



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina

Área de Nutrición y Bromatología

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Nutrición Humana y Dietética

CURSO ACADÉMICO 2020-2021

“Sulforafano: Estructura y propiedades”

Autor: Elías José Verdugo Almeida

Tutora: María del Pilar Jiménez López

Agradecimientos

A mi familia, porque yo soy yo y mi circunstancia, y sin ellos no estaría donde estoy. Gracias por enseñarme que el camino a seguir, depende del sitio al que quieras llegar, si caminas lo suficiente.

Índice de contenidos

Índice de tablas	4
Índice de Figuras	5
Índice de abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción	10
2. Justificación	13
3. Objetivos	15
4. Marco teórico	16
4.1. Glucosinolatos como compuesto fitoquímicos	16
4.2. Hidrólisis de glucosinolatos a isotiocianatos	19
4.3. Biotransformación de glucosinolatos en el aparato digestivo.....	21
4.4. El sulforafano	23
4.4.1. Estructura	24
4.4.2. Sulforafano nitrilo	25
4.4.3. Posología y dosificación	26
4.4.4. Función principal	27
4.4.4.1. Propiedades anticancerígenas.....	29
4.5. Métodos de almacenamiento de crucíferas	30
4.5.1. Refrigeración.....	30
4.5.2. Congelación.....	31
4.6. Métodos de cocinado de crucíferas	33
4.6.1. Microondas.....	34
4.6.2. Hervido.....	37
4.6.3. Vapor.....	40
4.6.4. Comparativa de los métodos de cocinado	42
5. Conclusiones	44
6. Bibliografía	45

Índice de tablas

Tabla 1. Comparativa de la biodisponibilidad por consumo oral, de los polifenoles más comúnmente usados en suplementación	11
Tabla 2. Contenido de glucosinolatos en brotes de brócoli.....	23
Tabla 3. Cantidad de sulforafano presente en brotes de brócoli durante su germinado.....	26
Tabla 4. Cantidad de sulforafano presente en 5 cabezas distintas de brócoli	26
Tabla 5. Contenido de sulforafano durante almacenamiento a 6 ° C, a lo largo de 35 días.....	31
Tabla 6. Brócoli blanqueado a 76 ° C durante 146 s, posteriormente congelado a – 80 ° C, y con la adición durante el descongelado de daikon (rábano japonés), con diferentes concentraciones en peso	32
Tabla 7. Efecto de la temperatura en la pérdida de actividad enzimática de la mirosinasa en brócoli, durante 145 s de blanqueado previa congelación	33
Tabla 8. Contenido de glucofaranina y sulforafano, mediante tratamiento térmico con microondas	36
Tabla 9. Contenido de sulforafano (barras grises) y contenido de sulforafano nitrilo (barras blancas), tras tratamiento térmico con microondas (900 W), en diferentes periodos de tiempo	37
Tabla 10. Actividad residual de la mirosinasa en el brócoli, tras tratamiento térmico.....	38
Tabla 11. Actividad residual de la mirosinasa en semillas de mostaza, tras tratamiento térmico	38
Tabla 12. Efecto del tratamiento térmico (hervido) en el contenido de glucorafanina en el brócoli	39
Tabla 13. Contenido de sulforafano nitrilo tras tratamiento térmico	39
Tabla 14. Contenido de sulforafano tras tratamiento térmico	40
Tabla 15. Contenido de sulforafano en brocoli hervido tras la adición de semillas de mostaza.....	40

Tabla 16. Actividad de la mirosinasa en brocoli crudo y al vapor	41
Tabla 17. Contenido en glucorafanina de las variedades de brocoli booster y marathón, con diferentes métodos de cocinado	41
Tabla 18. Impacto del cocinado en la formación de sulforafano, y en la formación de nitrilo	42
Tabla 19. Resumen de los principales métodos de cocinado y su influencia en la formación de sulforafano.	44

Índice de Figuras

Figura 1. Hidrólisis de glucorafanina catalizado por la enzima mirosinasa	12
Figura 2. Estructura química de un glucosinolato	16
Figura 3. Estructura química de la glucorafanina	16
Figura 4. Elementos generados en la reacción de hidrólisis de un glucosinolato, catalizado por la enzima mirosinasa	17
Figura 5. Liberación de mirosinasa, tras la rotura mecánica o química del tejido fibroso de una crucífera	17
Figura 6. Formación de una aglicona, reacción de hidrólisis de un glucosinolato, catalizado por la enzima mirosinasa.....	18
Figura 7. Mecanismo de formación de un isotiocianato.....	18
Figura 8. Conversión de glucorafanina en una aglucona y posteriormente en sulforafano y nitrilo	19
Figura 9. Resumen del metabolismo humano de los glucosinolatos	22
Figura 10. Metabolización del sulforafano hasta ser excretado por la orina, por la ruta del ácido mercaptúrico.....	22
Figura 11. Síntesis de sulforafano por la hidrólisis de la glucorafanina por la enzima mirosinasa.....	23
Figura 12. Estructura química del sulforafano	24
Figura 13. Mecanismo de formación del sulforafano nitrilo en vegetales crucíferos	25

Figura 14. Factor de transcripción Nrf2, inducido por el sulforafano	27
Figura 15. Mecanismo de inducción del factor Nrf2 para la expresión de genes de Fase II.....	28
Figura 16. Proteínas y enzimas generadas tras la activación del factor Nrf2	28
Figura 17. Mecanismo quimioprotector del sulforafano en las células humanas	29
Figura 18. Mecanismo quimioterapéutico del sulforafano en las células cancerosas.....	30

Índice de abreviaturas

SF = Sulforafano

SF-N= Sulforafano nitrilo

GLS = Glucosinolatos

GRA = Glucorafanina

MYR = Mirosinasa

ESP = *Epithiospecifier protein*

ITCs = Isotiocianatos

Resumen

El procesado y el cocinado afectan a la cantidad de glucosinolatos presentes en los vegetales de la familia *Brassicaceae*. Estos vegetales, han demostrado tener un gran potencial inductor anticancerígeno, gracias a un compuesto presente en ellos, el sulforafano, el cual proviene de la hidrólisis de un glucosinolato en concreto, la glucorafanina. Esta hidrólisis se cataliza por una enzima, llamada mirosinasa, la cual es sensible a temperaturas por encima de 60 ° C o por debajo de - 20 ° C, por lo que el cocinado juega un papel importante en el proceso de formación del sulforafano. El uso de microondas, hervido y vapor, antes de la ingesta, incrementan el contenido de glucorafanina, y la formación de sulforafano, permitiéndonos de esta manera, obtener los mayores beneficios de este compuesto para la salud.

Palabras clave: sulforafano, mirosinasa, glucorafanina, glucosinolatos, cocinado.

Abstract

Processing and cooking affect the amount of glucosinolates present in vegetables of the *Brassicaceae* family. These vegetables have shown to have a great anticancer inducing potential, thanks to a compound present in them, the sulforaphane, which comes from the hydrolysis of a specific glucosinolate, glucoraphanin. This hydrolysis is catalyzed by an enzyme, called myrosinase, which is sensitive to temperatures above 60°C or below – 20 ° C, so cooking plays an important role in the formation of sulforaphane. The use of microwaves, boiling and steam, before ingestion, increases the content of Glucoraphanin, and the formation of Sulforaphane, thus allowing to reach the greatest health benefits of this compound.

Keywords: *sulforaphane, myrosinase, glucoraphanin, glucosinolates, cooking.*

1. Introducción

Las plantas de la familia *Brassicaceae* (*Brasicáceas*), también llamadas *Cruciferae* (Crucíferas), posee una diversidad de 350 géneros y 3500 especies. El género *Brassica* parece ser el más estudiado dentro de la familia *Brassicaceae*. La especie más grande, *Brassica oleracea*, incluye vegetales tales como brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica*), kale (*Brassica oleracea* var. *Sabellica*), coliflor (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) y repollo (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) entre otras crucíferas comestibles; el consumo de esta especie, es la que aporta, mayores beneficios para la salud.¹

Los efectos beneficiosos de los vegetales del género *Brassica oleracea*, se deben a sus compuestos fitoquímicos, los glucosinolatos (GLS), los cuales han demostrado en humanos, prevenir el estrés oxidativo, inducir la detoxificación enzimática, estimular el sistema inmune, y disminuir el riesgo de cáncer, o en su defecto, una vez instaurado el cáncer, disminuyen la proliferación de células cancerosas.²

Los glucosinolatos, son un grupo de tioglucósidos, localizados en el tejido vegetal de las *brasicáceas*, responsables de la defensa química de la planta una vez convertidos en isotiocyanatos (ITCs), los cuales son tóxicos para herbívoros e insectos.

El GLS de mayor interés en este trabajo es la glucorafanina (GRA), precursor de un ITCs, llamado sulforafano (SF), con un amplio interés descrito por la bibliografía en torno a su efecto anticancerígeno, induciendo la formación de enzimas detoxificantes Fase II, las cuáles protegen frente a carcinógenos.

Los GLS se hidrolizan cuando la planta sufre daños estructurales, de rasgado, rotura, o por acción de los insectos, mediante la liberación en la rotura del tejido, de una enzima llamada mirosinasa (MYR), la cual cataliza la reacción de hidrólisis de los GLS, en ITCs, nitrilos y tiocyanatos. La MYR se encuentra dentro de las células vacuolas, liberándose al igual que los GLS, cuando la planta sufre daños estructurales, como pueden ser el cortado o picado.

Los ITCs, entre los compuestos derivados de la hidrólisis de GLS, han sido los que mayor bioactividad han demostrado tras su administración clínica, tanto en animales como en humanos.³

Más concretamente, dentro de los ITCs, el SF, parece ser el que mayores beneficios acarrea tras el consumo de *brassicáceas*.³

El SF fue descubierto y sintetizado por primera vez por V. Schmidt y P. Karrer en 1948, pero no fue hasta 1992, que Zhang, Talalay y sus colaboradores, reportaron su bioactividad, entre la que destaca como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio y anticarcinógeno.⁴

Los fitoquímicos más usados en la suplementación dietética carecen de biodisponibilidad, es aquí donde el SF destaca con una biodisponibilidad aproximada del 80 %, con un pico máximo en plasma tras su consumo en 1 hora.⁵

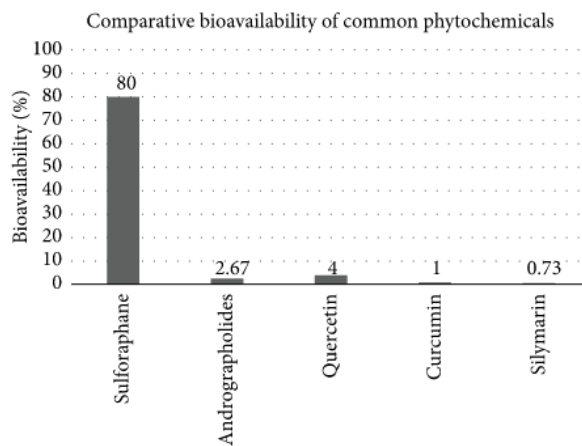


Tabla 1. Comparativa de la biodisponibilidad por consumo oral, de los polifenoles más comúnmente usados en suplementación.⁵

La biodisponibilidad oral de los polifenoles suele ser de menos del 10 %, rondando entre el 2 % y el 10 % en función del compuesto. Sin contar que el cocinado y procesado disminuye el contenido en polifenoles.⁶

A su vez, el SF posee una capacidad significativa superior de inducción de enzimas desintoxicantes fase II, siendo mínima su acción sobre las de fase I, comparado con la quercetina.⁷

El interés de estudio de este trabajo no se haya en la determinación de los beneficios para la salud del SF, (puesto que estos ya han sido ampliamente descritos y revisados), sino en aclarar, la mejor metodología para preservar el mayor porcentaje posible de SF, para que a la hora del consumo de los vegetales *brassicáceos*, seamos

capaces de obtener el mayor rendimiento cuantitativo y por tanto bioactivo de dicho compuesto.

