

Estimulación de especies de la familia *Cruciferae* con metabolitos secundarias con importancia farmacéutica

Diego Ríos, Ramiro García, Zulma I. Monsalve, Benjamín A. Rojano y Darío A. Castañeda

RESUMEN

La búsqueda de fuentes de metabolitos secundarios con propiedades farmacológicas, ha sido un trabajo intelectual y científico realizado desde principios de la humanidad. En este sentido se han encontrado propiedades importantes de un grupo de hortalizas pertenecientes a la familia *Cruciferae* o también conocida como *Brassicaceae*. Familia que ha mostrado en múltiples estudios la presencia de glucosinolatos, metabolitos secundarios de gran interés por sus propiedades anticancerígenas. Con la presente investigación se busca como, a partir de estímulos nutricionales, físicos y biológicos se puede aumentar la producción de dichos metabolitos, dando al cultivo de estas especies, un valor agregado adicional, de importancia económica.

Palabras claves: Metabolitos secundarios, *Cruciferae*, anticancerígenas, elicitación.

I. INTRODUCCIÓN

La tendencia actual de los productos agrícolas para consumo humano y animal, es que sean alimentos funcionales o con características nutraceuticas definidas.

Dentro de estas funciones, se destacan principalmente dos, una es que las propiedades nutritivas por lo que se utilizan en las dietas habituales se vean aumentadas y definidas. La otra se centra en cómo estos alimentos contienen metabolitos secundarios que poseen propiedades terapéuticas con un alto valor.

En este sentido y según la nota descriptiva N° 297 emitida en febrero de 2015 en la página web de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la que se reporta estadísticas del cáncer en 2012, menciona que, anualmente se presentan 14 millones de nuevos casos y adicionalmente 8.2 millones de personas mueren a causa o en relación al cáncer. Los casos diagnosticados con mayor

frecuencia son los de pulmón, colon, mama, cuello uterino, próstata, recto, estomago e hígado [1].

En el mercado se encuentra una gran cantidad de medicamentos y tratamientos relacionados para esta enfermedad, pero el mayor problema es que además de su alto costo, estos tratamientos son en su gran mayoría formulados para intentar curar el mal y pocos, para no decir ninguno, tienen una función preventiva.

En la familia *Cruciferae* se reporta ampliamente la producción de glucosinolatos, metabolitos secundarios que son de interés farmacéutico, de estos por su parte, se muestran reportes de estas dos funciones, tanto preventivas, así como tratamiento cuando ya el cáncer ha aparecido. Todos los reportes encontrados se pueden clasificar por su funcionalidad [2]–[8], pero pocos estudios hacen referencia a como propender a que dichas especies los produzcan en mayor cantidad.

Ya que la concentración de glucosinolatos, así como de otros metabolitos secundarios en general es baja, se hace imperativo saber si es posible aumentar la cantidad de dichos compuestos, mediante elicitaciones nutricionales, físicas y biológicas, individuales.

El presente proyecto plantea una alternativa con la cual se podría ver la posibilidad de aumentar dichos metabolitos, con los cuales se facilitaría la producción de biomasa en alta cantidad y con mayor concentración de estos metabolitos por unidad de masa, como materia prima para la producción de medicamentos y/o tratamientos alternativos para la prevención y/o curación del cáncer, que ya han sido probados bio-activamente en dicho tratamiento [8]–[10].

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los glucosinolatos tienen propiedades benéficas en la salud humana como buenos antioxidantes y como anticancerígenas, para varios tipos de esta enfermedad. Una fuente importante de estos metabolitos es la familia *Brassicaceae* o *Cruciferae* [5], [10]–[12].

En diferentes fuentes [13]–[15], se reporta como ciertos estímulos en algunas especies vegetales, muestran respuesta variable de las especies en su comportamiento, tanto a nivel macroscópico como microscópico. Como una de estas posibles respuestas es el cambio de la concentración de sus metabolitos, este hecho se hace una herramienta importante para la producción de metabolitos de interés no solo nutritivos, sino también de importancia médica e industrial [13]–[15].

Estudios realizados en relación al aumento de la producción de glucosinolatos han sido en referencia del aumento de algunos compuestos en su fertilización y la temperatura para el caso de la rúgula, brócoli [16]–[18] y en cultivos celulares para otras especies como *Lepidium peruvianum* Chacón (MACA) [19]; pero en cuanto el comportamiento de las plantas a otros estímulos, el desconocimiento es amplio.

III. HIPÓTESIS

El cultivo aeropónico, facilita la manipulación de todos los estímulos para producir una variación en las concentraciones de los metabolitos secundarios en especies familia *Cruciferae*.

