



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Tema de tesis:

Producción y análisis de compuestos de interés nutracéutico durante la fermentación de *Brassica oleracea L. var. capitata* (Sauerkraut)

Para obtener el grado de
Maestría en Biotecnología Aplicada

Presenta:

IAL. Margarita Morales Maldonado

Director:

Dr. Marlon Rojas López

Dra. Silvia Luna Suárez



Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala

Junio de 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlaxcala siendo las 12:00 horas del día 20 del mes de Junio del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA - IPN para examinar la tesis titulada:

Producción y análisis de compuestos de interés nutracéutico durante la fermentación de Brassica oleracea L. var. capitata (Sauerkraut)

Presentada por el alumno:

Morales
Apellido paterno

Maldonado
Apellido materno

Margarita
Nombre(s)

Con registro:

A	1	4	0	0	7	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Biotecnología Aplicada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Marlon Rojas López

Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. Fábila Eloisa Jiménez Montejo

Dr. Víctor Eric López y López

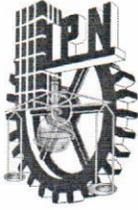
M.C. Orlando Zaca Moran

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En el Municipio de Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala; el día 21 del mes Junio del año 2016, el que suscribe Margarita Morales Maldonado alumna del Programa de Maestría en Biotecnología Aplicada con número de registro A140072, adscrito a CIBA-Tlaxcala, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Marlon Rojas López y la Dra. Silvia Luna Suárez ceden los derechos del trabajo titulado **Producción y análisis de compuestos de interés nutracéutico durante la fermentación de *Brassica oleracea L. var. capitata* (Sauerkraut)**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ogam_16@hotmail.com, marlonr1@hotmail.com, sluna@ip.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

IAL. Margarita Morales Maldonado

La presente tesis se realizó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de beca 308495, en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional



ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
ABSTRACT.....	
INTRODUCCIÓN	i
CAPÍTULO I.....	1
1 MARCO TEÓRICO	1
1.1 Las crucíferas y sus beneficios	1
1.2 <i>Brassica oleracea</i>	2
1.2.1 Características de la col para cosechar en campo.	3
1.2.2 Calidad para el beneficio en agroindustria.....	4
1.2.3 Composición Química.....	4
1.2.4 Importancia económica.....	6
1.3 Glucosinolatos.....	6
1.4 La enzima mirosinasa	9
1.5 Compuestos derivados de la hidrólisis de glucosinolatos	10
1.6 Fermentación ácido láctica de <i>Brassica oleracea</i> : Sauerkraut.....	11
1.6.1 Bacterias ácido lácticas producidas durante la fermentación	13
1.7 Compuestos nutracéuticos presentes en Sauerkraut.....	14
1.7.1 Fibra.....	14
1.7.2 Compuestos fenólicos.....	15
1.7.3 Vitamina C	15
1.7.4 Carotenoides	16
1.8 Isotiocianatos y sus propiedades anticancerígenas	16



1.9	Análisis de compuestos mediante técnicas separativas	17
1.10	Espectroscopia de absorción infrarroja en biomoléculas	17
1.10.1	Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier.....	19
1.11	Espectroscopia UV-Visible.....	20
1.12	Cromatografía de gases.....	20
1.13	Cromatografía líquida de alta resolución – HPLC	21
1.14	Antecedentes directos.....	22
1.15	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
1.16	JUSTIFICACIÓN.....	23
1.17	OBJETIVO GENERAL	23
1.17.1	OBJETIVOS PARTICULARES	23
1.18	HIPÓTESIS	23
CAPITULO II	24
2	DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
2.1	Estándar y reactivos.....	24
2.2	Materia prima	24
2.3	Proceso de fermentación	24
2.4	Determinación de pH y acidez	25
2.5	Análisis microbiológico.....	25
2.6	Medición espectroscópica por FTIR.....	25
2.7	Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteau	25
2.7.1	Elaboración de la curva patrón de ácido gálico	26
2.8	Medición espectroscópica por UV-Visible.....	27
2.9	Extracción de las muestras de fermentación natural e inducida	27
2.9.1	Medición por cromatografía de gases - GC	27



2.10 Degradación del estándar Allyl isotiocianato (AITC)	28
2.11 Medición por cromatografía líquida de alta resolución – HPLC	28
2.12 Elaboración de una curva patrón del estándar AITC, usando FTIR como equipo de medición	29
2.13 Análisis estadístico.....	29
2.14 Diseño experimental	30
CAPITULO III	31
3 RESULTADOS	31
3.1 Obtención del fermentado (Sauerkraut)	31
3.2 Temperatura.....	32
3.3 pH	33
3.4 Acidez titulable, porcentaje de ácido láctico.....	34
3.5 Análisis microbiológico	35
3.6 Glucosa.....	38
3.7 Contenido de Fenoles totales	39
3.8 Cromatografía de gases - GC	45
3.9 Cromatografía líquida de alta resolución – HPLC	49
3.10 Absorción FTIR de muestras de fermentados de col blanca.....	54
3.11 Espectro FTIR del compuesto Allyl Isothiocyanato y curva de calibración.	55
3.12 Espectro FTIR de extracciones de fermentados de col blanca con CH ₂ Cl ₂	59
CAPITULO IV	63
4 CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación científica de la col blanca (<i>Brassica oleracea var. capitata</i>) .	2
Tabla 2. Composición por cada 100 g de producto	5
Tabla 3. Estructura química de glucosinolatos presentes en <i>Brassic</i> as.....	7
Tabla 4. Productos de hidrólisis obtenidos del género <i>Brassica</i>	10
Tabla 5. Valores de concentración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.....	26
Tabla 6. Relación de la fase móvil Acetonitrilo:Agua.....	28
Tabla 7. Valores de concentración de AITC para su cuantificación	29
Tabla 8. Concentración de glucosa (g/L) durante la fermentación natural de col..	38
Tabla 9. Valores de absorción y cuantificación de fenoles totales para el periodo de 0 – 44 días, expresadas en mg/L.	42
Tabla 10. Frecuencias y enlaces asociados a vibraciones de la molécula de glucosa.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vegetales del genero Brassica.....	1
Figura 2. Etapa final de crecimiento de col blanca.	3
Figura 3. Producción agrícola de col blanca en México (2007).....	6
Figura 4. Estructura química de un glucosinolato.....	7
Figura 5. Mecanismo de defensa de una planta del genero Brassica.	8
Figura 6. Estructura de la Mirosinasa, extraída de Sinapis alba.....	9
Figura 7. Productos de degradación a partir de la hidrólisis de glucosinolatos en contacto con la enzima mirosinasa.	11
Figura 8. Primera fase de fermentación de col blanca: Sauerkraut.....	12
Figura 9. Producto final obtenido de la fermentación de col blanca, conocido como Sauerkraut.....	13
Figura 10. a) Bacterias de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , b) Bacterias de <i>Lactobacillus Plantarum</i>	14
Figura 11. Estructura química de ácido L-ascórbico.	15
Figura 12. Estructura química del isotiocianato.....	17
Figura 13. Huella dactilar ubicada en el rango 1600 – 600 cm ⁻¹	18
Figura 14. Esquema de un interferómetro.....	19
Figura 15. Aplicación de la transformada de Fourier a un interferograma.....	20
Figura 16. (a) ensayo completo fermentación natural, (b) ensayo completo de fermentación inducida (c) almacenados a 30°C.....	31
Figura 17. Temperatura registrada durante la fermentación de col blanca (Sauerkraut) (a) fermentación natural, (b) fermentación inducida	32
Figura 18. Dependencia del pH con el tiempo de fermentación de Sauerkraut (0-44 días) (Fermentación natural)	33
Figura 19. Dependencia del pH con el tiempo de fermentación de Sauerkraut (0-44 días) (Fermentación inducida).....	33
Figura 20. Dependencia del porcentaje de ácido láctico con el tiempo de fermentación (a) fermentación natural, (b) fermentación inducida	34
Figura 21. Morfología de <i>Lactobacillus</i> (a) medio MRS, (b) Objetivo 40X.....	35
Figura 22. Crecimiento de <i>Lactobacillus</i> al 0.5% de NaCl (0-44 días)	36



Figura 23. Crecimiento de Lactobacillus al 0.5% de NaCl, (0-44 días)	36
Figura 24. Desviación estándar durante el crecimiento de Lactobacillus	37
Figura 25. Desviación estándar durante el crecimiento de Lactobacillus	37
Figura 26. Concentración de glucosa (g/L) producida en la fermentación natural de Sauerkraut (0-44 días)	39
Figura 27. Curva de calibración del estándar de ácido gálico	40
Figura 28. Espectros de absorción UV-visible de ácido gálico	40
Figura 29. Absorción UV-Visible - Fermentación inducida (0 – 44 días)	41
Figura 30. Concentración en equivalentes de ác. Gálico (mg/L) en relación con UFC/mL (Log) (Fermentación natural)	43
Figura 31. Concentración en equivalentes de ác. Gálico (mg/L) en relación con UFC/mL (Log) (Fermentación inducida)	43
Figura 32. Glucosa, fenoles totales, bacterias, acidez y pH de la fermentación natural de col blanca durante 44 días.	44
Figura 33. Fenoles totales, bacterias, acidez y pH de la fermentación inducida de col blanca durante 44 días.	45
Figura 34. Cromatogramas del estándar de a) AITC, b) Allyl cyanide, c) ambos estándares.....	46
Figura 35. Cromatogramas de muestras de fermentación natural de col blanca. .	47
Figura 36. Cromatogramas de muestras de fermentación Inducida de col blanca.	48
Figura 37. Cromatograma del estándar AITC, obtenido por HPLC	49
Figura 38. Cromatograma del estándar AITC degradado extraído con CH ₂ Cl ₂ , obtenido por HPLC	49
Figura 39. Cromatograma del estándar AITC de la fase acuosa, obtenido por HPLC.....	50
Figura 40. Porcentaje correspondiente al área en un tiempo de retención de 3.882 min - 3.939 min.....	51
Figura 41. Espectro del estándar del AITC degradado extraído con CH ₂ Cl ₂ y la fase acuosa, a una longitud de onda de 229nm y 254nm.	52
Figura 42. a) Espectro del estándar del AITC degradado extraído con CH ₂ Cl ₂ y la fase acuosa, b) y c) Espectros de varias muestras (día0 y día4)	53



Figura 43. Posible vía para la formación de N,N-diallylthiourea a partir del AITC...	53
Figura 44. Espectros FTIR traslapados con el espectro de glucosa	55
Figura 45. Espectro FTIR del estándar de allyl isothiocyanato (AITC).....	56
Figura 46. Espectro FTIR de una dilución del estándar de allyl isothiocyanato (AITC) con CH ₂ Cl ₂ (región 2450-1800 cm ⁻¹)	56
Figura 47. Espectro FTIR de una dilución del estándar de allyl isothiocyanato (AITC) con CH ₂ Cl ₂ (región 1680-1580 cm ⁻¹).	57
Figura 48. Espectro FTIR de una dilución del estándar de allyl isothiocyanato (AITC) con CH ₂ Cl ₂ (región 1040-960 cm ⁻¹).	57
Figura 49. Intensidad FTIR de las bandas centradas en 2169, 2088, 1649 y 987 cm ⁻¹ asociadas a los grupos –N=C=S y CH-CH ₂ como función del contenido de AITC en dilución con CH ₂ Cl ₂	58
Figura 50. Intensidad FTIR en grafica Log-Log de las bandas centradas en 2169, 2088, 1649 y 987 cm ⁻¹ asociadas a los grupos –N=C=S y CH-CH ₂ como función del contenido de AITC en dilución con CH ₂ Cl ₂	59
Figura 51. Espectros FTIR de extracciones con CH ₂ Cl ₂ en fermentación natural de col blanca de 0 a 44 días. Se ha agregado el espectro del estándar de AITC.....	60
Figura 52. Espectros FTIR de extracciones con CH ₂ Cl ₂ en fermentación inducida de col blanca de 0 a 44 días. Se ha agregado el espectro del estándar de AITC.	61



RESUMEN

La investigación sobre la acción de componentes bioactivos en plantas se ha centrado en sus compuestos fitoquímicos, en particular el género *Brassica* posee antioxidantes, compuestos fenólicos y glucosinolatos. Estos últimos al entrar en contacto con la enzima mirosinasa que está presente también en el vegetal, se lleva a cabo una hidrólisis que da origen a nuevos metabolitos, entre los que destacan los isotiocianatos. En este trabajo se analizaron y cuantificaron algunos de los compuestos bioactivos que se generan durante la fermentación de *Brassica oleracea L. var. capitata* (col blanca) conocido como Sauerkraut, utilizando métodos cromatográficos, colorimétricos y espectroscópicos. Lo anterior se llevó a cabo analizando los cambios que ocurren en una fermentación natural y una inducida (*L. casei*) en un periodo de 44 días.

ABSTRACT

Research on the bioactive compounds in plants has centered in phytochemical compounds, particularly the genus *Brassica* has antioxidants, phenolic compounds and glucosinolates. The last begins to react with the myrosinase enzyme, which is present in the vegetal too, and a hydrolysis process is carried out giving rise to new metabolites, between them the isothiocyanates. In this work some of the main compounds arisen from fermentation of *Brassica oleracea L. var. capitata* (white cabbage) known as Sauerkraut are analyzed and quantified by using chromatography, colorimetric y spectroscopic techniques. The above was conducted by analyzing the changes that occur in a natural and induce (*L. casei*) fermentation during a period of 44 days.



INTRODUCCIÓN

La búsqueda de compuestos naturales con actividad citotóxica y antitumoral es una de las prioridades actuales de la lucha contra el cáncer. Esto es a nivel mundial y México no es la excepción, el cáncer ocupa el tercer lugar como causa de muerte (SECRETARIA DE SALUD, 2013).

Durante las últimas décadas, la investigación sobre la acción de los componentes bioactivos de plantas se ha centrado predominantemente en sus propiedades preventivas de cáncer. Hoy en día se puede explicar por qué el consumo de dietas ricas en hortalizas crucíferas tiene efectos terapéuticos. (Herr Ingrid & Büchler Markus W, 2010)

En particular el género *Brassica*, tiene un papel protector frente a algunos tipos de cáncer, estos son una excelente fuente de compuestos fitoquímicos, entre los que cabe destacar a los glucosionolatos, antioxidantes naturales como las vitaminas A, C, E y K, compuestos fenólicos, isotiocianatos, además de minerales esenciales para la salud del consumidor (Cartea *et al.*, 2003). Existen evidencias de las propiedades anticancerígenas al consumir crucíferas, esto se atribuye en gran medida a los altos contenidos de glucosinolatos. Estos se encuentran almacenados en el interior de las vacuolas celulares. La enzima mirosinasa, localizada en las células vegetales, cataliza la hidrólisis de estos compuestos, dando lugar a una gran variedad de productos, entre los que destacan los isotiocianatos (Pérez L. F & Zamora N S, 2002)

Sin embargo, más allá de las importantes características nutricionales y terapéuticas de las crucíferas del género *Brassica*, es conocido desde la antigüedad que la fermentación de *Brassica oleracea* ha sido una de las primeras aplicaciones biotecnológicas que el ser humano ha utilizado para su beneficio, en la conservación de este vegetal por largos periodos de tiempo (meses), así como para la obtención de un alimento rico en vitaminas y con propiedades curativas



contra enfermedades. Lo anterior se debe a que el proceso de fermentación está ligado a la producción de una variedad enriquecida de compuestos derivados de la hidrólisis de glucosinolatos, tales como: isotiocianatos, cuya actividad anticancerígena ha sido reportada (Paramithiotis *et al.*, 2010; Peñas *et al.*, 2012,).

En el presente trabajo se busca producir y analizar la presencia de compuestos bioactivos de interés nutracéutico, derivados de la hidrólisis de glucosinolatos, durante la fermentación de *Brassica oleracea L. var. capitata*, así como otros compuestos derivados del mismo proceso bajo distintas condiciones experimentales de preparación.

CAPÍTULO I.

1 MARCO TEÓRICO

1.1 Las crucíferas y sus beneficios

Entre la extensa familia botánica de las crucíferas, destacan varias del género *Brassica*, que desde tiempo inmemorial han sido utilizadas como ingredientes de la medicina popular por su eficacia en tratamientos de enfermedades infecciosas. Estas plantas crucíferas sobresalen, por sus contenidos en sustancias fitoquímicas, a las que se les atribuyen numerosos efectos positivos sobre la salud humana: protección frente al desarrollo de tumores malignos, prevención de algunas enfermedades cardiovasculares, protección de la visión, etc. (Bello, 2005)

En las últimas dos décadas se ha mostrado gran interés en un grupo de hortalizas de la familia *Brasicáceas* o *Crucíferas*, del género *Brassica*, entre las que se incluye el brócoli, col de bruselas, col blanca, coliflor, etc. (Verhoeven *et al.*, 1997) como se muestra en la Figura 1.

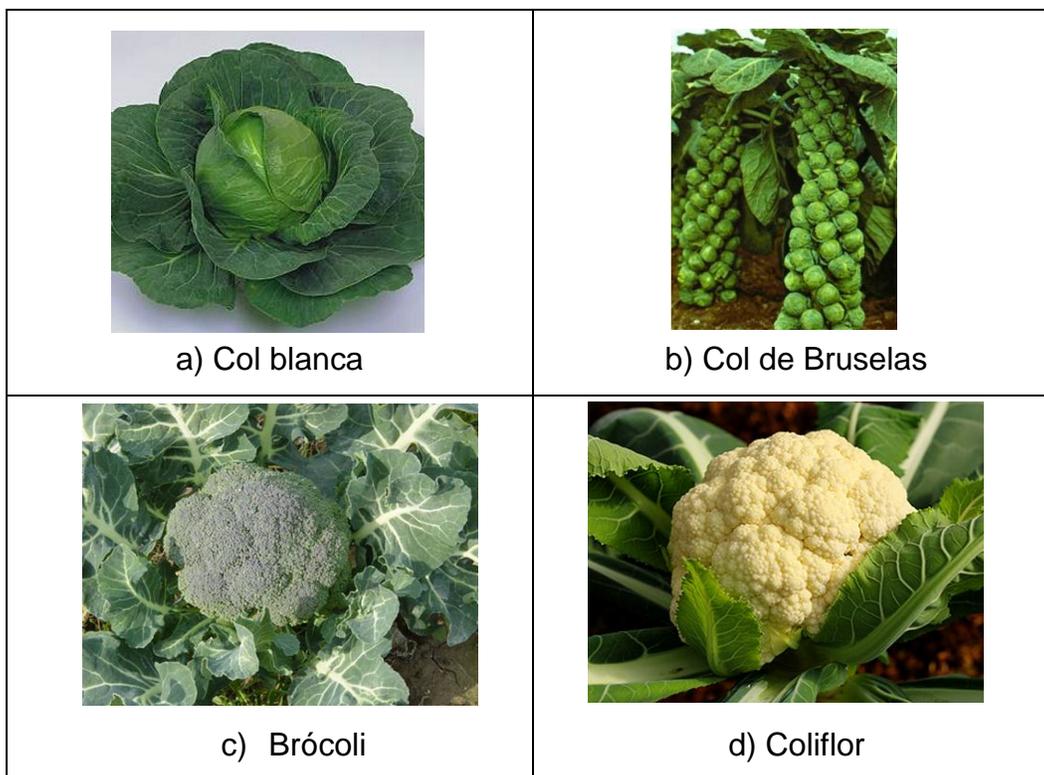


Figura 1. Vegetales del genero *Brassica*.



Las crucíferas contienen un número de nutrientes y fitoquímicos con propiedades quimiopreventivas, incluyendo, fibra, carotenoides, estructuras fenólicas y sulforafanos, que tienen reconocidos y muy variados efectos fisiológicos: antioxidante, desintoxicante, regulador del sistema hormonal, estimulantes del sistema inmune, actividad antibacteriana, etc. Su asociación con los anteriores efectos saludables ha despertado tal interés por ellos, que se ha producido un notable incremento en su consumo habitual (Bello, 2005). Las crucíferas son una rica fuente de glucosinolatos, estos al entrar en contacto con la enzima mirosinasa se hidrolizan dando nuevos compuestos como: isotiocianatos, tiocianatos, indoles, nitrilos, epitionitrilos, lo cual las hace únicas. (Higdonm *et al.*, 2007)

Las propiedades fitoquímicas inducen enzimas de desintoxicación, eliminan los radicales libres, estimulan las funciones inmunes, disminuyen el riesgo de cáncer, inhiben la transformación maligna y regulan el crecimiento de células (Herr Ingrid & Büchler Markus W, 2010). En experimentos in vivo, animales fueron alimentados con productos de hidrólisis de glucosionolatos, junto con un agente cancerígeno, se encontró que menos animales desarrollaron tumores en comparación con el control de animales que no recibieron ese tipo de dieta. (Miller *et al.*, 2004)

1.2 *Brassica oleracea*

La col blanca es una hortaliza perenne de aproximadamente 30 cm en estado máximo de desarrollo, pertenece a la familia de las *Brassicaceae*, también denominada *Crucíferas* debido a la forma de las flores (cuatro pétalos diagonalmente opuestos en forma de cruz); la podemos clasificar de la siguiente manera (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación científica de la col blanca (*Brassica oleracea var. capitata*)

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>

Orden:	<i>Brassicales</i>
Familia:	<i>Brasicáceas o Crucíferas</i>
Género:	<i>Brassica</i>
Especie:	<i>Oleracea</i>
Variedad:	<i>Capitata</i>
Fonegra G. R & Jiménez R. S. L, 2007	

En México recibe el nombre de col blanca, en otros países como Alemania = kohl, Estados Unidos = cabbage, Francia = chou, Brasil = couve.