Identificamos el brócoli, más concretamente los brotes jóvenes del brócoli (semillas brotadas de entre 3 y 7 días), como la mejor fuente de SF, puesto que estos poseen, hasta un 90 % de sus GLS en forma de GRA, el precursor del SF. Podemos afirmar que existe casi diez veces más concentración de GRA en brotes jóvenes de germinados de semillas de brócoli (1140 – 1483 mg/100g peso seco) que, en el brócoli ya maduro, con todas sus inflorescencias (45-246 mg/100g peso seco).⁸

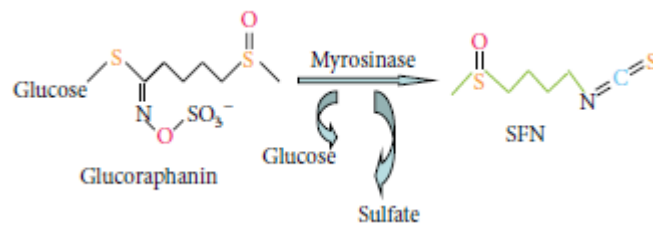


Figura 1. Hidrólisis de la GRA, catalizado por la enzima MYR.⁹

La porción comestible de un brócoli maduro, contiene alrededor de 45-246 µg/g de SF (Materia seca), mientras que los brotes de brócoli poseen alrededor de 1140 – 1483 µg/g (Peso seco) de SF, unas 10 veces más de concentración.¹⁰

No obstante, no somos lo que comemos, sino lo que somos capaces de absorber, y es aquí, donde radica nuestro trabajo de investigación, en el proceso de preparación de los vegetales *brassicáceos*.

2. Justificación

El principal uso del SF, y su efecto más estudiado en la salud, es su potencial de inducción defensiva anticarcinógena. Se ha descrito su potencial en los siguientes tipos de cáncer (piel, pulmón, vejiga, próstata, colon, páncreas, mamas, cabeza, cuello e hígado), así como su efecto neuroprotector y antimicrobiano.¹¹

A continuación, enumeramos los mecanismos probados científicamente, entorno a la prevención de diferentes enfermedades:

- Alteración del metabolismo de los carcinógenos, debido a los cambios que provoca el SF en la actividad de las enzimas citoprotectoras. Disminuyen por tanto la activación de procarcinógenos.¹²
- Reducción del crecimiento tumoral, activando la detención del ciclo celular de células cancerosas, así como su apoptosis.¹³
- Inhibición de la angiogénesis y metástasis.¹²
- Inducción de cambios en el estatus de metilación de histonas.¹⁴
- Actividad antiinflamatoria (inhibe producción de citocinas), antioxidante e inmunomoduladora.¹⁴
- Efecto antimicrobiano (afecta a sobrecimiento estomacal de *Helicobacter pylori*).¹⁴
- Debido a que el SF es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, también se han descrito efectos neuroprotectores de este compuesto (Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple y ELA).¹⁵

Todos los mecanismos nombrados anteriormente tienen que ver con la activación de las defensas celulares, mediante enzimas detoxificantes, produciéndose un efecto de bloqueo y supresión contra diversas enfermedades. Es decir, induce activación de enzimas de fase II y a su vez inhibe enzimas de fase I (citocromo p450).

Por otro lado, la ingestión de los precursores del SF (los glucosinolatos), por sí solos, no aseguran su biodisponibilidad, debido a que es necesaria su hidrólisis para su conversión en subproductos (SF) con efectos bioactivos.

La hidrólisis de los glucosinolatos (GLS), se lleva a cabo (en su procesado y cocinado), antes de atravesar las vellosidades intestinales, mediante una enzima propia de

los vegetales crucíferos, llamada MYR; también existe la posibilidad, si la microflora del sujeto es la adecuada, de que una pequeña cantidad de GLS sean hidrolizados por algunas cepas de bacterias (las cuales producen la enzima MYR), convirtiéndose en ITCs (SF), que posteriormente serán absorbidos por el sistema digestivo.

En futuras líneas de investigación, podríamos centrar nuestro foco de estudio en el aumento de cepas bacterianas de la microflora intestinal en seres humanos, capaces de sintetizar de forma endógena dicha enzima.

Los procesos culinarios del cocinado de estos vegetales, son muy importantes, en este caso son, la cocción en medio líquido, la cocción al vapor y la cocción en el microondas.

La cocción en medio líquido es un tipo de cocción en la que el medio con el que se transmite el calor al alimento es un fluido acuoso, que puede ser tanto agua como caldo corto o vapor de agua. Como ejemplos tenemos el caso del escaldado que es un tipo de cocción incompleta en agua hirviendo durante un periodo de tiempo muy corto.

Cocido o hervido, que es una cocción del alimento por inmersión en un medio acuoso. El escalfado que es una cocción lenta en medio líquido por debajo del punto de ebullición. La cocción al vapor donde se cocinan alimentos únicamente con vapor de agua realizada a presión normal o a alta presión.

Las cocciones mixtas en las que el medio de cocción puede tener tanto agua como grasa y los tipos son: brasear, cuando se cocina al calor de las brasas. Estofar sería el homónimo anglosajón del braseado. Y guisar que se diferencia entre otros con el braseado en que se cocina con más cantidad de líquido.

La cocción en el microondas que es la operación culinaria en la que los alimentos se calientan por la acción de ondas electromagnéticas de alta frecuencia, en virtud del comportamiento dieléctrico de algunos de sus compuestos. Trabajan a la presión atmosférica y nunca superan los 100°C en el alimento.

3. Objetivos

3.1. Generales

3.1. Conocer el mecanismo de formación del sulforafano.

3.2. Conocer el mejor método de cocinado para obtener la máxima formación de sulforafano en vegetales crucíferos.

3.1 Búsqueda bibliográfica

Para la realización de este trabajo se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva en la base de datos Pubmed, introduciendo los términos que señalamos en tabla 1. Observamos que la especificidad del objetivo de estudio, reduce las fuentes de información disponible, por lo que se deduce la novedad del tema. Futuras líneas de investigación, permitirán seguir avanzando en el conocimiento de este área.

Términos búsqueda	Total	Últimos 10 años		Últimos 5 años	
		Trabajo experimental	Revisión	Trabajo experimental	Revisión
Cooking	16.315	543	159	304	122
Brassica Vegetables	2.784	38	3	22	2
Glucoraphanin	351	25	0	11	0
Sulforaphane	2.421	50	8	27	8
Brassica Vegetables + Cooking	159	8	0	5	0
Glucoraphanin + Cooking	25	0	4	2	0
Sulforaphane + Cooking	16	3	0	2	0

Tabla. Resultados de búsqueda bibliográfica en base de datos Pubmed.

4. Marco Teórico

4.1. Glucosinatos como compuestos fitoquímicos

La principal característica de interés de estudio para este trabajo sobre las crucíferas, es su producción de compuestos ricos en azufre, llamados GLS, y en especial sus derivados. Se conocen alrededor de 130 tipos de GLS, presentes en los vegetales crucíferos.

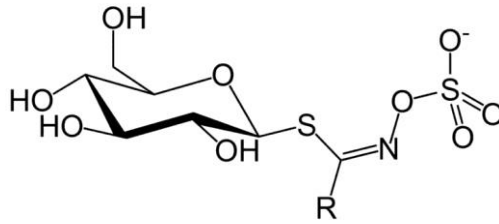


Figura 2. Estructura química de un GLS. El grupo R es variable en función del tipo de GLS.¹⁶

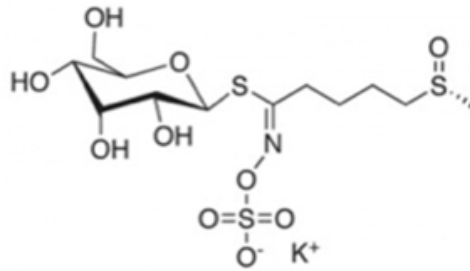


Figura 3. Estructura química la GRA.¹⁷

De manera taxonómica, podemos afirmar que las inflorescencias de los vegetales, son los lugares donde mayor concentración de GLS podemos encontrar, en concreto se localizan en las vacuolas, y sirven como mecanismo de defensa para el vegetal, tras su hidrólisis.

La defensa, se lleva a cabo cuando los GLS, inocuos a simple vista y relativamente estables, se hidrolizan mediante una enzima separada físicamente de estos, la cual se libera, tras la rotura mecánica de los tejidos del vegetal.

Dicha enzima es la tioglucosidasa, también llamada glucohidrolasa tioglucósido (MYR), la cual generará compuestos bioactivos (ITCs, tiocianatos, indoles y nitrilos entre otros).

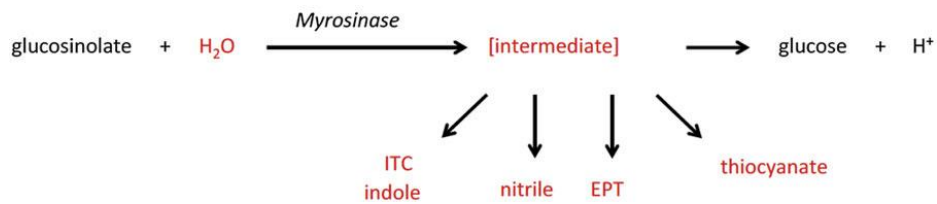


Figura 4. Elementos generados en la reacción de hidrólisis de un GLS, catalizado por la enzima MYR.¹⁶

Estos compuestos bioactivos, son sustancias de sabor amargo (que repelen al agente agresor, animal o insecto) con propiedades antiparasitarias, e insecticidas.¹⁶

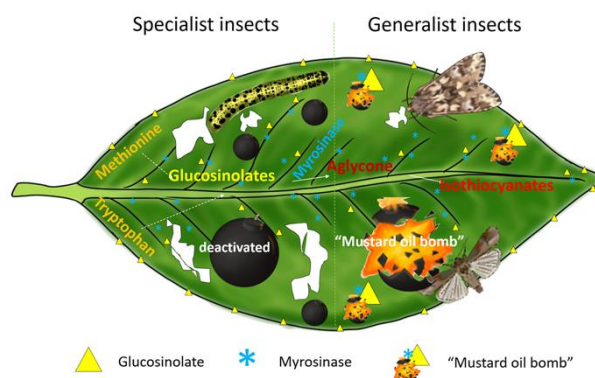


Figura 5. Liberación de MYR, tras la rotura mecánica o química del tejido fibroso de una crucífera.¹⁶

Algunos insectos se han adaptado a lo largo de la evolución para ser capaces de hidrolizar los GLS con sulfatasas, inactivando la llamada, bomba de aceite de mostaza “mustard oil bomb” complejo glucosinolato, mirosinasa (GLS + MYR).

El resto de insectos no adaptados, serían repelidos tras la formación de compuestos tóxicos, (hidrólisis de GLS por la MYR), dichos compuestos no generarían daño tóxico alguno en seres humanos.

Es por ello que, tras su estudio, estos compuestos han resultado ser especialmente beneficiosos para el hombre, tras su consumo.

Nuestro estudio se centrará en un solo tipo de GLS, la GRA (también llamada sulforafano glucosinolato), la cual, tras reaccionar con la MYR, genera una molécula de glucosa, otra de bisulfato y una de aglicona.¹⁸

La reorganización de la aglicona está mediada en función de su estructura, concentración de iones Fe^{2+} y factores proteicos adicionales (ESP), así como el pH.¹⁸

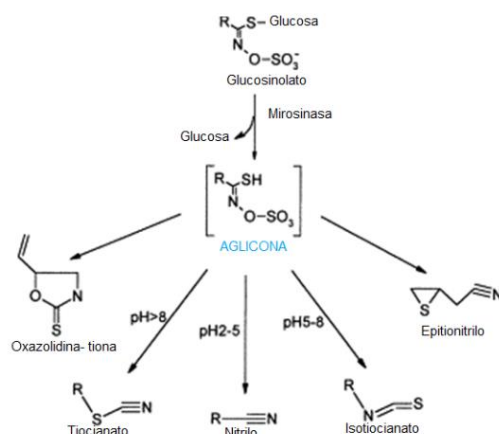


Figura 6. Formación de una aglicona, reacción de hidrólisis de un GLS, catalizado por la enzima MYR.¹⁸

Nuestro ITCs de interés de estudio, es el SF, la aglicona se transformará en SF, únicamente tras la descomposición de un solo tipo de GLS, la GRA, si las condiciones químicas son las adecuadas, es decir, si existe la presencia de mirosinasa a un pH entre 5-8, junto con la ausencia de, Fe^{2+} y ESP (*epithiospecifier protein*).

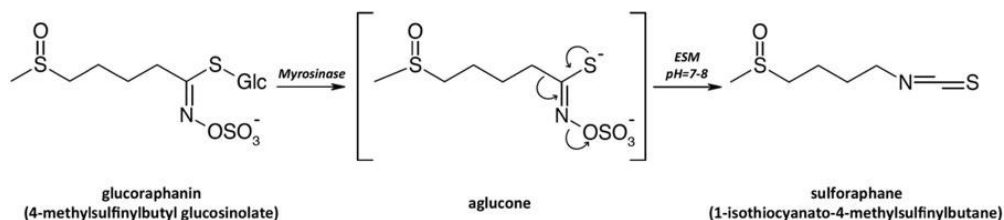


Figura 7. Mecanismo de formación de un ITCs.¹⁸

4.2. Hidrólisis de glucosinolatos a isotiocianatos

La estructura química del GLS, en concreto la cadena lateral (Figura 2), junto con la presencia de la MYR, son factores que afectan los subproductos de la hidrólisis de un GLS.