Las elicitaciones nutricionales, físicas y biológicas, producen un cambio en la concentración de glucosinolatos u otro tipo de metabolitos secundarios de interés humano, en las especies familia *Cruciferae*.

Estadísticamente es validable el método de producción de glucosinolatos en las especies familia *Cruciferae*, generando un modelo adecuado en este sentido.

IV. METODOLOGÍA

La metodología que se utilizaría para el presente proyecto está dividida en siete bloques, muchos de ellos se realizarían paralelamente para con esto garantizar el tratamiento completo de los resultados y el cumplimiento en los cronogramas, otros si tienen una dependencia exclusiva del proceder del proyecto.

Cultivo:

Seleccionadas las especies con mayor prospección en producción de glucosinolatos, se someterán estas al siguiente procedimiento.

Siembra y endurecimiento: En una superficie homogénea de sustrato de aserrín de pino patula, *Pinus patula* (Shiede), se generan orificios superficiales, con una distancia suficiente entre orificios, se agregan 3 semillas de la especie y se tapan con sustrato. El semillero permanece húmedo y bajo oscuridad hasta la germinación de los especímenes, en dicho momento se les proporciona luz día, generando elongación y endurecimiento de las plántulas.

Trasplante y aeroponía: Cuando las plantas tengan hojas reales y una altura promedio de 5.0 cm se trasplantan en recipientes de cultivo cónicas y expandibles, a las cuales después de ser trasplantada las plantas, se les agrega aserrín como soporte de ellas. Estos recipientes se coloca sobre cama hidropónica durante 72 horas para el endurecimiento de las plantas, momento en el cual son transferidos a las camas aeropónicas definitivas, en las cuales cumplirán todo el proceso productivo.

Las dimensiones de la superficie de las camas aeropónicas son un metro de ancho por seis metros de largo, con una densidad de especies de 36 plantas/m², el sistema de irrigación es de 10.0 s de riego con 4.40 min de descanso, esto ocurre con el uso de aspersores ubicados por debajo de los soportes finales de la cama. Todo el sistema es controlado electrónicamente.

Elicitación:

Análisis preliminares: Para determinar las mejores condiciones para experimentación, se realizan varios análisis experimentales con las especies, así como con varios de los elicitores.

- **Tiempo de colecta:** Usando la solución nutritiva cero (SN₀) (solución nutritiva (SN) sin ningún tipo de alteración), se realizara el cultivo de la planta. Después del endurecimiento con intervalo de tres (3) días se realizara la colecta de especímenes para someterlos a análisis de contenido de glucosinolatos. Así se encontrará el tiempo más adecuado (días), en el cual la concentración de glucosinolatos sea el mayor, con respecto al material colectado.

- **Determinación de la proporción de nutrientes en la SN:** Teniendo como base de cálculo la cantidad de nitrógeno presente en la SN₀, se haría una variación porcentual entre los

dos compuestos que aportan este elemento en dicha solución, nitrógeno amoniacal ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) y nitrógeno de nitrato ($\text{NO}_3^-\text{-N}$), determinando cuál de estas combinaciones muestra una mejor producción de glucosinolatos en la especie para el tiempo de colecta ya encontrado

- Determinación del estímulo fotolumínico: Comparando varios tipos de lámparas, con diferentes longitudes de onda, se encontrará la mejor fuente fotolumínica, también se determinará la altura más adecuada de la lámpara con respecto al individuo, colectando los datos para establecer cual lámpara y a que distancia es la que genere la elicitación mayoritaria en la producción de glucosinolatos en el tiempo de colecta.

Experimentación:

Elicitación nutritiva:

- $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{NO}_3^-\text{-N}$: Usando la mejor combinación porcentual de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{NO}_3^-\text{-N}$, se determinará, como la variación de concentración (aumento o disminución de N total), de esta mezcla en la SN, afecta la producción de glucosinolatos en las especies de la familia *Cruciferae*, en el tiempo de colecta.

Elicitación física:

- Fotoluminosidad: Con la longitud de onda adecuada, se someterá en varios periodos de tiempo durante el cultivo a las especies, encontrando cual es el grado de exposición (tiempo), más adecuado para permitir una variación en la concentración de glucosinolatos en la especie.

Elicitación biológica:

Usando como estímulos dos tipos de enfermedades características de las especies de las *Brassicaceae*, se analizara el material cosechado, determinando si hubo cambios en la concentración de glucosinolatos en dichas especies.

NOTA: En todos los experimentos preliminares, como los de elicitación se realizaran cinco repeticiones, con un número de especímenes de 72 para preliminares y 216 plantas para la fase experimental.