Esta hortaliza se compone por un tallo corto engrosado, que sostiene un gran número de hojas desplegadas que descansan una sobre otra y forman un conjunto más o menos compacto. Las hojas exteriores son más grandes y desarrolladas, las interiores se expanden muy poco (ver Figura 1Figura 2). La superficie es lisa, su tamaño es variable (FAO, 2006). La mejor época para el consumo de col, tiene su mejor temporada entre los meses de septiembre y enero, aunque se compran en los mercados todo el año.



Figura 2. Etapa final de crecimiento de col blanca.

1.2.1 Características de la col para cosechar en campo.

Una vez que este vegetal tiene las características para ser consumido, este debe tener las siguientes características:



-
- ✘ Poseer una forma globulosa.
 - ✘ Firmeza y regularidad.
 - ✘ Color bien definido, apreciado por su aspecto intrínseco por la interacción de las hojas de la corona que acompañan generalmente a la inflorescencia, limitando su deshidratación y protegiéndola de los choques durante las manipulaciones.

1.2.2 Calidad para el beneficio en agroindustria

Dependiendo al sector al cual se dirijan se pueden recoger de manera manual o mecánica. Una vez cosechada, se almacenan cabezas solidas no deterioradas o dañadas por manejo mecánico, se mantienen los siguientes parámetros:

- ✘ Deben estar libres de enfermedades y lesiones.
- ✘ Estar bajo un grado de humedad moderado.
- ✘ Las cabezas de col para mercado, se envasan en bolsas de polietileno perforado y son almacenadas a baja temperatura inmediatamente (1.6°C).

Estas hortalizas con elevado contenido en agua y de textura poco densa se presentan al consumo en estado crudo. La turgencia y los bajos contenidos en celulosa permiten una cocción rápida que además puede reducir los contenidos en glucosinolatos, que son los responsables de un pequeño amargor que presenta el producto fresco. Sin embargo, algunos de estos compuestos azufrados y sus productos de degradación son volátiles y provocan olores en la cocción (Blandón, 1999).

1.2.3 Composición Química

La col blanca proporciona, igualmente, pequeñas cantidades de zinc, hierro, cobre, que están implicados en la resistencia contra infecciones, la Tabla 2 muestra el contenido por cada 100 g de col.

Tabla 2. Composición por cada 100 g de producto

	Contenido	Variación
Energía	126 kJ	
Contenido / 100 g		
Proteína total	1.2 g	0.7 – 2.2
Grasa total	0.2 g	0.2 – 0.4
Carbohidratos totales	7 g	4.7 – 9.0
Fibra dietética	2.3 g	
Ceniza	0.6 g	0.4 – 1.0
Humedad	90.5 g	88.4 – 94.0

	Contenido / 100g	Variación		Contenido / 100g	Variación
Vitamina A	2.92 RE	–	Sodio, Na	6 mg	4.40 – 9.00
β-carotenos	35 µg	16.0 – 66.0	Potasio, K	240 mg	175 – 320
Vitamina E	0.02 aTE	–	Calcio, Ca	50.9 mg	42.5 – 57.0
Vitamina K	0.02 µg	–	Magnesio, Mg	10.9 mg	8.10 – 15.0
Vitamina B1 Tiamina	0.049 mg	0.028 – 0.079	Yodo, I	30.1 mg	23.3 – 40.7
Vitamina B2 Riboflavina	0.036 mg	0.025 – 0.059	Fosforo, P	0.305 mg	0.190 – 0.600
Niacina	0.550 NE	0.200 – 0.560	Hierro, Fe	0.019 mg	0.009 – 0.035
Vitamina B6	0.156 mg	0.101 – 0.212	Cobre, Cu	0.145 mg	0.100 – 0.230
Ácido Pantoténico	0.21 mg	–	Zinc, Zn	0.7 µg	0.100 – 3.10
Biotina	1.2 µg	0.810 – 1.40	Magnésio, Mg	0.24 mg	0.110 – 0.360
Folatos	77 µg	42.0 – 125	Cromo, Cr	1.7 µg	–
Vitamina C	45.8 mg	25.5 – 62.0	Selenio, SE	0.767 µg	–
			Níquel, Ni	2.7 µg	0.400 – 9.50

Fuente: Danish Food Composition [Databank, 2014](#).

1.2.4 Importancia económica

La producción de col en el país se ubica principalmente en el estado de Puebla, con el 31.9% de la superficie cosechada, 31.5% de la producción total, el 34.5% del valor de la producción y un rendimiento de 34.6 ton/ha. Le siguen en importancia las entidades de Michoacán, Sonora, Chiapas, Baja California, Aguascalientes y Jalisco.

Conforme a los datos de la SAGARPA, a través del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) que brinda información de la producción agrícola 2007, en el caso de la col, el estado de Puebla representa el 31.5% de la producción nacional, le sigue el estado de Michoacán con 19.6%, Chiapas con 7%, Sonora con 6.5%, Nuevo León 6.3%, Jalisco 5.9%, Aguascalientes, 5.1 % y el resto de las entidades con el 18.1% como se observa en la Figura 4.

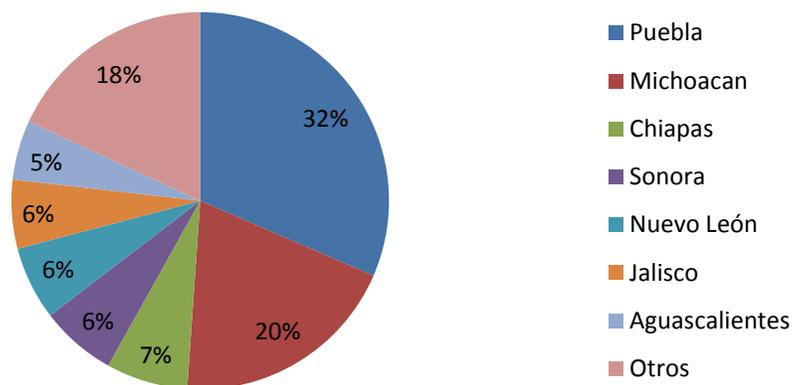


Figura 3. Producción agrícola de col banca en México (2007).

1.3 Glucosinolatos

Los glucosinolatos también conocidos como glucósidos son aniones orgánicos, (Nafisi *et al.*, 2006) se caracterizan por compartir una base común que contiene un grupo β -D- tioglucosa, una oxima sulfatada y una cadena lateral variable (R), ver Figura 5. La cadena lateral los clasifica en glucosinolatos alifáticos, aromáticos e

indólicos dependiendo de su precursor, (Arias, 2011) esto brinda su diversidad estructural (Verhoeven *et al.*, 1997)

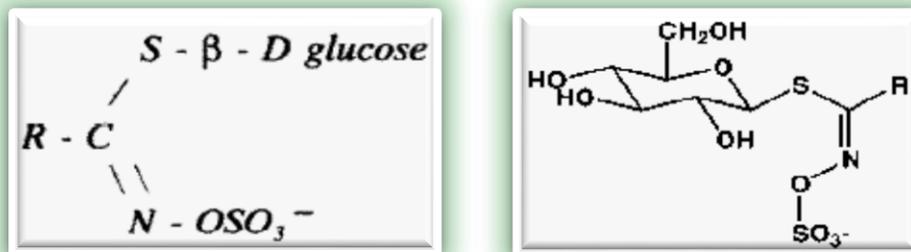
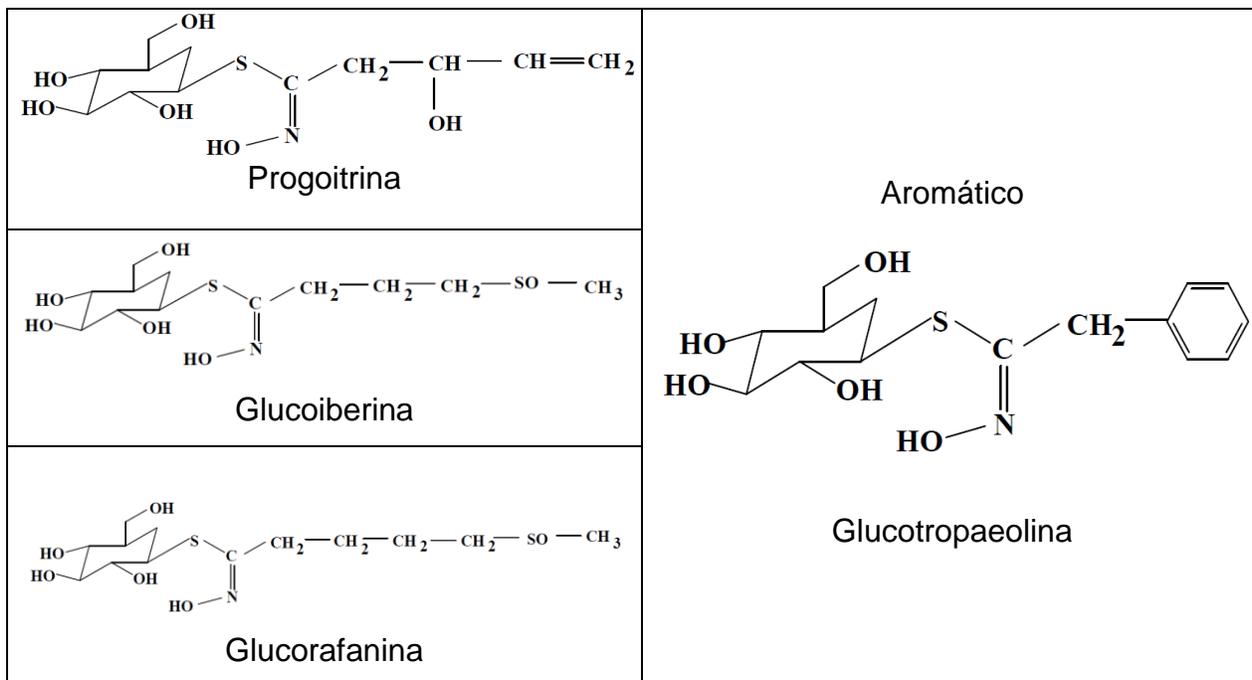


Figura 4. Estructura química de un glucosinolato.

Se han identificado más de 120 glucosinatos diferentes aquí los más abundantes presentes en el género *Brassica* son los siguientes; en la Tabla 3 se observan cinco desulfo-glucosinatos alifáticos: sinigrina, gluconapina, progoitrina, glucoiberina, glucorafanina; los indólicos: glucobrasicina; los aromáticos: glucotropaeolina (Vicas *et al.*, 2012)

Tabla 3. Estructura química de glucosinatos presentes en *Brassicas*.

Alifáticos	Indólico
<p>Sinigrina</p>	<p>Glucobrasicina</p>
<p>Gluconapina</p>	



Los glucosinolatos que se encuentran localizados en vacuolas. Ante un daño en la planta; por ejemplo un corte provocado por un insecto, los glucosinolatos son liberados de las vacuolas y se ponen en contacto con la enzima mirosinasa localizada en el citoplasma (Joaquín, 2012) ver Figura 6.

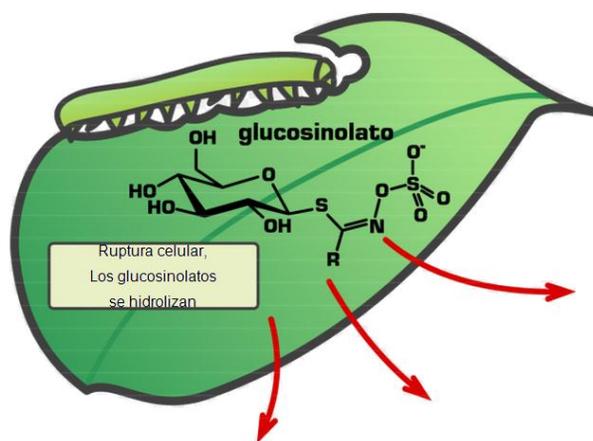


Figura 5. Mecanismo de defensa de una planta del genero Brassica.

1.4 La enzima mirosinasa

La mirosinasa se aisló por primera vez en semillas de *Sinapis alba*, es un glicoproteína que contiene varios grupos tiol y sulfuro, forma parte de la familia glucósido hidrolasa; junto con carbohidratos, principalmente hexosas. La mirosinasa se compone de dos subunidades idénticas (ver Figura 7) de 71.1 kD y un punto isoeléctrico de 5.1 (Leoni *et al*; 1997).

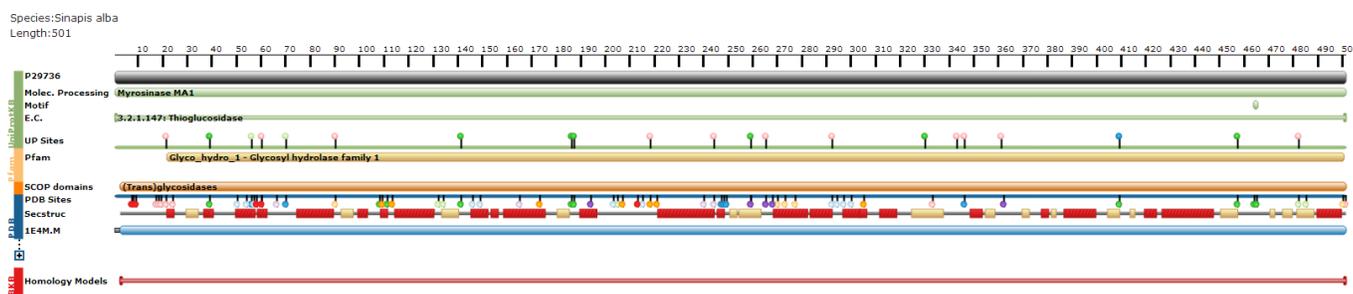
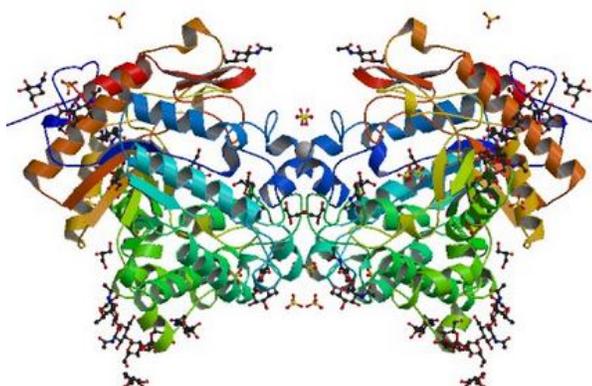


Figura 6. Estructura de la Mirosinasa, extraída de *Sinapis alba*.

Su papel principal es la defensa de plantas crucíferas y cataliza la hidrólisis de glucosinolatos, que poseen actividad fungicida y propiedades bactericidas (Besle *et al*; 2009), esta enzima se inhibe por calor a 90°C durante 15 min, pero este tratamiento no es definitivo, ya que en la flora intestinal hay mirosinasa capaces de liberar también principios activos de la mirosinasa (Soriano, 2006).

1.5 Compuestos derivados de la hidrólisis de glucosinolatos

Cuando los glucosinolatos entran en contacto con las β -glucosidasas (mirosinasas) debido a una ruptura celular (mecánica o química) se hidrolizan generando una mezcla de agliconas, glucosa y sulfato. La aglicona, es inestable por lo que sufre un cambio de forma que da como consecuencia isotiocianatos, tiocianatos, indoles, nitrilos, epitionitrilos, etc. dependiendo de la estructura del glucosinolato y de la reacción que tenga lugar (Núñez, 2012), como vemos en la Figura 8, estos productos hacen una contribución significativa al típico sabor picante del género *Brassica*. La naturaleza de los productos de hidrólisis depende principalmente de la cadena lateral de la glucosinolatos, además de la presencia de cofactores. Por ejemplo las oxazolidinas se forman partir de glucosionolatos con cadena lateral alquilo. La Tabla 4 indica la cadena lateral, el glucosinolato y el producto que da origen durante la hidrólisis.

Tabla 4. Productos de hidrólisis obtenidos del género *Brassica*.

Cadena lateral (R)	Glucosinolato	Productos de Hidrólisis			Otros
		N ^b	I ^b	T ^b	
2-propenil	sinigrina	+	+	-	Epitionitrilo ^c
3-butenil	gluconapina	+	+	-	Epitionitrilo ^c
2-hidroxi-3- butenil	progoitrina	+	-	-	Oxazolidina, Epitionitrilo ^c
3- metilsulfinilpropil	glucoiberina	+	+	-	
3-indolilmetil	glucobrasicina	+	-	+	
Benzil	glucotropaeolina	+	+	-	

^bNitrilo R-C=N; I Isotiocianato R-N=C=S; T Tiocianato S-C=N
^cEstructura: R-C=N con sulfuro insertado en el enlace terminal.

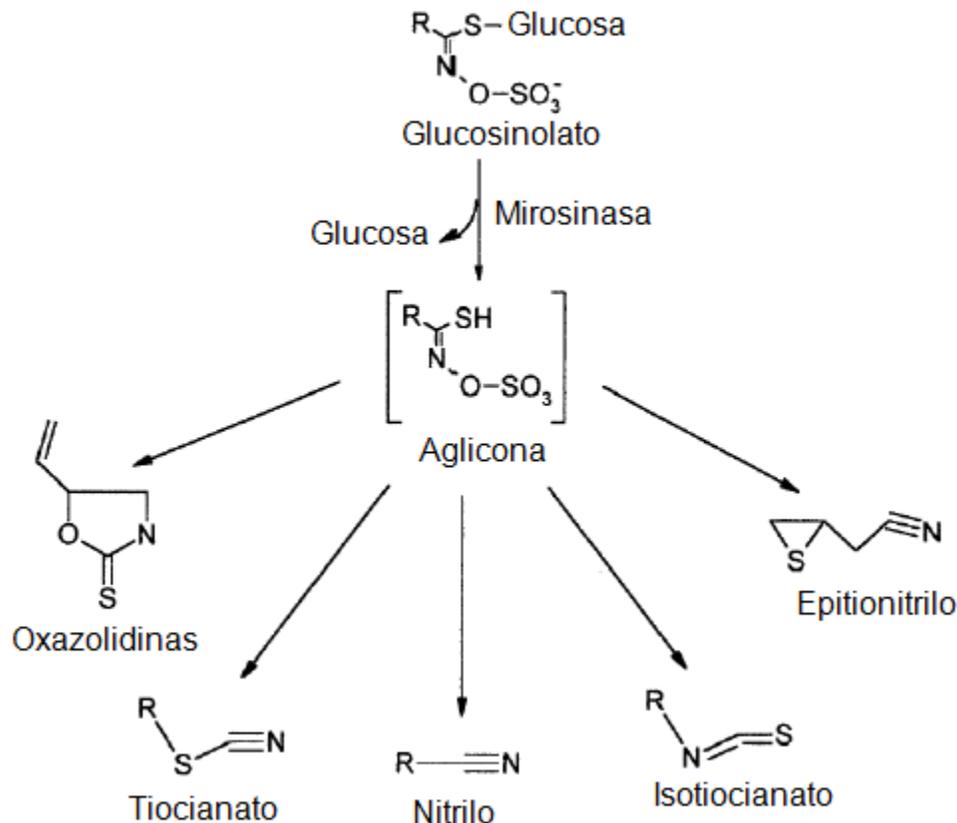


Figura 7. Productos de degradación a partir de la hidrólisis de glucosinolatos en contacto con la enzima mirosinasa.

1.6 Fermentación ácido láctica de *Brassica oleracea*: Sauerkraut

El término “sauerkraut” palabra alemana que significa col agria, se refiere a la fermentación natural, con producción de ácido láctico, consiste en triturar col a la cual se le añade cloruro de sodio (sal común) para su conservación. La fermentación se trata de un complejo químico-microbiológico influido sobre todo por factores tales como concentración de sal, exclusión del aire y temperatura de fermentación con producción de ácido láctico, estas medidas son con la finalidad de facilitar la propagación de las bacterias que producen ácido láctico. (Müller, 1981)

La fermentación de alimentos ha sido utilizada durante siglos como un método para conservar productos alimenticios perecederos. La materia prima principal para realizar una fermentación es el uso de frutas, cereales, verduras, leche, etc., es posible obtener una gran variedad de productos diferentes. La actividad principal de la fermentación es convertirlos hidratos de carbono a metabolitos deseados como alcohol, ácido acético, ácido láctico. (Bech, 2002)

Se definen las siguientes fases de fermentación:

Primera fase de la fermentación

Después de cortar la planta y ponerlas en sal y apisonarlas, las hojas pierden su elasticidad, se quiebran y liberan jugo celular, ver Figura 9. Los organismos aerobios consumen el oxígeno que queda en el frasco. La formación de gas se manifiesta en los primeros días de fermentación por una abundante formación de espuma, debido a bacterias *Pseudomonas* y *Enterobacter*.



Figura 8. Primera fase de fermentación de col blanca: Sauerkraut.

Segunda fase de la fermentación

La variada flora aeróbica disminuye poco a poco y aumenta la actividad de los microorganismos anaerobios formados de ácido láctico. Estas se encargan de

transformar una parte de los hidratos de carbono en ácido láctico como *Leuconostoc mesenteroides*.

Tercera fase de fermentación

Esta fase se caracteriza por una intensa formación de ácido láctico, actúan principalmente *Lactobacillus plantarum*, esta bacteria es resistente a la sal común (se inhibe solamente a una concentración mayor del 12%) el ácido láctico es el conservador más importante de la col fermentada.

Cuarta fase de fermentación

Suponiendo que el jugo celular contenga todavía suficientes hidratos de carbono, bacterias como *Lactobacillus brevis* actuaran, sin embargo no se desea una concentración de ácido alta, puesto que el sabor se vuelve amargo, ver Figura 10.



Figura 9. Producto final obtenido de la fermentación de col blanca, conocido como Sauerkraut.

