continuación se presenta la tabla No. 1 que ilustra la composición del brócoli (7):

Tabla No. 1:

Compuestos y elementos presentes en *Brassica oleracea var. italica* (Brócoli)(6)

Componente		Precursor ¹	Metabolito	Beneficios para la salud
Glucosinolatos	Glucosinolatos de sulfuro	Glucorafanina $C_8H_9N_2OC=NOSO_2OK$ $SC_6H_{11}O_5$	<u>Isotiocianatos:</u> $RSO(CH_2)_nNCS$ $CH_3SO(CH_2)_nNCS$	Pueden inhibir tumores. En brócoli se aisló el 1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano (Sulforafano) que es un potente inhibidor de tumores mamarios y estomacales.
	Glucosinolatos de olefinas	Sinigrina $C_3H_5C=NOSO_2OK$ $SC_6H_{11}O_5$	<u>Isotiocianatos:</u> $RSO(CH_2)_nNCS$	Pueden proporcionar protección contra los agentes químicos inductores de cáncer, inclusive de la replicación del virus VIH.
	Glucosinolatos de Indolito	Glucobrasicina $C_9H_8NC=NOSO_2OK$ $SC_6H_{11}O_5$	<u>Isotiocianatos:</u> $RSO(CH_2)_nNCS$	Previene el cáncer en general, también se ha determinado que son protectores de cánceres inducidos por hormonas.
		Neoglucobrasicina $C_9H_8NC=NOSO_2OK$ $SC_6H_{11}O_5$	<u>Isotiocianatos:</u> $RSO(CH_2)_nNCS$	
Sulfoxidos ($R_2S=O$)			S-metilcisteín sulfóxido $C_{18}H_{28}O_3S$	Inhibe La mutagénesis inducida químicamente y por radiación UV
Vitaminas			Vitamina A, C, Tiamina, Niacina y Riboflavina.	Las vitaminas A y C se ha demostrado que poseen propiedades anticancerígenos además de las que ya se conocían.
Minerales			Potasio, Magnesio, Hierro, Zinc, Fósforo y Calcio	Ayudan en el crecimiento y fortalecimiento de huesos y dientes sanos.

Fuente: Mazza, G. Alimentos Funcionales. Aspectos Bioquímicos y de Procesado. Edición Acibia S.A. España. 1998. Pp. 33-55.

¹ Revisar estructuras en el Anexo No. 2

3.4. Investigaciones previas:

3.4.1. Brócoli como anticancerígeno:

Desde 1977 la Universidad Johns Hopkins se interesó por el estudio del brócoli, debido a los compuestos azufrados presentes, ya que podrían ser una cura para el cáncer, estos estudios fueron realizados tanto por científicos estadounidenses como franceses. Uno de los profesores que más ha dedicado su trabajo a la investigación del brócoli como anticancerígeno es el profesor J. Fahey de la Universidad de Johns Hopkins de Baltimore (Maryland, USA), en 1997 logró aislar e identificar una sustancia llamada Sulforafano [1-isotiocianato-4-metilsulfinil)butano)], un compuesto natural del brócoli que sería el motor del aumento de las enzimas que bloquean la formación tumoral (8).

De igual manera J. Mercola (1997) comprobó en estudios con animales, que el Sulforafano promueve enzimas que dan protección molecular al cáncer causado por químicos y ayudando a reducir este mal (9).

La función del Sulforafano consiste en actuar como un químico-protector-deliberado, que incrementa en el cuerpo mecanismos de defensa que reducen la susceptibilidad a carcinógenos (9).

El Sulforafano actúa de una forma indirecta, estimulando nuestras defensas anticancerígenas y de esta forma previene la aparición de tumores, actúa rápidamente con la desintoxicación por electrófilos y la reactividad del oxígeno a los metabolitos que pueden causar la mutagénesis de las células y la neoplasia (3,9).

El trabajo elaborado en el 2001 por Finley, J. et. al. y el Centro Nacional de Investigación Científica de Francia, afirma que esta hortaliza puede ser un eficaz sustituto de los antibióticos que eliminan la bacteria *Helicobacter pylori*. Además de ayudar a la digestión de los alimentos, el Sulforafano presente en grandes cantidades, es eficaz contra todo tipo de cáncer (10,11).

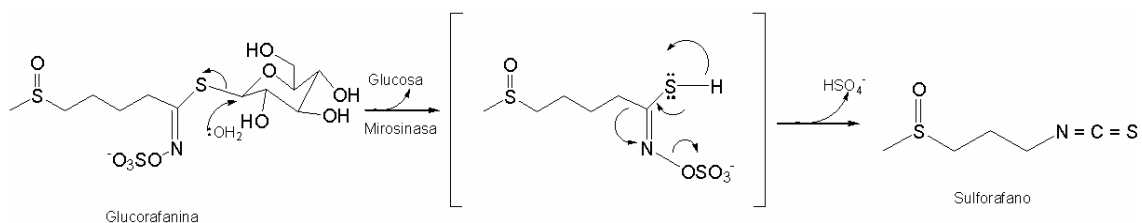
3.4.2. Presencia del Sulforafano en brócoli:

En el año 1992 Paul Talalay y sus colaboradores aislaron el Sulforafano y desde entonces se han hecho multitud de trabajos para comprobar sus propiedades anticancerígenas (12).

En un trabajo efectuado por T. Shapiro, et. al. (2001), se reporta que la sustancia presente en el brócoli es la glucorafanina como precursor del Sulforafano. La glucorafanina se hidroliza y produce Sulforafano, siendo este el compuesto que finalmente consume el organismo como anticancerígeno (13).

3.4.3. Cantidad presente de glucorafanina (precursor del Sulforafano) en brócoli:

A mayor cantidad de glucorafanina en brócoli mayor será la cantidad de Sulforafano a obtener (14). La siguiente reacción muestra la conversión de Sulforafano a partir de glucorafanina y la enzima mirosinasa presentes en el brócoli (14).



El retoño de brócoli es una excepcional fuente de introducción de células enzimáticas que desintoxican de los químicos cancerígenos, ya que en dichos brotes existe una concentración elevada de Sulforafano (14,16,17).

En el año 2001 Paul Talalay reportó que pequeñas cantidades de retoño de brócoli fresco contienen grandes cantidades de protección contra el cáncer en forma natural, cálculos aproximados determinaron que retoños de brócoli en Estados Unidos poseen cinco gramos de glucorafanina (precursor del Sulforafano) en 150 gramos de brócoli, lo que equivaldría a 0.6 %P/P de Sulforafano debiéndose consumir 720 gramos de brócoli (17,18).

Una persona debe consumir 720 gramos de retoño de brócoli fresco durante la semana para reducir en un 50% el riesgo de cáncer (16).

Estudios realizados por Talalay (2001) y Mercola (2002), advierten que la cantidad de Sulforafano en el brócoli fresco varía considerablemente de unos brotes a otros, por lo que es muy difícil obtener cantidades tan elevadas de Sulforafano en todos sus brotes (3, 9,10).

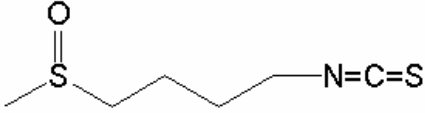
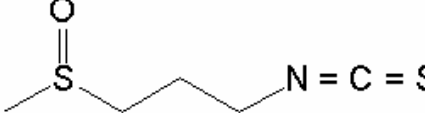
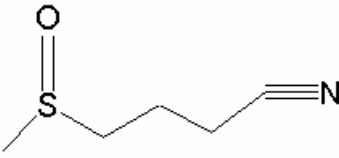
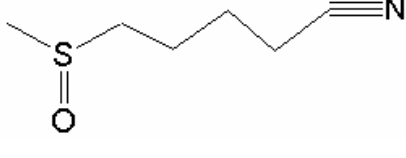
3.4.4. Isotiocianatos procedentes de glucosinolatos presentes en *Brassica oleracea var italica* (brócoli):

El Sulforafano fue identificado en 22 variedades de repollo, inicialmente por Daxenbichler, y luego por un método modificado de Daxenbichler y VanEtten, detectando además del Sulforafano compuestos muy parecidos llamados isotiocianatos que también se encuentran en *Brassica oleracea var italica* (18).

Los compuestos azufrados reportados de mayor importancia se especifican en la tabla No. 2 (Pag. No. 17). Todos estos compuestos han sido identificados por cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplado a espectroscopía de masas (18).

Tabla No. 2

Isotiocianatos presentes en *Brassica oleracea var. Italica* (brócoli)

 <p>1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano</p> <p>Sulforafano</p> <p>(compuesto anticancerígeno)</p> <p>$[\alpha]_{D}^{22}$: -79.3 (c = 1.22g/100ml en cloroformo)</p> <p>$[\alpha]_{D}^{25}$: -78.6 (c = 1.19g/100ml en cloroformo)</p> <p>UV_{max} 238 nm ($\epsilon = 910 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)</p> <p>UV_{max} 226 nm ($\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), sobre adición de 0.1M NaOH.</p>	 <p>1-isotiocianato-3-(metilsulfinil)propano</p>
 <p>4-(metilsulfinil)butanonitrilo(12).</p>	 <p>5-(metilsulfinil)pentanonitrilo</p>

Rosa Patricia Navas Nájera, 2004.

Para la separación, purificación e identificación de isotiocianatos se utiliza básicamente un proceso que consiste en una hidrólisis, extracción con solventes y determinación por HPLC (19,20).

4. JUSTIFICACIÓN

En la última década se ha demostrado el importante papel de la incorporación del brócoli en la dieta con el propósito de prevenir un gran número de tumores e inhibir la ocurrencia de cáncer gracias a la presencia de Sulforafano procedente de la glucorafanina presente en retoños de brócoli. El Sulforafano [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil) butano], actúa estimulando las defensas anticancerígenas previniendo la aparición de tumores. Según investigaciones previas los retoños de brócoli después de su germinación, contienen mayor cantidad de glucorafanina y por lo tanto mayor cantidad de Sulforafano, que en la planta madura.

Ante la alternativa de la incorporación del brócoli y otras crucíferas con las propiedades mencionadas en la dieta y considerando que se trata de un cultivo no tradicional de exportación y de comercialización en Guatemala se pretende identificar y cuantificar el Sulforafano en el estado fenológico de retoño del brócoli en una de las especies mas cultivadas en nuestro país.

5. OBJETIVOS

5.1. General:

Cuantificar el Sulforafano, [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano], procedente de glucorafanina presente en *Brassica oleracea var. Italica* en su fase de retoño mediante cromatografía líquida de alta resolución-HPLC-.

5.2. Específicos:

- 5.2.1. Cultivar retoños de *Brassica oleracea var. Italica*, cultivada en condiciones controladas de temperatura, pH, luz y humedad relativa.
- 5.2.2. Aislar el Sulforafano, [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano] procedente de glucorafanina presente en *Brassica oleracea var. italica*.
- 5.2.3. Identificar y cuantificar Sulforafano, [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano] procedente de glucorafanina presente en *Brassica Oleracea var. Italica* por cromatografía líquida de alta resolución-HPLC- con detector de Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

6. HIPÓTESIS

Retoños de *Brassica oleracea var italica*, cultivados en condiciones controladas de temperatura, pH, luz y humedad relativa presenta cantidades medibles de Sulforafano.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Universo: *Brassica oleracea var italica*

7.2. Muestra: *Brassica oleracea var italica* cultivada en medio controlado.

7.3. Recursos:

7.3.1. Humanos:

7.3.1.1. Asesor Interno: Licenciada Diana Pinagel

7.3.1.2. Asesor Externo: Licenciado Jorge García

7.3.2. Materiales:

7.3.2.1. Recursos Institucionales:

7.3.2.1.1. Empresa R.G.H., S.A.

7.3.2.1.2. Unidad de Análisis Instrumental, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad San Carlos de Guatemala.

7.3.2.1.3. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad San Carlos de Guatemala.

7.3.2.1.4. Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad San Carlos de Guatemala.

7.3.2.1.5. Departamento de Toxicología, Antigua Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad San Carlos de Guatemala.