Extracción de glucosinolatos de especímenes de la familia *Cruciferae*.

El material vegetal es colectado en horas de la mañana y lavado para eliminar polvo en la parte

aérea, aserrín y remanentes de SN en sus raíces. Sin humedad, las especies se separa la parte foliar de la radicular.

Usando el material fresco, tanto aéreo como radicular, se someterán a una extracción utilizando método de percolación con diferente polaridad de los solvente. Se determinara el mejor método de separación y purificación de los glucosinolatos de interés para luego pasar a la fase de análisis.

Análisis y determinación de concentración de glucosinolatos:

Aislados y purificados los glucosinolatos, se realizaran análisis instrumentales (RMN-H y RMN- ^{13}C) para determinar cuáles glucosinolatos están presentes en las especies, trascurrido esto se determinara la concentración de estos, utilizando HPLC-Uv con rearrreglo de diodos, para dicho fin.

V. RESULTADOS ESPERADOS

Lograr el objetivo general del presente proyecto, estaría planteando un precedente de cómo se podrían mejorar cultivos de alto interés para la producción de una mayor cantidad de materia prima, para múltiples usos.

Generar un impulso importante al método aeropónico, no solo para el uso habitual de producción limpia de material vegetal como ha sido usada, sino como una herramienta eficaz de producción de material biológico con un valor agregado importante, en la producción de material con propiedades valiosas.

Comprobar que la estimulación adecuada de ciertos factores, aumenta la concentración de metabolitos secundarios en especies de la familia *Cruciferae* usadas en la investigación, se puede extrapolar este método a más miembros de esta familia así como a una infinidad de especies con un interés especial para la humanidad.

Se da un paso en la generación de herramientas científicas, en el sentido de cómo aumentar la biosíntesis de metabolitos secundarios específicos en especies de interés farmacológico y nutricional, generando un mayor valor agregado a especies cultivadas por pequeños productores del agro colombiano, haciendo con esto más rentable y viable dichos cultivos.

VI. IMPACTO DEL PROYECTO

Uno de los principales impactos de este proyecto, es la generación de conocimiento en el área de la elicitación de las especies a investigar,

en condiciones ambientales y de cultivo controladas, como lo son la nutrición y las interacciones ambientales tanto físicas, como biológicas que se usaran con los individuos de estudio. Con ello la ciencia adquiriría una nueva herramienta para mejorar los cultivos, no solo de estas especies, sino también extrapolando los aportes adquiridos en este estudio, para ser aplicados en otras y así como para otros metabolitos secundarios.

Dar una dirección de estos conocimientos, para realizar trabajos posteriores con el fin de transferir la información de la elicitación, en métodos de cultivo tradicionales, buscando resultados similares o mejores a los encontrados en la aeroponía en invernadero.

Científicamente, se estaría generando un modelo de producción de metabolitos secundarios de interés humano, aumentando la concentración de los mismos, controlando los estímulos proporcionados a los individuos de producción.

Ambientalmente al realizarse los estudios en un espacio de invernadero y bajo las condiciones de aeroponía, el consumo de energía es optimizado y el de agua baja considerablemente comparativamente con otros métodos de cultivo, como también la eliminación del uso de agroquímicos para control de enfermedades, infecciones y plagas en general; haciendo mucho más eficiente la ejecución de la experimentación.

Económica y socialmente el alcance generado sería el cómo a partir de estímulos, una especie fácilmente cultivable y que comercialmente en nuestro país es explotada para otros fines, podría ser una alternativa de producción para muchas personas y organizaciones con el fin de comercializar glucosinolatos contenidos en la biomasa para ser extraídos y purificados.

El impacto sobre la productividad y la competitividad se ve reflejada en la determinación de cuales especies de la familia *Cruciferae*, poseen las mejores características y propiedades con respecto a la concentración de glucosinolatos que estas contengan, en principio, al finalizar el proyecto, se podrán tener individuos especializados en la producción de concentraciones superiores de glucosinolatos, utilizando elicitaciones controladas.

Aunque la investigación no está directamente implicada con pruebas de los glucosinolatos en sus posibles actividades médicas ya comprobadas por otros autores, el peso de esta investigación se

vería reflejado en este campo, en cuanto este recurso producido biotecnológicamente puede ser más económico que otros compuestos o los mismos producidos por métodos tradicionales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo será realizado gracias al apoyo recibido por la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad de Antioquia, a través de sus vicerrectorías de investigación.

Un agradecimiento especial al ingeniero Héctor Chavarría por su colaboración y ayuda en los aspectos relacionados con las condiciones aeropónicas ideales para la experiencia.