1.6.1 Bacterias ácido lácticas producidas durante la fermentación

Las bacterias ácido lácticas; comprenden una amplia gama de géneros e incluyen un considerable número de especies, tienen características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general son cocos o bacilos Gram Positivos, no esporulados, anaerobios, oxidasa, catalasa negativas, carecen de

citocromos y producen ácido láctico como único o principal producto de fermentación de carbohidratos (Ramírez *et al.*, 2011)

En la fermentación de la col blanca se incluyen dos bacterias lácticas principales: *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 11 a) y *Lactobacillus Plantarum* (Figura 11 b). Estas bacterias producen el sabor característico del fermentado y la concentración de ácido láctico. La producción de ácido se determina de forma rutinaria por mediciones de acidez titulable y pH, estos parámetros se utilizan como criterio de evaluación del fermentado (Namsou, 2005). Las bacterias ácido lácticas son una pequeña parte de la microbiota autóctona de verduras y frutas o bien funcionan como motores de arranque seleccionados. (Cagno *et al.*, 2013)

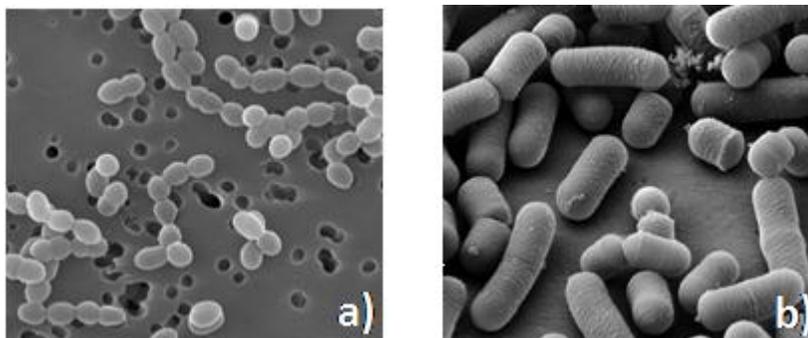


Figura 10. a) Bacterias de *Leuconostoc mesenteroides*, b) Bacterias de *Lactobacillus Plantarum*.

1.7 Compuestos nutraceuticos presentes en Sauerkraut

La col blanca está compuesta de fibra, carotenoides, estructuras fenólicas que tienen efectos fisiológicos: antioxidante, desintoxicante, estimulantes del sistema inmune, actividad antibacteriana, etc (Bello, 2005).

1.7.1 Fibra

Está constituida por los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales, entre los que destacan la celulosa, la hemicelulosa; son aprovechadas por el hombre porque cumplen una función muy importante en el bienestar del

individuo. Se reporta para la col un 3.3% contenido de fibra por cada 100 g. La función principal: tienen la capacidad de hincharse para absorber agua y, por lo tanto, de aumentar el volumen de la materia fecal; esto provoca un incremento en los movimientos peristálticos del intestino y facilita el tránsito, la distensión intestinal, su acción principal se lleva a cabo en el colon del ser humano. (Badui, 2006)

1.7.2 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios generalizados en el reino vegetal. Se clasifican en función de su estructura y se subcategorizan de acuerdo con el número y la posición del grupo hidroxilo y la presencia de otros sustituyentes. Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, poseen diferentes actividades biológicas, pero las más importantes son su actividad antioxidante, efecto inhibidor en etapas de tumores. Diversos estudios han demostrado que compuestos fenólicos tienen mayor poder antioxidante que las vitaminas y carotenoides (Podsędek Anna, 2007).

1.7.3 Vitamina C

Es una vitamina hidrosoluble también conocida con el nombre de ácido L-ascórbico, se deriva de los hidratos de carbono, tiene una estructura de cetona cíclica; contiene un enol entre los carbonos 2 y 3 que la hace un agente ácido (ver Figura 12) y altamente reductor, por lo que se oxida fácilmente.

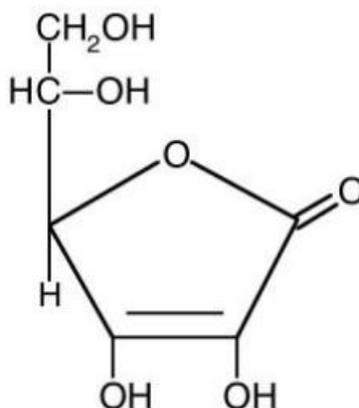


Figura 11. Estructura química de ácido L-ascórbico.



Su deficiencia en la dieta provoca el escorbuto, conocido desde las antiguas civilizaciones, se hizo notorio en los viajes largos por mar en donde la alimentación de los marineros no contemplaba frutas frescas; la enfermedad conocida como escorbuto vuelve al individuo muy susceptible a contraer diversas infecciones, inflamación articular, hemorragias subcutáneas (Badui, 2006).

1.7.4 Carotenoides

Los carotenoides son los más difundidos en la naturaleza, estos pueden oxidarse con facilidad, no es de extrañar que tengan propiedades antioxidantes. Debido a sus dobles enlaces conjugados son capaces de captar radicales y de ese modo proteger contra el daño oxidativo celular. Las funciones antioxidantes de los carotenoides desempeñan un papel en la reducción del riesgo de cáncer, cataratas, y los procesos de envejecimiento. (Fennema *et al.*, 2008)

1.8 Isotiocianatos y sus propiedades anticancerígenas

Se conoce como isotiocianato al grupo funcional $-N=C=S$, (ver figura 13) un ejemplo de estos es el isotiocianato de alilo, también conocido como aceite de mostaza, nombre procedente del hecho de que puede extraerse de un glucósido de la mostaza negra (Macy, 1992). El isotiocianato se obtiene a partir de la sinigrina, este se hidroliza por acción de la mirosinasa, liberando glucosa, ácido sulfúrico e isotiocianato de alilo.

Un estudio muestra el efecto de allyl-isotiocianato, derivado del glucosinolato sinigrina, donde células HT-29 colorrectales fueron expuestas a alil-isotiocianato durante 24 h, se determinó el número de adherentes y desprendidas. Como resultado se reconoció un bajo nivel de apoptosis, en lugar de aumentarla mitosis, es un buen predictor de riesgo de neoplasia colorrectal en modelos animales (Smith *et al.*; 2004).

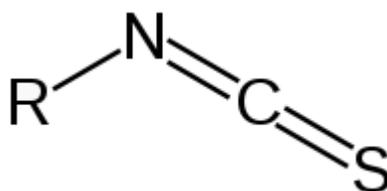


Figura 12. Estructura química del isotiocianato.

La comprensión del mecanismo de los efectos de quimioprotectores de los isotiocianatos es de gran importancia, porque bloquean la formación de una amplia variedad de tumores carcinógenos. Los mecanismos para los efectos anticancerígenos de isotiocianatos implican modulación del metabolismo carcinógeno, la depresión de la activación de carcinógenos y la aceleración de su eliminación. La evidencia de esto se basa en mediciones de: formación de ADN carcinógeno y las modificaciones de nucleótidos que se acompañan; las tasas de activación de carcinógenos (Zhang Yuesheng & Talalay Paul, 1994).

1.9 Análisis de compuestos mediante técnicas separativas

Una de las técnicas utilizadas para separar identificar y cuantificar algún compuesto es la cromatografía de gases tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra, el único dato que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente por lo tanto se acopla a espectrometría de masas: esto permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez, 2002).

1.10 Espectroscopia de absorción infrarroja en biomoléculas

La espectroscopia infrarroja se debe a la interacción entra la energía infrarroja y una muestra analizada. Las particularidades específicas de cualquier espectro infrarrojo, se determina por los movimientos vibraciones de los grupos funcionales de la estructura analizada (Ostrooumov, 2007). Debido a que cada material tiene

una combinación única de átomos, no hay dos compuestos que produzcan exactamente el mismo espectro infrarrojo. Por lo tanto, la espectroscopia infrarroja puede resultar en una identificación positiva de cualquier tipo de material (Thermo Nicolet, 2001)

La región infrarroja se subdivide en:

Infrarrojo cercano: $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$

Infrarrojo medio: $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$

Infrarrojo lejano: $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$

Se utiliza la región media del infrarrojo porque se encuentra la huella dactilar que corresponde al rango de $1600 - 600 \text{ cm}^{-1}$, (ver Figura 14) proporciona un modelo de bandas de absorción para cada molécula y se crea como contribución de todos los átomos de la molécula que están vibrando, esto crea un modelo único que no lo reproduce ninguna otra molécula (Johll, 2008).

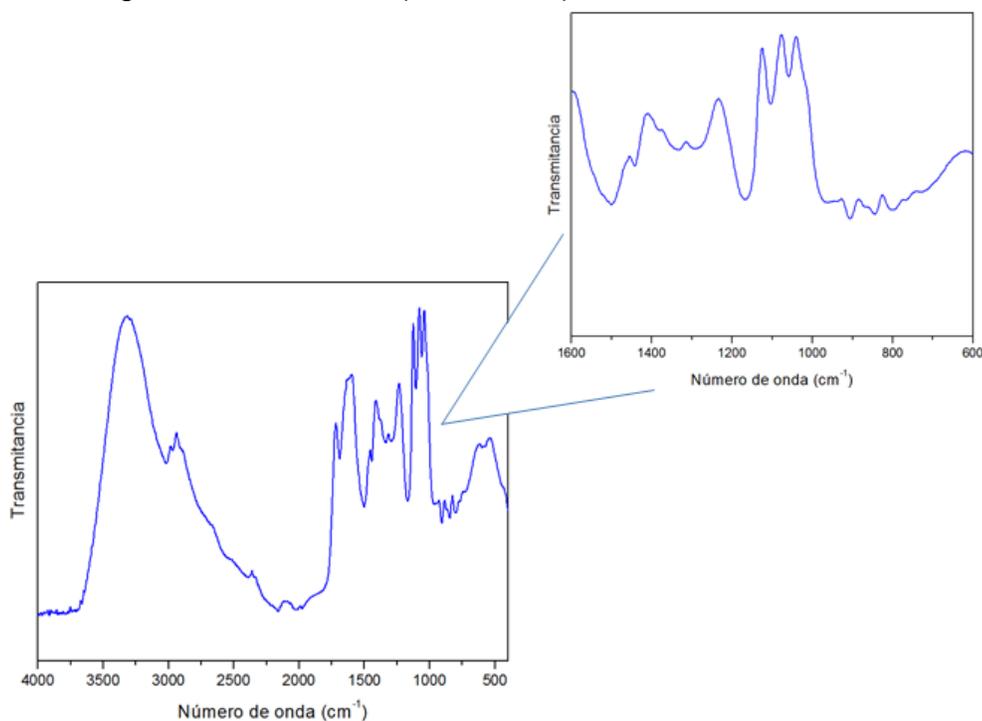


Figura 13. Huella dactilar ubicada en el rango $1600 - 600 \text{ cm}^{-1}$.

1.10.1 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopia FTIR es una técnica fácil de usar, rápida y rentable, en los últimos años se ha aplicado para identificar microorganismos, fármacos, proteínas, etc., es un método no destructivo. (Savic *et al.*, 2008) La transformada de Fourier es una operación matemática demostrada por Jean Fourier que convierte el dominio de la frecuencia a partir del tiempo (Dole *et al.*, 2011).

Un método para la medición de todas las frecuencias de infrarrojos de forma simultánea es el uso de un dispositivo óptico muy simple llamado interferómetro. El interferómetro produce un único tipo de señal que tiene todas las frecuencias infrarrojas "codificado" en ella. La señal se puede medir rápidamente, generalmente en el orden de un segundo o menos. Por lo tanto, el tiempo por muestra se reduce a una cuestión de segundos en lugar de minutos.

La mayoría de los interferómetros emplean un divisor de haz, divide el haz de luz infrarroja entrante. Un haz refleja fuera de un espejo plano que se fija en su lugar. El otro haz refleja fuera de un espejo plano que está en un mecanismo que permite moverse una corta distancia (por lo general unos pocos milímetros). Los dos haces se reflejan en sus respectivos espejos y se recombinan nuevamente (Ver Figura 15).

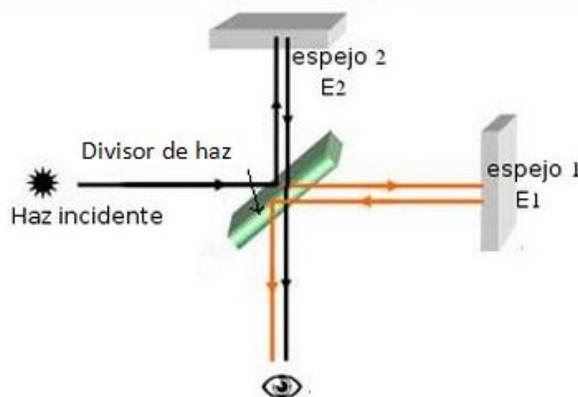


Figura 14. Esquema de un interferómetro.

La señal resultante se llama un interferograma, se necesita un medio para "decodificar" las frecuencias individuales. Esto se puede lograr a través de una técnica matemática conocida como transformación de Fourier. Esta transformación es realizada por el ordenador, (ver Figura 16) finalmente muestra la información espectral deseada para el análisis (Thermo Nicolet, 2001).

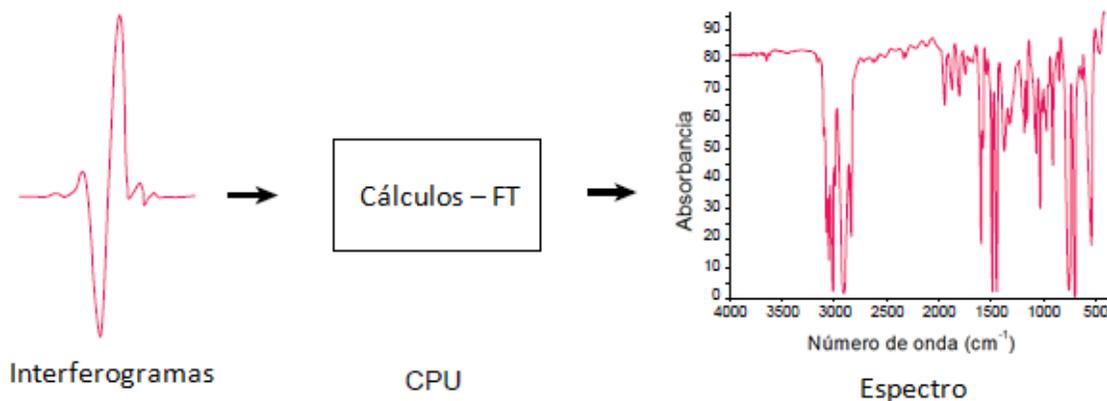


Figura 15. Aplicación de la transformada de Fourier a un interferograma.

1.11 Espectroscopia UV-Visible

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que mide la cantidad de radiación electromagnética que puede absorber o transmitir una muestra. También permite determinar la concentración de un compuesto en solución, se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda, así como el intervalo espectral de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma. La radiación ultravioleta (UV) y visible comprende sólo una pequeña parte del espectro electromagnético (Owen, 2000).

1.12 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases separa compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles, la cromatografía gas-liquido lleva a cabo la separación por medio del reparto de los componentes de una mezcla química, entre una fase gaseosa que fluye (móvil) y una fase líquida (estacionaria) sujeta a un soporte sólido. Es ampliamente usada para análisis cuantitativos y cualitativos,



al efectuar una separación cromatográfica de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de la columna. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de la mayoría de las otras técnicas cromatográficas la fase móvil no interactúa con las moléculas de los compuestos a separar, su única función es transportar los compuestos a través de la columna. (Montoya y Páez, 2012).

1.13 Cromatografía líquida de alta resolución – HPLC

La cromatografía líquida, es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es una sílica. La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes; algo importantes es que deben ser grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de que entren a la columna.

1.14 Antecedentes directos

Autor – Título del trabajo	Año	Trabajo de Investigación
Karovicova J & Kohajdova Z Fermentación ácido láctica en jugos vegetales	2003	Diferentes productos (fermentación de col) Microorganismos identificados <ul style="list-style-type: none">• <i>Leuconostoc mesenteroides</i>• <i>Lactobacillus plantarum</i>
CiskaEwa & Pathak Dorothy R Glucosinolatos derivados durante al almacenamiento de la fermentación de col.	2004	Identifican los GLS presentes antes de la fermentación y su precursor.
Peñas et al. Influencia de las condiciones de fermentación de col en compuestos hidrolizados de GLS	2012	Diferentes especies de col Cultivos iniciadores t = 7 días
Di Cagno et al. Aprovechamiento de vegetales a lo largo de la fermentación ácido láctica	2013	Uso de cultivos iniciadores <ul style="list-style-type: none">• <i>Leuconostocmesenteroides</i>• <i>Lactobacillusplantarum</i>
Ciska Ewa et al. Actividad antioxidante en extractos de col blanca y sauerkraut	2005	Contenido de fenoles totales (mg/g), usando como estándar catequina

1.15 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se desea realizar un estudio de las propiedades químicas del jugo de Sauerkraut, obtenido de la fermentación anaerobia de *Brassica oleracea*. Las propiedades nutraceuticas y anticancerígenas de este producto dependen del tipo y concentración de aquellos compuestos que se derivan durante la fermentación, los cuales a su vez dependen de las condiciones de preparación. Por lo que empleando técnicas cromatográficas y espectroscópicas, se desea determinar las



condiciones que permitan determinar y cuantificar la detección de este tipo de compuestos.

1.16 JUSTIFICACIÓN

Sauerkraut es un alimento que posee importantes propiedades nutraceuticas y anticancerígenas; estas dependen del tipo y concentración de compuestos con esta actividad, entre los que se encuentran los isotiocianatos. Conocer sobre los parámetros de preparación, pueden contribuir a la obtención de un producto de mayor calidad con beneficios muy importantes para la salud humana, en particular para la prevención y tratamiento de algunos tipos de cáncer.

1.17 OBJETIVO GENERAL

Analizar compuestos de interés nutraceutico que se generan durante la fermentación de *Brassica oleracea L. var. Capitata* (Sauerkraut)

1.17.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones experimentales adecuadas para producir una mayor cantidad de compuestos de interés nutraceutico durante la fermentación de col blanca.
- Evaluar cuantitativamente el contenido de acidez, pH, fenoles totales producidos durante la fermentación de col blanca.
- Determinar y cuantificar algunos de algunos compuestos de interés nutraceutico mediante técnicas instrumentales.

1.18 HIPÓTESIS

Existen condiciones experimentales en las que se pueden obtener mayores concentraciones de compuestos de interés nutraceutico, durante la fermentación de *Brassica oleracea* (Sauerkraut)



CAPITULO II.

2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Estándar y reactivos

El estándar de alilisotiocianato (AITC) y alil cianuro fueron de Sigma-Aldrich, Agar MRS para lactobacilos de BD, BaCl₂, H₂SO₄, NaOH, HCl, Na₂CO₃, Ácido gálico, CH₂Cl₂ adquirido por Meyer, fenolftaleína, NaCl (comercial, libre de yodo), Fenol Folin-Ciocalteau 2N de productos Hycl, Acetonitrilo grado HPLC marca Honeywell.

2.2 Materia prima

Se utilizó col blanca (*Brassica oleracea L. var. Capitata*) proveniente de la central de abastos localizada en la ciudad de Puebla, se retiró el corazón de la planta y las hojas externas, posteriormente se lavaron para retirar partículas de tierra, se eliminó el exceso de humedad, por último se troceo finamente utilizando un procesador de alimentos Oster FPSTFP1355-013.

2.3 Proceso de fermentación

Se realizó por triplicado un proceso de fermentación anaerobia del vegetal de manera natural e inducida, utilizando una sola concentración de NaCl (0.5%) durante un periodo de 44 días, ambas incubadas a 30°C. Para esta última fermentación se ocupó el microorganismo *L. casei* (aislada de aguamiel), se utilizó la escala McFarland para determinar el número de células que se inocularon por frasco. Se colocaron 350 g de muestra en cada frasco, se añadió el porcentaje de sal correspondiente, el vegetal troceado se presionó para liberar jugo de la planta, finalmente se realizó el envasado, dejando dos centímetros de espacio de cabeza.



2.4 Determinación de pH y acidez

El valor de pH se midió del líquido generado en la fermentación, con un potenciómetro. La acidez titulable fue calculada por titulación volumétrica con 0.1N de NaOH usando fenolftaleína (0.1%) como indicador, de acuerdo a la AOAC (2005).

2.5 Análisis microbiológico

Para este análisis se ocupó el método de gota en placa (Miles y Misra, 1938) con modificaciones, incubando las placas durante 48 hrs a 37°C, esto se elaboró por cuadruplicado.

2.6 Medición espectroscópica por FTIR

El equipo que se utilizó para caracterizar las muestras fue un espectrómetro FTIR marca Bruker, modelo Vertex 70, se utilizó el programa OPUS 6.5 para la adquisición de los datos y la técnica de muestreo fue por Reflectancia Total Atenuada (ATR). Ciento veinte mediciones fueron realizadas para cada espectro en el rango espectral de 450 – 4000 cm^{-1} , tomando como línea base cristal.

Para la obtención de los espectros de absorción infrarroja se utilizaron los sobrenadantes de la fermentación natural e inducida (0 – 44 días), utilizando de cada uno de ellos 2 μ , se colocó sobre el cristal, dejando secar la muestra con la finalidad de retirar el exceso de agua.

2.7 Determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

Para determinar el contenido total de fenoles se utilizaron 250 μ l de cada uno de los extractos, a los cuales se le agrego 250 μ l de agua destilada, 250 μ l del reactivo Folin-Ciocalteu al 50% y se dejó reposar durante 5 min. Después se le agrego 1250 μ l de Na_2CO_3 al 20%, se agito y después se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente, por último se realizó un barrido de la absorbancia den un

rango de 400 – 850 nm se observó el máximo de absorbancia a 760 nm (Dora *et al.*, 2008).

2.7.1 Elaboración de la curva patrón de ácido gálico

Se preparó una disolución patrón de ácido gálico de 0.1 g/L, para lo cual se pesó 50 mg de ácido gálico, se aforó a un volumen de 50 mL utilizando agua destilada, finalmente se hizo una dilución de este patrón 1:10, posteriormente se preparó carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 20%, se pesó 10g y se aforo en 50mL, utilizando agua destilada (Angelo *et al.*, 2009).