7.3.2.2. Equipo:

7.3.2.2.1. Rotavapor

7.3.2.2.2. Cromatoplasmas de Sílica gel 60F-254

7.3.2.2.3. Columna Cromatográfica de Vidrio de 3X50cm

7.3.2.2.4. Balanza analítica Sartorius

7.3.2.2.5. Lámpara de luz ultravioleta 254nm Merck A-

7.3.2.2.6. Desecadora

7.3.2.2.7. Cromatógrafo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución Merck HITACHI. (Anexo No. 1, Fotografía No. 18).

Bomba: Merk HITACHI Bomba Inteligente LC 6200^a

Detector : Merk HITACHI UV-VIS L 2450

Columna: Merck LiChrospher Rp-18e 250X22.5 mm

7.3.2.3. Cristalería:

	Capacidad	Material
Cámara Cromatográfica	20 X 20	Vidrio
Balones aforados	100, 50, 25 ml	Vidrio
Probeta	100, 25, 10 ml	Vidrio
Beakers	250, 100, 50, 25 ml	Vidrio o plástico
Kitazato	250 ml	Vidrio
Probeta	50 ml	Vidrio
Tubos de ensayo	----	Vidrio
Campanas	----	Dunhan
Capilares	----	Sin heparina
Vidrio de reloj	Pequeño	Vidrio
Termómetro	0 – 300 °C	----
micro pipetas	10 cm. de longitud	Vidrio
Espátula	----	Acero inoxidable
Rejilla	----	Asbesto
Pinzas universales	----	----
Balanza	----	Semi-analítica
Manguera	3 pies de largo	Para vacío
Soporte universal	----	----
Tijeras	----	----
Matraces Earlenmeyer	250 y 25 ml	Vidrio
Micropipetas	---	Vidrio

7.3.2.4. Reactivos:

7.3.2.4.1. Fertilizante líquido 75N 25P 25K

7.3.2.4.2. Hexano p.a.

7.3.2.4.3. Diclorometano grado reactivo

7.3.2.4.4. Sulfato de sodio anhidro Pureza 99.8%

7.3.2.4.5. Agua desmineralizada

7.3.2.4.6. Sephadex G-10

7.3.2.4.7. Nitrógeno gaseoso

7.3.2.4.8. Metanol p.a.

7.3.2.4.9. Acetona p.a.

- 7.3.2.4.10. Cloroformo p.a.
- 7.3.2.4.11. Acetonitrilo HPLC
- 7.3.2.4.12. Agua HPLC
- 7.3.2.4.13. Ácido clorhídrico

7.3.3. Métodos:

7.3.3.1. Resumen (Anexo No. 3):

Se cultivaron 16 plantas de brócoli bajo un sistema controlado, dentro de la ciudad de Guatemala a temperatura 15-22 °C, pH 6.5, fotoperíodo de 11-13 horas de luz, humedad relativa intermedia a baja, este proceso se detalla en inciso 7.3.3.2. (21).

Luego se realizó una hidrólisis con una solución de ácido clorhídrico de pH 3, para obtener Sulforafano a partir de glucorafanina. Posteriormente se realizaron extracciones líquido-líquido usando como solvente diclorometano y agua hasta llevar el extracto a un aceite de color café-dorado, este proceso se detalla en el inciso 7.3.3.3. (19).

Se separó el Sulforafano de los otros compuestos mediante cromatografía en columna utilizando Sephadex como fase estacionaria y metanol al 5% como fase móvil; además una placa cromatográfica de sílica gel que se eluye con hexano:eterdietílico 50:50, según la metodología del inciso 7.3.3.4. Y por último se identificó y cuantificó por medio de cromatografía líquida de alta resolución –HPLC- con detector de luz ultravioleta-visible, como lo indica el inciso 7.3.3.5. (19).

7.3.3.2. Cultivo:

7.3.3.2.1. Medir la distancia entre planta y planta, ya que este debe de ser de 22 cm en disposición triangular, esto es para permitir una mejor distribución de plantas y de esa manera una mejor difusión de aire, mejor sanidad y temperatura de cultivo.

7.3.3.2.2. Sembrar 20 plantas.

7.3.3.2.3. Fertilizar con fertilizante líquido 75N, 25P, y 25K :

7.3.3.2.4. Controlar que el pH del suelo tomando dos gramos de este mezclarse en agua y tomar el pH este debe de oscilar entre los 5.5 a 7.5 siendo el óptimo 6.5.

7.3.3.2.5. Cortar el cultivo al llegar al 5to. día de retoño, es decir cuando tiene dos hojas, se corta el cultivo.

7.3.3.3. Aislamiento de Sulforafano:

7.3.3.3.1. Pesar 900g de brócoli y licuar hasta la formación de una pasta.

7.3.3.3.2. Desgrasar la muestra con 400mL de hexano a temperatura ambiente.

7.3.3.3.3. Separar la muestra, filtrar y dejar al aire hasta secar.

7.3.3.3.4. Pesar la muestra seca y adicionar 500ml de solución de ácido clorhídrico a pH 3 para su hidrólisis durante 24 horas.

7.3.3.3.5. Liofilizar el producto obtenido (harina).

7.3.3.3.6. Extraer con diclorometano seco a temperatura ambiente.

7.3.3.3.7. Concentrar en un rotavapor a 40°C el extracto crudo de diclorometano, hasta la obtención de un aceite de color café oscuro.

7.3.3.3.8. Lavar el concentrado dos veces con 150ml de agua.

7.3.3.3.9. Mezclar las capas acuosas y homogenizar

7.3.3.3.10. Saturar con cloruro de sodio las capas acuosas y reextraer con 400ml de diclorometano.

7.3.3.3.11. Secar la capa de diclorometano con sulfato de sodio anhidro.

7.3.3.3.12. Concentrar al vacío en un rotavapor a 40°C, hasta que el extracto concentrado sea de color café dorado.

(Diagrama de flujo, Anexo No. 3.2.)

7.3.3.4. Separación de Sulforafano en columna de Sephadex:

7.3.3.4.1. Colocar el extracto de brócoli obtenido en el inciso 6.3.3.3.12, dentro de una columna preparatoria abierta (60cm X 3cm de diámetro interno) conteniendo Sephadex gel de filtración medio.

7.3.3.4.2. Eluir con metanol al 5% en agua a una velocidad de flujo de 2-5ml/min.

7.3.3.4.3. Descartar un volumen de aproximadamente 220ml.

7.3.3.4.4. Colectar 10 fracciones de eluato de 10ml cada una.

7.3.3.4.5. Saturar con cloruro de sodio las capas acuosas.

7.3.3.4.6. Reextraer con 400ml de diclorometano cada capa.

7.3.3.4.7. Secar la fase de diclorometano con sulfato de sodio anhidro.

7.3.3.4.8. Concentrar cada fracción al vacío en un rotavapor a 40°C,

7.3.3.4.9. Secar bajo nitrógeno, hasta la formación de una sustancia semicristalina de color café claro.

7.3.3.4.10. Las fracciones derivadas de brócoli contienen isotiocianatos y nitrilos (19):

- 1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano (IMSB)
- 1-isotiocianato-3-(metilsulfinil)propano (IMSP)
- 4-(metilsulfinil)butanonitrilo (MSBN)
- 5-(metilsulfinil)pentanonitrilo (MSPN)

(Diagrama de flujo, Anexo No. 3.3.)

7.3.3.4.11. Purificar las fracciones concentradas en columna de Sephadex, representando el rendimiento de 1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano (IMSB) en 50g de Brócoli.

7.3.3.4.12. Purificar las fracciones concentradas por medio de cromatografía en capa fina preparativa de silica gel (20 X 20cm, espesor 1mm), usando como solventes hexano:eter dietílico 50:50.

(Diagrama de flujo, Anexo No. 3.4)

7.3.3.5. Identificación y cuantificación de Sulforafano [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano] por cromatografía líquida de alta resolución -HPLC-:

7.3.3.5.1. Para la identificación y cuantificación del Sulforafano por cromatografía líquida de alta resolución –HPLC-, diluir las muestra obtenidas de la cromatografía en capa fina de silica gel, en 0.5 ml con acetonitrilo y establecer las siguientes condiciones:

7.3.3.5.1.1. Columna: LiChrospher Rp-18e 15µm

7.3.3.5.1.2. Fase móvil:
acetonitrilo:ácido clorhídrico pH 5.4
(85:15)

7.3.3.5.1.3. Flujo: 1 ml/min.

7.3.3.5.1.4. Detector: Ultravioleta-visible (236nm)

7.3.3.5.1.5. Inyección: 10 µl.

(Diagramas de flujo, Anexo No. 3.5.)

7.4. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

Debido a la naturaleza de la prueba y el analito que se analiza (Sulforafano), cuyas concentraciones varían de un cultivo a otro e incluso entre un estado fenológico y otro, y tomando en consideración que no se ha realizado ningún tipo de estudio en brócoli cultivado en Guatemala se realizó un estudio exploratorio donde se verificó la presencia de Sulforafano y se cuantificó por Cromatografía Líquida de alta resolución.

Se realizó ensayo de repetibilidad (5 repeticiones) y de linealidad (5 puntos), para confirmar que los resultados son confiables con el método utilizado.

En el ensayo de repetibilidad se calculó el coeficiente de variación y en el de linealidad el coeficiente de regresión lineal.

7.4.1. Muestra analizada: Brócoli cultivado en Guatemala (*Brassica oleracea var. Italica*).

7.4.2. Variables medidas: Concentración de sulforano expresado en gramos de Sulforafano por gramo de muestra.

Se obtuvieron 16 retoños realizando el proceso de extracción y cuantificación por duplicado.

8. RESULTADOS

Se cultivo brócoli en las condiciones predeterminadas como lo demuestra la siguiente tabla:

Tabla No. 3
Condiciones de cultivo desde siembra de pilones hasta su cosecha

Condiciones	Fase juvenil (pilones)	Fase de inducción Floral	Retoños				
			Días				
			1	2	3	4	5
Temperatura °C	---	18 – 22	20	21	22	18	18
Humedad	---	Intermedia	Intermedia				
pH del suelo	---	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Fotoperíodo	---	13	13	13	13	13	13
Fotos	2 – 3	4 - 6	7	8	9	10	11-13

Para la obtención del extracto se comenzó con secar la muestra. La muestra seca se hidrolizó y luego se extrajo con diclorometano, el cual se evaporó en un rotavapor hasta la obtención del extracto que luego se purificó por cromatografía en columna (F.M. metanol al 5%; F.E. Sephadex) y cromatografía en capa fina (F.M. hexano: éter dietílico 50:50; F.E. Sílica gel), como se aprecia en la siguiente tabla:

Tabla No. 4
Obtención de extracto a partir de retoños de brócoli

	Muestra húmeda	Muestra seca	Extracto obtenido
Cantidad (g)	900.00	205.50	3.4060
Color	Verde	Café claro	Café dorado
Apariencia	Pastoso	Harina	Gel
Solvente utilizado para la extracción	600 ml de Ácido clorhídrico pH 4	---	4 litros de Diclorometano
Fotos	15 – 16	---	17

La concentración del Sulforafano procedente de retoños de brócoli se calculo por referencia de un estándar y de la ecuación obtenida por el ensayo de regresión lineal, lo que se aprecia en la siguiente tabla:

Tabla No. 5
Cuantificación de Sulforafano procedente de extractos de retoños de brócoli

Anexo No. 6.5	Sulforafano	Tiempo de retención	Área del pico	Concentración de Sulforafano (µg/ml)	Concentración de Sulforafano en 100g de muestra (%P/P)
Cromatograma No. 12	Estándar	2.41	43100	70.8	---
Cromatograma No. 13	Extracto	2.40	61221	95.26	0.476

Se realizó un ensayo de repetibilidad y linealidad con el fin de observar la precisión del método y su modelo lineal, teniendo muy buenos resultados, lo que se demuestra en la siguiente tabla:

Tabla No. 6
Ensayo de Repetibilidad y Linealidad de Sulforafano

Ensayo	Coeficiente de Variación	Coeficiente de regresión lineal	Cromatogramas en Anexos
Ensayo de repetibilidad	0.63	---	Anexo 6.6
Ensayo de linealidad	---	0.9938	Anexo 6.7

9. DISCUSION DE RESULTADOS

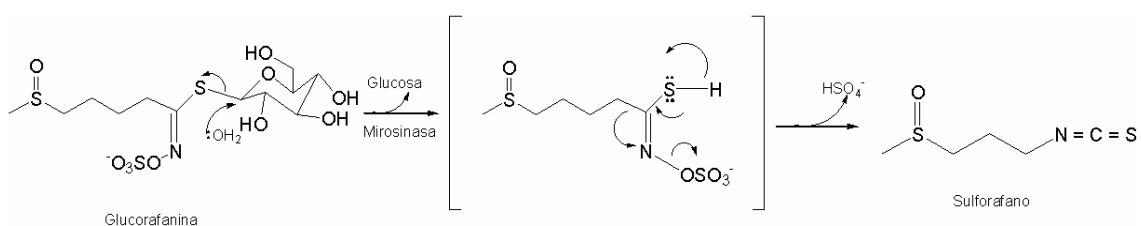
9.1. Cultivo de brócoli

Se cultivó brócoli (*Brassica oleracea var italica*), a la sombra a temperaturas entre los 18-22°C, ya que a mayores temperaturas la descomposición de glucorafanina es inevitable, siendo posible cuantificar Sulforafano en estos retoños cultivados, bajo las condiciones que se muestran en la tabla No. 3 logrando la obtención de óptimos resultados en el crecimiento y desarrollo de la planta.