La variabilidad de los subproductos de esta hidrólisis, a su vez, se ha relacionado con las condiciones químicas de la reacción, siendo el pH, la condición más destacada, formándose nitrilo (pH 2-5), isotiocianato (pH 5-8), o tiocianato (pH mayor de 8). A su vez, factores proteicos como la ESP, y la presencia de iones de Fe^{2+} , favorecerán la formación de nitrilos, en vez de isotiocianatos.

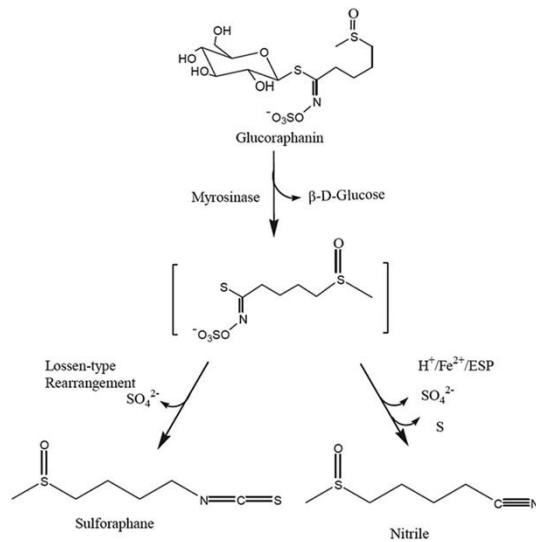


Figura 8. Conversión de GRA en una aglicona, y posteriormente en SF y nitrilo.¹⁹

En la hidrólisis de la GRA, en función de las condiciones químicas, obtendremos en mayor o menor medida los subproductos de SF y nitrilo. A diferencia del SF, el nitrilo no presenta efectos beneficiosos para el ser humano. Por ello, la optimización del proceso de hidrólisis debe ser clave.

Los ITCs serán los subproductos dominantes a un pH mayor de 5, pero los nitrilos se formarán a un pH menor de 4, o en su defecto con la presencia de niveles elevados de Fe^{2+} y ESP.²⁰

La GRA será nuestro GLS de interés de estudio, existen dos maneras de hidrolizarla para que esta se convierta en un ITCs.

La primera manera, es la mencionada anteriormente a través de la enzima MYR, y la segunda es a través de la flora intestinal de los seres humanos (*Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, y *Escherichia*).²¹

La hidrólisis de GRA a través de la flora intestinal, requiere de unas condiciones específicas en las que el pH tiene que ser mayor de 5, para ser hidrolizada más del 80 %, de esta. Es por ello que, combinar el consumo de crucíferas con alimentos que contengan gran cantidad de ácidos en su matriz, como la vitamina C (en su forma de ácido ascórbico) inhiben la formación de SF.

Existe la creencia de que los ITCs, poseen una función goitrógena, en patologías con disfunción en las hormonas tiroideas, debido a que se generaría una sustancia que puede impedir que la tiroides fabrique las hormonas adecuadas ya que estos compuestos interferirían en su función, sin embargo, esta función goitrógena, ha sido desmentida a día de hoy, por lo que parece seguro el consumo de vegetales crucíferos para este tipo de patologías.²²

No obstante, la influencia sobre el sistema del citocromo P-450 (ruta de metabolización de diversos medicamentos), está siendo aún estudiada, por lo que esto debe ser tenido en cuenta, pese a las múltiples funciones positivas en el organismo de los ITCs.

4.3. Biotransformación de glucosinolatos en el aparato digestivo

Hay muy poca información sobre biotransformación de GLS en el hígado. En futuras líneas de investigación podríamos considerar el estudio del papel que desempeñan diferentes cepas de bacterias de la microflora intestinal, en el metabolismo de los GLS, al igual que la influencia de algunas proteínas con funciones similares a la MYR.

Los GLS, en función de su tipo, poseen diferentes estructuras químicas, por lo que su degradación en el intestino dependerá de esto. No obstante, un factor importante común a todos ellos es la actividad o inactividad de la enzima MYR, la cual se asocia con el tipo de técnica culinaria utilizada, es decir, el tipo de cocinado.²³

La mayoría de las personas consumen los vegetales cocinados, esto provoca una desnaturalización de la MYR. Remarcamos que la desnaturalización, puede ocurrir en diferentes grados, dependiendo de la temperatura de cocinado, cantidad de agua presente en el cocinado, vapor desprendido, o si por el contrario se cocina con microondas.²³

En términos generales, la MYR se inactiva ante una exposición de temperatura superior de 60 ° C, la actividad de la MYR determinará la cantidad de productos hidrolizados de los GLs.²⁴

Para cerrar esta introducción, conviene que describamos de manera muy resumida, la ruta que seguiría un GLS.

Tras ser ingerido, sería hidrolizado por la flora intestinal o por la MYR propia del vegetal (si no se ha desactivado dicha enzima en el cocinado), convirtiéndose en un ITCs, en nuestro caso de estudio, este ITCs, si el GLS ingerido fuese la GRA, sería el SF.

El SF, se absorbería en el intestino delgado y colon, y podríamos detectarlo en la orina, unas 2-3 horas después de haber consumido crucíferas, siempre y cuando el contexto de cocinado de estos vegetales sea el óptimo.

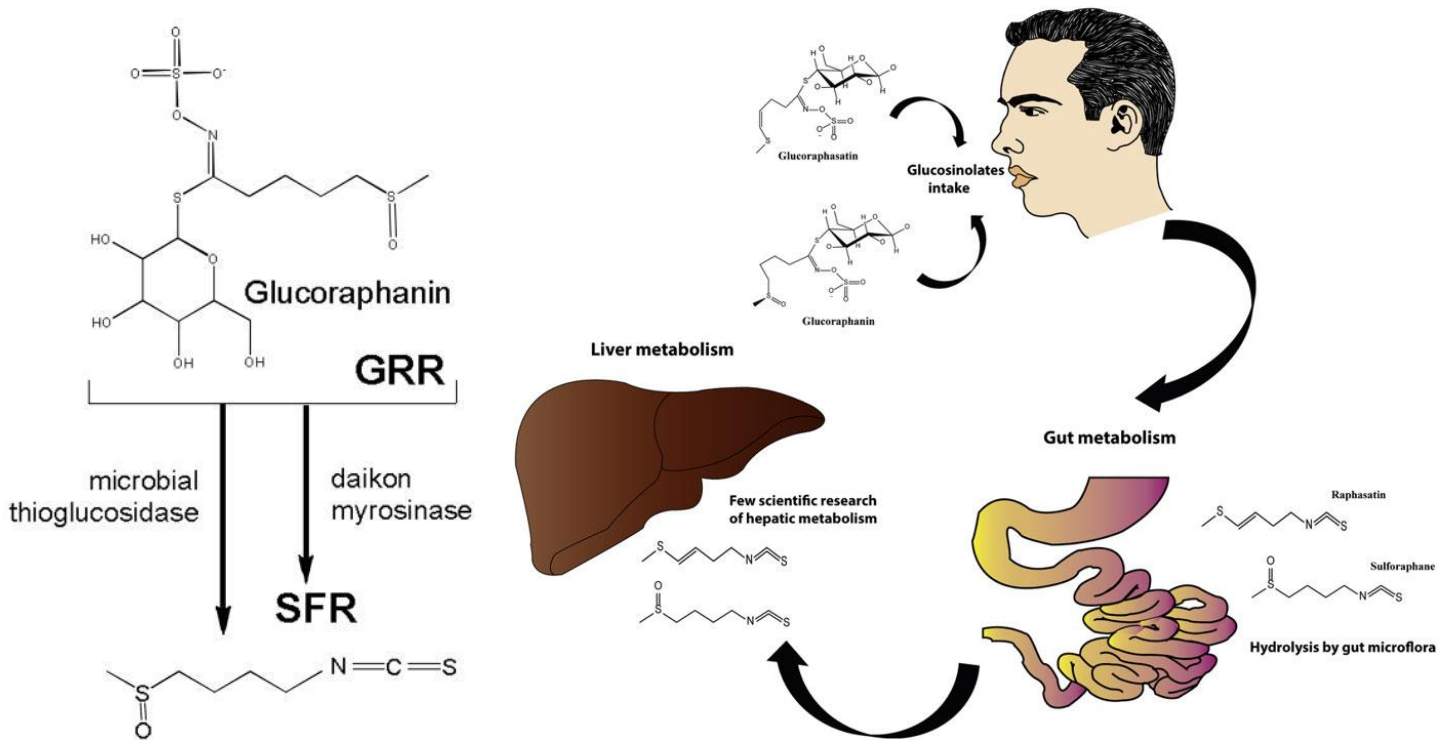


Figura 9. Resumen del metabolismo humano de los GLS.²⁵

Sulforaphane

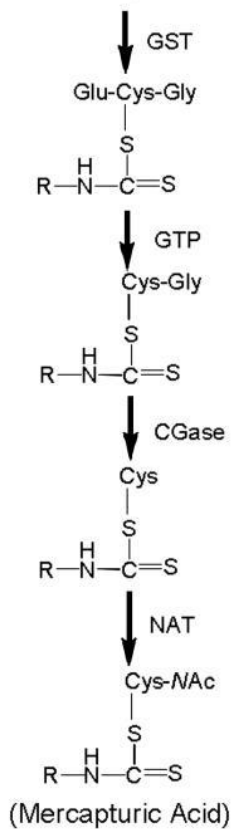


Figura 10. Metabolización del SF hasta ser excretado por la orina, por la ruta del ácido mercaptúrico.²⁶

4.4. El Sulforafano

Dentro de la familia de las *Brasicáceas*, el género *Brassica*, y más concretamente la especie *Brassica oleracea*, parecen ser las que mayor cantidad de GRA poseen, destaca la especie *Brassica oleracea var. Itálica*, es decir, el brócoli, con hasta un 90 % de sus GLS en forma de GRA, la cual es precursora del SF.²⁷

La bioactividad de las *brasicáceas*, depende de una doble presencia de, en primer lugar, una molécula precursora, los GLS, y, en segundo lugar, de una enzima, la MYR, la cual hidroliza los precursores. El producto obtenido de esta hidrólisis será un ITCs, dependiendo del tipo de GLS, este ITCs, variará en su forma final.

Nuestro trabajo se centra en el SF, ITCs sintetizado por el GLS, GRA.

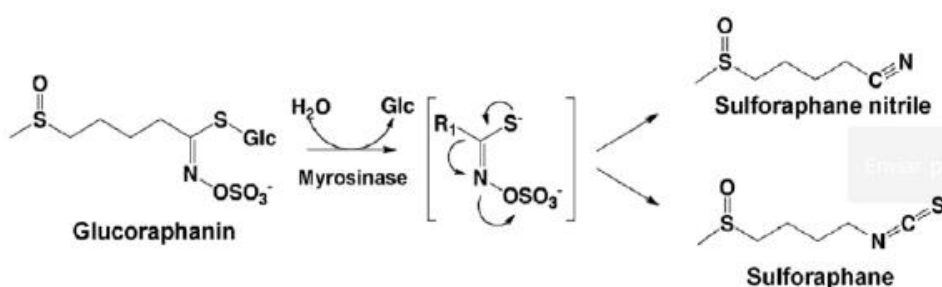


Figura 11. Síntesis de SF por la hidrólisis de la GRA por la enzima MYR.⁵

Antes hemos mencionado que el brócoli, es el vegetal crucífero con mayores niveles de GRA de todos los de su especie, a lo largo del crecimiento del brócoli, los niveles de GRA varían, siendo la etapa de germinado, (etapa en la que la semilla desarrolla brotes jóvenes, en la primera semana de germinado) cuando mayores niveles de GRA podemos encontrar.

GSLs alifáticos		GSLs indólicos	
	μmol/g brócoli seco		μmol/g brócoli seco
GIB	1,6 ± 0,1	4-OHGBS	2,7 ± 0,1
GRA	43,6 ± 0,6	GBS	0,7 ± 0,0
GER	13,1 ± 0,1	4-OMeGBS	0,8 ± 0,0
		NeoGBS	1,0 ± 0,1
Total	58,3 ± 0,8	Total	5,2 ± 0,2

Tabla 2. Contenido de GLS en brotes de brócoli, germinados durante una semana, GSLs: glucosinolatos, GRA: glucorafanina.²⁸

4.4.1. Estructura

El SF es una molécula de pequeño tamaño, y bajo peso molecular, este hecho es el que confiere a nuestra molécula de estudio algunas ventajas que la hacen única y diferente frente al resto, dándole ventaja sobre otros fitoquímicos, como los polifenoles los cuales son de estructura grande e hidrofílicos, mientras que el SF es lipofílico y de estructura pequeña, este hecho hace que su biodisponibilidad aumente en relación con los polifenoles.