Del patrón de ácido gálico cuya concentración es de (0.1g/L), se tomaron las siguientes cantidades y se completaron a un volumen de 2000µl con agua destilada (ver Tabla5).

Tabla 5. Valores de concentración de ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

Ácido gálico – solución patrón (µl)	Agua destilada (µl)	Concentración (mg/L)
0	2000	0
20	1980	1
40	1960	2
60	1940	3
80	1920	4
100	1900	5
120	1880	6
140	1860	7
160	1840	8
180	1820	9
200	1800	10



Se agregaron 500 μl de cada concentración de ácido gálico en viales color ambar, después se adiciono a cada tubo 250 μl del reactivo de Folin-Ciocalteau se dejó reposar durante 5 min, finalmente se agregó 1250 μl de Na_2CO_3 al 20%, se agito y después se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente, por último se realizó un barrido de la absorbancia de 400nm – 850nm se obtuvo un máximo de absorción a 760 nm (Dora *et al.*, 2008).

2.8 Medición espectroscópica por UV-Visible

El equipo que se utilizó para caracterizar las muestras (fenoles) fue un espectrofotometro UV-Visible marca Termo Scientific, modelo Evolution 600 UV-vis. Se empleó la modalidad de muestreo por absorbancia, en el rango de 400nm a 850nm con una celda de cuarzo y un paso de luz óptico de 1cm.

2.9 Extracción de las muestras de fermentación natural e inducida

Se tomó 1mL de cada fermentado natural e inducido (0 – 44 días), se realizaron dos extracciones usando CH_2Cl_2 , ambos sobrenadantes se unieron y se eliminó el exceso de humedad con Na_2SO_4 , finalmente se centrifugo durante 3 min a 5000 rpm.

2.9.1 Medición por cromatografía de gases - GC

Se inyectaron los estándares (Allyl isothiocyanate y Allyl cyanide) y las muestras extraídas con CH_2Cl_2 de ambas fermentaciones (natural e inducida), en un cromatografo de gases Hewlett Packard HP 6890 GS System, Version A.01.11 equipado con un detector de ionización de flama, se ocupó una columna SBP-50 (30m x 0.25mm x 0.25 μm), un flujo de 0,7 mL/min, inyector a 250°C y detector a 250°C usando como gas acarreador N_2 .

2.10 Degradación del estándar Allyl isotiocianato (AITC)

Se pesó 0.5g del estándar AITC, se le agregó 50 mL de agua destilada (se ajustó su pH a 3.25 usando HCL al 0.1N), se dejó a reflujo (100°C) durante 1h (Chen & Ho, 1998), después se realizaron 3 lavados con CH₂Cl₂ (20 mL), se eliminó el exceso de humedad con Na₂SO₄. Finalmente se colocó en el rotavapor a 46°C sin vacío. La fase acuosa se también se colocó en el rotavapor a 70°C usando vacío.

2.11 Medición por cromatografía líquida de alta resolución – HPLC

Se realizó la medición en un HPLC Hewlett Packard Series 1100, equipado con un detector de diodos (DAD) usando una longitud de onda de 229 y 254nm, se ocupó una columna Zorbax Eclipse XDB-C148 (4.6 x 150mm y 3.5 micrones), un flujo de 1mL/min, volumen de inyección 10µl a una T de 29.37°C, usando como fase móvil Acetonitrilo:Agua (ver Tabla 6).

Tabla 6. Relación de la fase móvil Acetonitrilo:Agua

Tiempo (min)	Acetonitrilo [%]	Agua [%]
0	30	70
6	50	50
9	0	100
15	20	80
20	30	70

Se pesó la cantidad de 0.5mg del degradado del estándar, de la fase acusa y el estándar, se colocaron en los viales y se les agrego 1mL de Acetonitrilo grado HPLC, de las fermentaciones natural e inducida (0 – 44 días), se tomó 500µl de muestra y se le agrego 500µl de Acetonitrilo grado HPLC, se colocaron 500µl de muestra de ambas fermentaciones pero sin diluir. Se realizó una extracción con CH₂Cl₂ a las muestras del día 0 y día 4 de ambas fermentaciones, se dejó evaporar y se le agrego 500µl de Acetonitrilo grado HPLC, se realizarón las mediciones por triplicado.

2.12 Elaboración de una curva patrón del estándar AITC, usando FTIR como equipo de medición

Se partió del estándar AITC, se tomaron las siguientes cantidades y se completaron a un volumen de 500 μ l con CH₂Cl₂ (ver Tabla7).

Tabla 7. Valores de concentración de AITC para su cuantificación

AITC – Estándar (μl)	CH₂Cl₂ (μl)	Concentración (mg/L)
0	500	0
0.5	499.5	0.1
2.5	497.5	0.5
5	495	1
25	475	5
50	450	10
100	400	20
150	350	30
250	250	50
500	0	100

Se acondiciono una pequeña celda para llevar a cabo la medición y evitar la evaporación del disolvente (CH₂Cl₂), se colocó 100 μ l de muestra, ciento veinte mediciones fueron realizadas para cada espectro en el rango de 450 – 4000 cm⁻¹, tomando como línea base cristal, cada medición se realizó por triplicado.

2.13 Análisis estadístico

Para los datos se empleó una análisis de varianza (ANOVA de dos factores) con una diferencia significativa menor al 0.05%, utilizando la herramienta de datos de Excel.



2.14 Diseño experimental

Los experimentos se realizaron mediante el siguiente diseño experimental, con 2 factores: A (tiempo de fermentación) y B (concentración de NaCl) para diferentes variables de respuesta:

		Factor A			
		Porcentaje NaCl			
		0.5 %	0.5 %	0.5 %	
Factor B	Tiempo de fermentación	0	R1_1	R1_2	R1_3
	4	R2_1	R2_2	R2_3	
	8	R3_1	R3_2	R3_3	
	12	R4_1	R4_2	R4_3	
	16	R5_1	R5_2	R5_3	
	20	R6_1	R6_2	R6_3	
	24	R7_1	R7_2	R7_3	
	28	R8_1	R8_2	R8_3	
	32	R9_1	R9_2	R9_3	
	36	R10_1	R10_2	R10_3	
	40	R11_1	R11_2	R11_3	
	44	R12_1	R12_2	R12_3	

R = Variable de respuesta
Medibles
R: pH
R: Porcentaje de ácido láctico
R: Concentración de glucosa
R: Conteo de bacterias
R: Concentración de fenoles totales
R: Concentración (AITC) $\mu\text{mol}/100\text{ g SK}$

CAPITULO III.

3 RESULTADOS

3.1 Obtención del fermentado (Sauerkraut)

Se realizaron dos fermentaciones, bajos los siguientes parámetros (ver Figura 16).

Fermentación 1	Fermentación 2
Porcentaje de NaCl 0.5 %	Porcentaje de NaCl 0.5 %
Tiempo de fermentación: 44 días (6 semanas)	Tiempo de fermentación: 44 días (6 semanas)
Temperatura (30°C)	Temperatura (30°C)
Fermentación natural	Fermentación inducida (<i>L. casei</i>)



Figura 16. a) ensayo completo fermentación natural, b) ensayo completo de fermentación inducida c) almacenados a 30°C

En estos ensayos, como medida preventiva se utilizaron cajas que permitieron mantener los frascos mejor sellados para evitar problemas de contaminación y cambios indeseables de coloración. En las imágenes se puede percibir los cambios que sufre la col con el paso de los días, el jugo que se libera aumenta su volumen y cambia su color conforme avanza la fermentación.

3.2 Temperatura

Los fermentados se almacenaron a una temperatura de 30°C, en la Figura 17 se observan los cambios de temperatura a lo largo de los 44 días de fermentación. Durante la fermentación natural, el valor de temperatura vario en comparación a la fermentación inducida, donde la temperatura mostro un valor constante a los 30°C, esto podría ser un factor que influyo en los demas parametros.

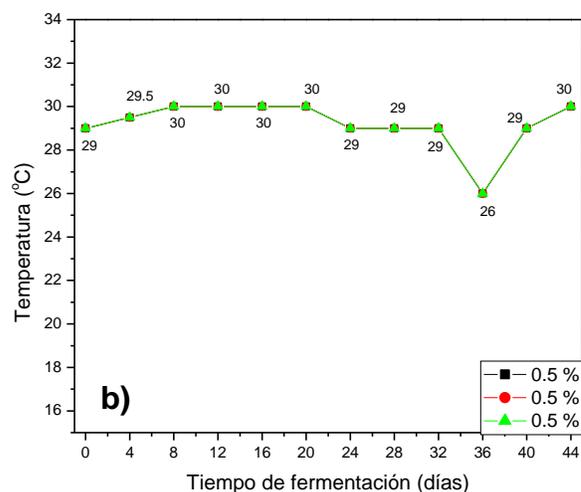
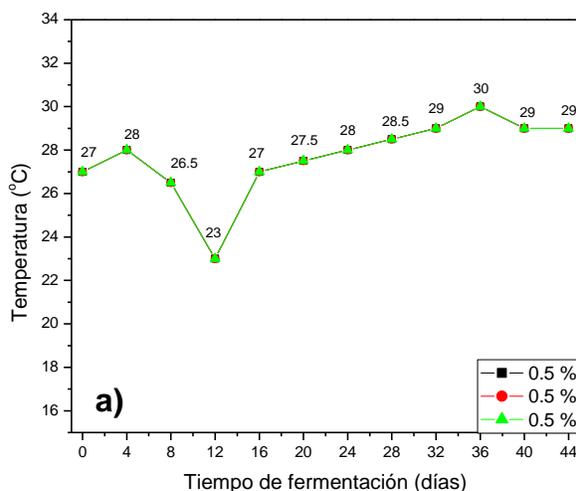


Figura 17. Temperatura registrada durante la fermentación de col blanca (Sauerkraut) (a) fermentación natural, (b) fermentación inducida

3.3 pH

El pH inicial que se obtuvo en ambas fermentaciones (natural – inducida) son cercanas a pH neutro (Tolonen *et al.*, 2002), el valor final para la primera fermentación fue de 3.7 al día 44, para la fermentación inducida el valor de pH es de 3.1 al día 44, como se ve en la Figura 18 y 19.

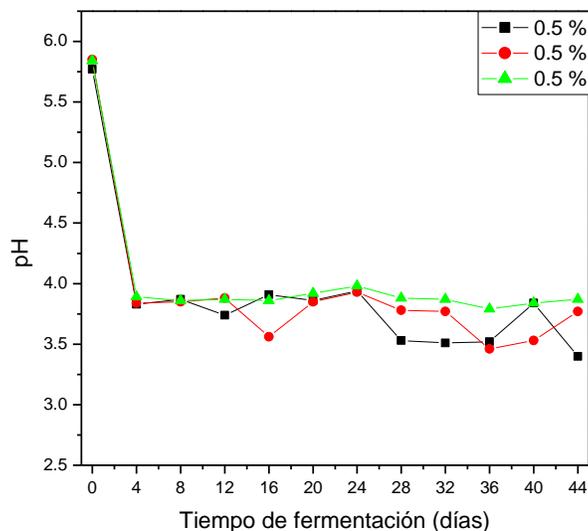


Figura 18. Dependencia del pH con el tiempo de fermentación de Sauerkraut (0-44 días) (Fermentación natural)

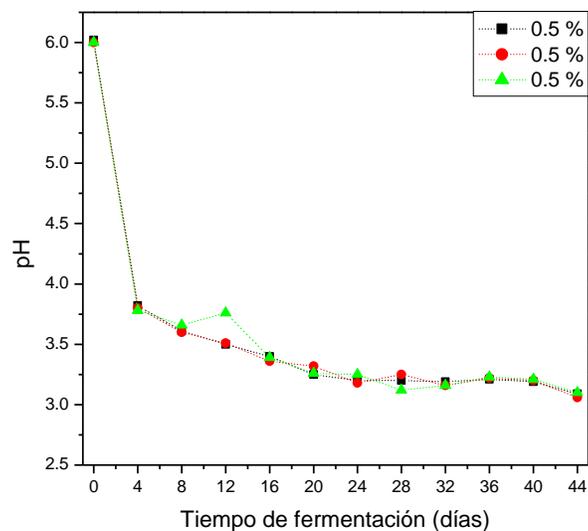


Figura 19. Dependencia del pH con el tiempo de fermentación de Sauerkraut (0-44 días) (Fermentación inducida)

Al comparar ambas fermentaciones podemos ver una diferencia, haber inoculado con *L. casei* mostro en definitiva mejor estabilidad.

3.4 Acidez titulable, porcentaje de ácido láctico

Se realizó la acidez titulable total, representada en porcentaje de ácido láctico. Para la fermentación natural se obtuvo un valor inicial de 0.3% y un valor final de 1.9%, en comparación con la fermentación inducida el valor inicial fue de 0.13%, para el día 44 se estimó 1.8% de ác. láctico, esto indica que el porcentaje de ácido láctico se encuentra dentro del intervalo de 1.8 – 2% (Roberts T. A, 1998), al seguir el proceso de fermentación el valor de la acidez disminuyo, la fermentación inducida muestra menos variaciones, pero el comportamiento se mantiene, como se observa en la Figura 20.

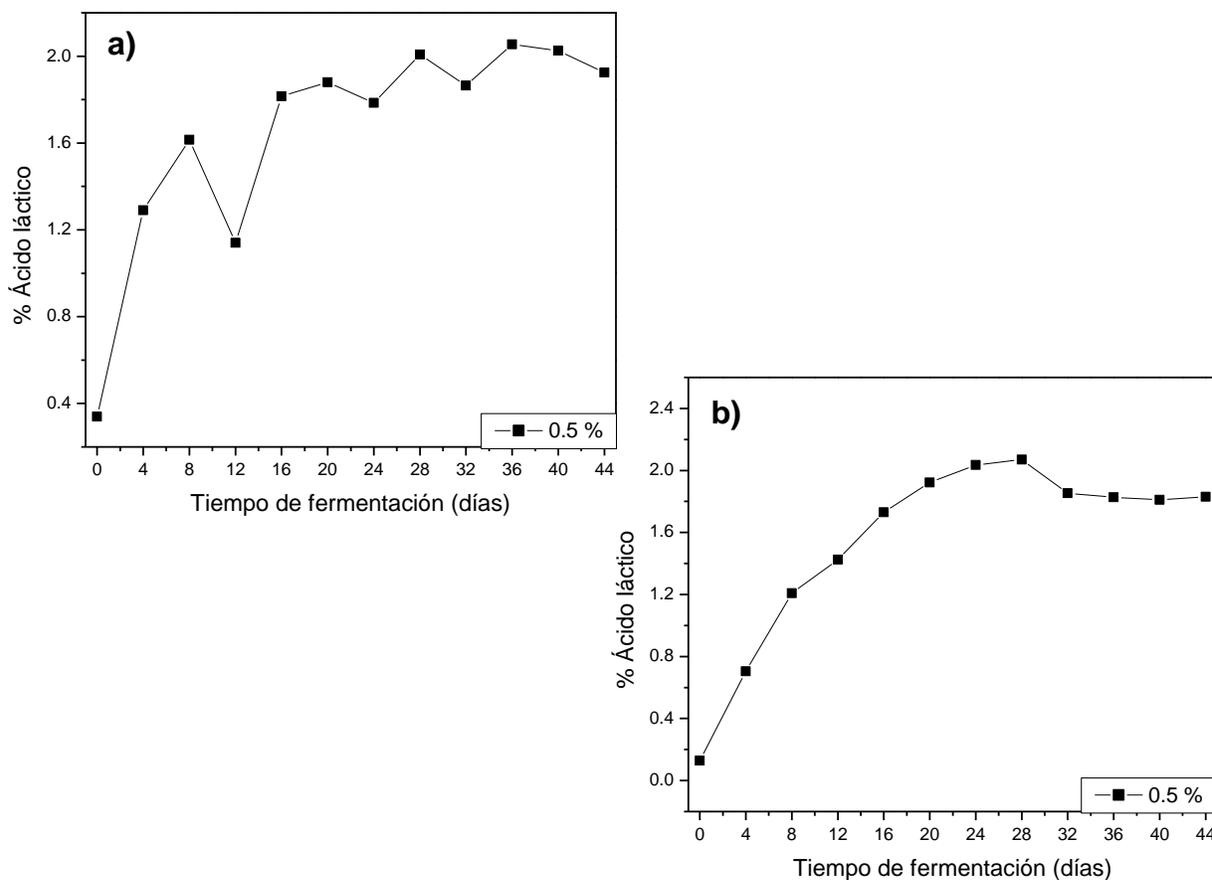


Figura 20. Dependencia del porcentaje de ácido láctico con el tiempo de fermentación (a) fermentación natural, (b) fermentación inducida

3.5 Análisis microbiológico

Se llevó a cabo un conteo celular a los procesos de fermentación en medio MRS por el método de conteo por gota (Miles & Misra, 1938), se realizó el conteo celular el mismo día que se tomaba muestra de pH y acidez. Para ambas fermentaciones: natural e inducida hubo crecimiento de bacterias.

Se confirmó la presencia de *Lactobacillus* en ambos procesos de fermentación de dos formas, la primera por morfología colonial, donde se distinguen colonias con márgenes redondeados de color crema. Esto se confirmó realizando una tinción de Gram, se observó bacterias Gram positivas, con forma de bacilos largos que forman cadenas como se muestra en la Figura 21.

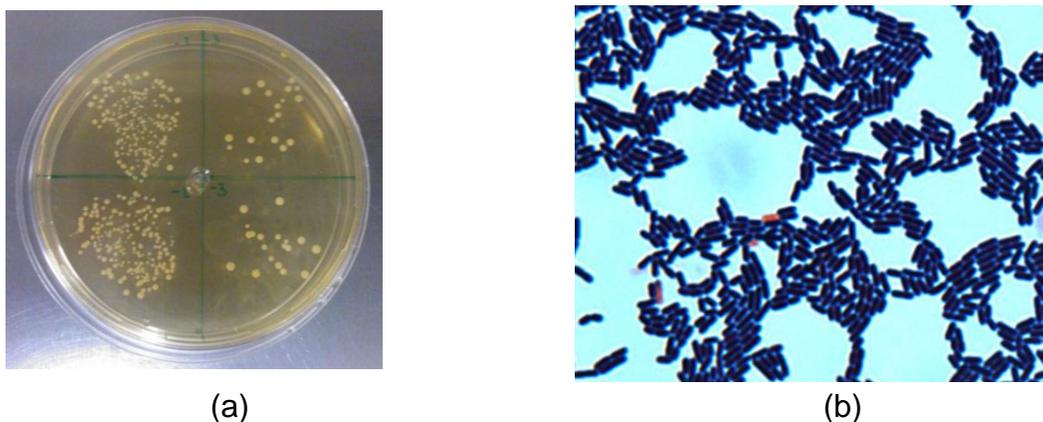


Figura 21. Morfología de *Lactobacillus* (a) medio MRS, (b) Objetivo 40X

En la Figura 22 podemos ver los resultados obtenidos durante el periodo de fermentación de 44 días, en esta fermentación natural el día 0 se obtuvo 3 UFC/mL (Log), para el día 24, 6 UFC/mL (Log) y finalmente el día 44 un valor de 0 UFC/mL, se aprecia correctamente un crecimiento y disminución de bacterias, durante el desarrollo microbiano que se genera a lo largo de la fermentación, tenemos una variada microbiota, donde actúan enterobacterias, levaduras, bacterias mesofilicas y bacterias lácticas (Paramithiotis *et al.*, 2010), la actividad de los microorganismos sigue tendencias muy diversas que se apartan de la típica

curva de crecimiento microbiano, no todos los organismos presentes entran en actividad simultáneamente esto depende de factores intrínsecos y extrínsecos. Para entender el comportamiento de las bacterias en la fermentación natural, se compara con bacterias lácticas presentes en leche, esta reportado que al principio los coliformes entran en actividad con una acidificación creciente del producto, esto conduce a que los lactobacilos lleven una acidificación a un mayor nivel (Fernández Escartín Eduardo, 2008)

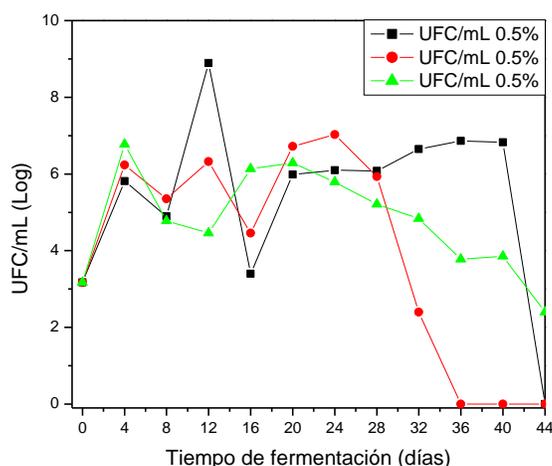


Figura 22. Crecimiento de *Lactobacillus* al 0.5% de NaCl (0-44 días)
(Fermentación natural)

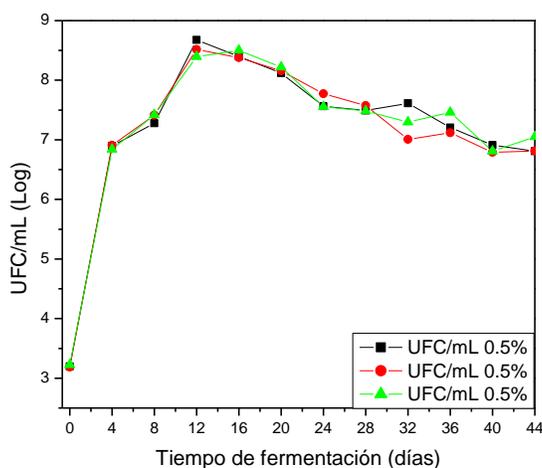


Figura 23. Crecimiento de *Lactobacillus* al 0.5% de NaCl, (0-44 días)
(Fermentación inducida)

Para llevar a cabo la fermentación inducida se utilizó *Lactobacillus casei*, se inoculo la cantidad de 10^5 UFC/mL, en la Figura 23 podemos ver un crecimiento reportado de 0 – 44 días, en comparación con la fermentación natural se percibe un crecimiento constante, Paramithiotis *et al.*, 2010 reporta que el desarrollo se observa de manera adecuada cuando se colocan microorganismos iniciadores, esto se observó en los datos obtenidos.