El brócoli fue cortado al quinto día de su fase de retoño (Anexo No. 1, Fotografía No. 11), su característica principal es la formación de yemas, Los retoños de brócoli cortados al quinto día no presentan el mismo tamaño (Anexo No. 4, Fotografía No. 12), ésto es debido a que las plantas tienden a desarrollarse en forma muy distinta y de allí que la concentración de Sulforafano también varía de cultivo a cultivo.

9.2. Extracción de Sulforafano

Una vez licuada la muestra se hidroliza con una solución de ácido clorhídrico en pH de 3, para la transformación de glucorafanina en Sulforafano según la siguiente reacción:



La muestra homogenizada se seca al aire sin calentamiento para evitar la descomposición del Sulforafano.

La extracción de Sulforafano se realizó con diclorometano, ya que el Sulforafano resulta muy soluble en este solvente, además gracias a su bajo punto de ebullición no es necesario llevarlo a altas temperaturas para su evaporación con lo que se evita la descomposición de Sulforafano provocado por altas temperaturas, y se obtiene el extracto deseado.

Según la tabla No. 4 los retoños de brócoli contienen un 77.22% de agua, teniendo únicamente el 23.88% de otros compuestos para la obtención del extracto, con lo que se explica que la cantidad de extracto final sea únicamente de 3.4060g, a partir de 900.00 g iniciales de muestra.

9.3. Determinación y cuantificación del Sulforafano

9.3.1. Evaluación de ruido

Antes de empezar todos los ensayos para la determinación y cuantificación del Sulforafano por cromatografía líquida de alta resolución se verificó que el ruido estuviera en 2, ya que este afecta la cuantificación afectando la definición de la base del pico (Anexo No. 6.1, Cromatograma No. 1).

9.3.2. Evaluación de columna

Se continuó con la evaluación de la columna LiChrospher Rp-18, usando una solución patrón de hidrocarburos (antraceno, naftaleno y tolueno) obteniendo picos simétricos y delgados los que se evalúan como muestras (Anexo No. 6.2, Cromatogramas No. 2-4) para obtener una desviación estándar de su área y por consiguiente de su concentración, dicha desviación estándar tuvo un valor numérico de 1.68 % (Anexo No. 4, Tabla No. 8), lo que nos indica que la columna esta en control.

9.3.3. Ensayos para la determinación y cuantificación de Sulforafano

9.3.3.1. Determinación de longitud de onda

El ensayo No. 1 se realizó para determinar cuál era la mejor longitud de onda para realizar el análisis de Sulforafano, dicho análisis se realizó a 215nm, 236nm y 260nm (Anexo No. 6.3 Tabla No. 9), ya que el máximo de absorción en ultravioleta reportado para el Sulforafano es a 236nm en acetona y pH básico, verificando que la mejor longitud de onda se mantiene a 236nm en

acetonitrilo, donde se obtuvo un pico simétrico y delgado que se observó en el minuto 2.39 con un área de 48597 que representa una concentración de 70.80 µg/ml (Anexo No. 6.3 Cromatograma No. 5). A pesar de que el área del pico es mayor a 215nm, también se observaron otros 11 picos que representan contaminantes en el estándar, estos picos resultaron representativos ya que sus áreas son mayores a 2000, mientras que a 236nm sus áreas son menores a 2000 y se identifican solamente 10 picos (Anexo No. 6.3 Cromatogramas No. 6 y 7).

El pico del Sulforafano a 260nm tiene un área muy baja por lo que no se trabajó a esta longitud (Anexo No. 6.3 Cromatograma No. 8).

9.3.3.2. Purificación del extracto de retoños de brócoli

Se realizó una solución de extracto de 20 mg/ml de extracto de brócoli a este se le adicionó óxido de magnesio para la precipitación de las clorofilas (14), esta muestra es inyectada en el cromatógrafo para observar en que estado se encuentra (Anexo No. 6.4 Cromatograma No. 9), lo que confirma que la muestra aún no se encuentra lista para ser cuantificada; esta solución se hace pasar por una columna cromatográfica de Sephadex usando como solvente metanol al 5% para la elusión del Sulforafano y otros compuestos polares (Anexo No. 6.4 Cromatograma No. 10), se observa un cambio notable de la muestra detectando un pico exactamente en el tiempo de retención donde se observa el estándar. Se continuó con la purificación de la muestra usando para ello una placa cromatográfica de silica gel que se eluyó con n-hexano:éter dietílico 50:50 con lo que se logro la separación de compuestos apolares aún presentes en la muestra. (Anexo No. 4, Tabla No. 12) Al inyectar la muestra se puede cuantificar el Sulforafano (Anexo No. 6.4 Cromatograma No. 11), la concentración inicial del extracto (20 mg/ml), se mantuvo ya que se colocaron 20 µl de la solución y al terminar la corrida cromatografica se disolvió en 1 ml de acetonitrilo, el mismo tratamiento recibió el estándar con lo que se confirmó con relación al área que no se perdió Sulforafano bajo este método de purificación.

9.3.3.3. Identificación y Cuantificación de Sulforafano presente en retoños de brócoli por Cromatografía Líquida de Alta Resolución:

Una vez purificada la muestra se lleva a cabo la comparación del tiempo de retención entre los picos de la muestra y el estándar para su identificación los cuales se encuentran en 2.40 min. y 2.41 min. correspondientemente, la diferencia entre ambos es de 0.01 que es menor al 1% por lo que se toma como el mismo compuesto. Luego se realiza el cálculo para determinar la concentración de Sulforafano en el extracto procedente de retoños de brócoli, este cálculo se realizó usando el ensayo de regresión lineal (Anexo 6.5, Cromatogramas 12-13; Anexo No. 7 Cálculos).

La concentración de Sulforafano asciende a 4.76 mg/g (0.476 % P/P), con lo se confirma la hipótesis de que el brócoli cultivado en las condiciones ya mencionadas posee cantidades medibles de Sulforafano a través de este método de purificación y cuantificación. Cabe mencionar que el Sulforafano no es necesario en cantidades muy elevadas para actuar como anticancerígeno, además podemos afirmar que la cantidad de sulforafano presente en los retoños de Brócoli cultivados es buena, ya que lo reportado en la literatura es de 0.6 %P/P .

9.3.3.4. Ensayo de repetibilidad para el Sulforafano

El ensayo de repetibilidad se realizó para verificar la precisión del método, las condiciones fueron repetitivas (mismo analista, mismo día y mismo instrumento). El coeficiente de variación obtenido en el ensayo de repetibilidad fue de 0.63 lo que nos indica según la USP, un criterio de aceptación de 98.5 - 101.5 (Anexo No. 4, Tabla No. 15; Anexo 6.6, Cromatogramas No. 14-16) (25).

9.3.3.5. Ensayo de linealidad para el Sulforafano

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta, para su determinación se preparó una serie de cinco diluciones en un rango comprendido de 18.75 a 150.00 $\mu\text{g/ml}$, con lo que se obtuvo un coeficiente de regresión lineal de (R^2) 0.9938, lo que indica que el modelo lineal se ajusta, una pendiente de 636.94 que es indicativo de la sensibilidad del método y la ordenada al origen con un valor de 544.11 que evalúa la proporcionalidad de la función analítica, es decir que la recta pase por el origen y además que cualquier desviación pueda adjudicarse únicamente a un error aleatorio (Anexo No. 4, Tabla No. 17; Anexo No.5, Figura No. 1; Anexo 6.7, Cromatogramas No. 17-21)

10. CONCLUSIONES

- 10.1. Se logró el aislamiento de Sulforafano procedente de retoños de brócoli por medio de cromatografía en columna (Fase estacionaria: Sílica gel y Fase móvil: metanol al 5%) y cromatografía en capa fina (Fase estacionaria: Sílica gel y Fase móvil Hexano:éter dietílico 50:50).
- 10.2. Se logró la identificación del Sulforafano presente en retoños de brócoli por cromatografía líquida de alta resolución, por comparación del tiempo de retención entre la muestra y el estándar.
- 10.3. Se logró determinar la concentración de Sulforafano presente en el extracto de retoños de brócoli cultivado en condiciones controladas por cromatografía líquida de alta resolución la cual asciende a 476 mg/g (0.476 % P/P).
- 10.4. Se determinaron ensayos estadísticos necesarios para la validez del método de identificación y cuantificación del Sulforafano encontrando para el ensayo de repetibilidad una desviación estándar de 0.88 indicando la precisión del método y para el ensayo de linealidad en el rango comprendido de 18.75 a 150.00 $\mu\text{g/ml}$ un coeficiente de regresión lineal de 0.9938, que confirma el modelo lineal.

11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Cultivar retoños de brócoli a una temperatura de 8°C, esto podría ser en áreas de nor-occidente tales como Quetzaltenango en los meses de octubre y noviembre para observar si la concentración de Sulforafano aumenta.
- 11.2. Determinar la presencia y concentración de Sulforafano presente en desperdicio (hojas y raíz) de brócoli, ya que esta puede ser fuente industrial de la obtención de Sulforafano a un bajo precio.
- 11.3. Diseñar una metodología para determinar la presencia y concentración de sulforafano en brócoli cocinado por distintos métodos o condiciones de almacenamiento.
- 11.4. Determinar y cuantificar la presencia de todos los compuestos azufrados [1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)butano, 1-isotiocianato-3-(metilsulfinil)propano, 4-(metilsulfinil)butanonitrilo, 5-(metilsulfinil)pentanonitrilo] presentes en retoños de brócoli, por cromatografía líquida de alta resolución.
- 11.5. En futuros trabajos de investigación se podría diseñar una metodología de bajo costo para aislar el Sulforafano procedente de retoños de brócoli ya que su precio comercial asciende a \$10,000.00 el gramo (27).

