

# Universidad Autónoma de Sinaloa Facultad de Ciencias Químico-Biológicas Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Identificación de compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante de tomate silvestre (Solanum lycopersicum var. cerasiforme)

#### **TESIS**

que presenta

# IBQ. ANAYANCI GUADALUPE LUNA MANDUJAN

Para obtener el Grado de

# MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores de Tesis

Dr. José Ángel López Valenzuela

Dr. Francisco Delgado Vargas

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, ambos de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de los Doctores José Ángel López Valenzuela y Francisco Delgado Vargas, así como la asesoría de las Doctoras Gabriela López Angulo, Nancy Yareli Salazar Salas y Karen Virginia Pineda Hidalgo. Contó con financiamiento del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Anayanci Guadalupe Luna Mandujan recibió Beca de Estudios de Maestría por parte de CONACYT.



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

## CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de <u>Culiacán de Rosales</u>, <u>Sinaloa</u> el día <u>1</u> del mes <u>julio</u> del año <u>2016</u>, el (la) que suscribe <u>IBQ</u>. <u>Anayanci Guadalupe Luna Mandujan</u> alumno (a) del Programa de <u>Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos</u> con número de cuenta <u>0528737-5</u>, de la Unidad Académica <u>Facultad de Ciencias Químico Biológicas</u>, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de <u>Dr. José Angel López Valenzuela y Dr. Francisco Delgado Vargas</u> y cede los derechos del trabajo titulado "<u>Identificación de compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante de tomate silvestre (<u>Solanum Lycopersicum var. cerasiforme</u>", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.</u>

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IBQ. Anayanci Guadalupe Luna Mandujan

#### **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Sinaloa y al programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos en especial a todos los profesores que forman parte de su planta docente, gracias por sus enseñanzas y por contribuir a mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis los doctores José Ángel López Valenzuela y Francisco Delgado Vargas, quienes son personas comprometidas con su trabajo y con una gran calidad humana. Mi mayor respeto y admiración hacia ustedes. Gracias por permitirme ser parte de sus respectivos equipos de trabajo, por su paciencia y sobre todo muchas gracias por su apoyo.

A la MC Jeanett Chávez Ontiveros, por estar siempre dispuesta a brindar su apoyo a quien lo necesite. Maestra, muchas gracias por sus palabras de aliento y motivación, por ese abrazo cálido y reconfortante que siempre tuvo para mí. Gracias por su ayuda dentro y fuera del ámbito académico.

A la Dra. Karen V. Pineda Hidalgo por su valioso apoyo para la realización de este trabajo, así como por su amistad y sus consejos. Gracias por su tiempo, paciencia y cariño.

A la Dra. Nancy Yareli Salazar Salas porque sin su ayuda no hubiera podido concluir este proyecto. Gracias por todo su tiempo y dedicación brindados a este trabajo, también por brindarme su amistad incondicional. Fue un largo camino el que tuvimos que recorrer juntas; aprendiendo, fallando y volviendo a empezar

muchas veces pero que finalmente llega a su conclusión. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Gabriela López Angulo y el Dr. Julio Montes Ávila por sus valiosas observaciones y aportaciones para la realización de este trabajo. También por su confianza y por la motivación que siempre me dieron.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular: Elthon, Lourdes, Fernanda, Érika, David, Milton, Alejandro y Glenda, gracias por su amistad y por tantos buenos momentos que pasamos juntos. De igual forma agradezco a mis nuevos amigos del Laboratorio de Química de Productos Naturales por adoptarme y hacerme parte de su grupo, Alejandra, Óscar, Carlos, Faustino, Eleazar, Jazmín, Manuel, Mariana, Almita, José Ángel, Martín, Maritza, Sara y Pedro; en especial a las "Ladies", maestra Gaby, Sandra, María, Belinda, Gisela, Alma y Perla, por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio y por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros de generación Lourdes, Fernanda, Rodolfo, Karen, Ana María, Karla, Brenda, Mariela, Jennifer y Ana Luisa, por brindarme su amistad y por todos los recuerdos que creamos juntos. Éxito en todo lo que emprendan.

De manera especial a mi compañera y amiga MC María de Lourdes Valenzuela Ponce por estar siempre a mi lado y darme ánimo para seguir adelante, por creer en mí y por la valiosa amistad que me ha brindado durante ya varios años. Ha sido una maravillosa experiencia andar juntas por los mismos caminos, gracias por todo, te quiero muchísimo.

Agradezco de forma muy especial a mi familia, a mis padres Rafael Luna Arce y Silvia Gpe. Mandujan Rodríguez, quienes junto a mis hermanas Sachary y Valeria me han dado su apoyo y amor incondicional durante toda mi vida. A ellos debo todo lo que soy y son el principal motor para lograr lo que todavía me falta por hacer. Muchas gracias por todo, los quiero mucho.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	7
A GENERALIDADES DEL TOMATE	7
1 Origen y domesticación	7
2 Taxonomía y aspectos botánicos	9
3 Producción	11
4 Composición química del fruto de tomate	14
B ESTRÉS OXIDATIVO	18
C COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS EN	21
TOMATE	
IV JUSTIFICACIÓN	29
V OBJETIVOS	31
A OBJETIVO GENERAL	31
B OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
VI MATERIALES Y MÉTODOS	32
A MATERIALES	32
B MÉTODOS	34
1 Obtención de extracto metanólico	34

2 Perfil de compuestos fenólicos	34
a Separación e identificación	34
b Cuantificación	35
3 Asociación entre contenido de compuestos fenólicos y la actividad	36
Antioxidante de los extractos metanólicos	
4 Actividad antioxidante de fracciones y estándares de compuestos	36
Fenólicos	
a Método ABTS	36
1) Evaluación de las principales fracciones de compuestos fenólicos	36
encontradas en el extracto metanólico de tomate	
2) Evaluación de estándares comerciales	37
3) Evaluación de la actividad antioxidante e interacción de los	38
principales compuestos fenólicos encontrados en tomate	
silvestre	
b Método DPPH	39
5 Análisis estadístico	40
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
A PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EXTRACTOS	41
METANÓLICOS DE TOMATE SILVESTRE	
1 Identificación de compuestos fenólicos	41
2 Cuantificación de compuestos fenólicos	50
3 Análisis de componentes principales	57
B ASOCIACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS	63