Si comparamos la biodisponibilidad de los polifenoles, esta se sitúa entre un 1 y un 10 % en función del tipo, mientras que el SF posee una biodisponibilidad alrededor del 80 %.⁵

Para considerar a una molécula como óptima y adecuada para afectar a la expresión génica, debe destacar por su gran biodisponibilidad, puesto que el camino que debe seguir hasta las células diana, es largo, atravesando diferentes membranas empezando por la del epitelio intestinal.

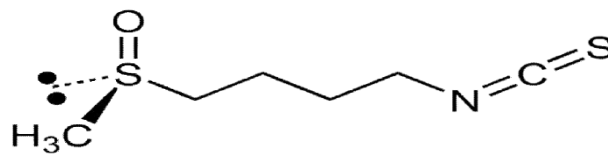


Figura 12. Estructura química del SF (C₆H₁₁NOS₂).⁵

4.4.2. Sulforafano nitrilo

Como hemos visto anteriormente, el contexto químico de la reacción, desencadenará un tipo de compuesto distinto de la reacción de hidrólisis entre la GRA y la MYR.

En condiciones normales, la ESP, es un cofactor de la MYR, la cual disminuye la formación de SF y deriva la ruta de hidrólisis hacia sulforafano nitrilo (SF-N), un compuesto parecido al SF, pero sin ninguna propiedad bioactiva en el cuerpo humano.

Para inactivar la ESP, y aumentar la formación de SF, tan solo debemos inactivar a esta proteína, la cual si es sometida a temperaturas por encima de 50 ° C decrece casi por completo su actividad.²⁹

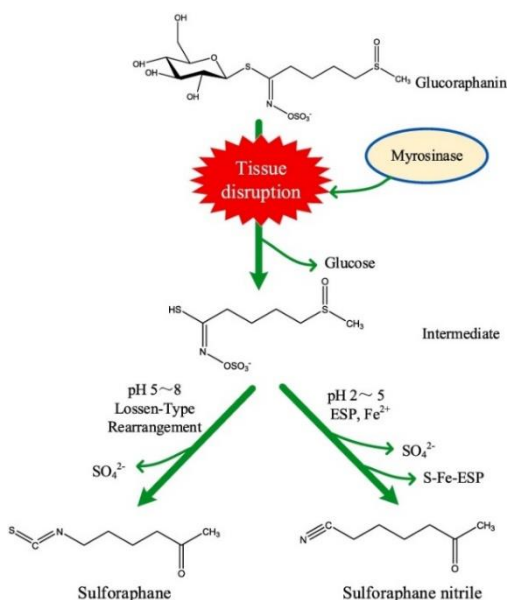


Figura 13. Mecanismo de formación del SF-N en vegetales crucíferos.³⁰

Por otro lado, para evitar la inactivación de la enzima MYR, se estudió su rango de actividad sometiéndola a distintas temperaturas, observándose su mayor actividad alrededor de 60-65 ° C, siendo inactivada por encima de estas temperaturas, y desnaturizándose por completo por encima de 100 ° C.²⁹

Esto nos da las claves, para encaminar el cocinado de nuestras crucíferas con el fin de maximizar la formación de SF.

4.4.3. Posología y Dosificación

No existen estudios que nos permitan validar la seguridad a largo plazo del uso de este compuesto, el más largo que hemos encontrado en seres humanos (doble ciego), data de 8 meses de duración, con una dosis diaria de 60 mg de SF, en 78 pacientes con niveles alterados de PSA, y no se detectó ningún efecto adverso, más que alguna molestia gastrointestinal, en un paciente aislado.³¹

Algunos investigadores han tratado de dilucidar la línea que separa la dosis segura, de la tóxica. En un estudio, se administró a 48 ratones diferentes dosis durante 14 días, dividiéndolos en grupos de 8, se les administraron dosis de 400, 300, 225, 170 y 125 mg/kg. Tras las 24 primeras horas de administración, murieron los 8 ratones a los que se les administró 400 mg/kg, siete ratones a los que se les administró 300 mg/kg, cuatro ratones a los que se les administró 225 mg/kg, y dos ratones a los que se les administró 170 mg/kg. Los ratones a los que se les administró los 125 mg/kg/día sobrevivieron al estudio de los 14 días, sin ningún tipo de alteración física ni mental.³²

Asumiendo que la hidrólisis de GRA es completa, si tomamos una ración de 40 gramos de brotes de brócoli y sabiendo que la cantidad de SF por gramo de brote de brócoli es de 1,5 mg, con esta ración tendríamos un total de 60mg de SF. En el caso de tomar 240 gramos de brócoli, y sabiendo que la cantidad de SF en el brócoli es de 0,25 mg de SF por gramo de brócoli tendríamos también los 60mg de SF y obtendríamos todos los efectos profilácticos del SF en el día.

Germination time (days)	Sulforaphane ($\mu\text{g g}^{-1}$ of dry matter)
0 (seeds)	3631.91 \pm 14.16 ^a
3	534.62 \pm 0.96 ^d
5	336.32 \pm 6.75 ^e
8	1055.13 \pm 9.68 ^c
11	1483.76 \pm 0.65 ^b

Tabla 3. Cantidad de SF presente en brotes de brócoli durante su germinado.³³

	Cabeza	Inflorescencia	Tallo	Hoja	Cabeza entera
1		448,35	250,58	313,91	195,30
2		513,69	202,33	495,86	267,28
3		218,93	154,43	239,04	108,82
4		634,02	234,62	430,71	297,68
5		683,27	231,82	437,50	359,02
Promedio		499,65 \pm 183	214,75 \pm 38	383,40 \pm 104	246,21 \pm 97

Tabla 4. Cantidad de SF ($\mu\text{g/g}$ peso seco) presente en 5 cabezas distintas de brocoli.³⁴

4.4.4. Función principal

Las dianas moleculares de este compuesto siguen siendo investigadas, no obstante, la que mejor se ha descrito es la que involucra al factor de transcripción Nrf2 (factor eritroide 2 nuclear), precisamente porque el SF parece ser a día de hoy el inductor natural más potente de Nrf2.²⁶

El SF activa Nrf2 mediante la reacción con Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch), Keap1 en condiciones de homeostasis se mantiene unida a Nrf2, inhibiéndola.

Una vez liberado el factor de transcripción Nrf2, se traslada al núcleo de la célula, donde estimula la expresión de genes al unirse a una secuencia del ADN llamada ARE (elemento de respuesta antioxidante), cuyos productos están involucrados en la defensa antioxidante y en las reacciones de detoxificación de fase II.³⁵

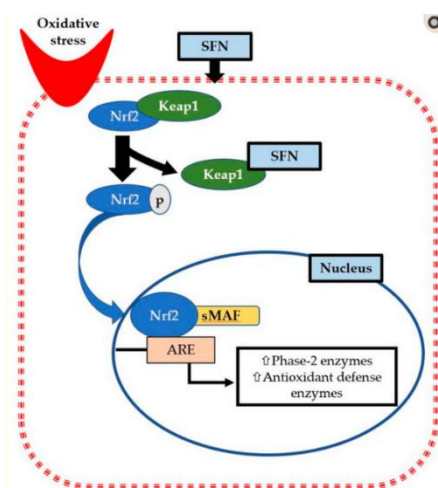


Figura 14. Factor de transcripción Nrf2, inducido por el SF.³⁶

A día de hoy se han identificado más de 500 genes que son activados por el SF a través de la vía Nrf2/ARE.³⁵

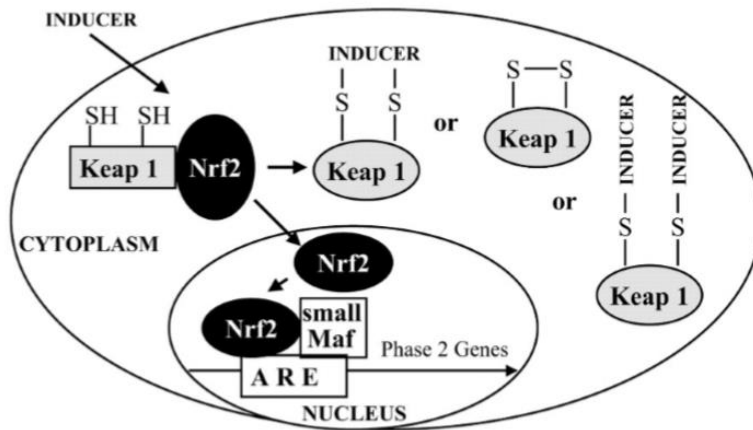


Figura 15. Mecanismo de inducción del factor Nrf2 para la expresión de genes de Fase II.³²

Estos genes codificarán, entre otros los siguientes productos con gran interés antioxidante y antiinflamatorio, HO1: hemo oxigenasa-1, NQO1: fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina, NADPH): quinona oxidoreductasa-1, SOD: superóxido dismutasa, TRX-1: tiorredoxina 1, GSTM-1: Glutatión-S-transferasa M 1.

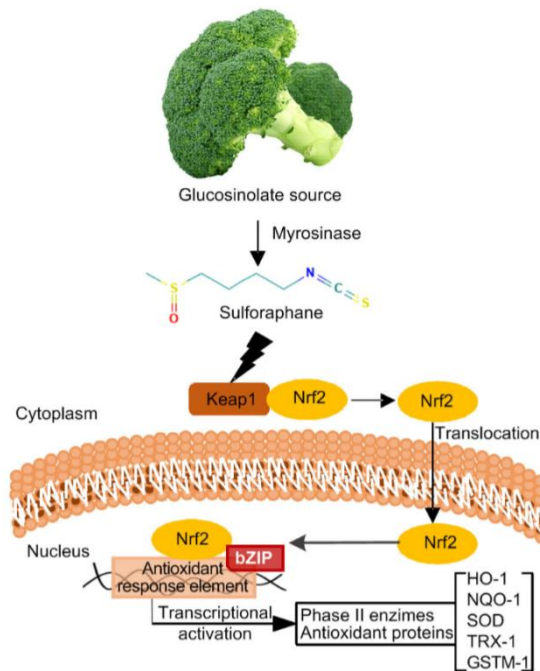


Figura 16. Proteínas y enzimas generadas tras la activación del factor Nrf2.³⁵

4.4.4.1. Propiedades anticancerígenas

El SF es conocido como el compuesto anticancerígeno más potente y prometedor a día de hoy. Las bondades de este compuesto, se basan en su capacidad para actuar en diferentes etapas del cáncer, desde su desarrollo hasta su progresión.

Gracias a su efecto pleiotrópico, causa modificaciones epigenéticas en genes involucrados en la reparación de daños del ADN, apoptosis y proliferación celular.

De esta manera, nos encontramos ante un doble efecto, quimioprotector y quimioterapéutico.

El efecto quimioprotector, se basa en su capacidad de detoxificación celular, por la inducción del factor de transcripción Nrf2 y Nfκβ, estimulando la producción de enzimas de Fase II e inhibiendo las de Fase I.

El aumento de la expresión de glutatión, mediado por el factor de transcripción Nrf2, facilitaría el balance redox en las células, permitiendo mantener su homeostasis.

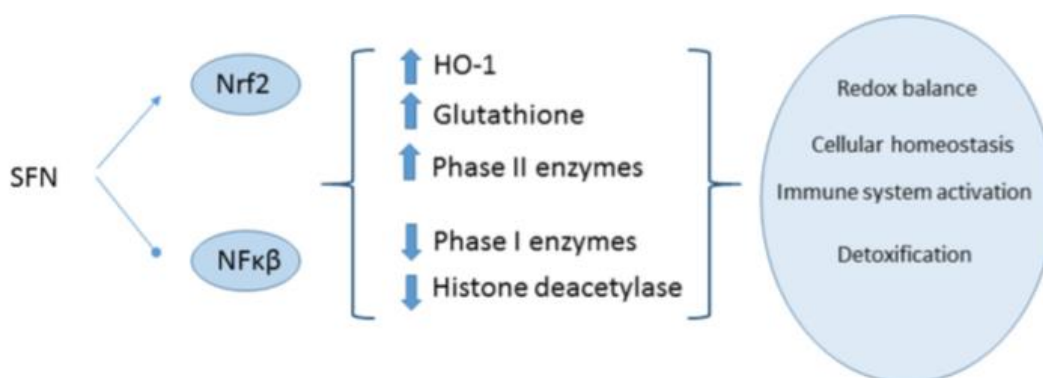


Figura 17. Mecanismo quimioprotector del SF en las células humanas.³⁷

En cuanto a su efecto quimioterapéutico, el SF actúa activando proteínas proapoptóticas y reparadoras del ADN, suprimiendo la desacetilación de histonas, e inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias.