12. REFERENCIAS

1. Fahey, J.H. Brassicas. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press, London 2003 (p606-615).
2. "Brecol" Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2000. © 1993-1999 Microsoft. 1993-1999.
3. Gamet-Payrastre, L., Li, P, Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, Chevolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J., Terce, F. y Inra. Sulforaphane, A Naturally Occurring Isothiocyanate, Induces Cell Cycle Arrest And Apoptosis In Ht29 Human Colon Cancer Cells Laboratoire Des Xenobiotiques, Toulouse, France.
4. Mackenzie, D. & Ingersoll, C. New Brócoli Varieties For The Midwest. 1992; Vol 40 No. 11, (p33-34).
5. Vásquez, J.E. Control Biológico De Plutella Xilostella En Brócoli *Brassica Oleracea Italica* Utilizando Un Parasitoide Y Don Entomopatógenos En Argueta Solola. Guatemala: Universidad de San Carlos (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1995. 42p.
6. Wattenberg, L.W.; Hanley, AB; Barany, G., Sparnins, VL., Lam, L.K. y Fenwick, GR. Inhibition Of Carcinogenesis By Some Minor Dietary Constituents Princess Takamtsu symp 1985 16: 193-203.
7. Mazza, G. Alimentos Funcionales. Aspectos Bioquímicos Y De Procesado. Edición Acribia S.A. España, 1998. 800p (56-62p)
8. Fahey, J. Chemoprotection Cancer. National Academy of Sciences 1997;94:10367-10372

9. Mercola, J. Brocoli Sprouts. Johns Hopkins University. Disponible en <http://www.healthnutrition.com> (23 de junio 2002).
10. Artículo de Ciencia "Brócoli Mata La Bacteria Responsable De Muchos Cánceres De Estomago. Disponible en <http://www.dsalud.com> (Washington 28 de mayo 2002)
11. Finley, J., Clement, Ip., Donald, J., Davis, K.J. Hintze y Whanger, P. Cancer-Protective Properties Of High-Selenium Broccoli Journal Agriculture Food Chemistry. 2001; 49: 2679-2683.
12. El brecol y su virtud curativa. 21 de agosto 2002. Disponible en <http://www.saludvital.com>. (20 de septiembre 2003)
13. Shapiro, T., Fahey J., Wade, K., Stephenson, K., Talay, P. Chemoprotective Glucosinolates And Isothiocyanates Of Broccoli Sprouts: Metabolism And Excretion In Humans. Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention, 2001; 10:501-508.
14. Fahey, J. W., Wade, K., Stephson K. y Chou, E. Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current cromatography. Journal of Chromatography. 2003; 996:85-93
15. Zhang, Y., Kensler, W., Cho, C.. Posner y Talalay P. Anticarcinogenic Activities of Sulforaphane and Structuralli Related Synthetic Norbornyl Isothiocyanates. National Academy of Sciences, 1994; 91: 3147-3150.
16. Brecol (brócoli). El enemigo de casi todos los cánceres. Disponible en <http://www.brocoli.htm> (23 de noviembre 2002)
17. Brócoli, el anticancerígeno número uno. Edición on line. Disponible en <http://www.ocexcelsior.com> (18 de abril 2004)

18. Daxenbichler, M.E., Van Etten y Spencer, F. Glucosinolates And Derived Products In Cruciferous Vegetables. Identification Of Organic Nitriles From Cabbage. Journal Agriculture Food Chemistry 1977; Vol., 25, No. 1, 121-124.
19. Kore, A., Gayland, F., Spencer, y Wallig, M. "Purification of the w-(methylsulfinyl)alkyl Glucosinolate Hidrolysis. Productos: 1-Isothiocyanato-3-(Methylsulfinyl)Propane, 1-Isothiocyanato-4-(Methylsulfinyl)Butane, 4-(Methylsulfinyl)Butanenitrile, And 5-(Methylsulfinyl)Pentanenitrile From Broccoli And Lesquerella Fendleri, Journal Agriculture Food Chemistry, 41, 89-95
20. Bradfield, C. y Bjeldanes L. High-Performance Liquid Cromatographic Analysis Of Anticarcinogenic Indoles In *Brassica Oleracea*. Journal Agriculture Food Chemistry 1987; 35:46-49.
21. Bailey, L.H. MANUAL OF CULTIVATED PLANTS. 16a. Ed. MacMillan Plublishing Co. American United States: 1977. 430p (p385-410).
22. Trease y Evans. 1991. FARMACOGNOSIA. 13a. edición Interamericana Mc. Graw Hill. México, DF., 1991. 1200p (585-589p).
23. McGregor, DI., Mullin, W. y Gruffydd, R. Analytical Methodology For Detemining Glucosinolate Composition And Content. Journal Assoc. of Anal. Chem. 1983 Vol. 66 No. 4
24. Faulkner, K., Mithen, R. y Williamson, G. Selective Increase Of The Potential Anticarcinogen 4-Methylsulphinylbutyl Glocosinolate In Broccoli. Carcinogenesis. 1998. Abril 19 Vol. 4. (p605-609)

25. Quattrocchi, O., Abelaira, S. y Laba. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica. 1ª. Edición Artes Graficas Farro S.A. Argentina, 1992. 407p (203-328)
26. The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 20a. edición. Merck & Co., Inc., Printed USA. 1996.
27. Catálogo de reactivos
www.ktlabs.com 22 de agosto de 2004.

AneXOS

13. ANEXOS

Anexo No. 1 Fotografías de Brócoli



Fotografía No. 1 Brócoli

Fuente: Enciclopedia Encarta Microsoft 2004



Patricia Navas, 2004

Fotografía No. 2 Brócoli con 15 días de germinación (Pilonos)



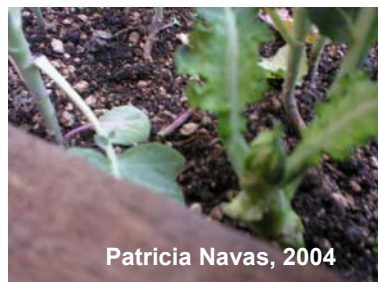
Fotografía No. 3 Brócoli con 21 días de germinación 6 días de cultivo (Pilonos)



Fotografía No. 4 Brócoli en Fase Juvenil



Fotografía No. 5 Brócoli en Fase de Inducción Floral



Fotografía No. 6 Formación de cogollos en el Brócoli



Fotografía No. 7 Brócoli en Fase de Retoño Día 1



Fotografía No. 8 Brócoli en Fase de Retoño Día 2



Fotografía No. 9 Brócoli en Fase de retoño Día 3



Fotografía No. 10 Brócoli en Fase de retoño Día 4



Fotografía No. 11 Retoño de Brócoli recién cosechado Día 5



Fotografía No. 12 Cosecha de retoños de Brócoli



Fotografía No. 13 Comparación de Brócoli maduro y Brócoli en retoño en fotografía de izquierda a derecha.



Patricia Navas, 2004

Fotografía No. 14 Retoños de Brócoli para licuar.



Fotografía No. 15 Retoños de Brócoli licuados (Muestra húmeda)



Fotografía No. 16 Extracciones realizadas con diclorometano



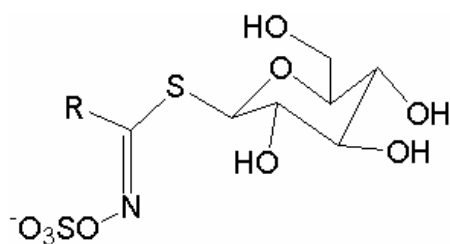
Fotografía No. 17 Extracto obtenido de retoños de Brócoli



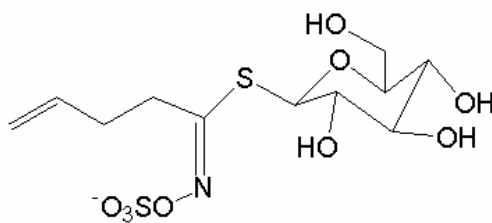
Fotografía No. 18 Cromatografo para Cromatografía Líquida de Alta Resolución Merck HITACHI
Bomba Merck HITACHI Bomba inteligente LC 6200 A
Detector Merck HITACHI L-2450 UV-VIS
Columna Merck LiChrospher Rp-18

Anexo No. 2 Estructuras de compuestos presentes en Brócoli

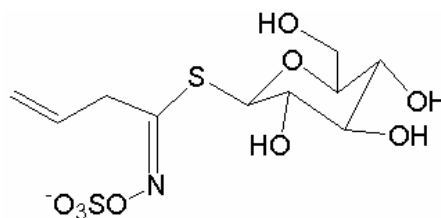
Anexo No. 2.1 Glucosinolatos:



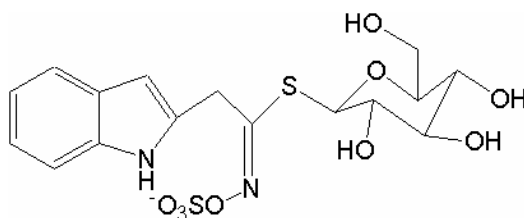
Anexo No. 2.1.1. Gluconapina:



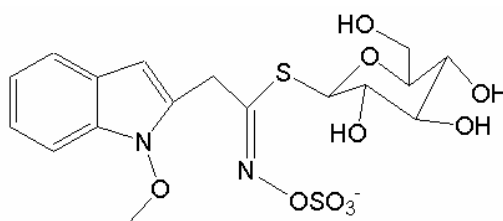
Anexo No. 2.1.2. Sinigrina:



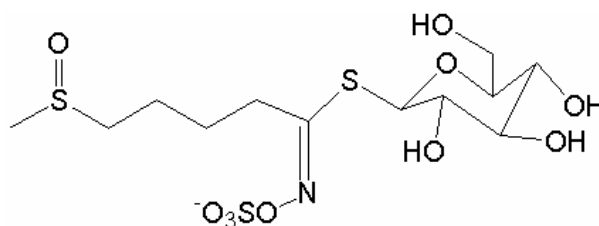
Anexo No. 2.1.3. Glucobrasicina:



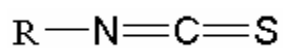
Anexo No. 2.1.4. Neoglucobrasicina:



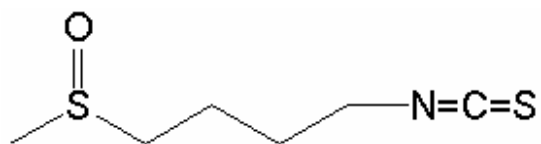
Anexo No. 2.1.5. Glucorafanina:



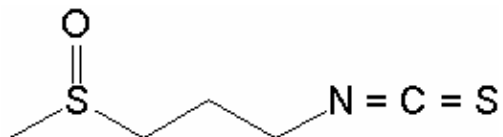
Anexo 2.2 Isotiocianatos:



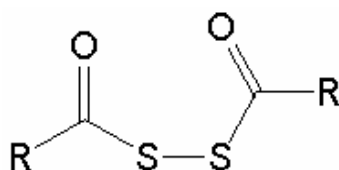
Anexo No. 2.2.1. 1-isocianato 4-metilsulfinilbutano (Sulforafano):



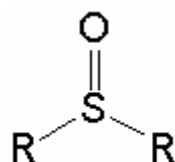
Anexo No. 2.2.2. 1-isotiocianato 3-metilsulfinilpropano:



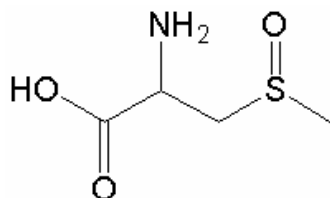
Anexo 2.3. Ditioltionas:



Anexo 2.4. Sulfóxidos:

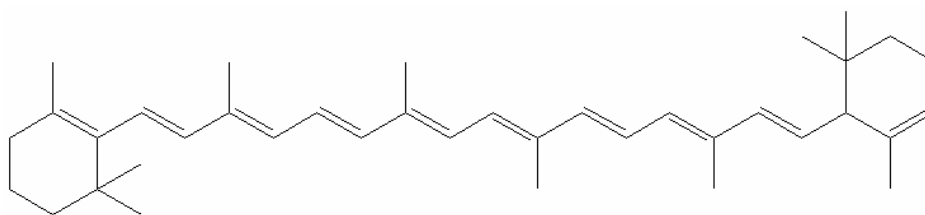


Anexo 2.4.1. Metilcisteín sulfóxido:

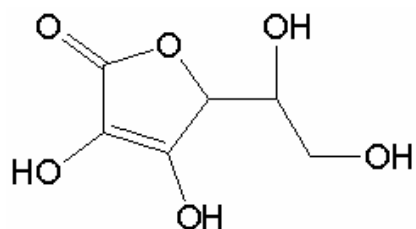


Anexo 2.5. Vitaminas:

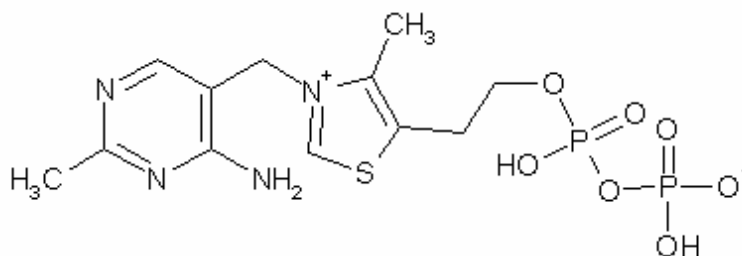
Anexo 2.5.1. Retinol (Vitamina A):



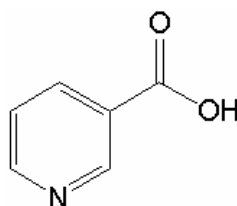
Anexo 2.5.2. Ácido Ascórbico (Vitamina C):