FENOLICOS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS	
ACCESIONES DE TOMATE SILVESTRE	
C ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS PRINCIPALES	68
COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL EXTRACTO	
METANÓLICO DE TOMATE SILVESTRE	
1 Actividad antioxidante de las fracciones correspondientes a los	68
compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos	
de tomate silvestre	
2 Actividad antioxidante de estándares comerciales de compuestos	70
fenólicos presentes en el extracto metanólico	
VIII CONCLUSIONES	76
X BIBLIOGRAFÍA	77
ABREVIATURAS	87

# **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura	Descripción	Pág
1	Principales estados productores de tomate en el año 2014	13
2	Estructuras genéricas de los principales flavonoides	23
3	Perfil de compuestos fenólicos de la accesión de tomate Tumbisca	42
	17	
4	Espectro UV-visible característico de flavonoides (A) y ácidos	43
	fenólicos (B) observado en los extractos metanólicos analizados	
5	Estructura de los compuestos fenólicos identificados en extractos	46
	metanólicos de tomate silvestre	
6	Espectro de masas $MS^2$ del ion $m/z$ = 609 de rutina. (A) Muestra y	48
	(B) Estándar comercial	
7	Curvas de calibración de estándares de ácido caféico, ácido	51
	clorogénico y rutina utilizada en la cuantificación de compuestos	
	fenólicos	
8	Contenido de cafeoil hexosa I de las accesiones de tomate	52
	evaluadas	
9	Contenido de ácido clorogénico de las accesiones de tomate	54
	evaluadas	
10	Contenido de rutina pentósido de las accesiones de tomate	55
	evaluadas	
11	Contenido de rutina de las accesiones de tomate evaluadas	56

- 12 Contenido de ácido dicafeoilquínico de las accesiones de tomate 58 evaluadas
- 13 Contenido de ácido tricafeoilquínico de las accesiones de tomate 59 evaluadas
- 14 Análisis de componentes principales a partir de compuestos 62 fenólicos en las accesiones de tomate silvestre
- 15 Análisis de componentes principales a partir del contenido de 67 compuestos fenólicos y actividad antioxidante por ABTS y DPPH en las accesiones de tomate silvestre

# **ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro	Descripción	Pág
1	Clasificación taxonómica del tomate	10
2	Principales países productores de tomate en el año 2013	12
3	Composición química del fruto de tomate en estado maduro	15
4	Clasificación de compuestos fenólicos	22
5	Accesiones de tomate silvestre analizadas y su estado de origen	33
6	Identificación por ESI-MS de los principales compuestos	45
	fenólicos presentes en extractos metanólicos de tomate.	
7	Valores propios y porcentaje de varianza explicada de los	61
	componentes principales generados a partir del análisis del	
	contenido de compuestos fenólicos en las accesiones de tomate	
	silvestre	
8	Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de	64
	compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos	
	metanólicos de tomate silvestre	
9	Valores propios y porcentaje de varianza explicada de los	66
	componentes principales generados a partir del análisis del	
	contenido de compuestos fenólicos en las accesiones de tomate	
	silvestre	
10	Actividad antioxidante por ABTS de las fracciones	69
	correspondientes a compuestos fenólicos identificados en los	
	extractos metanólicos de tomate silvestre	

- 11 Actividad antioxidante por ABTS y DPPH de estándares de 72 compuestos fenólicos evaluados a la concentración del extracto metanólico de tomate
- 12 Actividad antioxidante por ABTS de estándares de compuestos 75 fenólicos evaluados a la misma concentración (50 mg/L)

#### I RESUMEN

El tomate (Solanum lycopersicum L) es una de las hortalizas de mayor consumo en el ámbito mundial y tiene gran importancia en la dieta humana, al representar una fuente rica en compuestos con actividad biológica. Sin embargo, el desarrollo de cultivos comerciales ha llevado a una reducción en el número de cultivares empleados, por lo que es necesario evidenciar el potencial de accesiones de tomate silvestre para su uso en programas de mejora de variedades cultivadas con el fin de obtener tomates funcionales y que al consumirse proporcionen beneficios a la salud superiores a las variedades comerciales. De manera general, estos beneficios están asociados a la interacción entre los diferentes tipos de metabolitos encontrados en el fruto de tomate. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante de 18 accesiones silvestres de tomate de México. Se analizaron extractos metanólicos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detectores de arreglo de diodos y de espectrometría de masas. Las accesiones mostraron perfiles de fenólicos similares y se identificaron: cafeoil hexosa I, ácido clorogénico, rutina, rutina pentósido y ácidos di- y tricafeoilquínico. Asimismo, las accesiones mostraron una amplia variabilidad en el contenido de estos fenólicos, destacando por su alto contenido Kilim, Rincón, Muna y Tumbisca; accesiones promisorias como fuente de genes para el desarrollo de tomates funcionales. Los principales fenólicos encontrados en los extractos metanólicos fueron el ácido clorogénico (0.0-26.27 mg/100 g b.h.) y rutina (2.1-21.54 mg/100 g b.h.), compuestos que mostraron una correlación significativa con la actividad antioxidante por ABTS (r=0.8, p<0.01) y DPPH (r=0.7, p<0.01). La actividad antioxidante de estándares de estos compuestos, evaluada por ABTS a la concentración del extracto metanólico de Tumbisca, fue similar a la encontrada en la fracción correspondiente de dicho extracto. El compuesto identificado como rutina pentósido presentó la mayor actividad antioxidante en relación a su concentración molar en el extracto. La suma de actividades de las fracciones individuales fue superior a la del extracto total, sugiriendo interacciones antagónicas entre los compuestos, lo cual fue demostrado al combinar tres estándares comerciales (ácido clorogénico, ácido caféico y rutina).