En este ámbito la detoxificación generada por la activación del factor de transcripción Nrf2, jugaría un papel igual de importante que en la prevención.

No obstante, la función quimioterapéutica, parece ser dosis-dependiente, por lo que la posología juega un papel determinante. Para observar estos efectos, la concentración mínima de SF debe ser de 60 mg de SF.³⁷

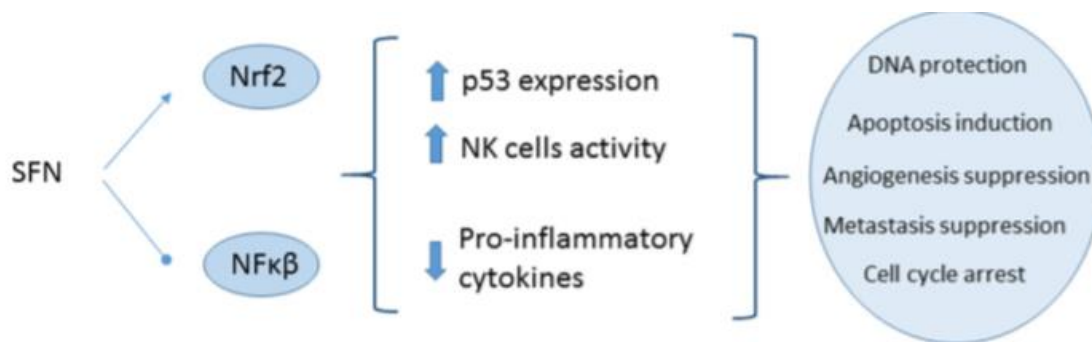


Figura 18. Mecanismo quimioterapéutico del SF en las células cancerosas.³⁷

De manera resumida podemos concluir con las siguientes afirmaciones al respecto de las propiedades anticancerígenas del SF:

- Desactivación preventiva de enzimas Fase I (convierten procarcinógenos en carcinógenos).³⁷
- Activa enzimas Fase II (detoxificación).³⁷
- Aumenta la expresión del gen NQ01 (detoxificación).³⁷
- Previene la degradación de la proteína supresora de tumores p53.³⁷
- Previene la formación de aductos en el ADN.³⁷

4.5. Métodos de almacenamiento de crucíferas

4.5.1. Refrigeración

La refrigeración a 6 ° C, no muestra una pérdida significativa del contenido de SF, en muestras de brócoli, hasta la cuarta semana de almacenamiento, siendo significativa esta pérdida a partir de los 35 días de almacenamiento, esto parece justificarse por una pérdida en el peso del alimento de hasta un 10 %, en el cual la pérdida de agua, y en ella nuestros compuestos, juega un papel importante.³⁸

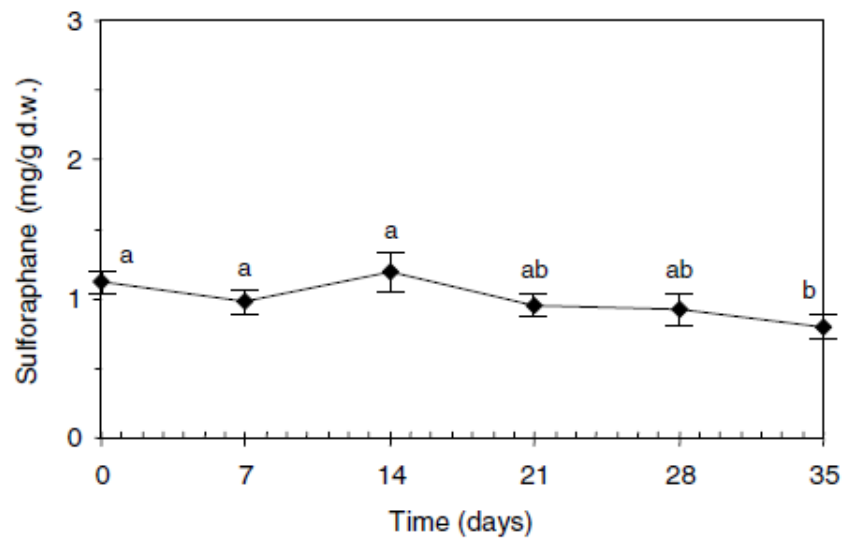


Tabla 5. Contenido de SF durante almacenamiento a 6 ° C, a lo largo de 35 días.³⁸

4.5.2. Congelación

Durante el congelado el volumen de agua del alimento se expande, formando cristales, puesto que el estado sólido del agua posee más espacios vacíos en su estructura, comparado con el estado líquido.

Dependiendo de la temperatura de congelación, la formación de cristales será más rápida, lo que inducirá a una formación de cristales más pequeños y menos destructivos con respecto a la integridad de la célula.

La contracción interna seguida de la expansión posterior provocada por la congelación facilita la liberación de la MYR (rotura de membranas en las vacuolas) para que esta entre en contacto con la GRA en el brócoli, durante el proceso de descongelado, siendo aquí donde se produciría la hidrólisis.³⁹

No obstante, el problema del congelado, parece ser el blanqueamiento necesario para inactivar lipooxigenasas y peroxidases; este blanqueamiento desnaturaría por completo la actividad de la MYR endógena del brócoli, no obstante, siempre podríamos añadir una fuente exógena de MYR, como la presente en la mostaza, wasabi o daikón, en una proporción tan pequeña como un 1 % de peso con respecto a la cantidad de brócoli que querríamos estimular la formación de SF, es decir, 1 gramo de semillas de mostaza machacadas, sería suficiente para estimular la formación SF de una ración de 100 gramos de brócoli, siempre y cuando la ESP haya sido correctamente inactivada mediante tratamiento térmico en el brócoli; la ESP no parece ser abundante en la mostaza, wasabi y daikón, por lo que excluiríamos de la ecuación térmica a estos, y podríamos añadirlos en crudo a la mezcla.⁴⁰

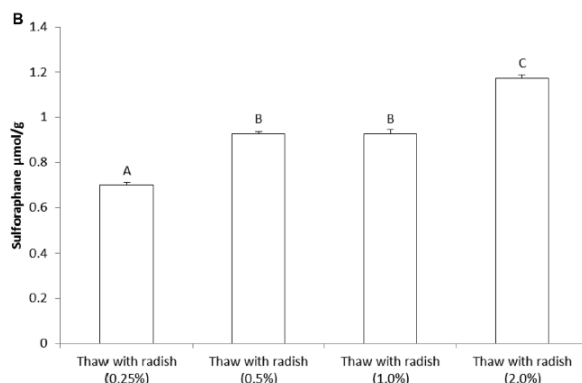


Tabla 6. Brócoli blanqueado a 76 ° C durante 146 s, posteriormente congelado a – 80 ° C, y con la adicción durante el descongelado de daikón (rábano japonés), con diferentes concentraciones en peso.⁴¹

Reduciendo la temperatura del blanqueado a 76 ° C, en vez de 100 ° C, conseguiríamos inactivar más del 93 % de las enzimas lipooxigenasas, dejando activas más del 87 % de las peroxidases, preservando hasta un 82 % de la capacidad para formar SF del brócoli.⁴¹

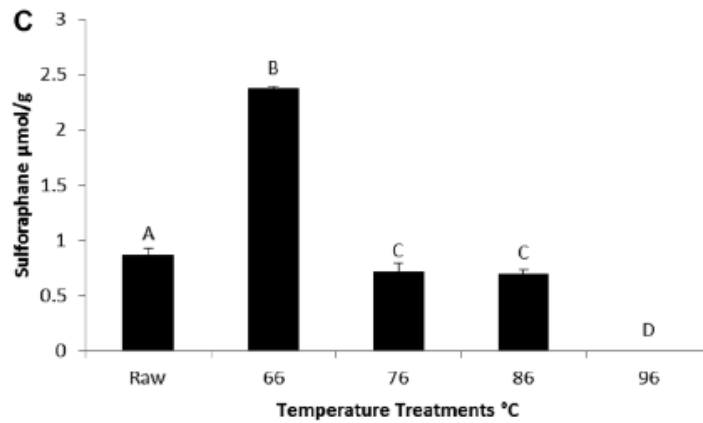


Tabla 7. Efecto de la temperatura en la pérdida de actividad enzimática de la MYR en brócoli, durante 145 s de blanqueado previa congelación.⁴¹

La MYR, parece seguir estando activa sometida a una congelación de -20 ° C, durante al menos 90 días. Es por ello que, tras usar métodos de ultracongelación, a temperaturas inferiores de -20 ° C, la enzima MYR se desnaturizaría, siendo necesaria la adición de MYR exógena para catalizar la hidrólisis de GRA.⁴¹

4.6. Métodos de cocinado de crucíferas

Se ha observado que los métodos de cocinado de las verduras crucíferas afectan a los niveles de GLS y por tanto a la formación de SF. Nos centraremos en el brócoli y los brotes de brócoli, por ser los que mayores concentraciones de GRA poseen.

El brócoli se suele consumir, previo cocinado con tratamientos térmicos, siendo los más comunes el Hervido, Vapor y Microondas.

Todos estos métodos de procesado y cocinado, pueden inducir pérdidas en nuestro compuesto de estudio, bien por degradación térmica de los GLS, o bien debido a la desaparición de la compartimentación celular en el vegetal, provocando la mezcla entre GLS con la MYR, perdiéndose por el traspaso de estos compuestos hacia el agua de cocción, o por pérdidas mediante evaporación.

Otro de los problemas que surge, es la existencia de un cofactor de la MYR, llamada ESP, la cual induce la formación de nitrilo, en vez de SF, afectando por tanto a la ratio de formación de SF-N.

Sabemos que la ESP, influencia directamente la formación de productos de la reacción de hidrólisis de la MYR, redirigiendo la formación hacia nitrilos y que su mecanismo bioquímico, ha demostrado ser dependiente de la presencia de iones de Fe^{2+} , sin embargo, más allá de estos datos, se desconocen sus interacciones y efectos, debido a que la estructura química de la ESP no ha sido caracterizada del todo, y las agliconas son muy inestables para llevar a cabo trabajos de investigación experimental.

En cuanto a la sensibilidad térmica, la ESP es más sensible al calor que la MYR, por lo que el cocinado se hace necesario para desactivar esta proteína, y exacerbar al máximo la producción de SF.⁴²

4.6.1. Microondas

El principio del procesado del microondas se basa en la fricción intramolecular, esto permite calentar alimentos en un periodo de tiempo menor, si lo comparamos con el hervido y vapor.

Los principios que buscamos combatir, son la lisis celular, difusión pasiva hacia medio externo, y la inactivación de la MYR, puesto que todo esto desencadenará pérdidas de GLS y, por lo tanto, menor formación de SF.

La temperatura de desnaturalización de la MYR, está ligeramente por encima de los 90 ° C, mientras que la temperatura de desnaturalización de la ESP, está ligeramente por encima de los 50 ° C. Es por ello que el tratamiento térmico juega un papel fundamental, para maximizar la conversión de GLS a ITCs, comprometiendo la formación de nitrilos, los cuales no son perjudiciales, pero no poseen ningún efecto beneficioso para la salud.

Debemos destacar que la temperatura de desnaturalización de la MYR, puede aumentar, según el género y la especie de crucífera, la del brócoli y sus brotes se sitúa por encima de 90 ° C, siendo la más termorresistente aquella presente en la mostaza, wasabi y daikón, la cual mostraría actividad incluso a temperaturas por encima de 100 ° C.

Debemos destacar que previa a la desnaturalización, el potencial y actividad enzimática disminuye a medida que nos acercamos a la temperatura de desnaturalización.

El tratamiento que provoca el microondas sobre el brócoli es el colapso en la estructura de la célula, debido al aumento de la diferencia en la presión osmótica de las membranas de las vacuolas, lo que genera una vez perdida la integridad de la célula, la mezcla de compuestos GLS y MYR.

Una de las ventajas del microondas sobre el resto de métodos, es la reducción de la pérdida de compuestos (difusión hacia el agua de cocción o por vaporización del propio agua del alimento), debido a la rapidez con la que aumenta la temperatura interna del alimento.