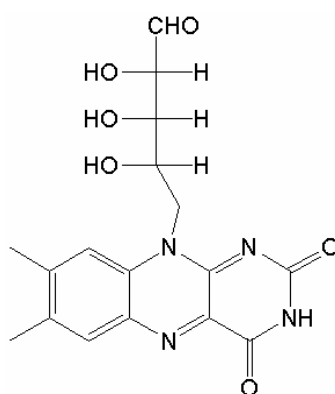
Anexo 2.5.3. Tiamina (Vitamina B₁):



Anexo 2.5.4. Niacina:

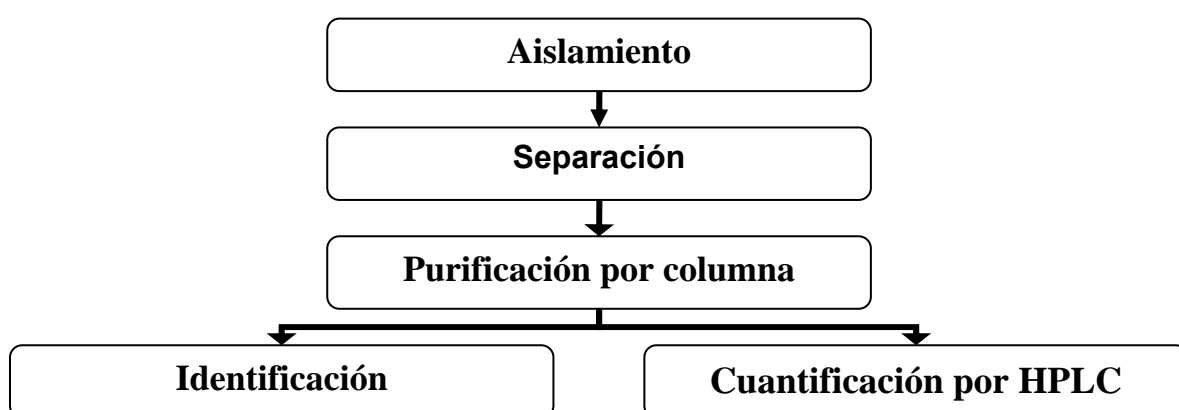


Anexo 2.5.5. Riboflavina:

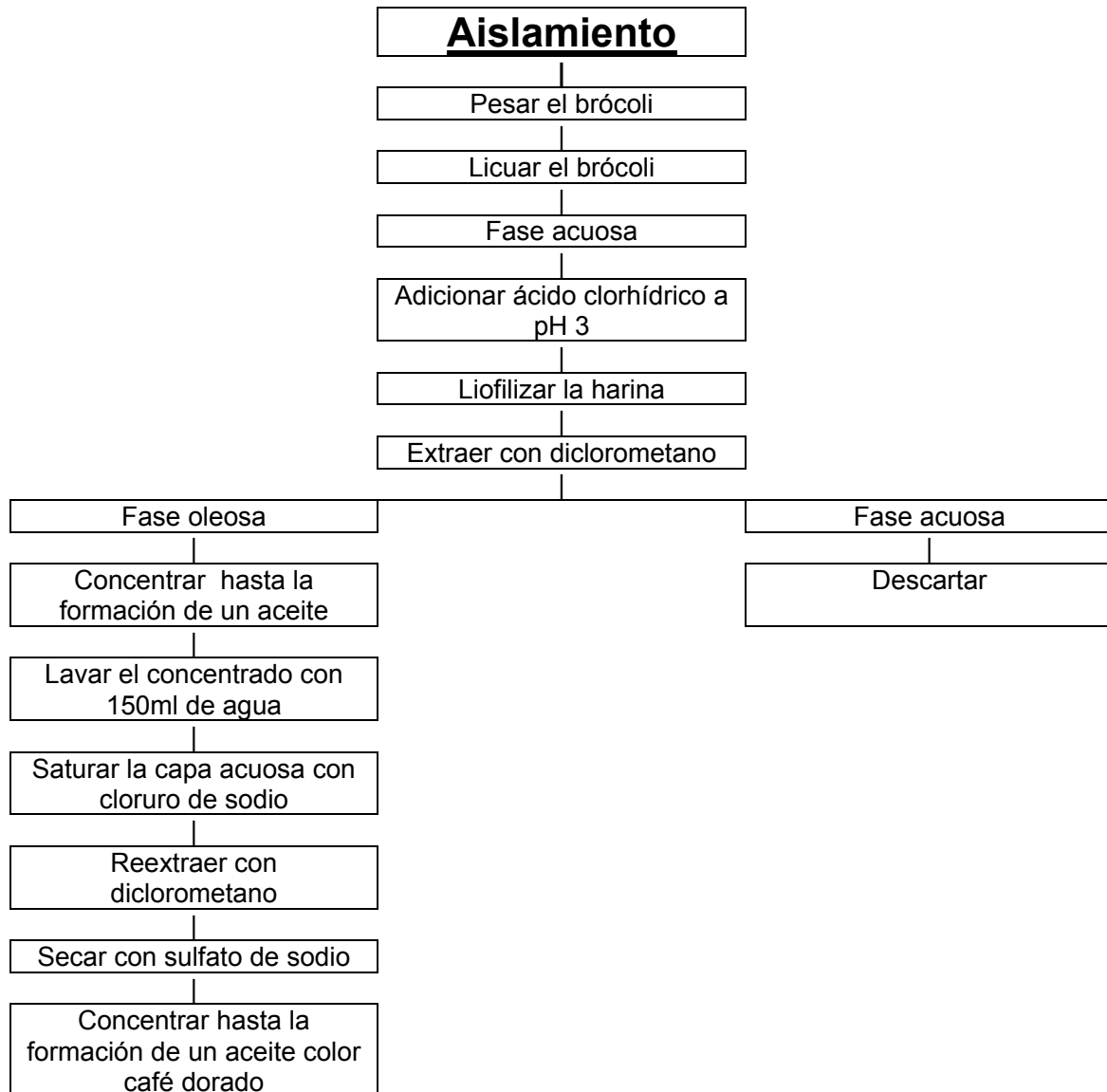


Anexo No. 3 Diagramas de flujo

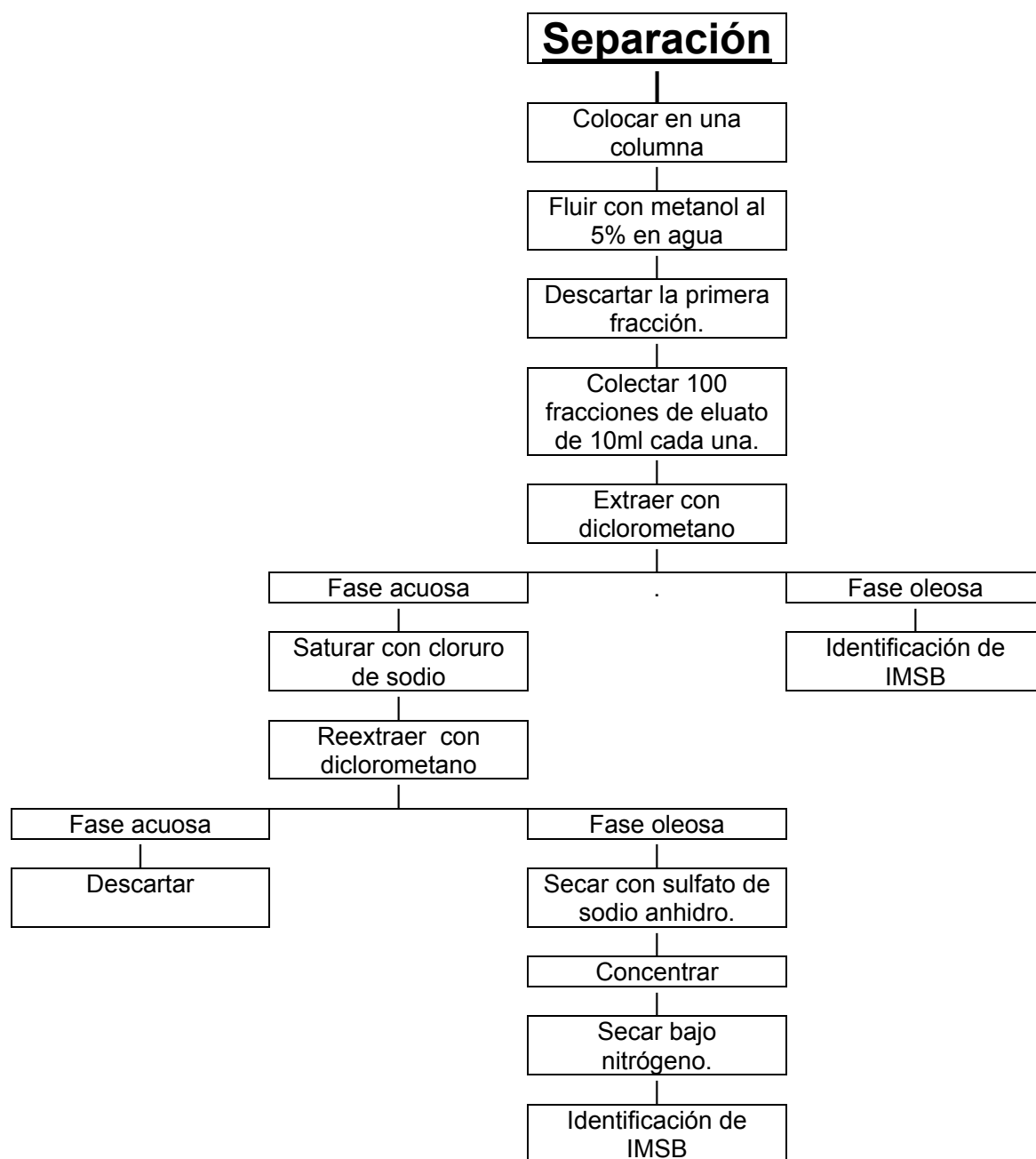
Anexo No. 3.1 Diagrama de flujo general para la identificación y cuantificación de Sulforafano en Retoños de Brócoli



Anexo No. 3.2 Diagrama de flujo de Aislamiento de Sulforafano presente en retoños de brócoli



Anexo No. 3.3 Diagrama de flujo de Separación de Sulforafano presente en retoños de Brócoli



Anexo No. 3.4 Diagrama de flujo para la purificación de Sulforafano presente en retoños de Brócoli



Anexo No. 3.5 Diagrama de flujo para la cuantificación de Sulforafano presente en retoños de Brócoli



Anexo No. 4 Tablas

Tabla No. 7
Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de
Alta Resolución para la evaluación de la columna

Patrón (Hidrocarburos):	Antraceno 6.8 µg/ml Naftaleno 91.8 µg/ml Tolueno 779.0 µg/ml
Columna:	LiChrospher Rp-18
Longitud de onda:	254nm
Fase móvil:	Acetonitrilo:agua (75:25)
Tiempo de corrida:	10 minutos
Flujo:	1 ml/min
Atenuación:	7
Velocidad de carta:	5

Tabla No. 8
Evaluación de columna LiChrospher Rp-18

Patrón (Hidrocarburos)	<u>Antraceno</u>		<u>Naftaleno</u>		<u>Tolueno</u>	
Tiempo de retención (min.)	4.50		5.20		8.74	
Concentración (µg/ml)	6.8		91.8		779.0	
	Área	% []	Área	% []	Área	% []
Cromatograma No. 2	140236.00	99.48	270238.00	100.11	505731.00	101.02
Cromatograma No. 3	136505.00	96.83	276329.00	102.37	510996.00	102.07
Cromatograma No. 4	135759.00	96.30	278869.00	103.31	523838.00	104.64
Promedio		97.54		101.93		102.58
Desviación Estándar		1.86		1.64		1.86
% de Desviación						1.68

Tabla No. 9
Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución
en la determinación de la longitud de onda

Patrón :	Sulforafano
-----------------	-------------

Columna:	LiChrospher Rp-18
Longitud de onda:	215, 236, 260nm
Fase móvil:	Acetonitrilo:agua pH 5.4 (85:15)
Tiempo de corrida:	10 minutos
Flujo:	1 ml/min
Atenuación:	5, 7
Velocidad de carta:	5, 10

Tabla No. 10
Determinación de la longitud de onda para la cuantificación de Sulforafano

Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención	Área del pico	Concentración (µg/ml)	Número de cromatograma
215	2.40	81198	70.8	5
215	2.38	42231	35.4	6
236	2.39	48597	70.8	7
260	2.38	18772	70.8	8

Tabla No. 11
Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución en la purificación de extracto