#### **ABSTRACT**

Tomato (Solanum lycopersicum L) is one of the most consumed vegetables worldwide and it is of great importance for human nutrition, representing an important source of bioactive compounds. However, the development of commercial varieties has lead to a reduction in the number of cultivars used, making necessary to demonstrate the potential use of wild tomato for breeding programs aiming at developing functional tomatoes that provide better health benefits than commercial cultivars. In general, these benefits are associated with interactions between the different metabolites found in tomato fruit. Therefore, the aim of this study was to identify phenolic compounds associated with the antioxidant activity of 18 wild tomato (S. lycopersicum var. cerasiforme) accessions from Mexico. Methanolic extracts were prepared and analyzed by high resolution liquid chromatography coupled with diode array and mass spectrometry detectors. The accessions showed similar phenolic profiles and the compounds identified were: caffeoyl hexose I, chlorogenic acid, rutin, rutin pentoside, and di- and tri- caffeoylquinic acids. The accessions showed a wide variability in the content of these phenolics, highlighting Kilim, Rincon, Muna and Tumbisca, which represent good sources of genes for developing functional tomatoes. The main phenolics found in the methanolic extracts were chlorogenic acid (0.0-26.27 mg/100 g f.w.) and rutin (2.1-21.54 mg/100 g f.w.), whose levels showed a significant correlation with the antioxidant activity by the ABTS (r=0.8, p<0.01) and DPPH (r=0.7, p<0.01). The antioxidant activity of these compounds measured by ABTS at the concentration of the Tumbisca's methanolic extract was similar to that found in the corresponding fraction. The compound identified as rutin pentoside

shower the highest antioxidant activity based on its molar concentration in the extract. The antioxidant activity of the extract was lower than the sum of activities from the individual fractions, suggesting antagonistic interactions among the compounds, which was demonstrated when three commercial standards were combined (Chlorogenic acid, caffeic acid and rutin).

# II INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas de mayor consumo en el ámbito mundial (FAO 2015) y tiene gran importancia en la dieta humana, al representar una fuente rica en compuestos con actividad biológica, tales como licopeno, β-caroteno y ácido ascórbico, los cuales han sido asociados con beneficios a la salud (Hernandez y col 2007). Sin embargo, el desarrollo de materiales de interés comercial ha llevado a una reducción en la diversidad genética de los cultivares empleados, con la consecuente disminución en la variabilidad de características nutricionales y de actividades biológicas, ya que la selección de estos materiales ha sido principalmente con base en características agronómicas como productividad y resistencia a enfermedades (Adalid y col 2010).

Varios estudios epidemiológicos indican que el consumo de frutas y hortalizas frescas se relaciona inversamente con el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como enfermedades cardiovasculares y cáncer (Subahir y col 2009). El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, sin embargo, puede prevenirse mediante la reducción de sus cuatro factores de riesgo más importantes: el tabaquismo, el sedentarismo, el uso nocivo del alcohol y las dietas malsanas (OMS 2015).

México constituye una fuente importante, además de tomate cultivado (*S. lycopersicum*), de variedades silvestres (*S. lycopersicum* var *cerasiforme*), por lo que es necesario tener conocimiento sobre las características de estos materiales y su potencial como fuente de mejora de variedades cultivadas.

En un estudio previo se realizó la caracterización de la variabilidad de 20 accesiones de S. *lycopersicum* var cerasiforme de México en cuanto a su contenido de compuestos bioactivos (Sicairos-Medina 2013). Los resultados mostraron que estos materiales presentan una amplia variabilidad en los componentes estudiados, los cuales en su mayoría poseen contenidos que superan lo encontrado en los materiales comerciales, lo que sugiere que tienen gran potencial en la mejora de variedades cultivadas. Además, dicho estudio encontró una buena correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante *in vitro* evaluado por los métodos ABTS y DPPH. El objetivo de la presente investigación fue identificar compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante de accesiones de tomate silvestre de México para avanzar en el establecimiento de su potencial nutracéutico y como fuente de germoplasma para los programas de mejoramiento de variedades comerciales de tomate.

#### III REVISIÓN DE LITERATURA

#### A GENERALIDADES DE TOMATE

#### 1 Origen y domesticación

El centro de origen del cultivo de tomate es la región andina, integrada por Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, donde crecen espontáneamente las diversas especies del género y donde existe la mayor variabilidad genética (Esquinas y Nuez 1995).

En cuanto al lugar de domesticación del tomate cultivado se han propuesto como alternativas Perú y México (Peralta Iris y Spooner David 2007). Sin embargo, México es considerado como el sitio de domesticación o sitio de origen secundario (Bai y Lindhout 2007). Entre los motivos que apoyan que el sitio de origen de la domesticación de los tomates es México está el hecho de que el uso de las formas domesticadas en nuestro país es muy antiguo, ya que sus frutos eran empleados como alimento por las culturas indígenas que habitaban el centro y sur de México, mientras que en la zona andina su consumo pudo haber sido más bien incidental. Además, el tomate no tiene ningún nombre conocido en quechua, aymara o cualquier otro idioma andino, mientras que el nombre moderno tiene su origen en el de *tomatl*, en la lengua náhuatl de México (Esquinas y Nuez 1995). Los Aztecas llamaban a esta hortaliza "Xitomatl", que significa "fruto con ombligo" (Smith 1994).

La domesticación del tomate ha ocurrido en dos etapas. En la primera etapa se seleccionaron frutos de tamaño moderado, tipo cherry, con la fijación de la autogamia o la producción de semillas por autofecundación, en el mismo centro de

origen. En la segunda, frutos de mayor tamaño se seleccionaron e introdujeron desde los Andes hacia América Central (Ranc y col 2008). Se estima que el tomate fue llevado a Europa en el año 1554 después de la colonización de las culturas mesoamericanas, donde se introdujo como una planta de ornato; posteriormente el establecimiento de rutas comerciales y colonias favoreció su dispersión alrededor del mundo (Esquinas y Nuez 1995). Los cambios más importantes en el proceso de domesticación y mejoramiento del cultivo de tomate ocurrieron recientemente y fueron: el sistema de reproducción desde la alogamia (fecundación cruzada) a la autogamia, el incremento del tamaño del fruto, la obtención de frutos de colores muy variados y uniformes (Chen y col 2007; Paran y van der Knaap 2007; Powell y col 2012).