En el siguiente estudio se llegó a la conclusión de que, en primer lugar, la concentración de GRA en el brócoli era mayor en las inflorescencias que en el tallo, y en

segundo lugar que el tratamiento térmico del microondas, a un nivel de potencia alto 900 W inducía mayor formación de SF que a una potencia media (500 W).⁴³

El hecho de que la formación de SF sea mayor a la potencia máxima, se explica, por un mayor colapso en la estructura de la célula.

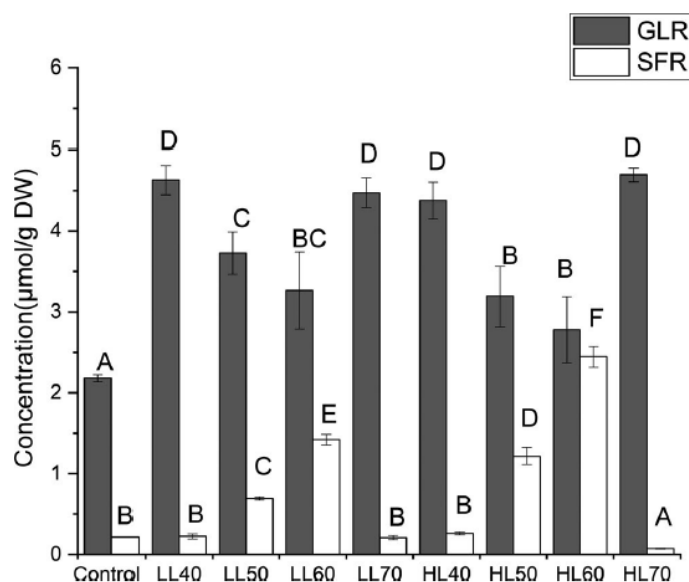


Tabla 8. Contenido de GRA y SF, mediante tratamiento térmico con microondas, durante LL (*Low Level*) y HL (*High Level*).⁴³

Como podemos observar, la concentración máxima se alcanza por encima de los 60 ° C, cuando la ESP ya se habría desactivado, no obstante, el rango de formación máxima de SF es muy reducido, dado que se observa un gran descenso, una vez se alcanzan los 70 ° C, cuando la actividad de la MYR empezaría a decaer al acercarse a su temperatura de desnaturalización.

En dicho estudio no se facilitan tiempo de cocinado en microondas, tan solo miden la temperatura interna del brócoli, y una vez alcanzado la temperatura objetivo lo sacan y sumergen en hielo inmediatamente.

Encontramos un estudio en el que sí nos aportaba un intervalo de tiempo de cocinado en microondas, como vemos en la tabla 10, a una potencia de 900 W, durante 30-45 s, se veía aumentada la formación de SF, mientras que, a diferencia de lo anterior, calentándolo durante 1 minuto, decrecía el nivel de formación con respecto al máximo.⁴⁴

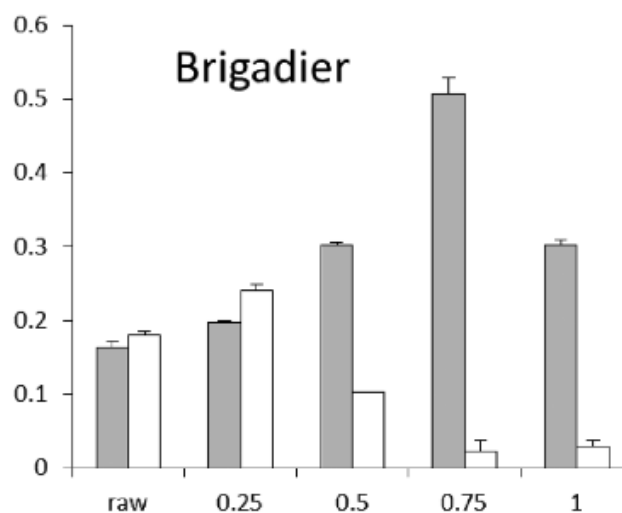


Tabla 9. Contenido de sulforafano, $\mu\text{mol/g DW}$ (barras grises), y contenido de sulforafano nitrilo, $\mu\text{mol/g DW}$ (barras blancas), tras tratamiento térmico con microondas (900 W), en diferentes periodos de tiempo (minutos).⁴⁴

Por lo tanto, parece ser que para maximizar la formación de SF con microondas, debemos utilizar, la máxima potencia 900 W, durante un periodo comprendido entre 30-45 s, o hasta alcanzar los 50 - 60 ° C de temperatura interna en el alimento, para posteriormente a esto usar un bañado del alimento en agua con hielo para parar el proceso de calentado.

4.6.2. Hervido

Como hemos mencionado anteriormente, los principales problemas del hervido serían la pérdida de compuestos en el caldo de cocción, y la desactivación de la MYR al ser sometida a temperatura de ebullición del agua (100 ° C).

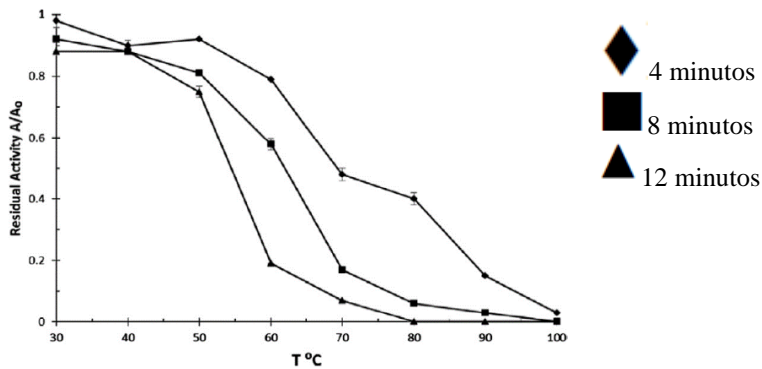


Tabla 10. Actividad residual de la MYR en el brócoli, tras tratamiento térmico, (rombo) 4 min; (cuadrado) 8 min; (triángulo) 12 min.⁴⁰

Como vemos en la figura, la actividad residual de la MYR, es máxima a 30 ° C, independientemente del tiempo de hervido hasta alcanzar dicha temperatura. A partir de los 40 ° C la actividad decrece, debido al inicio de su desactivación. Decrece su actividad de manera exponencial al alcanzar los 50 ° C, quedando prácticamente inactivada por encima de 90 ° C.

La solución a este problema, se haya en la adición de una MYR más termorresistente como la presente en las semillas de mostaza, la cual, tendría un pico de actividad máxima alrededor de los 70 ° C, decreciendo a medida que se sobrepasa esta temperatura. Siendo desactivada totalmente a partir de los 100 ° C.

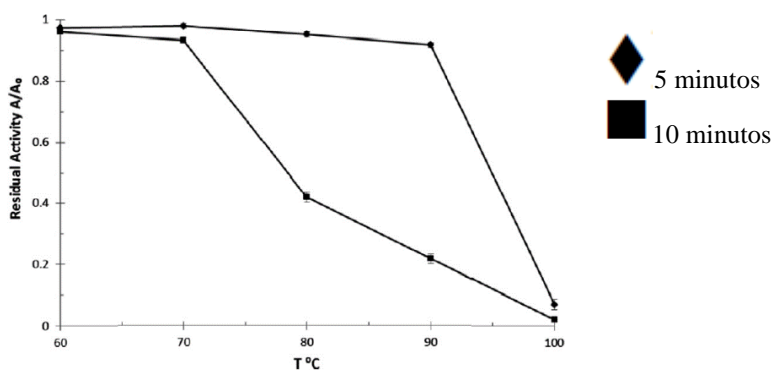


Tabla 11. Actividad residual de la MYR en semillas de mostaza, tras tratamiento térmico, (rombo) 5 min; (cuadrado) 10 min.⁴⁰

Por lo tanto, diferenciamos la máxima actividad de la MYR del brócoli, alrededor de los 50 ° C, y la de las semillas de mostaza alrededor de los 70 ° C.

La GRA en este aspecto es mucho más termorresistente que la MYR. Tras ser sometida a tratamiento térmico de 100 ° C, durante 12 minutos, el remanente de GRA se situaba en torno al 88 %, con respecto al contenido al inicio. Las pérdidas de GRA son mínimas cuanto menor temperatura y menor tiempo de cocción. Dado que a 80 ° C, durante 4 minutos, no se observaron ninguna pérdida de GRA. En el estudio se usaron bolsas protectoras al vacío, en las que se hirvió el brócoli, para evitar pérdidas por difusión hacia el agua de cocción, o por hidrólisis.

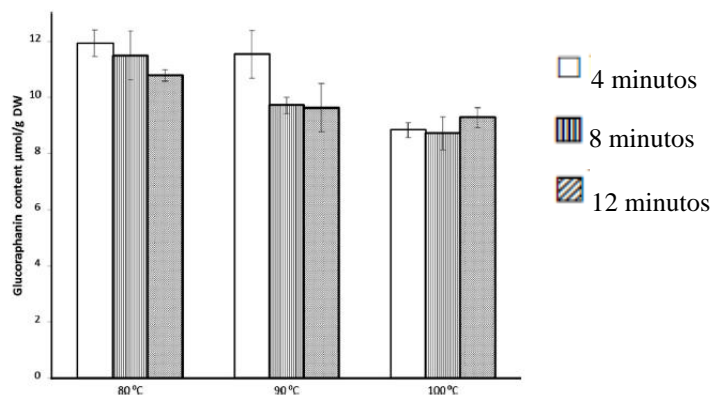


Tabla 12. Efecto del tratamiento térmico (hervido) en el contenido de GRA en el brócoli.⁴⁰

En cuanto a la ESP, se observa que tras tratamiento térmico de 80 ° C tras 4 minutos, se reduce hasta en un 50 % la formación de SF-N. A su vez si aplicamos 100 ° C durante el mismo tiempo, prevendremos cualquier formación de SF-N. No obstante, para no desnaturalizar la MYR, se debería aplicar un máximo de 70 ° C, que decrecería la formación de SF-N en 66 % o 74 %, en función de si se hierve 8 o 12 minutos.⁴⁰

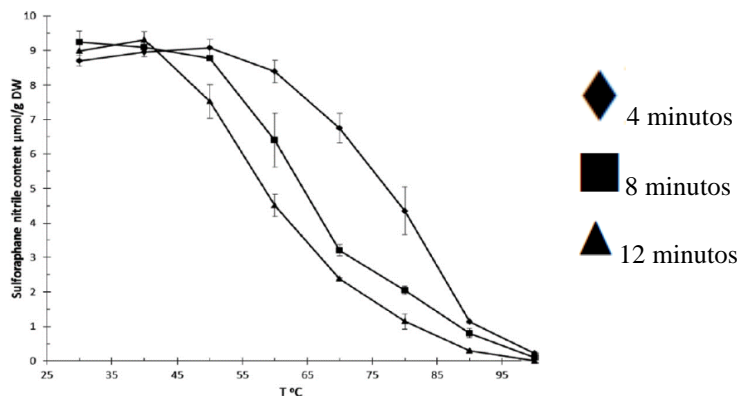


Tabla 13. Contenido de SF-N tras tratamiento térmico, (rombo) 4 min; (cuadrado) 8 min; (triángulo) 12 min.⁴⁰

Como bien sabemos, el punto óptimo de temperatura para la formación de SF, (gracias a la inactivación de la ESP) está en torno a 60 ° C- 70 ° C, no obstante, manejar temperaturas exactas, y evitar que la temperatura interna del alimento siga elevándose es difícil de controlar, por lo que abogamos por la adicción de MYR exógena, para asegurarnos de que la hidrólisis de GRA sea lo más completa posible.

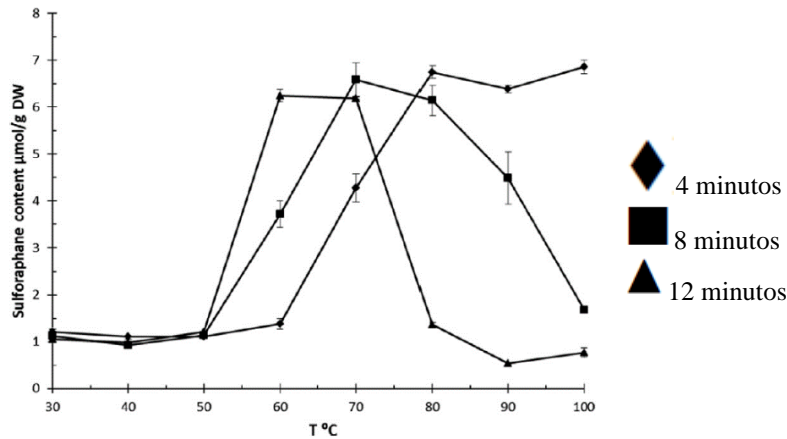


Tabla 14. Contenido de SF tras tratamiento térmico, (rombo) 4 min; (cuadrado) 8 min; (triángulo) 12 min.⁴⁰

Para ello tras el hervido, bastaría con añadir una proporción del 1 % de semillas de mostaza, daikón (rábano japones) o wasabi. Observamos que el tiempo óptimo de hervido, sería no más de 4 minutos, a una temperatura de 100 ° C (inactivación completa de la ESP y de la MYR), con la posterior adicción de semillas de mostaza, daikón o wasabi al brócoli o brotes de brócoli, una vez cocinados, para posteriormente dejarlo reposar en torno a 5 minutos, para asegurarnos que la hidrólisis ha sido completa.