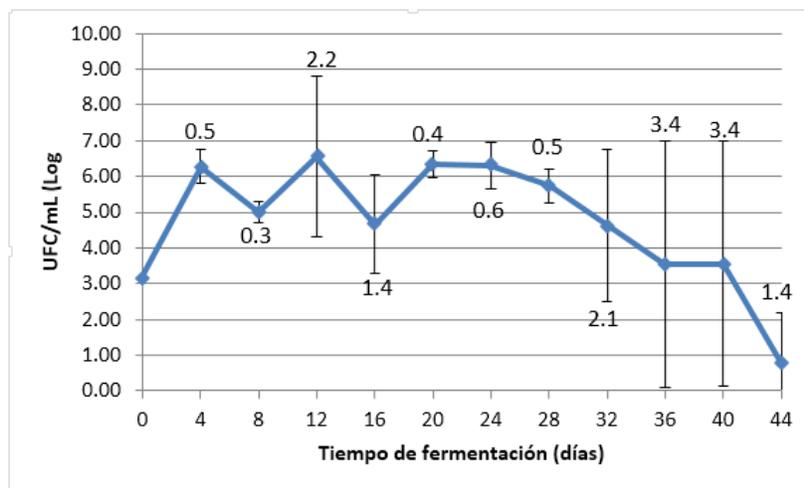


Figura 24. Desviación estándar durante el crecimiento de *Lactobacillus* al 0.5 % de NaCl (0-44 días) (Fermentación natural)

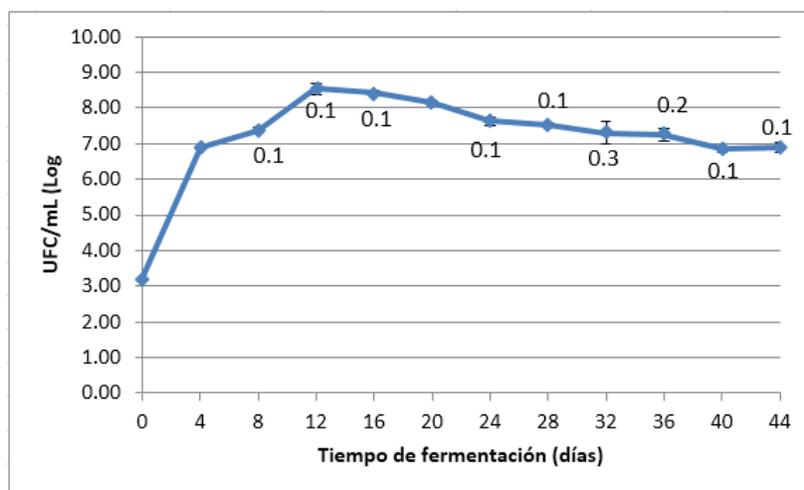


Figura 25. Desviación estándar durante el crecimiento de *Lactobacillus* al 0.5 % de NaCl (0-44 días) (Fermentación inducida)

En la Figura 24 y 25 se muestra el valor de la desviación estándar, comparando ambas fermentaciones, se observa que el proceso inducido presenta un error menor.

3.6 Glucosa

A cada muestra (0 – 44 días) se le realizó la medición de concentración de glucosa reportada en g/L, la base de datos Danish Food Composition, reporta que la concentración de glucosa para la col blanca es de 1.6 g/100g los resultados obtenidos para cada diferente concentración de NaCl varían con respecto al tiempo de fermentación (ver Figura 26).

Tabla 8. Concentración de glucosa (g/L) durante la fermentación natural de col.

Días	[Concentración g/L]	Desviación
0	20.75	1.1
4	19.10	0.7
8	13.34	7.9
12	16.00	1.1
16	15.60	2.4
20	20.65	0.6
24	15.75	5.9
28	16.90	2.8
32	12.55	2.6
36	15.10	1.7
40	7.51	0.5
44	5.59	6.7

Se observa claramente un incremento y un descenso de manera constante a lo largo de la fermentación durante estos 44 días, como se muestra en la Tabla 8. Wennberg y col en 2003 realizaron un estudio, donde se demuestra que la cantidad de carbohidratos presentes en *Brassica oleracea var. capitata*, disminuye si se acidifica en presencia de ácido acético. Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos, una posible respuesta a estas variaciones de concentración

de glucosa puede ser porque los glucosinolatos presentes entran en contacto con las β -glucosidasas (mirosinasas) llevando a cabo una hidrolisis, donde la glucosa se libera del glucosinolato, generando una aglicona inestable que da origen a isotiocianatos, tiocianatos, indoles, nitrilos, epitionitrilos, etc. (Núñez, 2012)

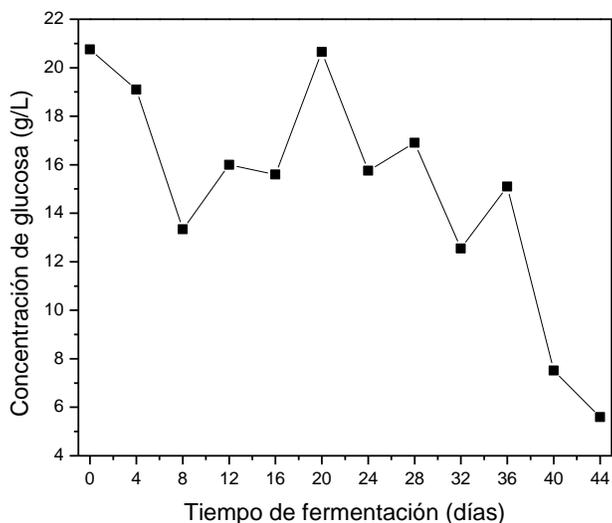


Figura 26. Concentración de glucosa (g/L) producida en la fermentación natural de Sauerkraut (0-44 días)

3.7 Contenido de Fenoles totales

En la Figura 27 se muestra la curva patrón de ácido gálico a distintas concentraciones desde 0 mg/L hasta 10 mg/L con la finalidad de obtener un marco de referencia, construido mediante cantidades conocidas, se utilizó para determinar la cantidad de fenoles totales en los fermentados de col blanca (natural e inducida), se muestra un espectro con las absorbancias obtenidas a 760nm (ver Figura 28).

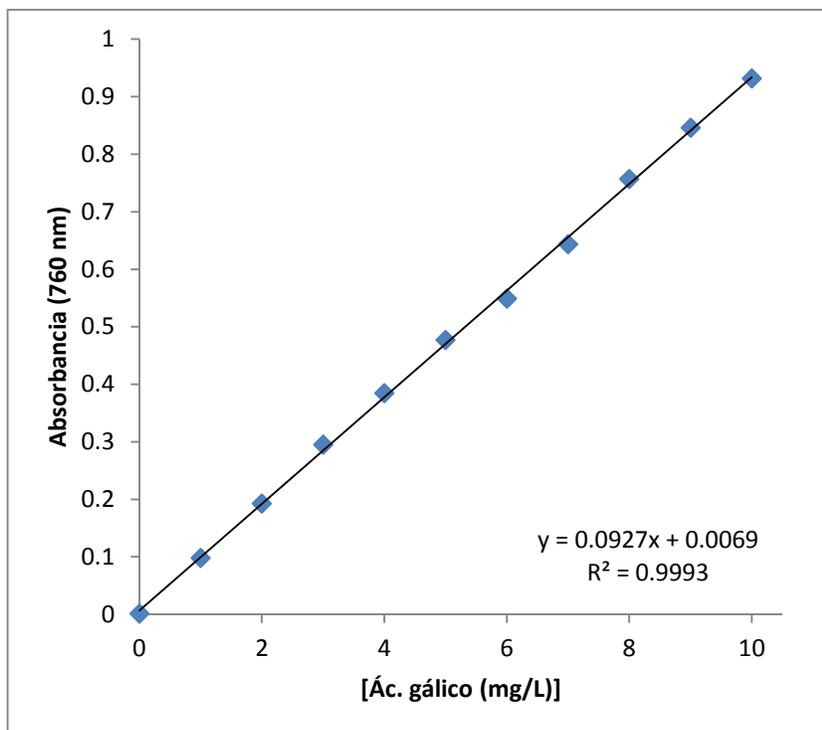


Figura 27. Curva de calibración del estándar de ácido gálico

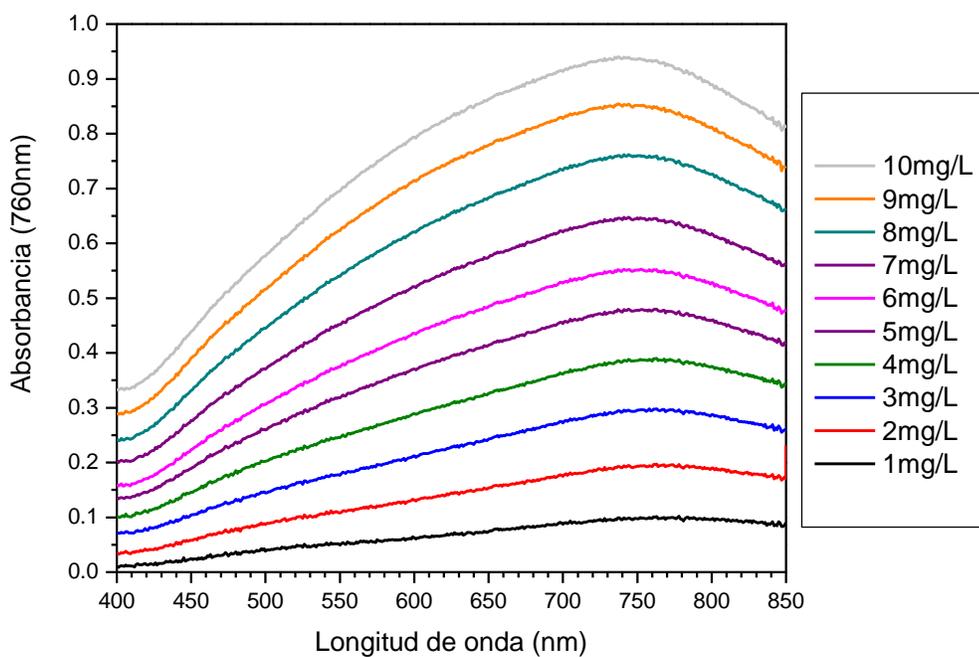


Figura 28. Espectros de absorción UV-visible de ácido gálico

El contenido de fenoles totales se cuantifico por el método de Folin-Ciocalteu, obteniéndose valores expresados como equivalentes de ácido gálico, expresados en miligramos de ácido gálico por cada 0.5 mL para las muestras de ambos procesos de fermentación (0 – 44 días). La concentración de fenoles totales en los extractos fue medida por espectrofotometría UV, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción, el agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual origina los óxidos azules de wolframio y molibdeno, obteniéndose una reacción colorimétrica, leída en el espectrofotómetro a 760nm (ver Figura 29).

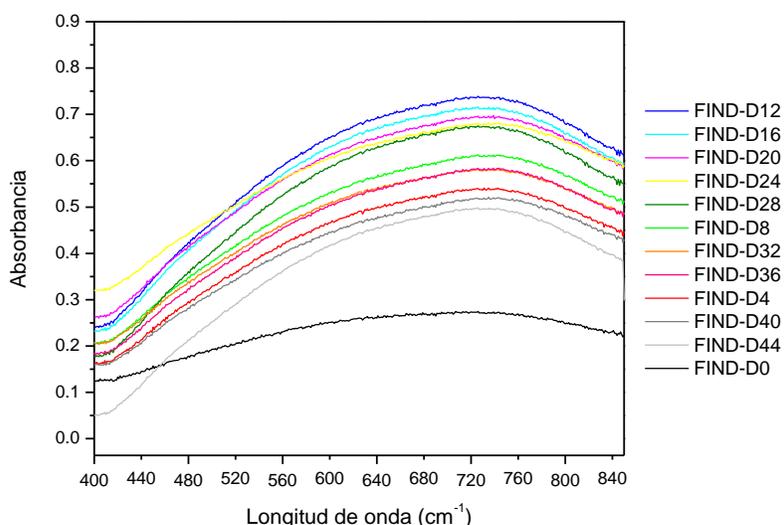


Figura 29. Absorción UV-Visible - Fermentación inducida (0 – 44 días)

Una vez obtenidos los valores de absorción a 760 nm, se utilizó la curva de calibración correspondiente al ácido gálico para cuantificar los fenoles totales, los valores se interpolaron en la ecuación obtenida en la curva de calibración, y posteriormente se obtuvo la cuantificación de fenoles de cada uno de los extractos expresados en mg/L (Tabla 9).

Tabla 9. Valores de absorción y cuantificación de fenoles totales para el periodo de 0 – 44 días, expresadas en mg/L.

	Muestra	Concentración de fenoles totales (mg/L)	Desviación estándar
Fermentación natural	Día 0	4.845	0.21
	Día 4	12.616	0.87
	Día 8	11.763	0.54
	Día 12	13.446	1.47
	Día 16	11.655	2.02
	Día 20	13.539	0.61
	Día 24	13.091	0.12
	Día 28	12.803	1.71
	Día 32	13.312	0.29
	Día 36	13.211	0.79
	Día 40	13.223	1.11
	Día 44	13.415	1.15
Fermentación inducida	Día 0	5.660	0.11
	Día 4	11.366	0.00
	Día 8	12.926	0.01
	Día 12	15.539	0.05
	Día 16	15.033	0.05
	Día 20	14.680	0.04
	Día 24	14.412	0.06
	Día 28	14.170	0.03
	Día 32	12.266	0.01
	Día 36	12.290	0.03
	Día 40	10.938	0.06
	Día 44	10.370	0.04

La concentración de fenoles totales para la fermentación natural presentó una mayor concentración el día 20 con un valor de 13.539 mg/L, seguido del día 44 y

12, un comportamiento parecido se presentó en la fermentación inducida, se tuvo un máximo el día 12 se estimó la cantidad de 15.539 mg/L, seguido del día 16 y 20, estos valores corresponden por cada 100 g de Sauerkraut, en la Figura 30 y 31 se logró observar bien el aumento y disminución en la concentración de fenoles totales, estos presentan una relación con las cantidad de microorganismos presentes.

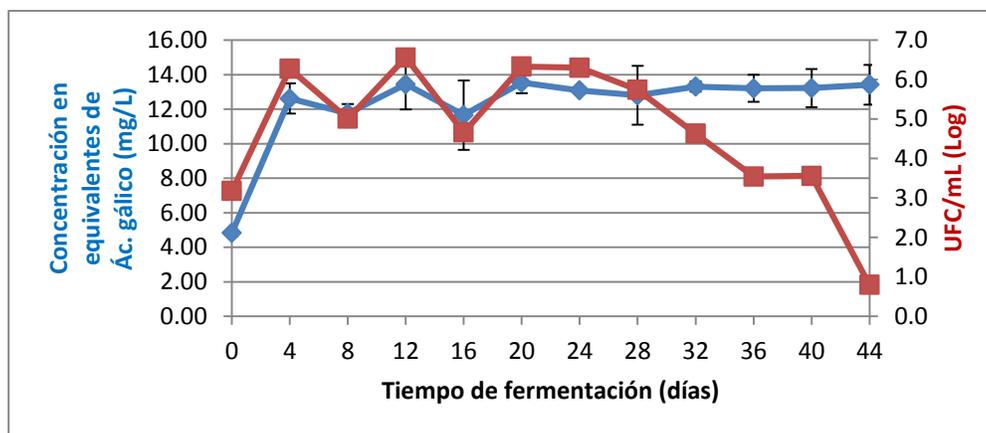


Figura 30. Concentración en equivalentes de ácido Gálico (mg/L) en relación con UFC/mL (Log) (Fermentación natural)

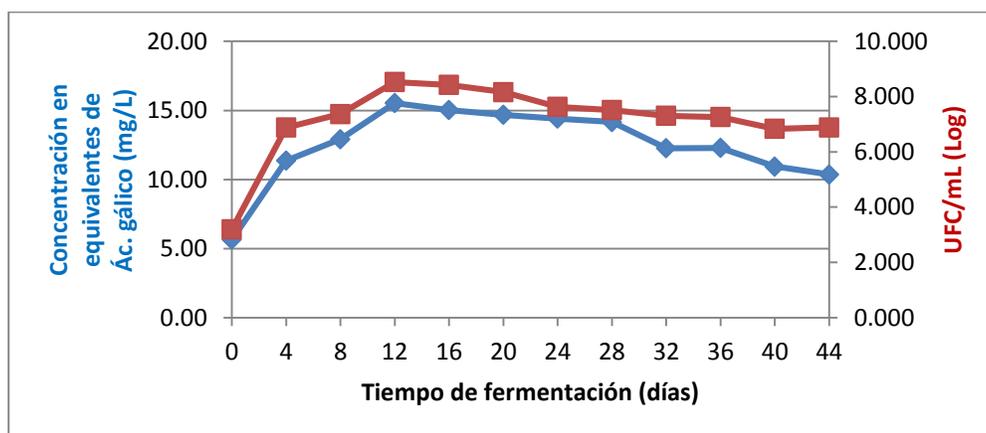


Figura 31. Concentración en equivalentes de ácido Gálico (mg/L) en relación con UFC/mL (Log) (Fermentación inducida)

La cantidad de fenoles totales varía en los diferentes días de fermentación. En ambas fermentaciones, podemos encontrar el canferol, ácido sinápico, ácido cafeico, que se encuentran principalmente en las hojas de la col (Podsędek Anna,

2007), la posible relación que presenta la cantidad de fenoles totales con las UFC/mL (Log), durante la fermentación puede ser por la hidrólisis que se lleva a cabo a lo largo de este proceso, donde se lleva a cabo la liberación de metabolitos secundarios, entre ellos ácidos orgánicos, los derivados de algunos precursores de glucosinolatos, cabe destacar que durante esta fermentación se tiene la producción de etanol (Fleming *et al.*, 1987).

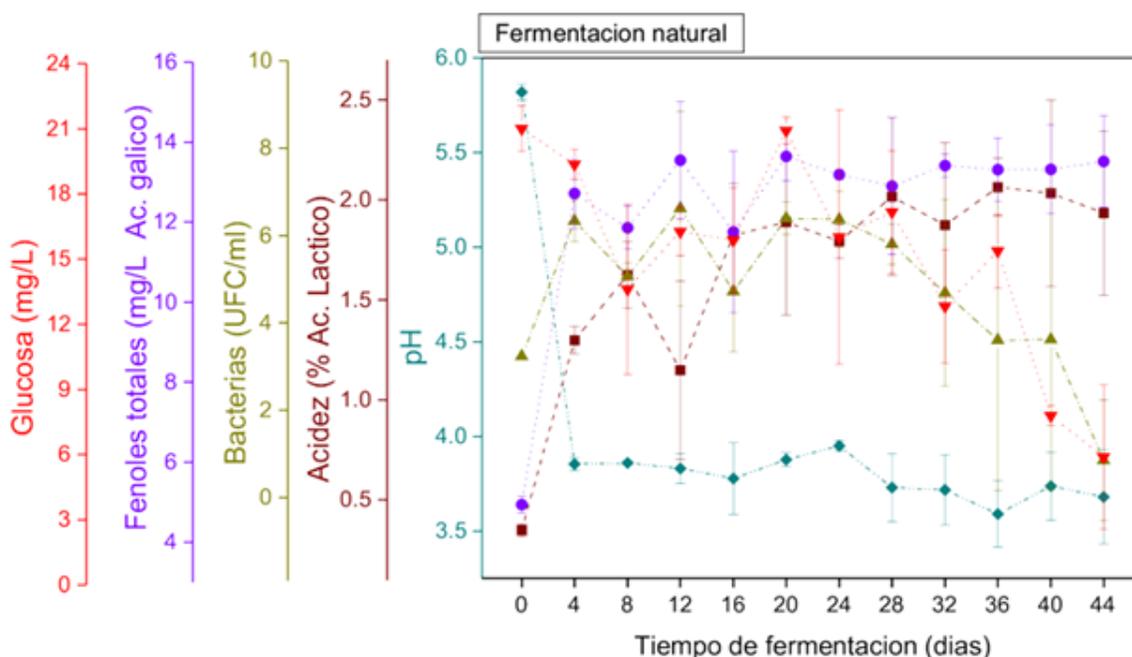


Figura 32. Glucosa, fenoles totales, bacterias, acidez y pH de la fermentación natural de col blanca durante 44 días.

En la Figura 32 se observa la relación que existe entre las mediciones de pH, el % de ácido láctico, el número de bacterias UFC/mL (Log), la concentración de fenoles en mg/L de ác. gálico y glucosa (g/L), en la Figura 33 vemos las mismas mediciones excepto la glucosa.