Actualmente se conocen nueve especies silvestres de tomate, dentro de las que se encuentran: Solanum pimpinellifolium, S. cheesmanii, S. neorickii, S. chmilewski, S. habrochaites, S. pinnelli, S. chilense, S. peravianum y S. lycopersicum var. cerasiforme (Spooner y col 2005; Bergougnoux 2014). Todas ellas presentan características muy particulares, sin embargo S. lycopersicum var. cerasiforme y S. pimpinellifolium han sido reconocidos como los ancestros de las formas domesticadas actuales (Blanca y col 2012).

Solanum lycopersicum var. cerasiforme se distribuye en regiones tropicales, prefiere condiciones húmedas muy variadas, y se encuentra en forma de mala hierba en terrenos de cultivo recientes. Como características interesantes y propias de su especie, esta planta es tolerante a la humedad, resistente a los hongos de la marchitez y la podredumbre de las raíces y la viruela; se autopoliniza y tiene una alta capacidad de cruzamiento con otras variedades de tomate (Esquinas y Nuez 1995)

TGRC 2013; Sanchez-Pena y col 2006). En poblaciones rurales del occidente de México, la variedad cerasiforme es conocida con distintos nombres (*e.g.* chaltomate, tomatillo, jaltomate, tinguaraque, ojo de venado) y es utilizada como alimento, básicamente en la elaboración de salsas y también de forma medicinal para humanos y animales (Rodriguez y col 2009).

#### 2 Taxonomía y aspectos botánicos

El tomate pertenece a la familia de las solanáceas (**Cuadro 1**), una de las familias de mayor importancia económica en el mundo, que incluye papa, pimiento, berenjena, petunia y tabaco (Foolad 2007). Tomando en cuenta relaciones filogenéticas, durante muchos años se discutió la pertenencia del tomate a los géneros *Solanum y Lycopersicum*. Datos morfológicos y moleculares, han colocado al tomate dentro del género *Solanum* (Spooner y col 2005), concordando de esta manera con la clasificación original de Linnaeus en 1753, por lo que se ha admitido el nombre de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado (Foolad 2007).

Botánicamente, el tomate es un fruto, pero desde el punto de vista hortícola es un vegetal. Proviene de una planta perenne herbácea de tallo voluble y largo, hojas lobuladas con los bordes dentados y puede desarrollarse de forma rastrera, semirecta o erecta. La forma de los frutos varía de redondos aplanados hasta redondos perfectos, redondos cuadrados, ovoides, en forma de pera y diferentes variaciones entre éstas (Hobson y Grierson 1993).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del tomate

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobinta
Superdivisión	Spermatophyta
Subdivisión	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Solanum L.
Especie	Solanum lycopersicum L.

Fuente: NRCS-USDA (2015).

El fruto de tomate se clasifica como una baya carnosa y se compone de una epidermis, un pericarpio grueso y tejidos placentarios rodeados de semillas (Tanksley 2004). El color del fruto, verde al principio y rojo cuando madura, se debe a una sustitución de clorofila en plástidos de las células por carotenoides. La coloración de los frutos maduros puede ser rojo, rosa, naranja, amarillo o blanco; sin embargo, la mayoría de las variedades comerciales son rojas o rosas (Madhavi y Salunkhe 1998).

#### 3 Producción

La producción mundial de tomate en el año 2013 fue superior a los 163 millones de Ton (**Cuadro 2**). Para este mismo año, los principales países productores fueron China, India, Estados Unidos, Turquía, Egipto, Irán, Italia, España, Brasil y México (FAO 2015).

Con respecto a la producción nacional, en el año 2014 se produjeron más de 2.8 millones de Ton de tomate; Sinaloa ocupó el primer lugar con 867,832 Ton, seguido por los estados de San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco y Zacatecas (**Figura 1**) (SIAP 2015). La mayor parte de la producción de tomate es utilizada para abastecer la demanda del mercado Estadounidense y en menor proporción el de Canadá, así como algunos países de Europa y Asia.

Cuadro 2. Principales países productores de tomate en el año 2013

País	Producción
	(Ton)
China	50,552,000
India	18,227,000
Estados Unidos	12,574,550
Turquía	11,820,000
Egipto	8,533,803
Irán	6,174,182
Italia	4,932,463
Brasil	4,187,646
España	3,683,600
México	3,282,583
Otros países	39,466,012
Total	163,433,839

Fuente: FAO (2015)

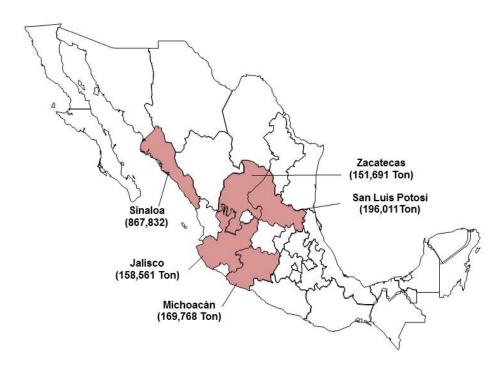


Figura 1. Principales estados productores de tomate en el año 2014.

(SIAP 2015).

#### 4 Composición química del fruto de tomate

La composición química del tomate depende de factores como diferencias genéticas, estado de madurez, condiciones ambientales y de cultivo, así como de las condiciones poscosecha (Tedeschi y col 2011). En el **Cuadro 3** se presenta de manera general la composición química del fruto de tomate, donde se puede observar que está compuesto principalmente por agua, carbohidratos y azúcares (glucosa y fructosa), además de contener una cantidad importante de fibra y vitamina C. Los azúcares libres, representan más del 60% de los sólidos presentes en el fruto, mientras que los ácidos orgánicos predominantes son el ácido cítrico y málico. Los ácidos glutámico, aspártico y γ-aminobutírico, así como glutamina, comprenden alrededor del 80% de los aminoácidos libres. La fracción lipídica está compuesta por triglicéridos, esteroles, ésteres de esterol, ácidos grasos libres e hidrocarburos (Madhavi y Salunkhe 1998).