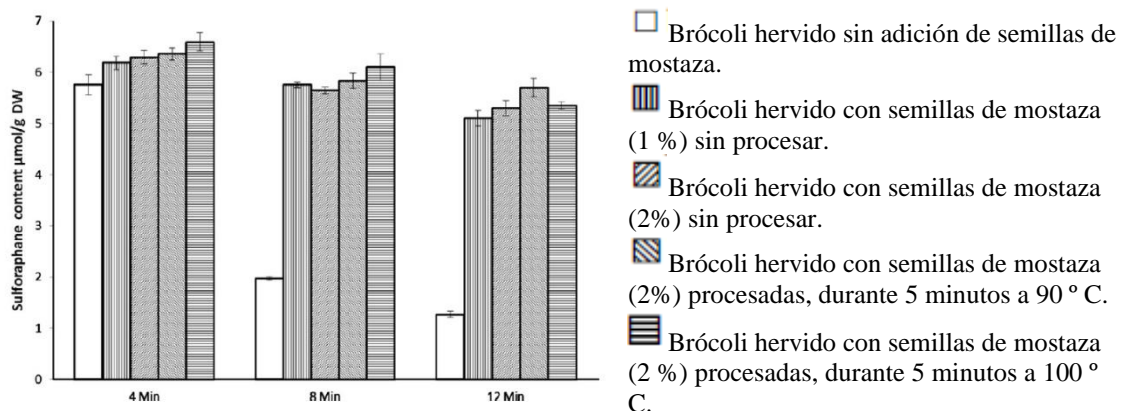


Tabla 15. Contenido de SF en brócoli hervido tras la adicción de semillas de mostaza.⁴⁰

4.6.3. Vapor

La ventaja del cocinado al vapor, parece ser la reducción de pérdidas tanto de GLS como de SF, provocadas por la difusión en el agua del cocinado. El tratamiento térmico del vapor ronda los 100 ° C, por lo que la adicción de MYR exógena seguiría siendo imprescindible.⁴⁵

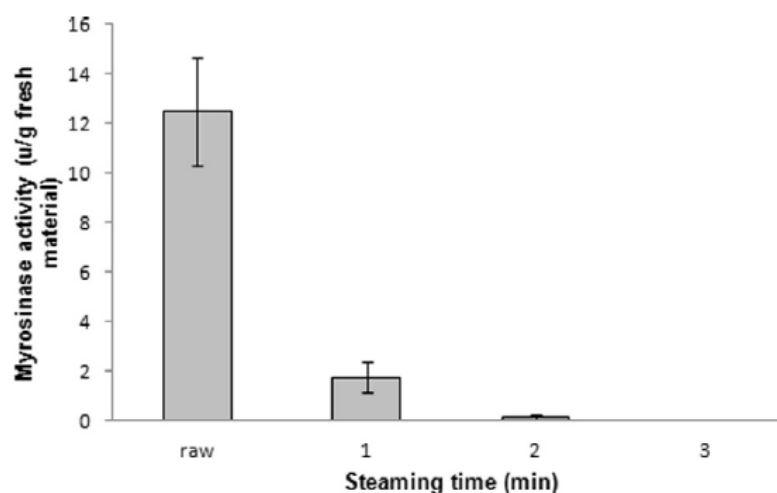


Tabla 16. Actividad de la MYR en brócoli crudo y al vapor.⁴⁶

El cocinado al vapor no induce tantas pérdidas de GRA como puede ocurrir con el hervido, en el siguiente estudio se vio que el cocinado al vapor del brócoli durante 2-5 minutos, no inducía pérdidas de GRA, comparado con la reducción de un 18 % provocadas en cambio en el cocinado hervido.⁴⁷

Cooking method	Cultivar	
	Booster™	Marathon
Raw	28.6 ^a	13.1 ^a
Steam 2 min	29.8 ^a	14.0 ^a
Steam 5 min	28.6 ^a	12.3 ^{a,b}
Microwave 2 min	27.3 ^a	13.1 ^a
Microwave 5 min	23.9 ^b	11.1 ^b
Boil 2 min	23.8 ^b	11.2 ^b
Boil 5 min	20.1 ^c	9.96 ^d
lsd (P = 0.05)	2.54	1.17

Tabla 17. Contenido en GRA de las variedades de *brocoli booster* y *marathon*, con diferentes métodos de cocinado.⁴⁷

En comparación con el microondas y el hervido, el cocinado al vapor durante 1-3 minutos, proporciona menos nitrilo y más formación de SF en el brócoli.⁴⁴

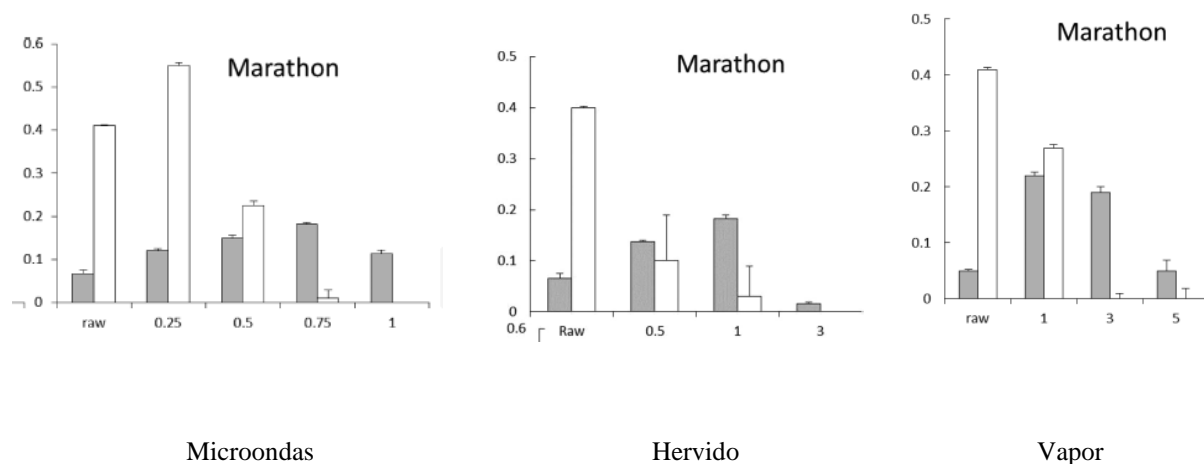


Tabla 18. Impacto del cocinado en la formación de SF (barra gris), y en la formación de nitrilo (barra blanca).⁴⁴

4.6.4. Comparativa de los métodos de cocinado

El método de cocinado será el factor que más influirá en la proporción final de formación de nuestro compuesto, el SF.

Si nos pasamos de temperatura, se inactivará la enzima MYR (por encima de los 65 ° C), reduciéndose su actividad catalizadora y reduciéndose la formación del compuesto final, y si nos quedamos cortos de temperatura, la reacción de hidrólisis no se llevará a cabo correctamente, derivando la reacción hacia otros compuestos secundarios como el SF-N, dirigido por la ESP.

Los principales métodos de cocinado que hemos revisado fueron, el microondas, hervido y vapor. Dado que, por las temperaturas usadas en estos, parecen ser los que mayor contenido de SF inducían.

El cocinado con microondas, sin superar temperaturas de 60 ° C, donde la actividad de la MYR decrece, parece ser el que mayor contenido de SF induce, siempre y cuando se realice a alta potencia (950 W), durante un breve periodo de tiempo (30-45 s).

El blanqueamiento realizado anteriormente al congelado, tiene como fin desactivar las enzimas lipoxigenasa y peroxidasa, pero debido a las altas temperaturas que requiere este proceso, inactivaríamos nuestra enzima catalizadora MYR, no obstante, un blanqueado ligero, a 76 ° C podría, inactivar parcialmente las enzimas lipoxigenasa y peroxidasa, sin desnaturalizar completamente la enzima MYR.

A su vez, el congelado a temperaturas no inferiores a -20 ° C parece exacerbar el contenido de SF en el brócoli, debido a la cristalización de los tejidos del vegetal, los cuales favorecen la rotura de membranas y con ello la unión del precursor GRA, con la enzima MYR.

El cocinado al vapor parece ser, un método controvertido, debido a las pérdidas por vapor que genera de compuestos ya hidrolizados, así como el hervido, que generará pérdidas de GRA y SF, disueltos en el agua de cocción.

El mayor contenido de SF se obtuvo, mediante el uso de microondas, a una potencia alta (950 W), hasta alcanzar en el centro del brócoli los 60 ° C, temperatura a la

cual la actividad de la MYR parece tener su pico máximo, a temperaturas superiores, el descenso de la formación de SF cae en picado.

No obstante, debido a la dificultad que conllevan este tipo de cocinado en cuanto a medición de temperatura y tiempo de cocción, nuestra propuesta de trabajo para obtener la mayor cantidad de SF posible, radica en el uso de una fuente de MYR exógena (mostaza, wasabi o daikón), junto a germinados de semilla de brócoli (brotes jóvenes), donde la cantidad de GRA, es muy superior, y por lo tanto el potencial de formación de SF también.

Nuestro resumen de operación culinaria sería el siguiente. Una vez obtenidos los brotes de brócoli, el primer paso sería, realizar un desgarrado mecánico de las fibras, véase con una batidora o simplemente cortándolos, muy picados con un cuchillo, para asegurarnos que la liberación de la GRA y MYR de la matriz son correctas. Una vez llegados a este punto procederemos a realizar la adicción de agua caliente a 70 ° C que desactivará tanto la ESP, como la MYR endógena. Retiramos el agua de cocción pasados 1-3 minutos. Para posteriormente añadir una fuente exógena de MYR (durante al menos 5 minutos), pero esta fuente será de un tipo de crucífera distinta, nosotros recomendamos semillas de mostaza, wasabi, o brotes de daikón, los cuales poseen un tipo de MYR más termorresistente que la del brócoli, y no se desnaturalizará a estas temperaturas. Un solo gramo de wasabi, mostaza o daikón (machacados), será suficiente para catalizar la reacción de hasta una ración de brotes de germinados, es decir, si nuestra ración es de 100 gr, con solo un 1 % de mostaza, wasabi o daikón, será suficiente.

TIPO DE COCINADO	CRUCÍFERA	TEMPERATURA		TIEMPO	SULFORAFANO	REFERENCIA	
MICROONDAS	BROCCOLI	475 W	40°C	No especifica	No significativo	43	
		475 W	50°C		+ 195,8 %		
		475 W	60°C		+ 491,7 %		
		475 W	70°C		No significativo		
		950 W	40°C		No significativo	48	
		950 W	50°C		+ 416,7 %		
		950 W	60°C		+ 920,8 %		
		950 W	70°C		- 54,2 %		
			950 W		1 min	+ 336,8 %	49
			950 W		3 min	No significativo	
HERVIDO	BROCCOLINI	100 ° C		15 min	- 88 %	50	
BLANQUEAMIENTO	PURÉ DE BRÓCOLI	60 ° C		1 min	+ 346,6 %	51	
				5 min	+ 286,9 %		
				5 min	- 38,3 %		
VAPOR	BROCCOLI	100 ° C		5 min	+ 61,7 %	48	
				10 min	No significativo		

Tabla 19. Resumen de los principales métodos de cocinado y su influencia en la formación de SF.

Conclusiones

1º) El precursor del sulforafano, es la glucorafanina, este glucosinolato se encuentra en la mayoría de plantas de la familia *Brassicaceae*, siendo la especie *Brassica oleracea*, la que mayor concentración de glucorafanina presenta, en especial el brócoli (*Brassica oleracea var. Itálica*), concretamente en su etapa de germinado.

2º) El sulforafano, es el mayor inductor natural conocido del factor de transcripción Nrf2, que induce la expresión de enzimas antioxidante y antiinflamatorias, con gran aplicación preventiva anticancerígena.

3º) El precursor del sulforafano, la glucorafanina, puede ser hidrolizada por la flora bacteriana de los seres humanos, pero en un porcentaje inferior al 20 %.