REFERENCIAS

- [1] OMS, "Cancer," 2015. .
- [2] C. Bonnesen, P. U. Stephensen, O. Andersen, H. Sørensen, and O. Vang, "Modulation of cytochrome P-450 and glutathione S-transferase isoform expression in vivo by intact and degraded indolyl glucosinolates.," *Nutr. Cancer*, vol. 33, no. 2, pp. 178–187, 1999.
- [3] I. Herr, V. Lozanovski, P. Houben, P. Schemmer, and M. W. Büchler, "Sulforaphane and related mustard oils in focus of cancer prevention and therapy," *Wiener Medizinische Wochenschrift*, vol. 163, no. 3–4, pp. 80–88, 2013.
- [4] J. V. Higdon, B. Delage, D. E. Williams, and R. H. Dashwood, "Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis," *Pharmacol. Res.*, vol. 55, no. 3, pp. 224–236, 2007.
- [5] M. Khoobchandani, N. Ganesh, S. Gabbanini, L. Valgimigli, and M. M. Srivastava, "Phytochemical potential of *Eruca sativa* for inhibition of melanoma tumor growth," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 4, pp. 647–653, 2011.
- [6] G. Murillo and R. G. Mehta, "Cruciferous vegetables and cancer prevention.," *Nutr. Cancer*, vol. 41, no. 1–2, pp. 17–28, 2001.
- [7] M. Nachshon-Kedmi, S. Yannai, and F. a Fares, "Induction of apoptosis in human prostate

cancer cell line, PC3, by 3,3'-diindolylmethane through the mitochondrial pathway.," *Br. J. Cancer*, vol. 91, no. 7, pp. 1358–1363, 2004.

[8] X. Wu, Q. Zhou, and K. Xu, "Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs?," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 30, no. 5, pp. 501–12, May 2009.

[9] J. D. Hayes, M. O. Kelleher, and I. M. Eggleston, "The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates," *Eur. J. Nutr.*, vol. 47, no. SUPPL. 2, pp. 73–88, 2008.

[10] M. Björkman, I. Klingen, A. N. E. Birch, A. M. Bones, T. J. a Bruce, T. J. Johansen, R. Meadow, J. Mølmann, R. Seljåsen, L. E. Smart, and D. Stewart, "Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health--influences of climate, environment and agronomic practice.," *Phytochemistry*, vol. 72, no. 7, pp. 538–56, May 2011.

[11] M. Miyazawa, T. Maehara, and K. Kurose, "Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*," *Flavour Fragr. J.*, vol. 17, no. 3, pp. 187–190, 2002.

[12] G. Graser, N. J. Oldham, P. D. Brown, U. Temp, and J. Gershenzon, "The biosynthesis of benzoic acid glucosinolate esters in *Arabidopsis thaliana*," *Phytochemistry*, vol. 57, no. 1, pp. 23–32, May 2001.

[13] A. El-Keblawy and A. Al-Rawai, "Effects of seed maturation time and dry storage on light and temperature requirements during germination in invasive *Prosopis juliflora*," *Flora*

- *Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants*, vol. 201, no. 2, pp. 135–143, Feb. 2006.

[14] M. V. Selma, A. Martínez-Sánchez, A. Allende, M. Ros, M. T. Hernández, and M. I. Gil, "Impact of organic soil amendments on phytochemicals and microbial quality of rocket leaves (*Eruca sativa*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 14, pp. 8331–8337, 2010.

[15] J. Yamamoto, K. Yamada, A. Naemura, T. Yamashita, and R. Arai, "Testing various herbs for antithrombotic effect," *Nutrition*, vol. 21, no. 5, pp. 580–587, 2005.

[16] S. J. Kim, K. Chiami, and G. Ishii, "Effect of ammonium: Nitrate nutrient ratio on nitrate and glucosinolate contents of hydroponically-grown rocket salad (*Eruca sativa* Mill.)," *Soil Sci. Plant Nutr.*, vol. 52, no. 3, pp. 387–393, 2006.

[17] C. López-Berenguer, M. C. Martínez-Ballesta, C. García-Viguera, and M. Carvajal, "Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli," *Plant Sci.*, vol. 174, no. 3, pp. 321–328, 2008.

[18] J. a B. Mølmann, A. L. H. Steindal, G. B. Bengtsson, R. Seljåsen, P. Lea, J. Skaret, and T. J. Johansen, "Effects of temperature and photoperiod on sensory quality and contents of glucosinolates, flavonols and vitamin C in broccoli florets," vol. 172, pp. 47–55, 2015.

[19] Á. R. Arias R., "Biotecnología y metabolitos secundarios de *Lepidium peruvianum* Chacón. 'MACA,'" Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2002.