De acuerdo a la información mostrada en el **Cuadro 3**, una porción de 100 g de tomate maduro fresco aporta el 16.7 y 22.8% de las recomendaciones diarias para vitaminas A y C, respectivamente (FDA 2015). Los contenidos de β-caroteno (provitamina A) y ácido ascórbico (vitamina C) en el fruto de tomate no son tan altos como en otros productos hortofrutícolas, pero debido a su alto consumo se considera una fuente importante de dichas vitaminas en la dieta del ser humano (Davies y Hobson 1981).

Cuadro 3. Composición química del fruto de tomate en estado maduro

Componente	Contenido por 100 g de tejido fresco
Componentes mayoritarios	
Agua (g)	94.52
Proteína ( <u>N</u> x 6.25) (g)	0.88
Lípidos totales (g)	0.20
Cenizas (g)	0.50
Hidratos de carbono (por diferencia) (g)	3.89
Fibra dietaria total (g)	1.20
Azúcares totales (g)	2.63
Vitaminas	
Vitamina C (ácido ascórbico total) (mg)	13.7
Ácido nicotínico (mg)	0.594
Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (mg)	0.540
Ácido pantoténico (mg)	0.089
Vitamina B6 (mg)	0.080
Tiamina (mg)	0.037
Riboflavina (mg)	0.019
Vitamina A (UI)	833
Minerales	
Potasio (mg)	237
Fósforo (mg)	24
Magnesio (mg)	11
Calcio (mg)	10
Sodio (mg)	5
Otros	
Licopeno (µg)	2573
β-caroteno ( μg)	449

Fuente:NRCS-USDA (2015)

Directrices dietéticas actuales recomiendan una mayor ingesta de alimentos de origen vegetal, ya que varios estudios epidemiológicos indican que el consumo de frutas y hortalizas se relaciona inversamente con el riesgo de desarrollar padecimientos crónicos, entre los que se encuentran enfermedades cardiovasculares y cáncer (Giovannucci 1999; Chang y col 2006; Rodriguez-Munoz y col 2009). En este sentido investigaciones recientes se han enfocado en la identificación de componentes biológicamente activos en los alimentos, encontrándose que muchos productos alimenticios tradicionales, como frutas y verduras contienen componentes con beneficios potenciales para la salud (Adalid y col 2010).

Algunos componentes que han sido identificados en la mayoría de frutos y vegetales como los principales responsables de estos beneficios son las vitaminas C, E, pro-vitamina A, minerales y metabolitos secundarios como carotenoides, antocianinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos, que actúan por diferentes mecanismos siendo uno muy importante el antioxidante (Luthria y col 2006). Al respecto, el fruto de tomate contiene compuestos fisiológicamente bioactivos entre los que se encuentran carotenoides y compuestos fenólicos, los cuales promueven beneficios positivos para la salud (Zanfini y col 2010).

En el caso de materiales silvestres, se reportó que accesiones de tomate tipo cherry (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) de diferentes países presentaron contenidos de vitamina C hasta 1.5 veces mayores que el tomate domesticado (Adalid y col 2010). Crisanto-Juarez y col (2010) evaluaron la calidad nutricional de tomates silvestres de Oaxaca, México. Los contenidos más altos de licopeno en base húmeda encontrados para estos materiales fueron de 26.8, 28.2 y 26.3 mg/100 g, por otro lado, el valor de contenido de vitamina C más alto fue de 13.8 mg/100g.

El licopeno es el carotenoide más abundante en el fruto maduro, representando aproximadamente del 80-90% de los pigmentos, el resto corresponde a β-caroteno y xantofilas. Se acumula principalmente en el periodo final de maduración. Las clorofilas y carotenoides, incluyendo al licopeno, son los principales agentes responsables del color del fruto (Hernandez y col 2007). En ensayos *in vitro*, el licopeno ha presentado una fuerte actividad antioxidante (Rao y Agarwal 1999) y estudios epidemiológicos han correlacionado positivamente su ingesta con un menor riesgo de cáncer de próstata (Mariani y col 2014).

Además de licopeno, otros carotenoides comúnmente encontrados en tomate y en productos derivados de éste son: violaxantina, neoxantina, luteína, zeaxantina,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno, fitoeno, fitoflueno, ciclolicopeno y  $\beta$ -caroteno 5, 6-epóxido. Entre éstos,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina tienen actividad de pro-vitamina A (George y col 2004; Guil-Guerrero y Rebolloso-Fuentes 2009).

Otro de los principales grupos de fitoquímicos dietéticos son los compuestos fenólicos. Éstos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos y pueden ser clasificados en función del número y disposición de sus átomos de carbono (Crozier 2006). Varios de estos compuestos se encuentran en la naturaleza como glicósidos y/o en forma de ésteres (Barros y col 2012).

Los fenólicos tienen funciones importantes en plantas y poseen actividad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana, además han sido relacionados con la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer (Melendez y col 2010).

#### **B ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo es el resultado de alteraciones en el balance prooxidativo/antioxidativo celular (Blasiak y col 2014), en esta condición los niveles celulares de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) sobrepasan las capacidades antioxidantes de la célula (Yan 2014).

Las ROS como anión superóxido (O<sub>2</sub>-), radical hidroxilo (HO·), y oxígeno singulete (¹O<sub>2</sub>) son producidos como resultado de procesos bioquímicos *in vivo* (Sueishi y col 2014). Éstas pueden formarse en muchas formas: 1) como producto de la cadena respiratoria en la mitocondria, reacciones fotoquímicas y enzimáticas, 2) como resultado de la exposición a la luz UV, 3) radiación ionizante, o 4) iones de metales pesados (Blasiak y col 2014).