4º) La mirosinasa, es la enzima que cataliza la hidrólisis de la glucorafanina, si las condiciones químicas son las adecuadas (ausencia del cofactor ESP, y pH neutro), la reacción se llevará a cabo, dando como producto el sulforafano.

5º) La enzima mirosinasa, muestra su mayor actividad en el intervalo de temperaturas de 40-70 ° C, a partir del cual, comienza su desnaturalización y por tanto su actividad enzimática cae. El cofactor ESP, es inactivado, tras tratamiento térmico por encima de 50 ° C.

6º) La refrigeración a 6 ° C no afecta significativamente al contenido final de sulforafano, hasta pasados 35 días. La congelación a -18 ° C, aumentará la biodisponibilidad de la glucorafanina, y no afectará significativamente el contenido final de sulforafano, hasta pasados 60 días

7º) La adicción de mirosinasa exógena (semillas de mostaza, wasabi y daikón), permite que se realice la hidrólisis de la glucorafanina. A su vez, la mirosinasa proveniente de estas fuentes, es más termorresistente, desnaturalizándose por encima de 100 ° C.

8º) Los métodos de cocinado de las crucíferas, para la máxima obtención de sulforafano son: microondas (950 w, 30-45 s), vapor (1-3 minutos) y hervido (1 minuto). La adicción de mirosinasa exógena (semillas de mostaza, wasabi o daikón), a un 1 % de concentración, permiten maximizar la hidrólisis de glucorafanina

5. Referencias Bibliográficas

1. Ramirez, D. Abellán, A, Beretta, V. Camargo, A. Moreno. D. *Functional Ingredients from Brassicaceae Species: Overview and Perspectives*. Int J Mol Sci. 2020; 21(6): 1998.
2. Kapusta, J. Kopeć, A. Piatkowska, E. Borczak, B. Leszczyńska, T. *The beneficial effects of Brassica vegetables on human health*. Roczniki Panstwowego Zakładu Higieny, 2012; 63(4): 389–395.
3. Palliyaguru, D. Yuan, J, Kensler, T. Fahey, J. *Isothiocyanates: Translating the Power of Plants to People*. Mol Nutr Food Res. 2018; 62(18).
4. Zhang, Y. Talalay, P. Cho, C. Posner, G. *A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89(6): 2399-2403.
5. Houghton, C. Fassett, R. Coobes, J. *Sulforaphane and other nutrigenomic Nrf2 activators: can the clinician's expectation be matched by the reality?*. Oxid Med Cell Long, 2016; 2016: 785718.
6. Hu, M. *Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms*. Molecular Pharmaceutics. Mol Pharm. 2007; 4(6): 803–806.
7. James, D. Devaraj, S. Bellur, P. Lakkanna, S. Vicini, J. Boddupalli, S. *Novel concepts of broccoli sulforaphanes and disease: induction of phase II antioxidant and detoxification enzymes by enhanced-glucoraphanin broccoli*. Nutrition Reviews. 2012; 70 (11): 654–665.
8. Le, T. Luong, H. Li, H. Chiu, C. Hsieh, P. *Broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) Sprouts as the Potential Food Source for Bioactive Properties: A Comprehensive Study on In Vitro Disease Models*. Foods. 2019; 8(11): 532.
9. Bai, Y. Wang, X. Zhao, S. Ma, C. Cui, J. Zheng, Y. *Sulforaphane Protects against Cardiovascular Disease via Nrf2 Activation*. Oxid Med Cell Longev. 2015.
10. Campas, O. Sánchez, D. Bueno, C. Ramírez, B. López-, J. *HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products*. Biomed. Chromatogr. 2010; 24: 387–392.
11. Wang, H. Oo Khor, T. Shu, L. Su, Z. Y, Fuentes F, Lee J. H, Tony Kong A.-N. *Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability*. Journal of Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry. 2012; 12(10): 1281–1305.

12. Soundararajan, P. Kim, J.S. *Anti-Carcinogenic Glucosinolates in Cruciferous Vegetables and Their Antagonistic Effects on Prevention of Cancers*. *Molecules*. 2018; 23: 2983.
13. AL-Ishaq, R. Overy, A. Büsselberg, D. *Phytochemicals and Gastrointestinal Cancer: Cellular Mechanisms and Effects to Change Cancer Progression*. *Biomolecules*. 2020; 10: 105.
14. Dinkova, A. Kostov, R. *Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease*. *Trends in Molecular Medicine*. 2012; 18(6): 337-347.
15. Houghton, Christine. *Chapter 12: The Emergence of Sulforaphane as a Clinically- Relevant Nutraceutical in the Prevention and Treatment of Disease*. 2020.
16. Chhajed, S. Mostafa, I. He, Y. Abou-Hashem, M. El-Domiaty, M. Chen, S. *Glucosinolate Biosynthesis and the Glucosinolate–Myrosinase System in Plant Defense*. *Agronomy*. 2020; 10: 1786.
17. Cuomo, V. Luciano, F. Meca, G. Ritieni, A. Mañes, J. *Bioaccessibility of glucoraphanin from broccoli using an in vitro gastrointestinal digestion model*. *CyTA - Journal of Food*. 2014; 13: 361-365.
18. Rincón, A. *Biosíntesis de los glucosinoidatos e importancia nutricional humana y funciones de protección a las plantas*. **Alimentos Hoy**. 2014; 22.
19. Liang, H. Yuan, Q. *Natural sulforaphane as a functional chemopreventive agent: including a review of isolation, purification and analysis methods*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012; 32(3): 218–234.
20. Hanschen, F. Pfitzmann, M. Witzel, K. Stützel, H. Schreiner, M. Zrenner, R. *Differences in the enzymatic hydrolysis of glucosinolates increase the defense metabolite diversity in 19 Arabidopsis thaliana accessions*. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 2018; 124: 126–135.
21. Oliviero, T. Verkerk, R. Dekker, M. *Isothiocyanates from Brassica Vegetables- Effects of Processing, Cooking, Mastication, and Digestion*. *Mol Nutr Food Res*. 2018; 62(18).
22. Chartoumpekis, D. Ziros, P. Chen, J. Groopman, J. Kensler, T. Sykiotis, G. *Broccoli sprout beverage is safe for thyroid hormonal and autoimmune status: Results of a 12-week randomized trial*. *Food Chem Toxicol*. 2019; 126: 1-6.

23. Hanschen, F. Lamy, E. Schreiner, M. Rohn, S. *Reactivity and stability of glucosinolates and their breakdown products in foods*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2014; 53(43): 11430-11450.
24. Angelino, D. Dosz, E. Sun, J. Hoeflinger, J. Van Tassell, M. Chen, P. Harnly, J. Miller, M. Jeffery, E. *Myrosinase-dependent and -independent formation and control of isothiocyanate products of glucosinolate hydrolysis*. *Front Plant Sci*. 2015; 6: 831.
25. Charis, M. *Glucosinolates: Properties, Recovery, and Applications*. 2019.
26. Kensler, T. Egner, P. Agyeman, A. Visvanathan, K. Groopman, J. Chen, J. Chen, T. Fahey, J. Talaly, P. "*Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane*". *Topics in current chemistry*. 2013; 329: 163-77.
27. Kushad, M. Brown, A. Kurilich, A. Juvik, J. Klein, B., Wallig, M. Jeffery, E. *Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea*. *J Agric Food Chem*. 1999; 47(4): 15418.
28. De Nicola, G. Bagatta, M. Pagnotta, E. Angelino, D. Gennari, L. Ninfali, P. Rollin, P. Lori, R. *Comparison of bioactive phytochemical content and release of isothiocyanates in selected brassica sprouts*. *Food Chem*. 2013; 141(1): 297-303.
29. Bhat, R. Vyas, D. *Myrosinase: Insights on structural, catalytic, regulatory, and environmental interactions*. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2019; 39(4): 508–523.
30. Yuanfeng, W. Chengzhi, L. Ligen, Z. Juan, S. Xinjie, S. Yao, Z. Jianwei, M. *Approaches for enhancing the stability and formation of sulforaphane*. *Food Chem*. 2021; 345: 128771.
31. Cipolla, B. Mandron, E. Lefort, J. Coadou, Y. Della Negra, E. Corbel, L. Le Scodan, R. Azzouzi, A. Mottet, N. *Effect of Sulforaphane in Men with Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy*. *Cancer Prev Res*. 2015; 8(8): 712-9.
32. Yang, M. Wang, H. Zhou, M. Liu, W. Kuang, P. Liang, H. Yuan, Q. *The natural compound sulforaphane, as a novel anticancer reagent, targeting PI3K-AKT signaling pathway in lung cancer*. *Oncotarget*. 2016; 7(47): 76656–76666.
33. López, J. Tirado, L. Sánchez, D. Campas, O. Cantu, E. Núñez, J. *Biochemical composition of broccoli seeds and sprouts at different stages of seedling development*. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013; 48: 2267.

34. Bueno, C. Martínez, D. Camacho, F. Villa, A. Rodríguez, J. López, J. Sánchez, D. *Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2009; 59.
35. Jardim, F. Almeida, F. Luckachaki, M. Oliveira, M. *Effects of sulforaphane on brain mitochondria: mechanistic view and future directions*. J Zhejiang Univ Sci B. 2020; 21(4): 263-279.
36. Ruhee, Ruheea Taskin, and Katsuhiko Suzuki. *The Integrative Role of Sulforaphane in Preventing Inflammation, Oxidative Stress and Fatigue: A Review of a Potential Protective Phytochemical*. Antioxidants. 2020; 9(6): 521.
37. Mahn, A. Castillo, A. *Potential of Sulforaphane as a Natural Immune System Enhancer: A Review*. Molecules. 2021; 26(3): 752.
38. Galgano, F. Favati, F. Caruso, M. Pietrafesa, A. Natella, S. *The influence of processing and preservation on the retention of health-promoting compounds in broccoli*. J Food Sci. 2007; 72(2): 130-135.
39. Jha, P. Xanthakis, E. Chevallier, S. Jury, V. Le-Bail, A. *Assessment of freeze damage in fruits and vegetables*. Food Research International. 2019; 121: 479–496.
40. Ghawi, S. K. Methven, L. Niranjana, K. *The potential to intensify sulforaphane formation in cooked broccoli (Brassica oleracea var. italica) using mustard seeds*. Food Chemistry. 2013; 138(2): 1734–1741.
41. Dosz, E. Jeffery, E. *Modifying the processing and handling of frozen broccoli for increased sulforaphane formation*. J Food Sci. 2013; 78(9): 1459-1463.
42. Matusheski, N. V. Juvik, J. Jeffery, E. *Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli*. Phytochemistry. 2004; 65: 1273–1281.
43. Lu, Y. Pang, X. Yang, T. (2020). *Microwave cooking increases sulforaphane level in broccoli*. Food Science and Nutrition. 2020; 8(4): 2052–2058.
44. Wang, G. Farnham, M. Jeffery, E. *Impact of thermal processing on sulforaphane yield from broccoli (Brassica oleracea L. ssp.italica)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012; 60: 6743–6748.
45. Nugrahedhi, P. Verkerk, R. Widianarko, B. Dekker, M. *A mechanistic perspective on process-induced changes in glucosinolate content in brassica vegetables: A review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2015; 55(6): 823–838.

46. Sarvan, I. Kramer, E. Bouwmeester, H. Dekker, M. Verkerk, R. *Sulforaphane formation and bioaccessibility are more affected by steaming time than meal composition during in vitro digestion of broccoli*. Food Chem. 2017; 214: 580-586.
47. Jones, R. Frisina, C. Winkler, S. Insic, M. Tomkins, R. *Cooking method significantly effects glucosinolate content and sulforaphane production in broccoli florets*. Food Chemistry. 2010; 123(2): 237–242.
48. Tabart, J. Pincemail, J. Kevers, C. Defraigne, J. Dommès, J. *Processing effects on antioxidant, glucosinolate, and sulforaphane contents in broccoli and red cabbage*. European Food Research and Technology. 2018; 244(12): 2085–2094.
49. Barakat, H. Rohn, S. (2014). *Effect of different cooking methods on bioactive compounds in vegetarian, broccoli-based bars*. Journal of Functional Foods. 2014; 11: 407–416.
50. Baenas, N. Marhuenda, J. García, C. Zafrilla, P. Moreno, D. *Influence of cooking methods on glucosinolates and isothiocyanates content in novel cruciferous foods*. Foods. 2019; 8(7): 257.
51. Cai, C. Miao, H. Qian, H. Yao, L. Wang, B. Wang, Q. *Effects of industrial pre-freezing processing and freezing handling on glucosinolates and antioxidant attributes in broccoli florets*. Food Chemistry. 2016; 210: 451–456.