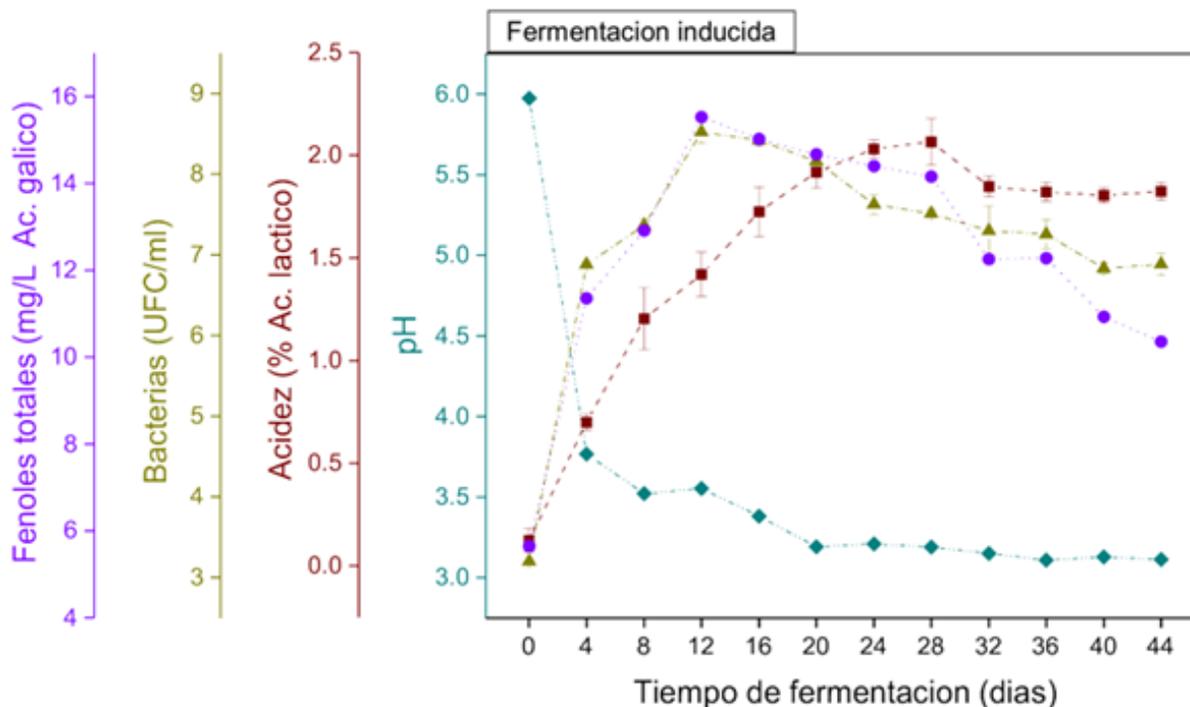


Figura 33. Fenoles totales, bacterias, acidez y pH de la fermentación inducida de col blanca durante 44 días.

3.8 Cromatografía de gases - GC

Se inyectaron los dos estándares, para el AITC se obtuvieron tres señales con los siguientes tiempos de retención (2.9min - 6.5min - 6.9 min) y para el Allyl cyanide también tres intensidades a un tiempo de (2.9min - 3.97min - 4.11 min), se inyectaron ambos estándares con la finalidad de verificar que no interfirieran entre ellos, presentan la misma señal a 2.9 min, como se observa en la Figura 33.

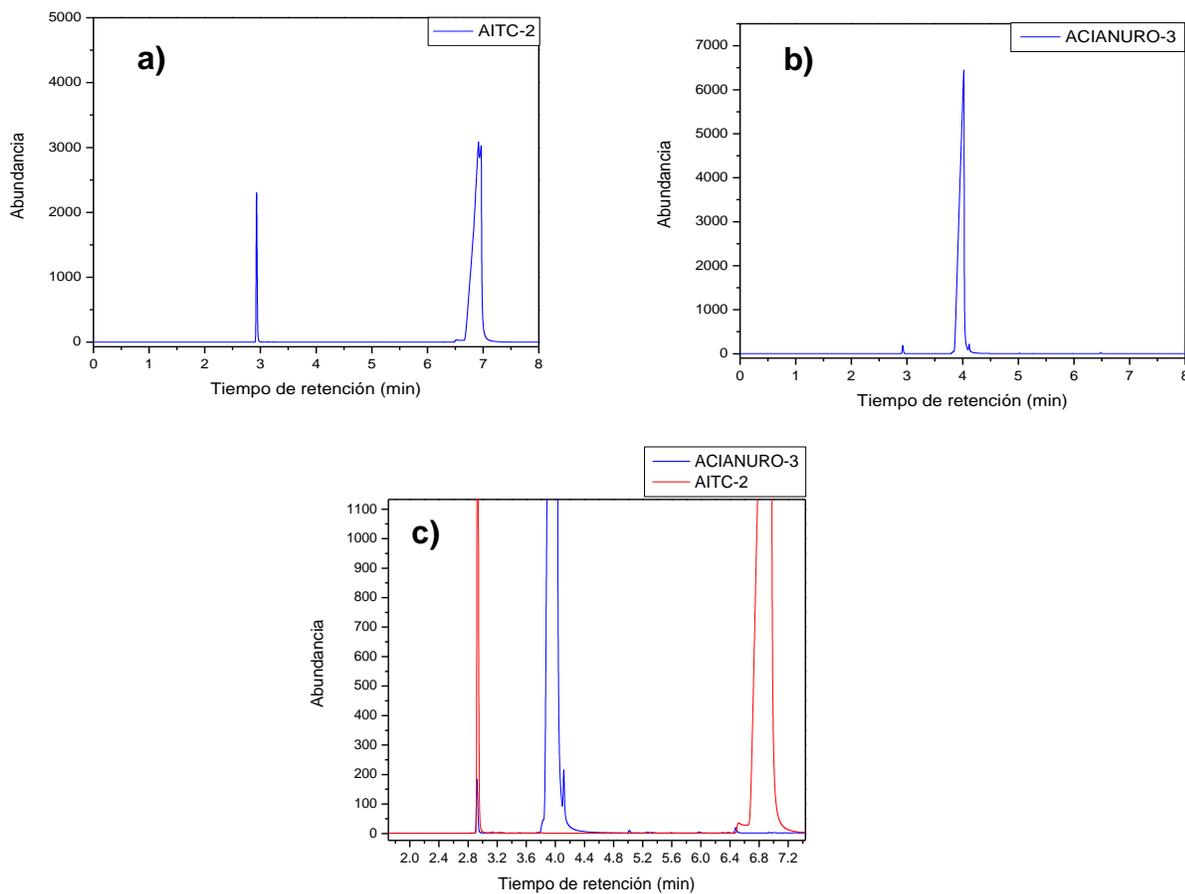


Figura 34. Cromatogramas del estándar de a) AITC, b) Allyl cyanide, c) ambos estándares

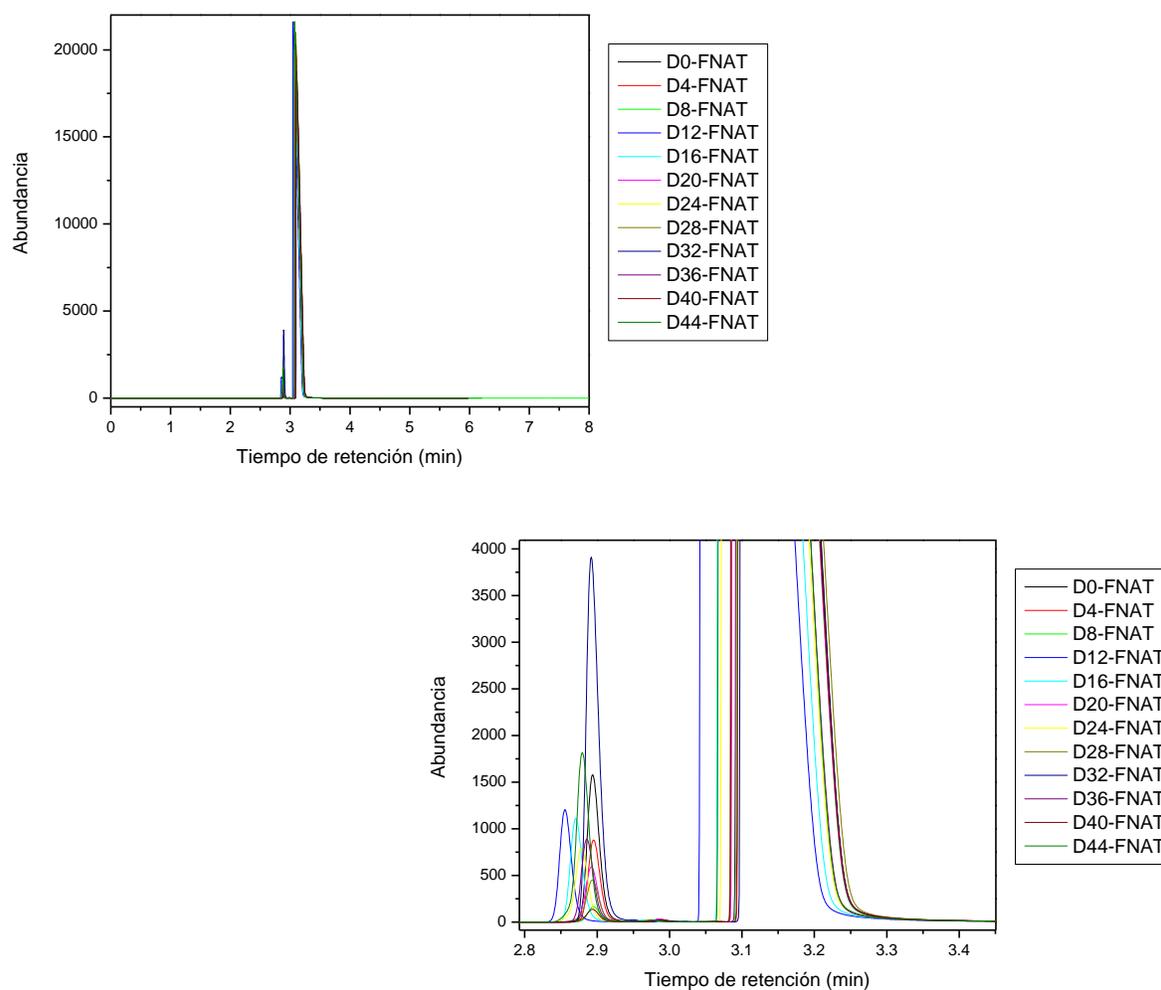


Figura 35. Cromatogramas de muestras de fermentación natural de col blanca.

Al inyectar las extracciones que se realizaron a las muestras de la fermentación natural y la inducida, la señal que se logró percibir fue a un tiempo de retención de 2.9 min, esto se observó para ambos procesos de fermentación, mostrando diferentes intensidades (ver Figura 33 y 34), para la fermentación natural se tuvo un mayor intensidad al día 44 seguido del día 32 y 12, para la fermentación inducida el día 0 mostro una mayor intensidad, seguido del día 8 y 16, al ver que no coincidieron las señales de mayor intensidad, por bibliografía se sabe que el AITC es inestable en sistemas acuosos, y esta reportado que se descompone un 75% cuando es incubado en agua a 37°C por un periodo de 10 días o bien

llevándolo a reflujo a 100°C durante 1h (Li *et al.*, 2015) (Kawakishi & Namiki, 1969).

Se obtienen las siguientes sustancias:

- Diallythiourea
- Allyl allyldithiocarbamate
- Diallyl tetrasulfide
- Diallyl pentasulfide

Por este motivo se decidió llevar a cabo la degradación del estándar y analizarlo por HPLC, con la finalidad de proponer una explicación a los resultados obtenidos en GC. Estos resultados que se analizaron por cromatografía de gases se midieron por Infrarrojo los resultados se muestran en el apartado de espectroscopia FTIR.

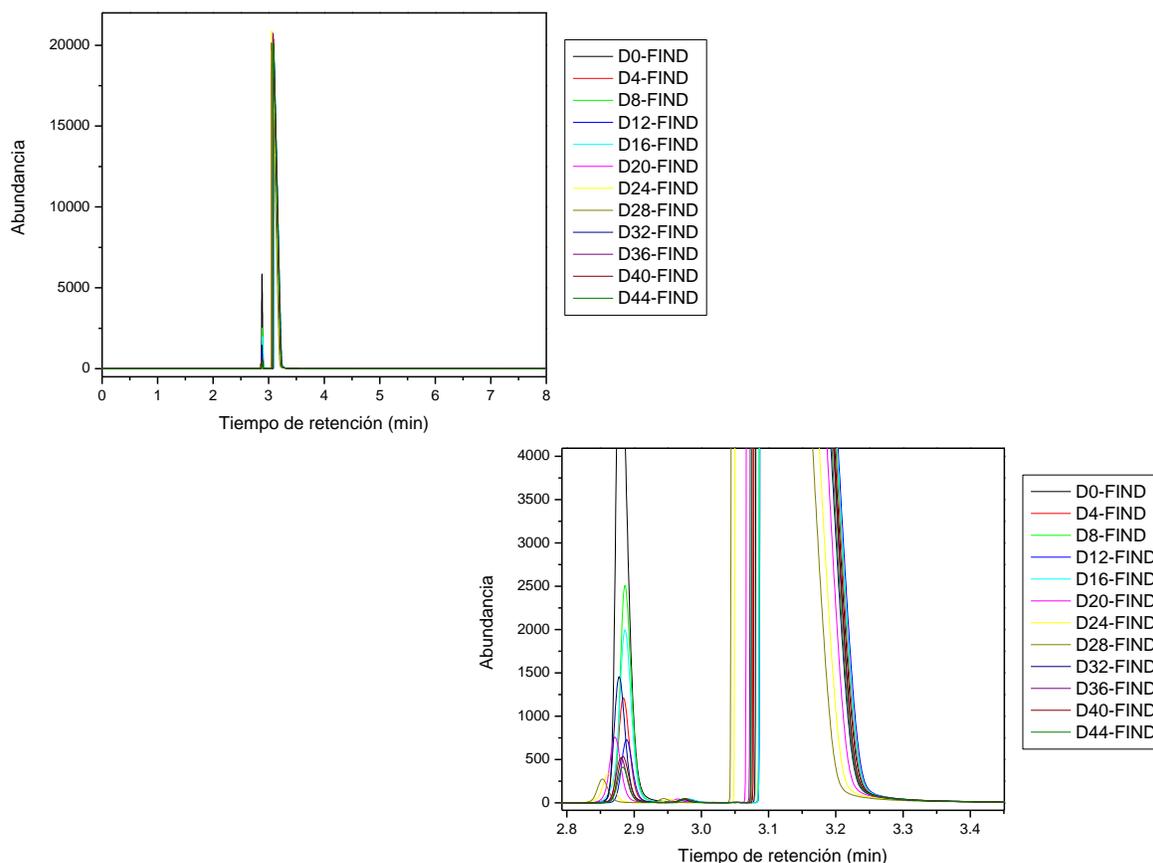


Figura 36. Cromatogramas de muestras de fermentación Inducida de col blanca.

3.9 Cromatografía líquida de alta resolución – HPLC

Se obtuvieron los siguientes cromatogramas a una longitud de onda de 229nm y 254nm, para el estándar AITC (ver Figura 37), se obtuvieron tres tiempos de retención a 5.28, 7.88 y 17.95 min este último presentando un área mayor a 92%.

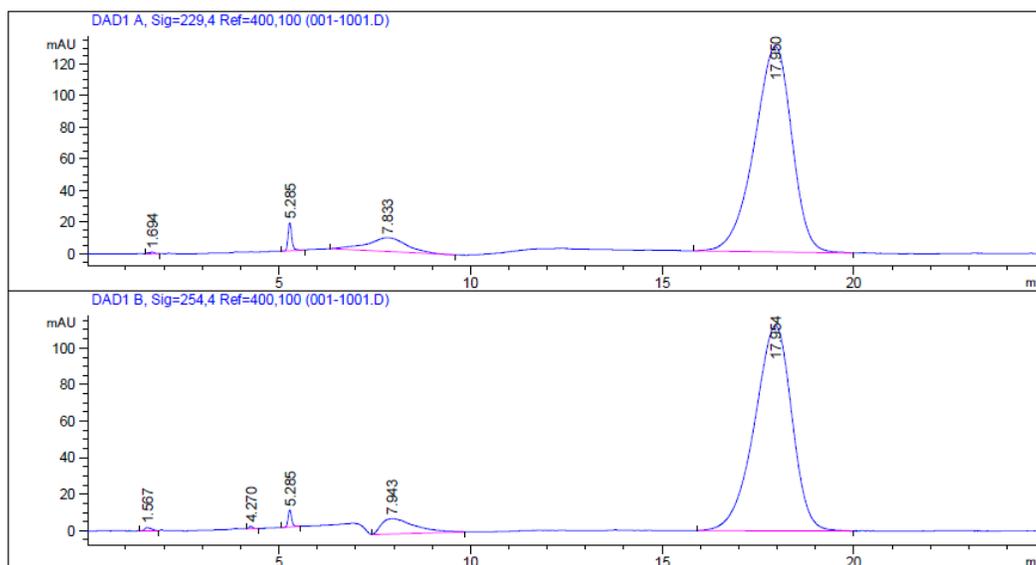


Figura 37. Cromatograma del estándar AITC, obtenido por HPLC

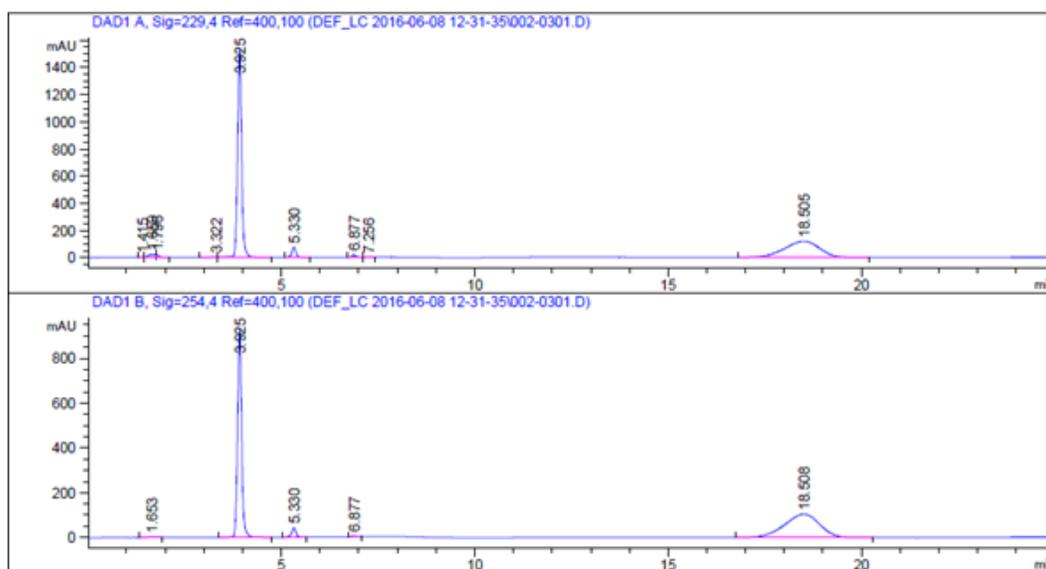


Figura 38. Cromatograma del estándar AITC degradado extraído con CH_2Cl_2 , obtenido por HPLC

Para el estándar AITC degradado extraído con CH_2Cl_2 (ver Figura 38) se obtuvieron dos señales a un tiempo de 3.882 y 17.86 min, esta última señal corresponde en el mismo tiempo con el estándar, podemos observar una disminución en su área (48 %) a pesar de haber sufrido una degradación la señal principal del estándar se encuentra presente, pero aparece una nueva señal (3.882 min) dando un área mayor al 50%, al comparar este resultado con la fase acuosa (ver Figura 39), en ambas longitudes de onda está presente la señal a 3.939 min, pero la señal al tiempo de 17.86 min desaparece.

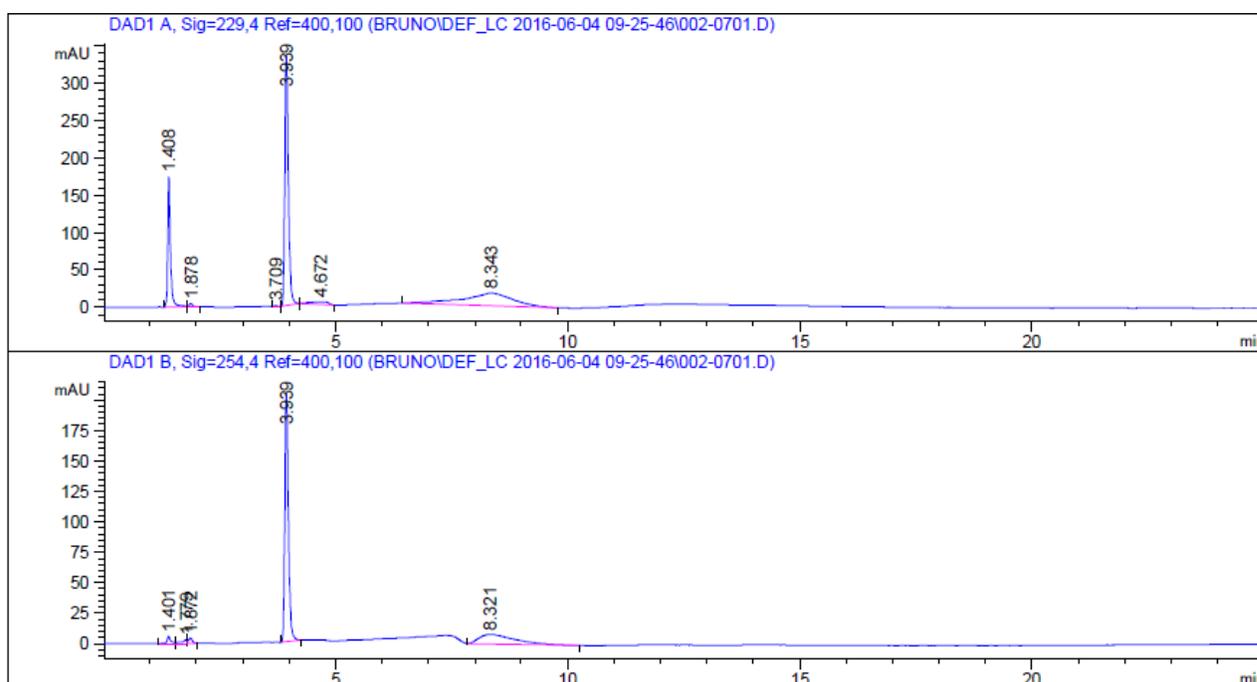


Figura 39. Cromatograma del estándar AITC de la fase acuosa, obtenido por HPLC

Al analizar las muestras.