Patrón :	Sulforafano
Columna:	LiChrospher Rp-18
Longitud de onda:	236 nm
Fase móvil:	Acetonitrilo:agua pH 5.4 (85:15)
Tiempo de corrida:	10 minutos
Flujo:	1 ml/min
Atenuación:	4, 5, 7
Velocidad de carta:	5, 10

Tabla No. 12
Proceso de purificación de Sulforafano en extracto procedente de retoños de Brócoli

Número de cromatograma	Fracción que posee Sulforafano	Tiempo de retención	Área del Pico	Concentración de Sulforafano (µg/ml)	Método de purificación
9	---	---	---	---	Sin purificar
10	1	2.41	68459	106.63	Cromatografía en columna de Sephadex (Metanol al 5%)
11	1	2.40	61221	95.26	Cromatografía en capa fina Silica (Hexano:eter dietílico 50:50)

Tabla No. 13

Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la cuantificación de Sulforafano en el extracto de retoños de Brócoli

Patrón :	Sulforafano
Columna:	LiChrospher Rp-18
Longitud de onda:	236 nm
Fase móvil:	Acetonitrilo:agua pH 5.4 (85:15)
Tiempo de corrida:	10 minutos
Flujo:	1 ml/min
Atenuación:	4, 5, 7
Velocidad de carta:	5, 10

Tabla No. 14

Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el ensayo de Repetibilidad

Patrón :	Sulforafano
Columna:	LiChrospher Rp-18
Longitud de onda:	236 nm
Fase móvil:	Acetonitrilo:agua pH 5.4 (85:15)
Tiempo de corrida:	5 minutos
Flujo:	1 ml/min
Atenuación:	5
Velocidad de carta:	5

Tabla No. 15

Ensayo de Repetibilidad

	Tiempo de retención	Área del pico	Concentración (µg/ml)	Número de cromatograma
Estándar	2.42	46068	75	14
Muestra 1	2.42	46634	75	14
Muestra 2	2.42	46304	75	15
Muestra 3	2.42	46822	75	16
Coeficiente de variación				0.63

Tabla No. 16
Condiciones de ensayo en Cromatografía Líquida de Alta Resolución para el ensayo de linealidad

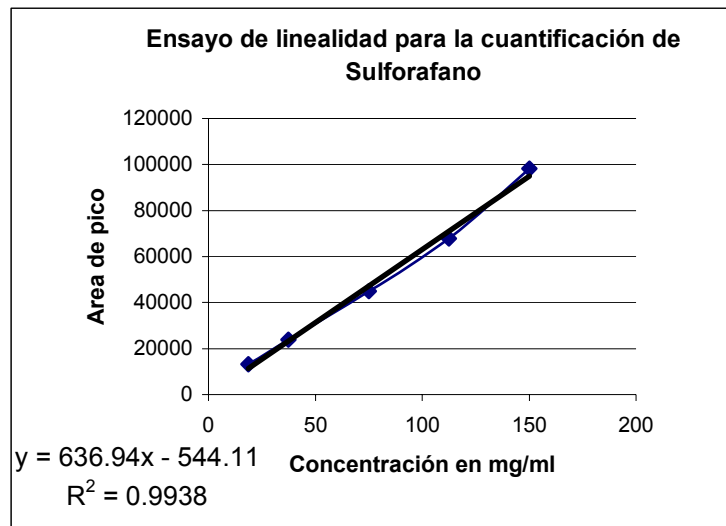
Patrón :	Sulforafano
Columna:	LiChrospher Rp-18
Longitud de onda:	236 nm
Fase móvil:	Acetonitrilo:agua pH 5.4 (85:15)
Tiempo de corrida:	10 minutos
Flujo:	1 ml/min
Atenuación:	4
Velocidad de carta:	10

Tabla No. 17
Ensayo de linealidad para Sulforafano

Número de cromatograma	Tiempo de retención	Área del pico	Concentración (µg/ml)
17	2.42	13236	18.75
18	2.42	23807	37.50
19	2.42	44890	75.00
20	2.40	67955	112.50
21	2.40	98186	150.00

Anexo No. 5 Curva de Linealidad

Figura No. 1
Gráfica de Regresión lineal para Sulforafano



Ecuación $y = 636.94x - 544.11$

Anexo No. 6 Cromatogramas de ensayos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución:

Anexo No. 6.1. Evaluación de ruido

Cromatograma No. 1

Evaluación de ruido

CH. 1 C.5 20.00 ATT 5

|

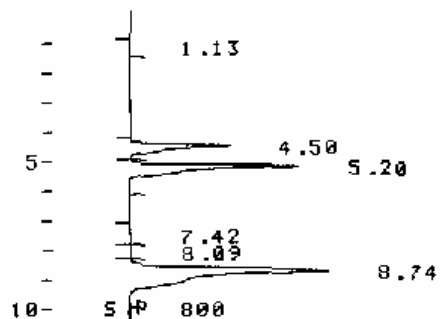
NOISE 2

Anexo No. 6.2. Evaluación de columna

Cromatograma No. 2

Inyección No. 1 de Hidrocarburos para la evaluación de columna

CH. 1 C.S 5.00 ATT 7 OFFS 3 07/18/04 14:24



INJ NO. OF STD : 3 / 5 REP , 1st level

D-2500

07/18/04 14:24

METHOD: HIDROCARBURO TAG: 27 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

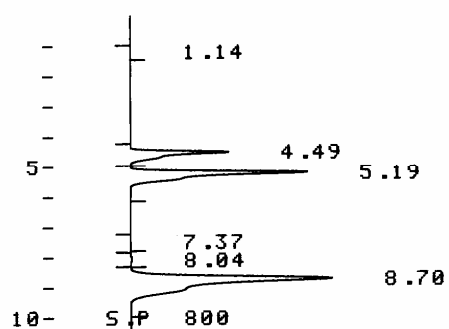
NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
2	4.50	140236	100.000	BU	13142
3	5.20	270238	100.000	UB	22434
6	8.74	505731	100.000	UB	26144

RAW DATA STORAGE NO. 6

Cromatograma No. 3

Inyección No. 2 de Hidrocarburos para la evaluación de columna

CH. 1 C.S 5.00 ATT 7 OFFS 3 07/18/04 14:35



INJ NO. OF STD : 4 / 5 REP , 1st level

D-2500

07/18/04 14:35

METHOD: HIDROCARBURO TAG: 28 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

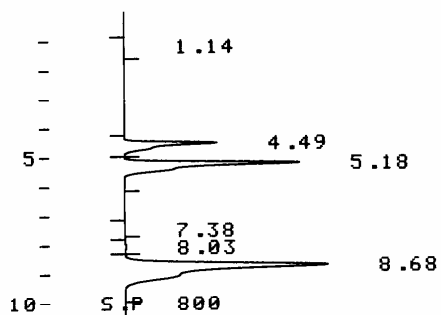
NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
2	4.49	136505	100.000	BU	12835
3	5.19	276329	100.000	UB	23077
6	8.70	510996	100.000	UB	26267

RAW DATA STORAGE NO. 7

Cromatograma No. 4

Inyección No. 3 de Hidrocarburos para la evaluación de columna

CH. 1 C.S 5.00 ATT 7 OFFS 3 07/18/04 14:47



INJ NO. OF STD : 5 / 5 REP , 1st level

D-2500

07/18/04 14:47

METHOD: HIDROCARBURO TAG: 29 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
2	4.49	130759	100.000	BU	12377
3	5.18	278869	100.000	UB	23384
6	8.68	523838	100.000	UB	27069

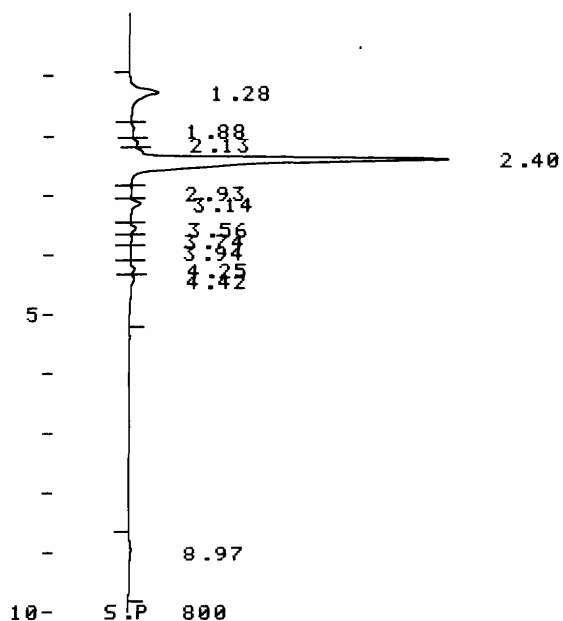
RAW DATA STORAGE NO. 8

Anexo No. 6.3. Ensayo para la Determinación de longitud de onda

Cromatograma No. 5

Sulforafano a 215nm 70.80 µg/ml

CH. 1 C.S 10.00 ATT 5 OFFS 3 07/18/04 17:40



D-2500

07/18/04 17:40

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 26 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.28	11034	10.332	BU	973
2	1.88	1842	1.725	UU	150
3	2.13	2270	2.126	UU	275
4	2.40	81198	76.032	UU	10409
5	2.93	361	0.338	TBB	52
6	3.14	2448	2.292	TBB	344
7	3.56	1303	1.220	TBU	218
8	3.74	715	0.670	TUU	93
9	3.94	558	0.522	TUB	65
10	4.25	1301	1.218	TBU	181
11	4.42	1880	1.760	TUB	157
12	8.97	1885	1.765	BB	97

TOTAL

106795

100.000

13014

PEAK REJ :

0

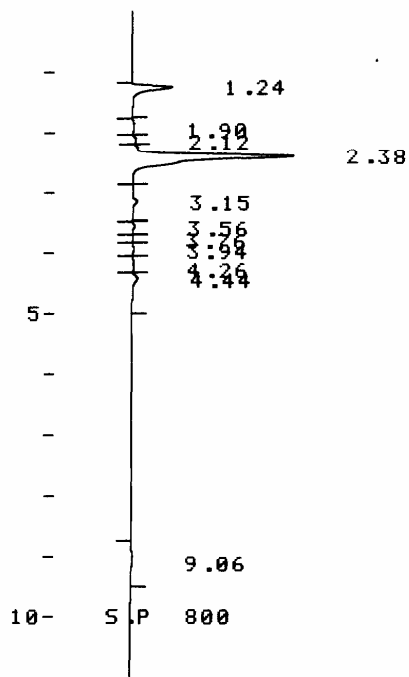
RAW DATA STORAGE NO.