Las ROS juegan un papel importante en la regulación de muchos procesos fisiológicos involucrados en la señalización intracelular, pero en condiciones de estrés oxidativo pueden inducir serios daños o modificaciones a biomoléculas como oxidación de lípidos, oxidación de proteínas, aminoácidos, rotura de la cadena de ADN y la modificación de las bases, así como la modulación de la expresión génica (Lee y col 2004; Yan 2014). La generación de ROS es una parte del metabolismo normal en un sistema biológico. Los radicales libres son especies muy reactivas, que una vez formados pueden iniciar una serie de reacciones que son perjudiciales para la célula. Es importante destacar que incluso en condiciones normales hay una producción celular fisiológica de los radicales libres, que normalmente se ve contrarrestada por los sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos celulares. El equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y antioxidantes es

esencial en un sistema biológico para prevenir los efectos adversos del estrés oxidativo. El daño causado por los radicales libres es causado por un desequilibrio entre su producción y su neutralización por los sistemas antioxidantes de las células en el cuerpo humano (Babbar y col 2014).

Investigaciones recientes han contribuido a mejorar la comprensión de la participación de las ROS en el desarrollo de muchas enfermedades crónicas, entre las que se incluyen aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, diabetes y cáncer (Lee y col 2004; Donovan y col 2012).

Un gran número de frutas y verduras frescas son consideradas fuentes principales de antioxidantes y un alto consumo de éstas ha demostrado tener un efecto protector contra enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Giovannucci 1999; Subahir y col 2009). La ingesta dietética de fruto y productos de tomate que contienen licopeno se ha asociado con un menor riesgo de padecer estas enfermedades (Chang y col 2006). Hallazgos epidemiológicos confirman los efectos observados sobre la salud debido a la presencia de diversos antioxidantes en tomate (George y col 2004).

El consumo regular de pequeñas cantidades de productos de tomate aumenta la protección de las células contra el daño del ADN por especies oxidantes (Riso y col 2004). Este efecto protector se atribuye comúnmente a los componentes antioxidantes, entre los que se encuentran ácido ascórbico, vitamina E, y metabolitos secundarios como carotenoides y compuestos fenólicos. En tomate se ha registrado la presencia de ácidos caféico, ferúlico, clorogénico y *p*-cumárico, destacando el alto contenido de ácido clorogénico (Hernandez y col 2007).

Zanfini y col (2010) estudiaron la actividad antioxidante de extractos lipofílicos obtenidos de diferentes variedades de tomate. Los tomates tipo cherry mostraron los valores más altos de actividad antioxidante y el contenido de licopeno se correlacionó con tal actividad ( $p \le 0.001$ ).

llahy y col (2011) evaluaron los componentes antioxidantes de seis cultivares de tomate altos en licopeno y uno ordinario cultivados simultáneamente en campo abierto. No se encontró una correlación significativa entre la actividad antioxidante hidrofílica medida por TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) y el contenido total de vitamina C (p > 0.05); sin embargo, se observó una buena correlación con compuestos fenólicos (p < 0.01).

Raffo y col (2002) evaluaron la actividad antioxidante de tomate cherry (cv. Naomi F1) en diferentes estados de maduración y de fracciones hidrosolubles y lipofílicas. En general, la fracción hidrosoluble mostró los mayores valores de actividad antioxidante (174-270 µmoles equivalentes de trolox [ET]/ 100 g de peso fresco) en comparación con la fracción lipofílica (15-36 µmoles ET/ 100 g de peso fresco). En este sentido, la fracción hidrosoluble (ácido ascórbico y compuestos fenólicos) presentó una correlación positiva (p  $\leq$  0.05) con la actividad antioxidante. La actividad antioxidante de la fracción lipofílica se debe esencialmente a carotenoides, especialmente licopeno, según lo confirmado por el valor relativamente alto del coeficiente de correlación (r=0.962, p  $\leq$  0.01) entre su contenido y la actividad antioxidante de la fracción.

## C COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS EN TOMATE

Diversos estudios han establecido que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante del tomate. En el **Cuadro 4** se muestran las principales familias de compuestos fenólicos. Varios de estos compuestos se encuentran en la naturaleza como glicósidos y/o en forma de ésteres (Barros y col 2012). Los fenólicos también pueden ser clasificados en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Crozier 2006).

Los flavonoides se definen por su esqueleto básico (**Figura 2**), que consiste en dos anillos aromáticos con seis átomos de carbono (anillo A y B) interconectados por un heterociclo de tres átomos de carbono (anillo C). De acuerdo con las modificaciones del anillo C central, los flavonoides se dividen en diferentes clases estructurales como flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles y antocianinas (Bovy y col 2007). Los flavonoides son considerados compuestos útiles en la prevención y en el tratamiento de enfermedades/ síntomas tales como inflamación, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Slimestad y Verheul 2009).

Los principales compuestos no flavonoides de importancia dietética son los ácidos fenólicos  $C_6$ - $C_1$ , sobre todo el ácido gálico que es precursor de los taninos hidrolizables, los hidroxicinamatos  $C_6$ - $C_3$  y sus derivados conjugados, así como los estilbenos  $C_6$ - $C_2$ - $C_6$  (Crozier 2006).

En tomate se ha encontrado la presencia de fenólicos de tipo flavonoide tales como rutina (quercetina-rutinósido), uno de los principales en fruto maduro, así como chalcona naringenina, y kaempferol (Bovy y col 2002; Martinez-Valverde y col 2002; lijima y col 2008; Vallverdú-Queralt y col 2011a; Di Lecce y col 2013).