1) 500µl de muestra + 500µl de Acetonitrilo 2) 500µl de muestra	De las señales obtenidas, al compararlas con los estándares, no se encontró una señal que correspondiera.
3) Extracción del día 0 y 4 de ambas fermentaciones	Para las extracciones se observó en el día 0 y 4 para ambas

fermentaciones una señal a 3.882 min - 3.939 min, que corresponde tanto para la parte de degradación del estándar y la fase acuosa.

En la Figura 40 se observa el área que se obtuvo en un tiempo de retención de 3.882 min - 3.939 min para ambas longitudes onda 229nm y 254nm, se obtuvo una mayor cantidad en la extracción del día 0 correspondiente a la fermentación inducida, seguido de la extracción del día 4 correspondiente a la fermentación natural, estos valores tienen una relación con los resultados anteriores, es notable que la fermentación inducida, ofrece una mayor cantidad de los compuestos que estén presentes.

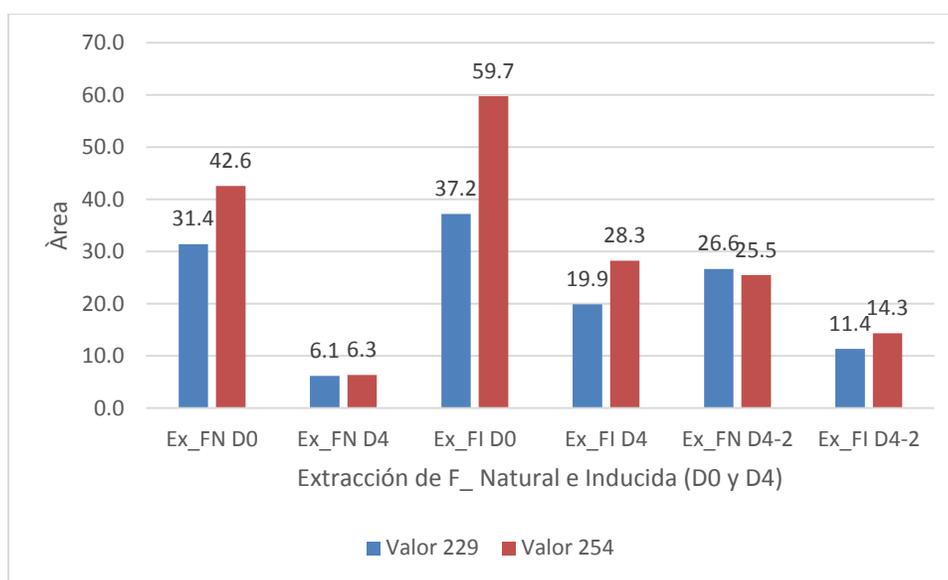


Figura 40. Porcentaje correspondiente al área en un tiempo de retención de 3.882 min - 3.939 min

Al ver que correspondió una señal de las muestras con los estándares (extracción, fase acuosa), para confirmar que realmente corresponde a la señal, se obtuvieron los espectros correspondientes a ambas longitudes de onda, en la Figura 41

podemos observar el espectro que corresponde al estándar del AITC degradado extraído con CH_2Cl_2 y a la fase acuosa, para ambas muestras en ambas longitudes de onda el espectro es el mismo.

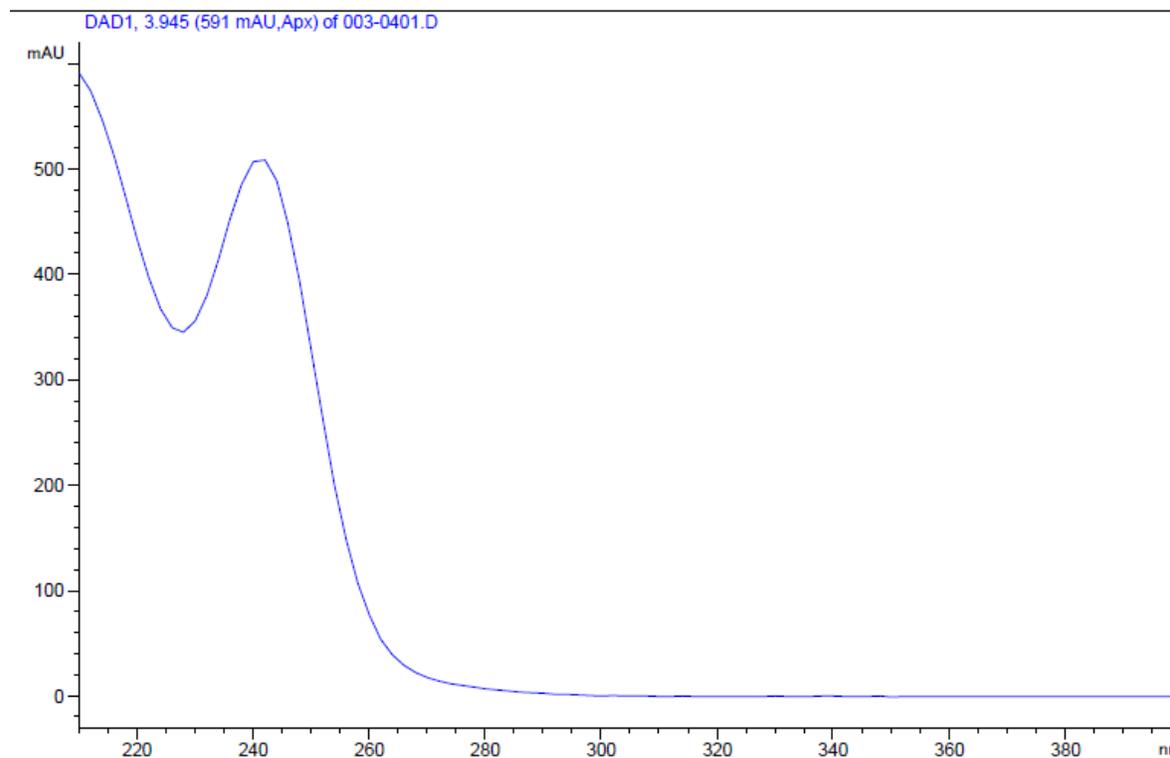


Figura 41. Espectro del estándar del AITC degradado extraído con CH_2Cl_2 y la fase acuosa, a una longitud de onda de 229nm y 254nm.

Al comparar los espectros de las muestras de ambas fermentaciones extraídas con CH_2Cl_2 (día0 y día4), su espectro no coincide con el estándar del AITC degradado extraído con CH_2Cl_2 o con la fase acuosa, no se puede asegurar a que compuesto pertenece la señal en 3.882 min - 3.939 min, por bibliografía se propone el mecanismo para la formación de otros compuestos no volátiles generados a partir de la degradación del AITC, los cuales generan un olor característico a ajo, el compuesto N,N-diallylthiourea esta reportado que es uno de los mayores productos que se generan durante la degradación del AITC (Kawakishi & Namiki, 1969) sin embargo hay pocos reportes que den soporte a su identificación.

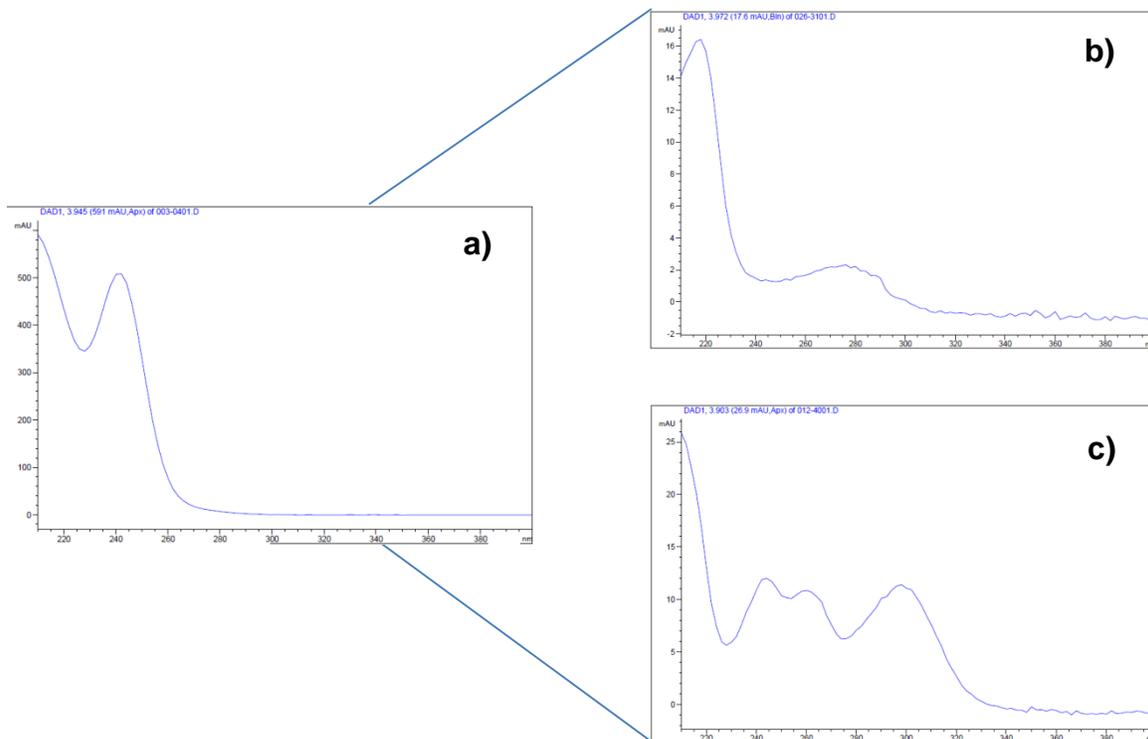


Figura 42. a) Espectro del estándar del AITC degradado extraído con CH_2Cl_2 y la fase acuosa, b) y c) Espectros de varias muestras (día0 y día4)

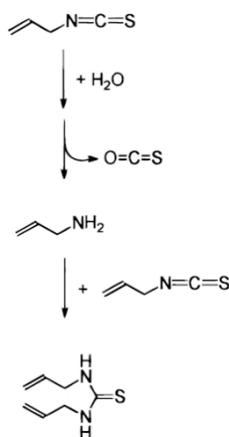


Figura 43. Posible vía para la formación de N,N-diallylthiourea a partir del AITC.

El AITC se hidroliza generando alilamina (un derivado del alilo), el cual reaccionara con el AITC para generar N,N-diallylthiourea (ver Figura 43), esto ya fue confirmado por la reacción de la alilamina y el AITC para la síntesis del N,N-

diallylthiourea (Chen & Ho, 1998). Este compuesto podría ser el que se encuentra presente en nuestras extracciones.

3.10 Absorción FTIR de muestras de fermentados de col blanca

La Figura 44 muestra los espectros FTIR en la región de la huella dactilar (800–1800 cm^{-1}) en muestras de fermentación natural de col blanca durante un periodo de 44 días. Puede observarse que en esta región las señales están dominadas principalmente por los carbohidratos presentes en la fermentación de la col blanca. Al iniciar la fermentación (días 0 y 4), el espectro muestra una banda ancha y posibles picos traslapados debido a la presencia de diferentes azúcares que constituyen al vegetal fresco. Sin embargo, cuando aumenta el tiempo de fermentación, lo hace así también la cantidad de azúcares producidos debido a la hidrólisis de los glucosinolatos por la enzima mirosinasa, manifestándose esto como un aumento en la intensidad FTIR. Además de lo anterior, puede observarse que con el tiempo de fermentación, los últimos espectros obtenidos sugieren la presencia de glucosa como principal carbohidrato producido. Esto se demuestra al comparar el espectro de glucosa estándar, incluido en la misma gráfica. La tabla 10 muestra algunas de las principales frecuencias y enlaces asociados a vibraciones de glucosa en la región de la huella dactilar.

Tabla 10. Frecuencias y enlaces asociados a vibraciones de la molécula de glucosa.

Frecuencia (cm^{-1})	Enlace
1027	C-O
1100	C-O
1145	C-C
1460	CH_2

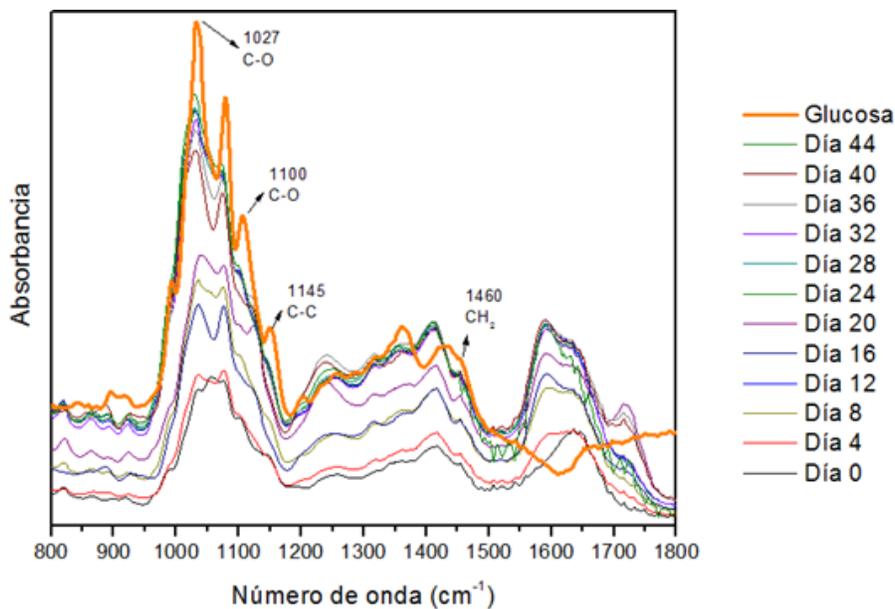


Figura 44. Espectros FTIR traslapados con el espectro de glucosa.

3.11 Espectro FTIR del compuesto Allyl Isothiocyanato y curva de calibración

Uno de los principales metabolitos producido durante la fermentación de la col blanca por la hidrólisis de glucosinolatos presentes cuando la enzima mirosinasa actúa, es el compuesto allyl isothiocyanato (AITC), el cual se sabe que se degrada fácilmente. A pesar de ese inconveniente, se decidió obtener y analizar su espectro vibracional FTIR a partir de un estándar. El espectro FTIR de AITC se muestra en la Fig. 45. Se observan algunas de las principales bandas de absorción de la molécula, asociadas a los enlaces -N=C=S en 2169, 2088 y 1649 cm^{-1} , así como al enlace CH-CH_2 en 987 cm^{-1} . Además de la obtención del espectro FTIR de AITC, se procedió a realizar una curva de calibración de este compuesto, mediante la dilución con diclorometano a diferentes porcentajes entre 0-100%, y analizadas por FTIR. Los espectros por regiones se muestran en las Figuras 46, 47 y 48.

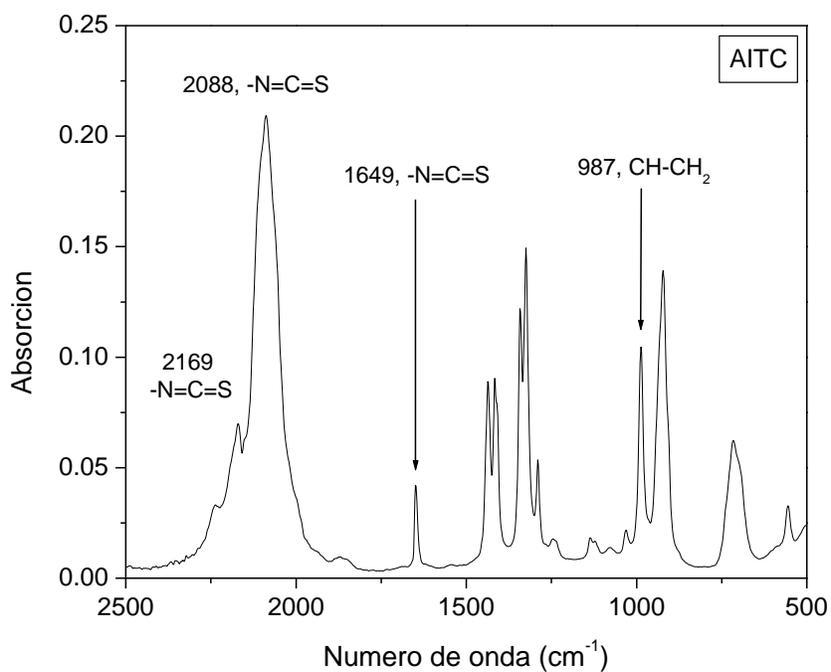


Figura 45. Espectro FTIR del estándar de allyl isothiocyanato (AITC).

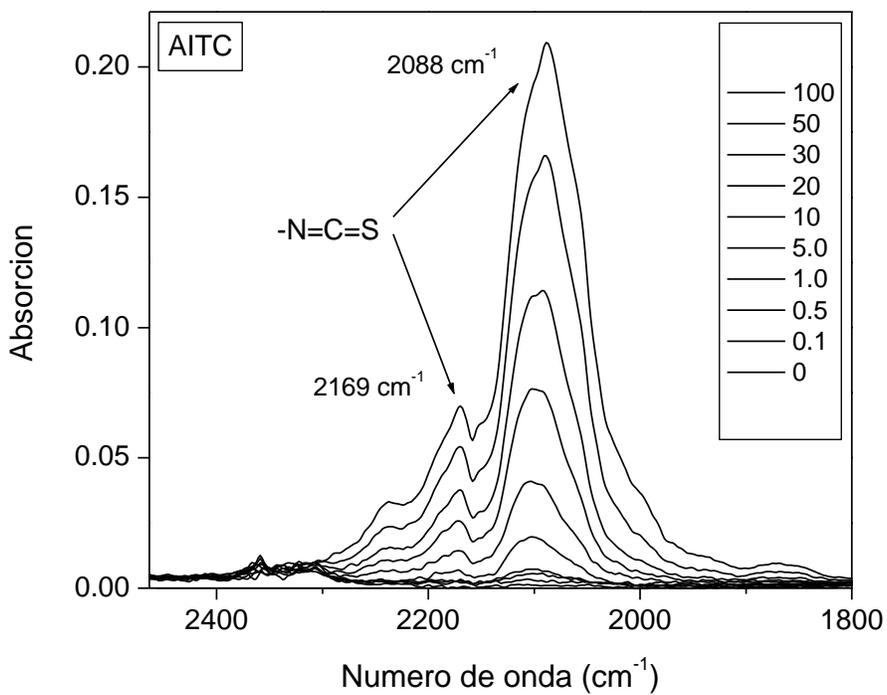


Figura 46. Espectro FTIR de una dilución del estándar de allyl isothiocyanato (AITC) con CH_2Cl_2 (región 2450-1800 cm^{-1})

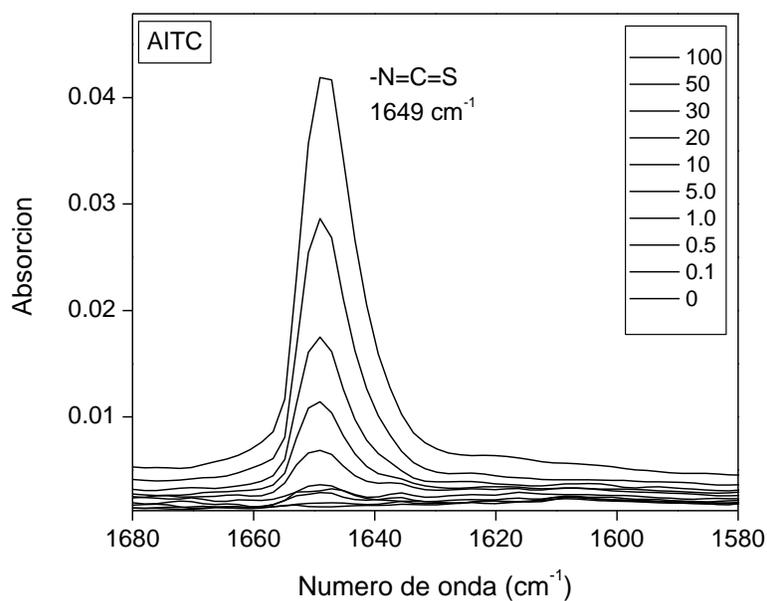


Figura 47. Espectro FTIR de una dilución del estándar de allyl isothiocyanato (AITC) con CH_2Cl_2 (región $1680\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$).

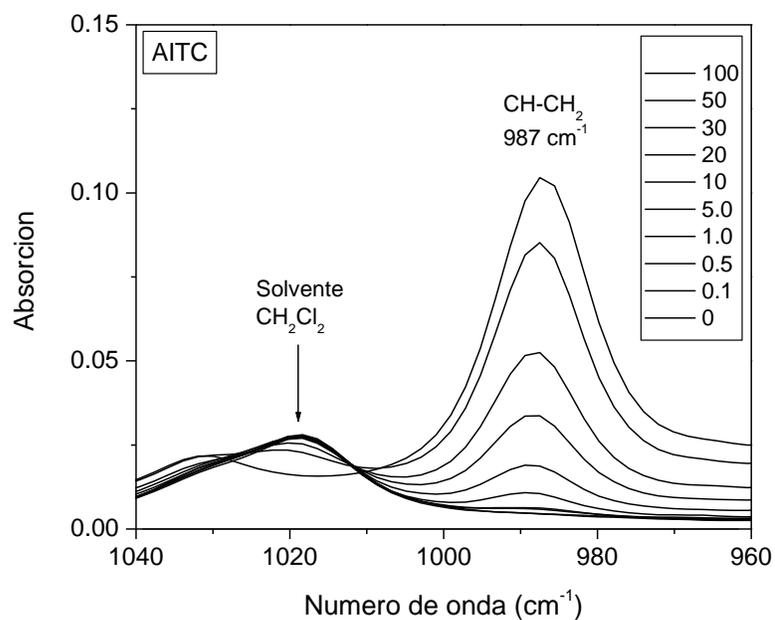


Figura 48. Espectro FTIR de una dilución del estándar de allyl isothiocyanato (AITC) con CH_2Cl_2 (región $1040\text{-}960\text{ cm}^{-1}$).