14

Cromatograma No. 6

Sulforafano 215nm 35.4 µg/ml

CH. 1 C.S 10.00 ATT 5 OFFS 3 07/18/04 18:06



D-2500

07/18/04 18:06

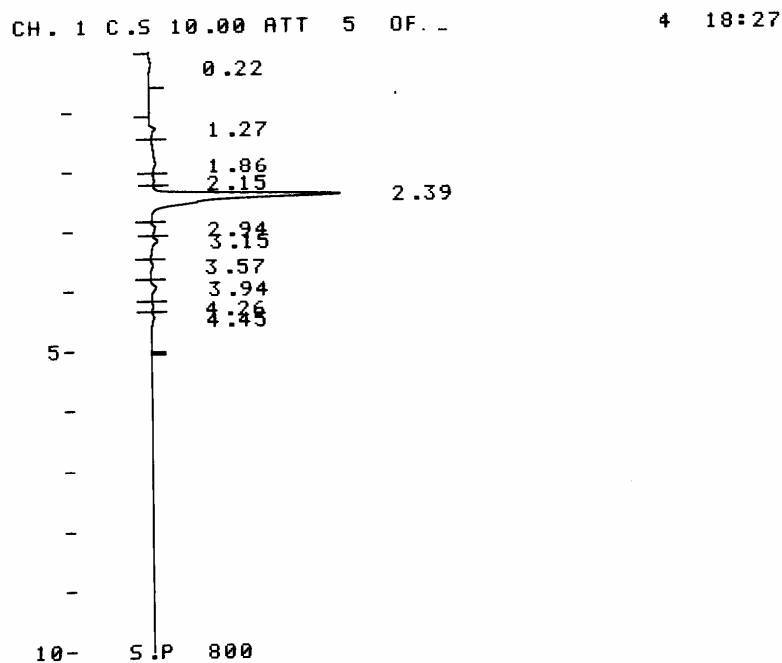
METHOD: SULFORAFANO- TAG: 28 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.24	7855	13.078	BB	1322
2	1.90	1194	1.988	BU	109
3	2.12	1367	2.276	VU	175
4	2.38	42231	70.311	UU	5251
5	3.15	1329	2.213	TBB	167
6	3.56	675	1.124	TBU	106
7	3.76	308	0.513	TUU	49
8	3.94	733	1.220	TUU	95
9	4.26	1164	1.938	TUU	105
10	4.44	2453	4.084	TVB	207
11	9.06	754	1.255	BB	55
TOTAL		60063	100.000		7641
PEAK REJ :		0			
RAW DATA STORAGE NO.			16		

Cromatograma No. 7

Sulforafano a 236 nm 70.80 µg/ml



D-2500

07/18/04 18:27

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 30 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	0.22	842	1.299	BB	69
2	1.27	1715	2.647	BV	204
3	1.86	5182	7.998	UU	215
4	2.15	1844	2.846	UU	170
5	2.39	48597	75.001	UU	6203
6	2.94	1048	1.617	TBV	128
7	3.15	1661	2.563	TVB	211
8	3.57	528	0.815	TBB	78
9	3.94	1492	2.303	TBV	174
10	4.26	625	0.965	TUU	84
11	4.45	1261	1.946	TVB	102

TOTAL		64795	100.000		7638
-------	--	-------	---------	--	------

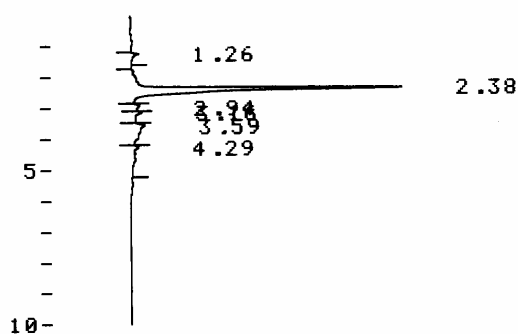
PEAK REJ : 0

RAW DATA STORAGE NO. 18

Cromatograma No. 8

Sulforafano a 260 nm 70.80 µg/ml

CH. 1 C.S 5.00 ATT 3 OFFS 3 07/18/04 18:46



D-2500

07/18/04 18:46

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 32 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

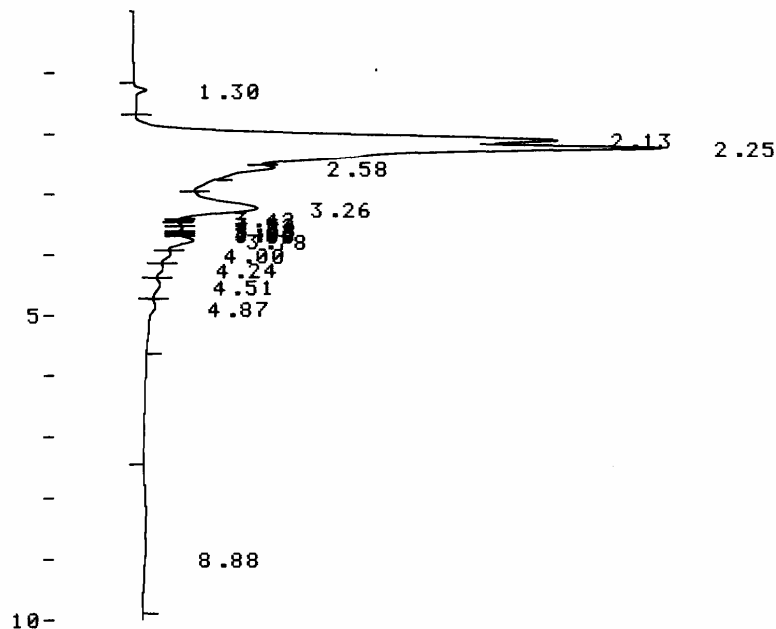
NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.26	364	1.565	BB	61
2	2.38	18772	80.709	BU	2138
3	2.94	462	1.986	TBU	52
4	3.16	731	3.143	TUU	71
5	3.59	2050	8.814	TUB	93
6	4.29	880	3.783	TBB	50
TOTAL		23259	100.000		2465
PEAK REJ :		0			

Anexo No. 6.4. Proceso de purificación de Extracto

Cromatograma No. 9

Extracto sin purificar 2 mg/ml

CH. 1 C.S 10.00 ATT 5 OFFS 3 07/25/04 13:12



D-2500

07/25/04 13:12

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 25 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.30	2277	0.402	BB	362
2	2.13	138476	24.450	BU	13474
3	2.25	266404	47.037	UU	16792
4	2.58	3224	0.569	TBB	750
5	3.26	74031	13.071	UU	3748
6	3.42	37	0.007	TBB	60
7	3.52	5434	0.959	UU	1300
8	3.58	7168	1.266	UU	1311
9	3.63	3503	0.618	UU	1281
10	3.68	2986	0.527	UU	1279
11	3.78	19263	3.401	UU	1658
12	4.00	10767	1.901	UU	930
13	4.24	8717	1.539	UU	668
14	4.51	9396	1.659	UU	540
15	4.87	8738	1.543	UB	358
16	8.88	5953	1.051	BB	78

TOTAL

566374 100.000

44589

PEAK REJ :

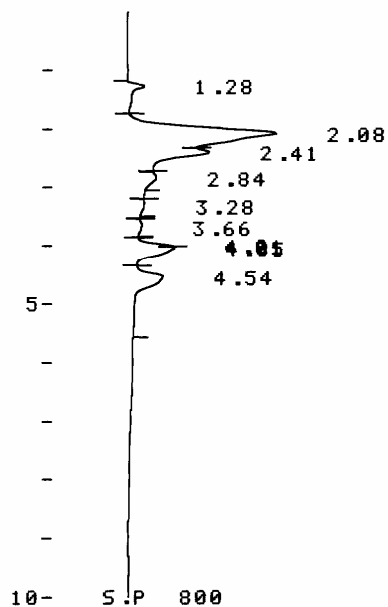
0

Cromatograma No. 10

Muestra purificada por columna cromatografica de Sephadex

MUESTRA PURIFICADA

CH. 1 C.S 10.00 ATT 5' OFFS 3 07/31/04 13:16



D-2500

07/31/04 13:16

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 4 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

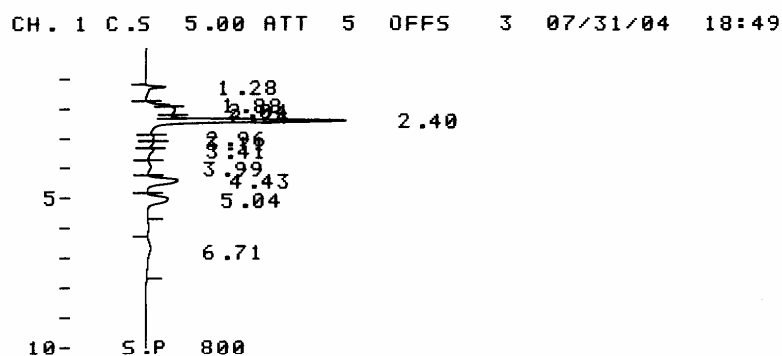
NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.28	5847	2.803	BV	571
2	2.08	88212	42.287	UU	4923
3	2.41	68459	32.818	UU	2689
4	2.84	2110	1.011	TBB	221
5	3.28	704	0.337	TBB	61
6	3.66	967	0.464	TBB	95
7	4.01	6751	3.236	UU	1428
8	4.05	15424	7.394	UU	1444
9	4.54	20131	9.650	VB	1054
TOTAL					

PEAK REJ :	208605	100.000	12486
	0		

RAW DATA STORAGE NO. 2

Cromatograma No. 11

Muestra purificada por placa cromatografica de Sílica gel



D-2500

07/31/04 18:49

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 25 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.28	4487	3.590	BB	671
2	1.88	3518	2.814	BV	803
3	2.04	15086	12.069	VV	982
4	2.24	7517	6.014	VV	1021
5	2.40	61221	48.978	VV	6516
6	2.96	874	0.699	TBU	108
7	3.11	1134	0.907	TUV	110
8	3.41	1673	1.338	TVB	142
9	3.99	1426	1.141	TBB	100
10	4.43	13793	11.035	VV	1005
11	5.04	10809	8.647	VB	680
12	6.71	3459	2.767	BB	108

TOTAL

124997 100.000

12246

PEAK REJ :

0

RAW DATA STORAGE NO.

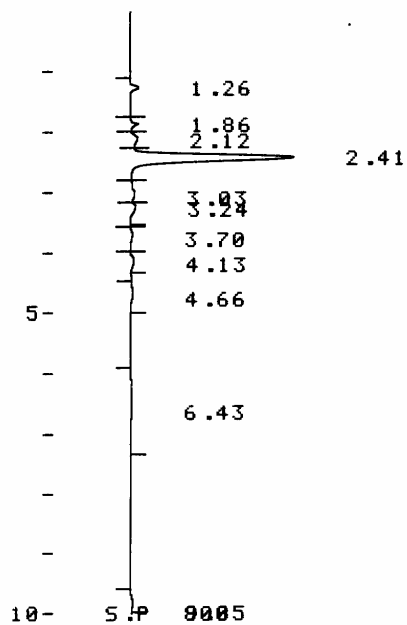
18

Anexo No. 6.5. Cuantificación de Sulforafano en extracto de retoños de Brócoli

Cromatograma No. 12

Sulforafano tratado por columna cromatografica

CH. 1 C.S 10.00 ATT 5 OFFS 3 07/31/04 13:42



D-2500

07/31/04 13:42

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 6 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.26	1857	3.218	BB	291
2	1.86	1267	2.196	BV	277
3	2.12	2866	4.967	VV	256
4	2.41	43100	74.692	VV	5321
5	3.03	1452	2.516	TBV	110
6	3.24	1605	2.781	TVB	161
7	3.70	718	1.244	TBB	65
8	4.13	1250	2.166	BB	109
9	4.66	914	1.584	BB	63
10	6.43	2161	3.745	BB	55
11	9.85	514	0.891	BB	37

TOTAL

57704

100.000

6745

PEAK REJ :

0

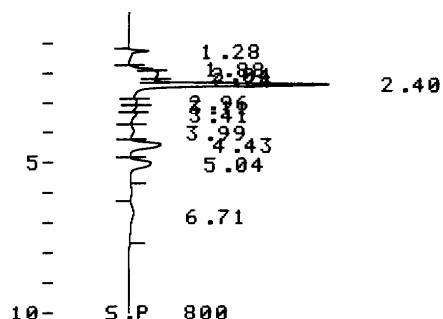
RAW DATA STORAGE NO.