Cuadro 4. Clasificación de compuestos fenólicos

Número de carbonos	Esqueleto	Clasificación	Estructura básica
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos	<b>С</b> СООН
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas	OCH <sub>3</sub>
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Ácido fenilacético	COOH
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos hidroxicinámicos	COOH
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas	O O
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas	oğ
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas	o
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos	000
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides	000

Fuente: Crozier (2006)

Figura 2. Estructuras genéricas de los principales flavonoides (Crozier 2006)

También se ha encontrado en tomate la presencia de fenólicos de tipo no flavonoide, particularmente derivados del ácido hidroxicinámico, tales como los ácidos caféico, p-cumárico, ferúlico y clorogénico (Slimestad y Verheul 2005; Luthria y col 2006; Hernandez y col 2007; Vallverdú-Queralt y col 2011a). Los ácidos clorogénicos tienen numerosas propiedades benéficas para la salud relacionadas con su actividad antioxidante, así como hepatoprotectora, hipoglucémica y antiviral. También son responsables de algunos sabores astringentes.

Gomez-Romero y col (2010) analizaron los metabolitos presentes en extractos metanólicos de tomate de tres variedades diferentes (Daniella, Raf y Rambo) utilizando cromatografía líquida acoplada a múltiples sistemas de detección. Entre las diferentes clases de metabolitos encontradas, los fenólicos fueron los más abundantes, y de éstos destaca el ácido hidroxicinámico y sus derivados, siendo los principales cafeoil hexosa I, ácido cumárico hexosa I, ácido clorogénico y ácido 5-cafeoil quínico. En el grupo de los flavonoides, los principales metabolitos encontrados fueron rutina, naringenina, chalconaringenina y floretina dihexósido.

Por su parte, Martinez-Valverde y col (2002) analizaron nueve variedades comerciales de tomate (Rambo, Senior, Ramillete, Liso, Pera, Canario, Durina, Daniella y Remato) en cuanto a su contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, encontrando que los más abundantes fueron quercetina y ácido clorogénico. Además, encontraron que algunos compuestos fenólicos individuales están relacionados con la capacidad antioxidante mostrada, entre ellos los ácidos ferúlico y caféico.

Recientemente, algunos estudios se han enfocado en determinar la interacción que presentan los compuestos fenólicos en términos de su actividad

antioxidante. En este sentido, es posible que se presenten tres diferentes efectos: a) un efecto aditivo (también referido como no interacción), b) un efecto sinérgico ó c) un efecto antagonista. Los estudios de este tipo muestran resultados contrastantes. Pinelo y col (2004) estudiaron el efecto sobre la actividad antioxidante de una mezcla de tres compuestos fenólicos a diferentes temperaturas mediante DPPH, observando un efecto antagonista. Estos resultados contribuyen a la hipótesis de que la interacción entre compuestos fenólicos es responsable de la baja actividad antioxidante observada en un sistema complejo en comparación con sus actividades individuales.

Raffo y col (2002) evaluaron la actividad antioxidante de la fracciones hidrosolubles y lipofílicas de tomate cherry (cv. Naomi F1). La fracción hidrosoluble (ácido ascórbico y compuestos fenólicos) mostró mayores valores de actividad antioxidante (174-270 µmoles ET/ 100 g de peso fresco) que la lipofílica (15-36 µmoles ET/ 100 g de peso fresco). Sin embargo, de los componentes de la fracción hidrosoluble solamente el ácido caféico mostró una correlación significativa (r = 0.933,  $p \le 0.05$ ) con la actividad antioxidante, por lo que es probable que la actividad antioxidante total dependa también de los efectos sinérgicos entre todos los antioxidantes solubles en agua y su interacción con otros componentes de la fracción.

Palafox-Carlos y col (2012) analizaron la actividad antioxidante en forma individual y en combinaciones de estándares de los principales compuestos fenólicos encontrados en la pulpa del mango Ataulfo (*i.e.* ácido clorogénico, ácido gálico, ácido protocatecuico y ácido vanílico) mediante el método de DPPH, encontrando sinergismo en la mayoría de las combinaciones evaluadas.

Con respecto a la variación en fenólicos y actividad antioxidante de tomate domesticado y sus parientes silvestres, Hanson y col (2004) encontraron una alta correlación positiva entre el contenido de fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de frutos de 50 accesiones de *Solanum lycopersicum* y tres de *S. pimpinellifollium*.

Por su parte, Melendez y col (2010) encontraron una amplia variación en la acumulación de fitoquímicos y actividad antioxidante de parientes silvestres del tomate. Los principales compuestos fenólicos encontrados fueron los flavonoides rutina (quercetina-3-O-rutinósido) y naringenín chalcona, así como el ácido clorogénico que es derivado del ácido hidroxicinámico. También se observaron diferencias cuantitativas importantes entre la actividad antioxidante *in vitro* de las muestras.

Kavitha y col (2014) realizaron un estudio en distintos genotipos de tomate (*i.e.* híbridos, variedades, tomates tipo cherry, especies silvestres, líneas de germoplasma de élite, híbridos interespecíficos y poblaciones de retrocruzamiento) con el objetivo de seleccionar líneas con alta actividad antioxidante y alto contenido de sólidos solubles totales para su uso en programas de mejoramiento de cultivos. Los resultados indicaron que las especies silvestres e híbridos interespecíficos fueron mejores fuentes de compuestos fenólicos. Además, evaluaron la correlación entre el contenido de compuestos antioxidantes (*i.e.* fenólicos totales, flavonoides totales, vitamina C y carotenoides totales) y la actividad antioxidante evaluada por los métodos FRAP y DPPH, encontrando una alta correlación con el contenido de fenólicos totales (r=0.92, r=0.94, p<0.01) y flavonoides totales (r=0.96, r=0.95, p<0.01).