De las figuras 46 a 48, se puede observar una disminución en la intensidad de absorción FTIR de las bandas centradas en 2169, 2088 y 1649 cm^{-1} asociadas al grupo funcional $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ de AITC, así como de la banda centrada en 987 cm^{-1} correspondiente al enlace $\text{CH}-\text{CH}_2$. La medición de la intensidad FTIR de las bandas mencionadas se realizó por triplicado para cada dilución desde 0-100% y los resultados promediados de intensidad de banda como función del porcentaje de AITC en cada dilución se muestran en la Figura 49. Una dependencia exponencial sigmoïdal es observada para las cuatro curvas de calibración obtenidas. La obtención de estas curvas de calibración podría permitir estimar el contenido de AITC, o bien grupos funcionales derivados de AITC presentes en fermentados de col blanca, después de haber sido extraídos con CH_2Cl_2 .

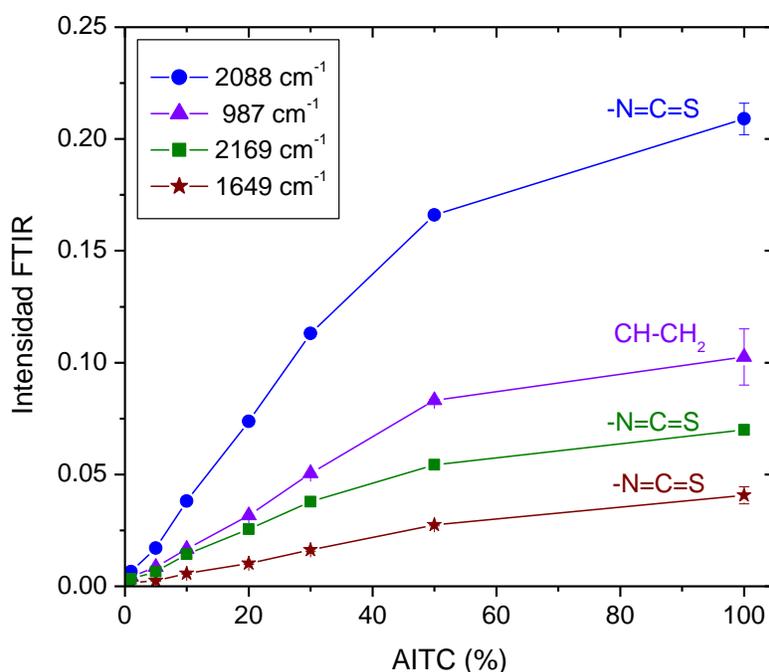


Figura 49. Intensidad FTIR de las bandas centradas en 2169, 2088, 1649 y 987 cm^{-1} asociadas a los grupos $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ y $\text{CH}-\text{CH}_2$ como función del contenido de AITC en dilución con CH_2Cl_2 .

Una manera alternativa de visualizar las cuatro curvas de calibración obtenidas mediante el registro de la intensidad FTIR de las bandas mencionadas es

utilizando las escalas Log-Log, Figura 50. De esta manera la dependencia funcional del contenido de AITC con el tiempo de fermentación se acerca más a un comportamiento lineal, y siendo la frecuencia 2088 cm^{-1} la más indicada (por su intensidad) para evaluar en contenido de AITC en fermentados de col blanca.

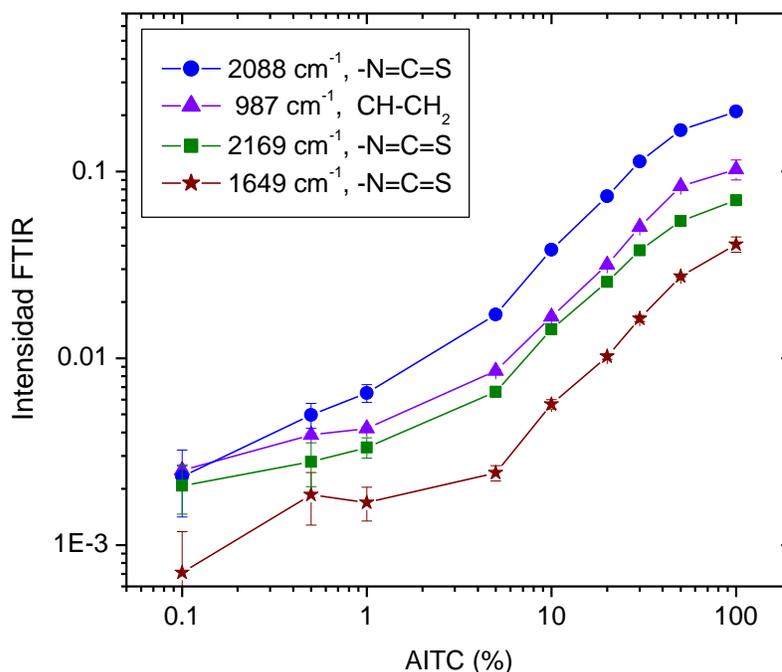


Figura 50. Intensidad FTIR en grafica Log-Log de las bandas centradas en 2169 , 2088 , 1649 y 987 cm^{-1} asociadas a los grupos $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ y $\text{CH}-\text{CH}_2$ como función del contenido de AITC en dilución con CH_2Cl_2 .

3.12 Espectro FTIR de extracciones de fermentados de col blanca con CH_2Cl_2 .

La Figura 51 muestra los espectros FTIR de extracciones con diclorometano (CH_2Cl_2) aplicadas a los fermentados de col blanca de 0 a 44 días.

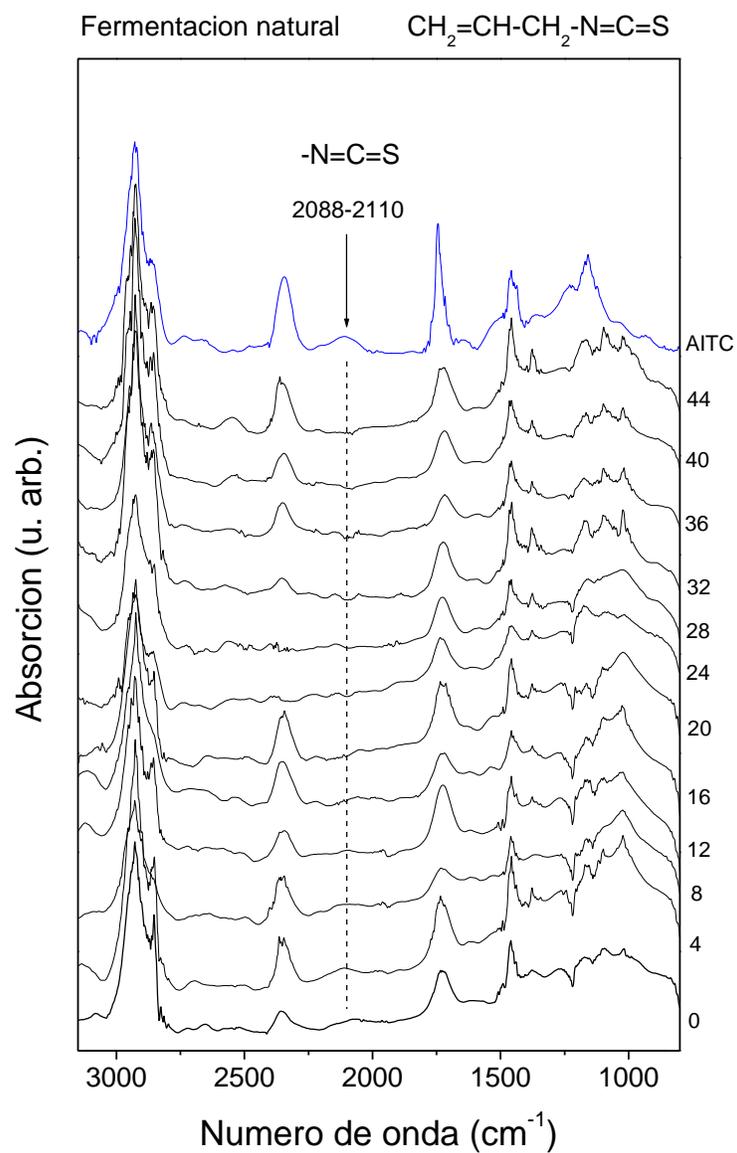


Figura 51. Espectros FTIR de extracciones con CH_2Cl_2 en fermentación natural de col blanca de 0 a 44 días. Se ha agregado el espectro del estándar de AITC.

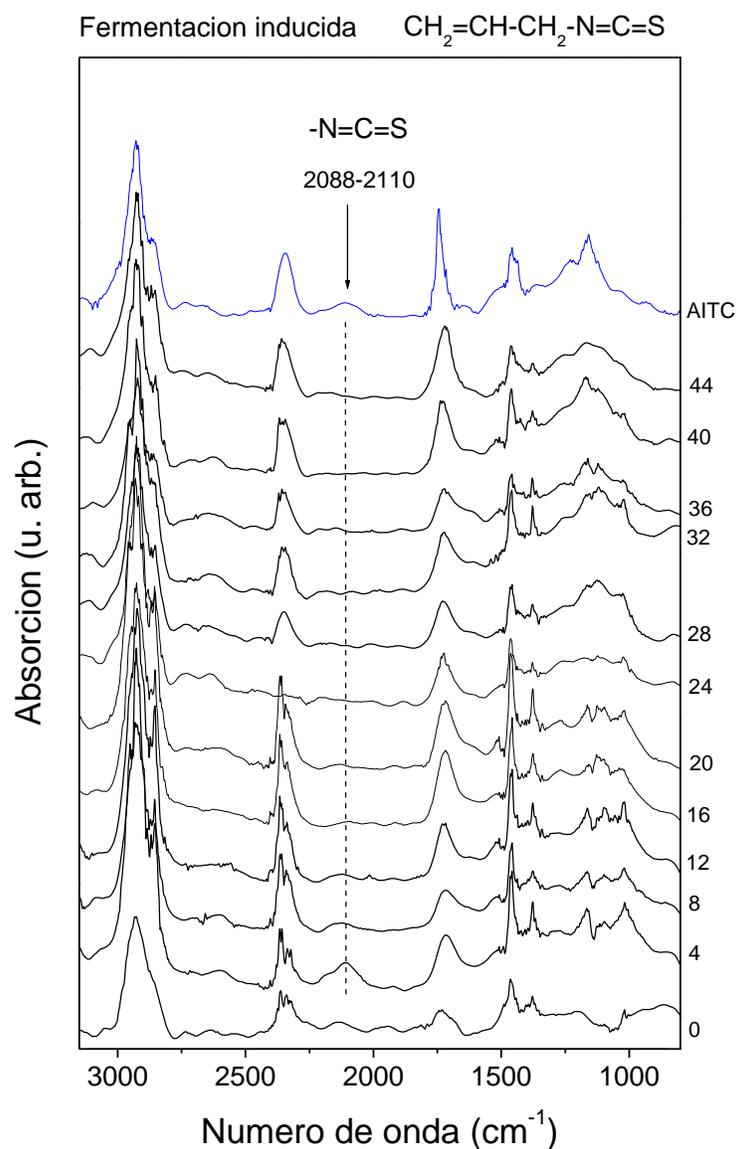


Figura 52. Espectros FTIR de extracciones con CH_2Cl_2 en fermentación inducida de col blanca de 0 a 44 días. Se ha agregado el espectro del estándar de AITC.

En términos generales, se observa una prevalencia del espectro FTIR dominado principalmente por la señal de AITC, una vez que ambos tipos de fermentados (natural e inducido) fueron sometidos al proceso de extracción con CH_2Cl_2 . En ambos tipos de fermentados, se observa la presencia de una banda ensanchada alrededor del intervalo espectral entre $2088\text{-}2110\text{ cm}^{-1}$, el cual se asocia al grupo



funcional $-N=C=S$, siendo este último parte esencial de la molécula de AITC, ya sea en su forma integrada como compuesto, o bien como un producto de la degradación del mismo. Aunque en ambos tipos de fermentaciones prevalece el espectro de AITC, la presencia del grupo $-N=C=S$ parece ser más acentuada para el caso de la fermentación inducida, sobre todo en los primeros 4 días. Lo anterior sugiere una mayor producción de AITC en fermentación inducida derivada de los procesos de hidrólisis enzimática.



CAPITULO IV.

4 CONCLUSIONES

- Los experimentos de fermentación anaerobia de *Brassica oleracea* (Sauerkraut) realizados en este trabajo produjeron valores de pH y % de ácido láctico consistentes con los reportados por Viander *et al.*, 2002; Paramithiotis *et al.*, 2010.
- Se observó una disminución de tipo exponencial del pH con el tiempo de fermentación, cambiando de 6 a 3.7 en el periodo de 44 días para la fermentación natural; a diferencia de la fermentación inducida, al día 24 está registrado un valor de 3.2, disminuyendo más rápido, debido al microorganismo iniciador.
- Para el crecimiento de bacterias lácticas, se observa una gran diferencia entre la fermentación natural y la fermentación inducida; en esta última se aumenta considerablemente, debido a los factores intrínsecos y extrínsecos, y toda la microbiota natural presente en la col blanca, al utilizar microorganismos iniciadores
- El contenido de fenoles totales en ambos tipos de fermentación muestra concentraciones entre 4-14 mg/mL. Estos son más bajos que los reportados por Ciska *et al.*, 2005, pero teniendo en consideración que este valor corresponde al jugo de Sauerkraut solamente.
- Los espectros FTIR de ambos fermentados corroboran el aumento en la producción de carbohidratos principalmente glucosa, lo cual se comprobó mediante la comparación con el estándar de glucosa, el cual muestra ser



muy similar al espectro de los últimos días de fermentación (32 – 44 días), banda alrededor de 1028 cm^{-1} característica del enlace C-O de la molécula de glucosa.

- En el caso de la fermentación inducida, la producción de fenoles totales está asociada directamente al conteo de bacterias participando en el proceso fermentativo.
- De acuerdo a mediciones FTIR, el compuesto allyl isothiocyanato (AITC) muestra estar presente de manera importante en la mayoría de las fermentaciones (natural e inducida), prevaleciendo aun en mayor proporción en fermentación inducida.



BIBLIOGRAFÍA

1. Arias Cortes María Mercedes. (2011). Análisis y comparación de los glucosinolatos presentes en diferentes accesiones de cubio (*Tropaeolumtuberosum*) para evaluar su uso potencial en el control del patógeno de la papa *Spongospora* subterránea. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Bogotá, Colombia
2. Angelo L, Domínguez F, Gil C, Duarte A, P. (2009). Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 3(11), pp. 886-893.
3. Badui Dergal Salvador. (2006). Química de los alimentos. Ed. Pearson. México
4. Bech Hansen Egon (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology* 78, 119– 131
5. Bello G. J. (2005). Calidad de vida, Alimentos y Salud Humana: Fundamentos científicos. Ediciones Díaz de Santos. España
6. Besle A, Brazzolotto X, Tatibouet A, Cerniauskaite D, Gallienne E, Rollin P, Burmeistera W. P. (2010). A micromolar O-sulfated thiohydroximate inhibitor bound to plant myrosinase. *Acta Cryst*, F66, 152–155



-
7. Campas B. O. N, López C. J, Sánchez M. D. I, Bueno S. C. (2011). Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en fermentados de brócoli. *CIENCIA@UAQ*. 4(2):10–18
 8. CiskaEwa&Pathak R. Dorothy. (2004). Glucosinolate Derivatives in Stored Fermentes Cabbage. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7938–7943
 9. Chun Wen Chen & Chi Tang Ho (1998). Thermal Degradation of Allyl Isothiocyanate in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem*, 46, 220-223
 10. Danish Food Composition Databank, 2014
www.foodcomp.dk/v7/fcdb_details.asp?FoodId=0088
 11. Dole M. N, Patel P. A, Sawant S. D, Shedpure P. S. (2011). Advance applications of Fourier transform infrared spectroscopy. Volume 7, Issue 2, article-029
 12. Dora M, Gutiérrez A, Christopher A, Ortiz G, Arturo M. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Centro Nacional de Metrología, pp. 1108-1-1108-5.
 13. Dorette T.H. Verhoeven, Hans Verhagen, R. Alexandra Goldbohm, Piet A. van den Brandtb, Geert van Poppel (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chemico-Biological Interactions* 103, 79-129
 14. FAO, 2006
http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ae620s/pfrescos/REPOLLO.HTM



-
15. Fennema O. W., Damodaran S., Parkin K. L. (2008). *Food Chemistry*. Four edition. Ed. CRC Press
 16. Gutiérrez B. M. C, Droguet M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)* Nº 122
 17. Herr Ingrid & Büchler Markus W. (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews* 36, 377–383
 18. Higdon J. V, Delage B, Williams D. E, Dashwood R H. (2007). Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research* 55, 224–236
 19. Johll M. E. (2008). *Química e investigación criminal*. Ed. Reverté. España
 20. Kalac P, Spicka J, Krizek M, Pelikánová T. (2000). The effects of lactic acid bacteria inoculants on biogenic amines formation in sauerkraut. *Food Chemistry* 70, 355–359
 21. Kawakishi, S.; Namiki, M. (1969). Decomposition of allyl isothiocyanate in aqueous solution. *Agric. Biol. Chem*, 33, 452-459.
 22. Leoni O, Iori R, Palmieri S, Esposito E, Menegatti E, Cortesi R, Nastruzzi C, (1997). Myrosinase-Generated Isothiocyanate from Glucosinolates: Isolation, Characterization and In Vitro Antiproliferative Studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Vol. 5, No. 9, pp 1799-1806
 23. Li Y, Teng Z, Chen P, Song Y, Luo Y, Wanga Q. (2015). Enhancement of aqueous stability of allyl isothiocyanate using nanoemulsions prepared by



an emulsion inversion point method. *Journal of Colloid and Interface Science* 438, 130–137

24. Macy R. (1992). *Química orgánica simplificada*. Ed. Reverté. España
25. Malviya R, Bansal V, Pal O. P, Sharma P. K. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*. 2(5): 22-26
26. Miller AB, Altenburg HP, Bueno-de-Mesquita B, Boshuizen HC, Agudo A, Berrino F. (2004). Fruits and vegetables and lung cancer: findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int J Cancer*. 10;108(2):269-76.
27. Nafisi M, Sønderby I. E, Bjarne G. B, Geu-Flores F, Nour-Eldin H. H, Nørholm M. H. H, Jensen N. B, Li J, Halkier B. A. (2006). Cytochromes P450 in the biosynthesis of glucosinolatos and indole alkaloids. *Phytochem Rev*, 5:331–346
28. Namsoo K, Kyung-rim P, In-Seon P, Yong-Jin C, Young M. B. (2005). Application of a taste evaluation system to the monitoring of Kimchi fermentation. *Biosensors and Bioelectronics* 20, 2283–2291
29. Núñez Sánchez Maria Angeles. (2012). Efecto del agua electrolizada sobre el sistema antioxidante y la enzima mirosinasa en brócoli mínimamente procesado. Universidad politécnica de Cartagena. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
30. Ostrooumov Mikhail. (2007). Espectrometría infrarroja de reflexión en mineralogía avanzada, gemología y arqueometría. Geofísica-UNAM



-
31. Owen, Tony (2000). Fundamentos de la espectroscopía Uv-visible moderna. Agilent Technologies, págs. 2-30.
32. Paramithiotis S, Hondrodinou O. L & Drosinos E. H. (2010). Development of the microbial community during spontaneous cauliflower fermentation. Food Research International 43 1098–1103
33. Peñas E, Pihlava J. M, Valverde-Vidal C, Frias J. (2012). Influence of fermentation conditions of *Brassica oleracea L. var. capitata* on the volatile glucosinolate hydrolysis compounds of sauerkrauts. LWT - Food Science and Technology 48, 16–23
34. Pérez L. F, Zamora N. S. (2002). Nutrición y alimentación humana. Ed. Aula de Mayores. Universidad de Murcia.
35. Podsędek Anna (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. Swiss Society of Food Science and Technology. Elsevier. LWT 40, 1–11
36. Ramírez R J. C, Rosa U. P, Velázquez G. M. Y, Armando U. J, Arce R. F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente Año 2, No. 7
37. SAGARPA, 2009
http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/FDTAFT.pdf
38. Savic D, Jokovic N, Topisirovic L. (2008). Multivariate statistical methods for discrimination of lactobacilli based on their FTIR spectra. DairySci. Technol. 88, 273–290



39. SECRETARIA DE SALUD, 2013.

<http://mexico.cnn.com/salud/2013/02/04/los-tipos-de-cancer-que-mas-afectan-a-los-mexicanos>

40. Smith T. K, Lund L. K, Parker M. L, Clarke R. G, Johnson I. T, (2004). Allyl-isothiocyanate causes mitotic block, loss of cell adhesion and disrupted cytoskeletal structure in HT29 cells. *Carcinogenesis* vol.25 no.8 pp.1409-1415

41. Tolonen M, Taipale M, Viadner B, Pihlava J. M, Korhonen H & Ryhänen E. L. (2002). Plant-Derived Biomolecules in Fermented Cabbage. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6798-6803

42. Viander B, Aki M. M, Palva A. (2003). Impact of low salt concentration, salt quality on natural large-scale sauerkraut fermentation. *Food Microbiology* 20, 391–395

43. Yuesheng Zhang & Paul Talalay (1994). Anticarcinogenic Activities of Organic Isothiocyanates: Chemistry and Mechanisms. *CANCER RESEARCH (SUPPL.)* 54. 1976s-1981s.