4

Cromatograma No. 13

Muestra cuantificada

CH. 1 C.S 5.00 ATT 5 OFFS 3 07/31/04 18:49



D-2500

07/31/04 18:49

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 25 CH: 1

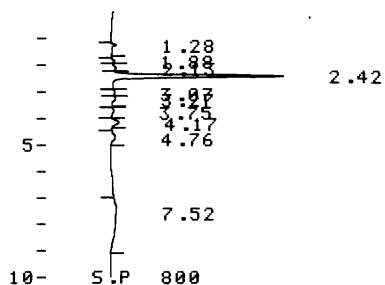
FILE: 1 CALC-METHOD: AREA% TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.28	4487	3.590	BB	671
2	1.88	3518	2.814	BV	803
3	2.04	15086	12.069	UV	982
4	2.24	7517	6.014	UV	1021
5	2.40	61221	48.978	UV	6516
6	2.96	874	0.699	TBV	108
7	3.11	1134	0.907	TUV	110
8	3.41	1673	1.338	TVB	142
9	3.99	1426	1.141	TBB	100
10	4.43	13793	11.035	UV	1005
11	5.04	10809	8.647	VB	680
12	6.71	3459	2.767	BB	108
TOTAL		124997	100.000		12246
PEAK REJ :		0			
RAW DATA STORAGE NO.			18		

Anexo No. 6.6. Ensayo de Repetibilidad**Cromatograma No. 14**

Inyección No. 1 de 75µg/ml de Sulforafano

CH. 1 C.S 5.00 ATT 5 OFFS 3 07/31/04 16:58



INJ NO. OF UNKNOWN : 3 / 3 REP

D-2500

07/31/04 16:58

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 17 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.28	1175	0.001	BB	227
2	1.88	815	0.001	BU	146
3	2.13	2370	0.002	VU	200
4	2.42	46822	106.111	VU	6393
5	3.07	1008	0.001	TBU	106
6	3.27	1628	0.002	TUB	164
7	3.75	787	0.001	TBB	75
8	4.17	3332	0.003	BB	283
9	4.76	2412	0.002	BB	171
10	7.52	11722	0.012	BB	168
TOTAL		73071	106.136		7933
PEAK REJ :		0			
SF :		1.000			
SAMP-AMT :		1.000			

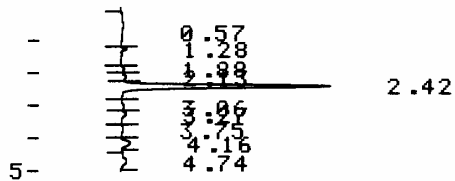
AVERAGE CALCULATION

RT	NAME	CONC	RSD
2.42	SULFOR	107.068	0.88

RAW DATA STORAGE NO. 10

Inyección No. 2 de 75µg/ml de Sulforafano

CH. 1 C.S 5.00 ATT 5 OFFS 3 07/31/04 16:46



INJ NO. OF UNKNOWN : 1 / 3 REP

D-2500

07/31/04 16:46

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 15 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

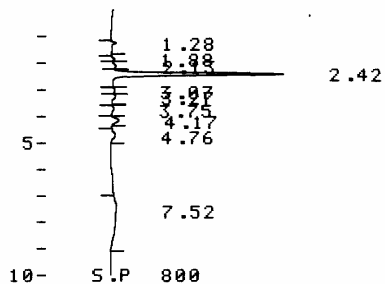
NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	0.57	1806	0.002	BB	48
2	1.28	1054	0.001	BB	191
3	1.88	886	0.001	BV	145
4	2.13	2114	0.002	VV	189
5	2.42	46634	103.475	VV	6295
6	3.06	1107	0.001	TBV	113
7	3.27	1684	0.002	TVB	167
8	3.75	777	0.001	TBB	76
9	4.16	3348	0.003	BB	285
10	4.74	2393	0.002	BB	171
TOTAL		61803	103.490		7680
PEAK REJ :		0			
SF :		1.000			
SAMP-AMT :		1.000			

RAW DATA STORAGE NO. 8

Cromatograma No. 16

Inyección No. 3 de 75µg/ml de Sulforafano

CH. 1 C.S 5.00 ATT 5 OFFS 3 07/31/04 16:58



INJ NO. OF UNKNOWN : 3 / 3 REP

D-2500

07/31/04 16:58

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 17 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
1	1.28	1175	0.001	BB	227
2	1.88	815	0.001	BU	146
3	2.13	2370	0.002	UV	200
4	2.42	46822	106.111	UV	6393
5	3.07	1008	0.001	TBU	106
6	3.27	1628	0.002	TUB	164
7	3.75	787	0.001	TBB	75
8	4.17	3332	0.003	BB	283
9	4.76	2412	0.002	BB	171
10	7.52	11722	0.012	BB	168

TOTAL 73071 106.136 7933

PEAK REJ : 0

SF : 1.000

SAMP-AMT : 1.000

AVERAGE CALCULATION

RT	NAME	CONC	RSD
2.42	SULFOR	107.068	0.88

RAW DATA STORAGE NO. 10

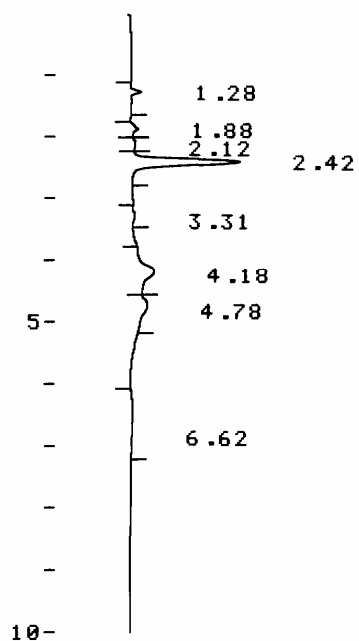
Anexo No. 6.7. Ensayo de linealidad

Cromatograma No. 17

Inyección de Sulforafano 18.75µg/ml

LOAD DATA STORAGE NO. 11 (RAW)

CH. 1 C.S 10.00 ATT 4 OFFS 3 07/31/04 17:14



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 1st level

D-2500

07/31/04 17:14

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 18 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 5 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
4	2.42	13236	18.750	UB	1727

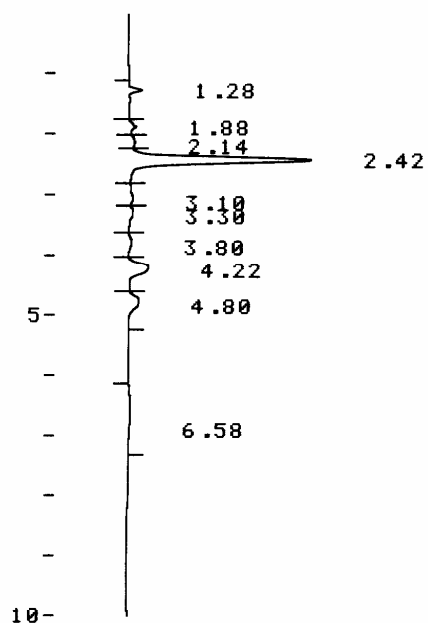
RAW DATA STORAGE NO. 11

Cromatograma No. 18

Inyección de Sulforafano 37.50µg/ml

LOAD DATA STORAGE NO. 12 (RAW)

CH. 1 C.S 10.00 ATT 4 OFFS 3 07/31/04 17:29



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 1st level

D-2500

07/31/04 17:29

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 19 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 5 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
4	2.42	23807	18.750	UV	2971

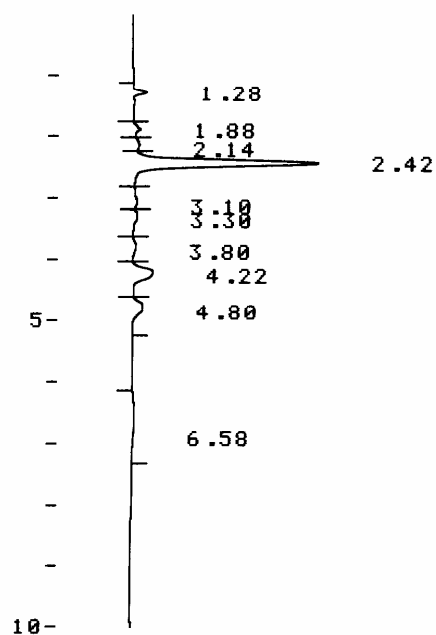
RAW DATA STORAGE NO. 12

Cromatograma No. 19

Inyección de Sulforafano 75.00µg/ml

LOAD DATA STORAGE NO. 12 (RAW)

CH. 1 C.S 10.00 ATT 4 OFFS 3 07/31/04 17:29



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 1st level

D-2500

07/31/04 17:29

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 19 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 5 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
4	2.42	23807	18.750	UU	2971

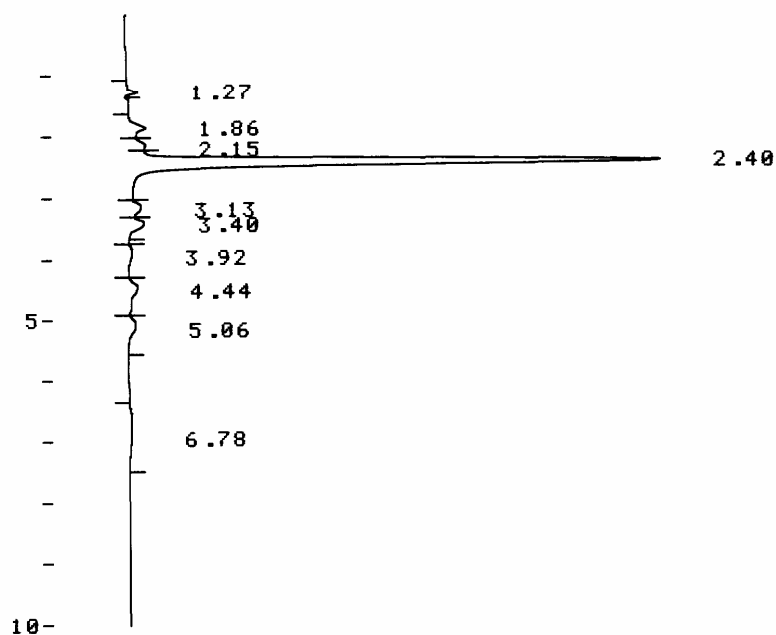
RAW DATA STORAGE NO. 12

Cromatograma No. 20

Inyección de Sulforafano 112.50µg/ml

LOAD DATA STORAGE NO. 14 (RAW)

CH. 1 C.S 10.00 ATT 4 OFFS 3 07/31/04 17:57



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 1st level

D-2500

07/31/04 17:57

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 21 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 5 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
4	2.40	67955	18.750	UU	8490

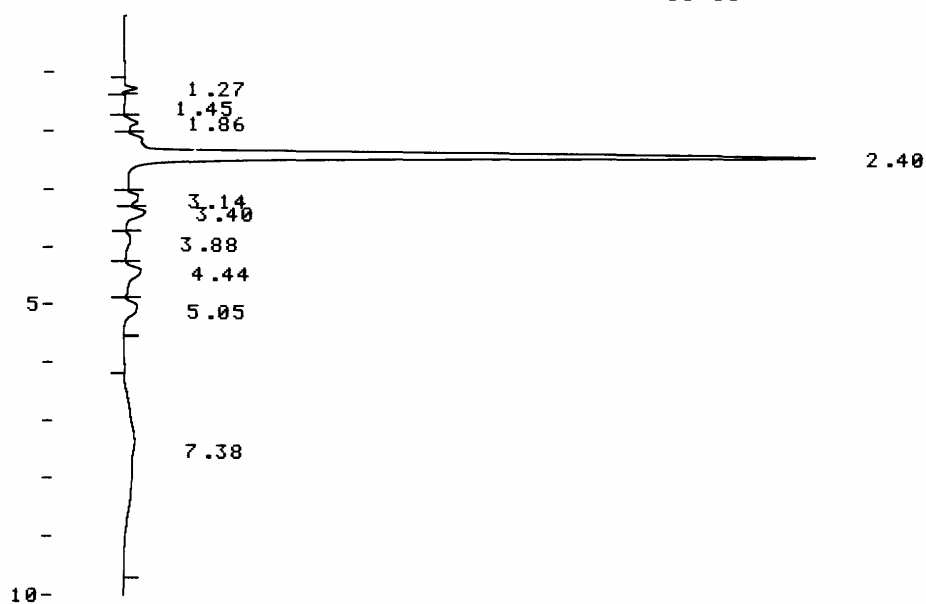
RAW DATA STORAGE NO. 14

Cromatograma No. 21

Inyección de Sulforafano 150.00µg/ml

LOAD DATA STORAGE NO. 15 (RAW)

CH. 1 C.S 10.00 ATT 4 OFFS 3 07/31/04 18:08



INJ NO. OF STD : 1 / 1 REP , 2nd level

07/31/04 18:08

D-2500

METHOD: SULFORAFANO- TAG: 22 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 5 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC	HEIGHT
4	2.40	98186	37.500	UU	11673

RAW DATA STORAGE NO. 15

Anexo No. 7 Cálculos

Cálculo de concentración de muestra:

$$\text{Ecuación } y = 636.94x - 544.11$$

Área del pico del extracto 61221

$$X = (61221 - 544.11)/636.94 = 95.26\mu\text{g/ml}$$

$$95.26\mu\text{g/ml} * (25 \text{ ml de solución} / 0.5 \text{ gramos de muestra}) = 4763.16 \mu\text{g/g}$$

$$4763.16 \mu\text{g/g} = 4.76 \text{ mg/g} = 0.476 \%P/P$$

Br. Rosa Patricia Navas Nájera
Tesista

Licda. Diana Pinagel
Asesor de Tesis Interno

Lic. Jorge García
Asesor de Tesis Externo

Ph.D. Alfredo Gálvez Sinibaldi
Director Escuela de Química

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
Decano