

PROYECTO: POTENCIACIÓN DE BIOMOLÉCULAS FUNCIONALES EN PRODUCTOS ALIMENTARIOS DE ORIGEN GALLEGO A TRAVÉS DE LA INVESTIGACIÓN AGROBIOTECNOLÓGICA

Grupo de Genética, Mejora y Bioquímica de Brásicas - Empresa A Rosaleira

A) OBJETIVOS DEL PROYECTO

El objetivo general del proyecto es la revalorización de los subproductos vegetales del grelo y de la berza generados durante su procesado industrial y comprobar el efecto antitumoral *in vitro* de los compuestos presentes en grelos sobre células tumorales humanas de colección, en ausencia y en presencia de fármacos antitumorales de elección para esos tipos de cáncer.

Este objetivo general se articuló en los siguientes objetivos y tareas específicas:

Subtarea 2.7. Técnicas de cultivo y procesado para potenciar la presencia de isotiocianatos en grelos y berzas gallegas

Subtarea 2.7.1. Estudio del valor nutricional de los subproductos vegetales obtenidos del grelo y la berza tras el procesado industrial. Estudio del efecto de las fechas de siembra y recolección en el contenido en compuestos bioactivos y por tanto en su aprovechamiento industrial.

Subtarea 2.7.2. Estudio del valor nutricional y aprovechamiento de las aguas de cocción resultantes del procesado industrial de grelo y berza sometidos a diferentes temperaturas y tiempos de cocción.

Subtarea 2.8. Validación *in vivo* de compuestos funcionales con efecto anticancerígeno y antimetastático presentes en el grelo.

Para abordar estos objetivos se llevaron a cabo los análisis nutricionales de los cultivos de berzas y grelos cosechados en diferentes ciclos de cultivo, localidades y partes diferentes de la planta (hojas frescas y residuos) así como sobre las hojas útiles tras un escaldado industrial a fin de conocer cómo se preservan estos compuestos tras la cocción y destacar el valor de los residuos con vistas a su aprovechamiento industrial.

Subtarea 2.7.1. Estudio del valor nutricional de los subproductos vegetales obtenidos del grelo y la berza tras el procesado industrial. Estudio del efecto de las fechas de siembra y recolección en el contenido en compuestos bioactivos y por tanto en su aprovechamiento industrial.

Los cultivos de grelos y berzas son cultivos típicamente de invierno y es muy complicado, principalmente en el caso del grelo, obtener producción durante el verano debido a su gran susceptibilidad a las altas temperaturas que provocan una floración precoz, produciendo plantas inservibles para su consumo y venta en fresco. No obstante, con vistas a una producción industrial, es interesante obtener una producción continuada a lo largo de todo el año con el fin de obtener un abastecimiento del producto a lo largo de aproximadamente todo el año. Por ello, se realizaron siembras secuenciales a lo largo de 2017 de modo a tener diferentes ciclos de cultivo correspondientes a un ciclo de otoño-invierno (ciclo habitual), primavera y verano (ciclos alternativos) en las parcelas habituales de producción utilizadas por la empresa A Rosaleira. En concreto, se utilizaron un total de tres parcelas diferentes situadas en la zona del Sur de Pontevedra para el grelo y una parcela para berza.). A modo resumen, en la Tabla 1 se presentan las fechas de siembra y cosecha para cada cultivo utilizados a lo largo de este proyecto.

Tabla 1. Resumen de las fechas de cosecha, cultivos y tipos de muestras incluidas en los análisis químicos.

Cosecha	Cultivo	Ambientes	Material fresco	Aguas cocción	Material escaldado
15/02/2016	Grelos	3	útil + residuos	Puesta a punto	-
18/04/2016	Berzas	1	útil + residuos	X	-
14/06/2016	Grelos	3	útil + residuos	X	X
19/12/2016	Grelos	3	útil + residuos	X	X
30/08/2017	Berzas	1	útil + residuos	X	X

En ambos cultivos se analizó el material fresco procedente de las hojas útiles y de los residuos de la cosecha, así como las hojas tras un proceso de escaldado y las aguas resultantes de esa cocción. Los tres tipos de muestras vegetales se detallan a continuación:

- i) Hojas sanas y útiles para el procesado, que se utilizarán como controles (A)
- ii) Residuos vegetales, incluyendo las hojas y tallos desechables e inservibles para el consumo (B y C).
- iii) Hojas cocinadas tras un escaldado industrial en la empresa (D). Este tipo de material no estaba previsto en la memoria, pero se añadió a lo largo del desarrollo del proyecto para obtener información adicional sobre la degradación de los compuestos glucosinolatos, fenólicos y la posible pérdida de capacidad antioxidante en el material procesado. Para ello, se recogieron 15 muestras o repeticiones de las hojas escaldadas en intervalos de 5 minutos, de modo que todas las muestras de hojas analizadas experimentan la misma temperatura (entre 69 °C y 71 °C) y el mismo tiempo de procesado.

Subtarea 2.7.2. Estudio del valor nutricional y aprovechamiento de las aguas de cocción resultantes del procesado industrial de grelo y berza sometidos a diferentes temperaturas y tiempos de cocción.

El objetivo de esta subtarea era analizar las aguas procedentes de la cocción industrial de berzas y grelos. El procesado industrial de estos dos cultivos incluye diferentes tratamientos térmicos en función de la presentación final del producto, como escaldados a diferentes tiempos y procesos de esterilización y pasteurización. Estos tratamientos térmicos tienen una importante repercusión ya que muchos nutrientes al ser solubles en agua y termosensibles, se pierden durante la cocción con la consiguiente pérdida de gran parte de las propiedades beneficiosas que presentan las partes vegetativas de la planta. El personal de A Rosaleira llevó a cabo el escaldado industrial del material fresco de grelos y de berzas de forma análoga al utilizado al envasado en lata y cristal. Se recogieron de forma secuencial diferentes muestras de aguas cada 5 minutos y se enviaron al grupo de investigación de Brásicas en la MBG.

Subtarea 2.8. Validación in vivo de compuestos funcionales con efecto anticancerígeno y antimetastático presentes en el grelo.

El objeto de este estudio es identificar moléculas en los grelos que puedan convertirse en potenciales fármacos antitumorales y/o antimetastáticos, o bien en complementos que aumenten la eficacia o disminuyan la toxicidad de los quimioterápicos disponibles en la actualidad. El grupo de Farmacología llevó a cabo estudios que demostraron importantes efectos antiproliferativos (tiempo y dosis-dependiente), favorecedor de la apoptosis e inhibitorio de la migración de células tumorales de próstata PC3 y DU145, de alil-isotiocianato (BITC) presente en los grelos, superiores al del Docetaxel (uno de

los antitumorales de referencia en esta patología). Se comprobó además que este compuesto potenciaba el efecto antitumoral del Docetaxel, lo que permitía obtener resultados similares con menor dosis del quimioterápico que tiene, como parte negativa, considerables efectos secundarios. Siguiendo el cronograma previsto en el proyecto, el grupo de Farmacología ha llevado a cabo una serie de técnicas destinadas a identificar los mecanismos moleculares involucrados en los efectos beneficiosos antes descritos para el BITC.

1. Para ello, se realizaron cultivos celulares de las líneas tumorales sensibles, que se sometieron a las dosis más eficaces obtenidas con este compuesto, en presencia o ausencia de Docetaxel, para evaluar la expresión de genes implicados.
2. Se ha extraído ARNm de las células cultivadas para proceder a realizar q-PCR por triplicado mediante QuantiFast SYBR Green PCR Kit, paso este último que se está programando en la actualidad. Asimismo, se han realizado otros cultivos similares, para identificar la expresión de proteínas mediante Western-Blot.
3. Se han llevado a cabo estudios de microscopia confocal para conocer los mecanismos implicados en el modo de acción de estas moléculas

B) RESULTADOS

Los resultados más destacados obtenidos en el conjunto del proyecto son los siguientes:

1. Los residuos (tallos y hojas más viejas) de las berzas y de los grelos presentaron un contenido en glucosinolatos totales e indólicos similares a las hojas frescas.
2. Los residuos y las hojas frescas útiles presentaron idéntico perfil en glucosinolatos tanto en los grelos como en las berzas. En los grelos los glucosinolatos alifáticos fueron los mayoritarios, siendo la gluconapina el compuesto mayoritario. En las berzas los compuestos indólicos fueron los mayoritarios, siendo la glucobrasicina y la neoglucobrasicina, los compuestos mayoritarios.
3. En las hojas escaldadas de grelos y berzas hubo una pérdida importante de glucosinolatos ya que estos compuestos se degradan con el calor.
4. Las hojas de berzas y grelos presentaron altas concentraciones de calcio, hierro, potasio y sodio. Los residuos, hojas cocinadas y hojas útiles frescas presentan contenidos similares en magnesio, fósforo y hierro y el potasio es mayor en los residuos. El escaldado no supone una pérdida en el contenido en minerales, excepto para la vitamina C en los grelos.
5. Los tres tipos de muestras analizadas: fresco útil, fresco residuo y escaldado presentaron el mismo perfil de compuestos fenólicos. Las partes útiles y las hojas procesadas tras el cocinado presentaron las mayores concentraciones de flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y compuestos fenólicos totales, mientras que los residuos presentaron las concentraciones más bajas, tanto en compuestos flavonoides como en ácidos hidroxicinámicos.
6. En grelos, se identificaron 10 compuestos fenólicos. De ellos, 7 compuestos fueron flavonoides y 3 compuestos fueron ácidos hidroxicinámicos. Los compuestos mayoritarios fueron el ácido sinápico, seguido de derivados del Kaempferol e Isorhamnetina. En berzas, se identificaron 15 compuestos fenólicos. De ellos, 10 compuestos fueron flavonoides y 5 compuestos fueron ácidos hidroxicinámicos.
7. Los residuos procedentes de los tallos y hojas más viejas de las berzas y grelos presentaron los valores más bajos de capacidad antioxidante mientras que las

hojas de berzas y grelos sometidas a un proceso de escaldado industrial presentan valores relativamente elevados de capacidad antioxidante, con valores intermedios entre las hojas frescas y los residuos.

8. La conservación de las aguas a temperatura ambiente no degrada los glucosinolatos. Se definieron nuevos protocolos para la recogida de estas aguas de modo secuencial en el tiempo, de forma que ello nos ha permitido valorar la concentración de dichos compuestos de modo correcto y fiable y evitar además la degradación de los mismos durante el transporte, demostrándose que
9. En las aguas de cocción de berzas y grelos el mayor contenido en glucosinolatos totales se encontró después de aproximadamente 65 minutos desde el inicio de la cocción. Los glucosinolatos alifáticos e indólicos en las aguas de cocción presentaron diferente comportamiento, los glucosinolatos alifáticos disminuyen mientras que los glucosinolatos indólicos incrementan su concentración.

C) CONCLUSIONES DEL PROYECTO:

1. Los residuos de las berzas y grelos presentan un contenido elevado en glucosinolatos, con valores similares o incluso superiores a los de las hojas frescas, indicando así que estos productos de desecho son fuentes interesantes en estos compuestos a fin de revalorizar su uso y su aprovechamiento industrial.
2. Las hojas de berzas y grelos sometidas al escaldado industrial pierden prácticamente todo el contenido en glucosinolatos ya que estos compuestos son termolábiles y, por tanto, se degradan con el calor.
3. Se confirma el efecto de las fechas de cultivo y de las condiciones ambientales en el contenido total en glucosinolatos.
4. Los residuos de las berzas y grelos presentan menores concentraciones en compuestos fenólicos que las hojas frescas útiles.
5. Las hojas sometidas al escaldado industrial presentan las mayores concentraciones en compuestos fenólicos, con valores superiores a las hojas frescas.
6. Las hojas frescas de berzas y de grelos presentan una mayor capacidad antioxidante que los residuos vegetales procedentes de los tallos y hojas más viejas, si bien los residuos siguen conservando concentraciones elevadas con pérdidas de un 25% aproximadamente respecto a las hojas útiles.
7. Las hojas de berzas y grelos tras el escaldado industrial preservan altos valores de capacidad antioxidante, con escasas pérdidas respecto al material fresco útil.
8. Los residuos vegetales de las berzas y grelos, considerados como productos de desecho durante el envasado industrial, constituyen una fuente importante de vitaminas y minerales, con contenidos en potasio superiores incluso a las hojas útiles utilizadas para consumo.
9. El escaldado industrial no reduce el contenido en minerales, excepto para el calcio, que disminuyó de modo importante y para la vitamina C en los grelos.
10. Durante el escaldado, los glucosinolatos que se pierden en las hojas de berzas y grelos se pasan de forma gradual a las aguas de cocción, con un contenido máximo a los 45 minutos desde el inicio del proceso industrial. Este sería el momento óptimo de recogida de las aguas con vistas a su utilización en la industria agroalimentaria.