La variabilidad asociada a las poblaciones silvestres de tomate hace factible la identificación de materiales con alto contenido de compuestos funcionales. Estos materiales podrían ser dirigidos a abastecer los mercados de calidad que exigen no sólo altas características sensoriales, sino también un valor funcional añadido. Para este propósito, sería conveniente desarrollar cruzas complementarias intra-varietales con el fin de desarrollar nuevas poblaciones con altos niveles de acumulación de conjuntos de diferentes compuestos. Esta estrategia sería muy valiosa en la exploración de las posibilidades de obtener un mayor precio como resultado del valor funcional añadido. Por lo tanto, podría contribuir a ofrecer una conservación in situ promoviendo la recuperación de estos materiales por los agricultores. Adicionalmente, estos recursos genéticos también podrían ser utilizados como fuentes promisorias de variación en programas de mejoramiento de nuevas variedades comerciales (Cortes-Olmos y col 2014). En este sentido, Willits y col (2005) propusieron realizar cruzas utilizando especies de tomate silvestre como una estrategia para desarrollar tomates con alto contenido de flavonoides, encontrando que los frutos F1 provenientes de la cruza entre S. lycopersicum y S. pennelli, mostraron un incremento de casi 12 veces en los niveles de flavonoides comparado con S. lycopersicum.

México es considerado el sitio de domesticación secundaria del fruto de tomate, pero los estudios sobre sus especies silvestres son escasos. Sicairos-Medina (2013) caracterizó accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* originarias de nueve estados diferentes de la República Mexicana en cuanto a su contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Los resultados mostraron una amplia variabilidad tanto en el contenido de compuestos fenólicos

como en su actividad antioxidante. Además se encontró una asociación positiva significativa entre la capacidad antioxidante determinada por ABTS y DPPH y el contenido de compuestos fenólicos totales (r = 0.86, r = 0.79). Sin embargo, se requieren estudios adicionales que permitan definir la identidad de estos compuestos y su interacción para poder establecer su contribución en la actividad antioxidante.

## IV JUSTIFICACIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas de mayor consumo en el ámbito mundial y tiene gran importancia en la dieta humana, al representar una fuente rica en compuestos con actividad biológica, tales como licopeno, β-caroteno, ácido ascórbico, entre otros. Sin embargo, el desarrollo de cultivos comerciales ha reducido la poza genética del tomate, con la consecuente disminución en la diversidad de características nutricionales.

La mayoría de los cultivares silvestres de tomate han desaparecido al ser reemplazados por híbridos y cultivares modernos de mayor rendimiento. No obstante, los actuales programas de mejoramiento, además de mejorar la productividad y adaptación, buscan mejorar la calidad nutricional y resistencia a patógenos en los genotipos mejorados. Esto hace necesario tener conocimiento sobre las características de las variedades silvestres y su potencial como fuente de genes para obtener nuevas variedades de tomate.

En un estudio previo, Sicairos Medina (2013) caracterizó accesiones de Solanum lycopersicum var. cerasiforme originarias de nueve estados diferentes de la República Mexicana, en cuanto a su contenido de compuestos con actividad biológica (fenólicos totales, β-caroteno, licopeno y ácido ascórbico) y a sus actividades antioxidante y antimutagénica. Este estudio mostró algunos materiales silvestres con contenidos superiores de estos compuestos respecto a variedades comerciales, destacándose las colectas de Sinaloa por su contenido de ácido ascórbico. Respecto a la actividad antioxidante, las accesiones mostraron una amplia variabilidad, lo que demuestra su potencial uso como fuente de genes para generar variedades con mayor valor comercial basadas en la producción de frutos de tomate

funcionales, que al consumirse aporten mayor cantidad de nutrientes así como mayores beneficios a la salud. Por otro lado, se observó una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido de fenólicos totales, lo cual sugiere que estos compuestos son los que contribuyen en mayor medida a la capacidad antioxidante mostrada por estos materiales. Sin embargo, falta definir con mayor claridad la identidad de los compuestos que pudieran estar impactando en la actividad antioxidante mostrada por estos materiales. Es por esto que en el presente trabajo se propuso realizar la caracterización de compuestos responsables de la actividad antioxidante en accesiones silvestres de tomate de México, con el fin de contribuir a definir con mayor claridad el potencial nutracéutico de estos materiales.

#### **V OBJETIVOS**

#### A OBJETIVO GENERAL

Identificar compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante de accesiones de tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var *cerasiforme*) de México.

### **B OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el perfil de compuestos fenólicos de los extractos metanólicos de las accesiones de tomate silvestre estudiadas.
- Determinar asociaciones entre el contenido de compuestos fenólicos de los extractos metanólicos de las accesiones de tomate estudiadas y su actividad antioxidante.
- Evaluar la actividad antioxidante de los componentes fenólicos mayoritarios a la concentración encontrada en los extractos para establecer si son responsables de dichas actividades.

## **VI MATERIALES Y MÉTODOS**

### **A MATERIALES**

Se utilizaron frutos de 38 individuos correspondientes a 18 accesiones de frutos de tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var cerasiforme) originarias de diferentes estados de la República Mexicana (**Cuadro 5**), las cuales fueron colectadas por el Dr. Pedro Sánchez Peña y crecidas bajo condiciones de riego en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

Los frutos se recolectaron en forma manual, en estado maduro y de al menos tres plantas de cada accesión tomando como criterios de selección color uniforme, firmeza al tacto y ausencia de defectos. Los tomates fueron transportados en hielo al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con sede en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde fueron lavados con agua, cortados en trozos pequeños y secados en una liofilizadora modelo 5L (The Virtis Company, New York, EUA). Las muestras secas fueron almacenadas en bolsas de plástico protegidas de la luz a -70°C hasta su posterior uso.

Cuadro 5. Accesiones de tomate silvestre analizadas y su estado de origen

Accesión	Código Individuos	Estado
Altamirano	14	Chiapas
Camaza	7, 9, 11	Sinaloa
Cartagena	3, 5, 6	Chiapas
Cañas	2	Guerrero
Chuylen	13, 14	Yucatán
F. Ruiz	6	Chiapas
Francisco	2	Tabasco
Jeronimito	5, 12	Guerrero
Kilim	14, 16	Yucatán
Llanos	11, 13, 16	Guerrero
Muna	7, 8	Yucatán
Placharosa	2, 10	Sinaloa
Pomparosa	10, 12, 19	Sinaloa
Rincón	8, 13, 15	Oaxaca
San Juan	2, 5	Veracruz
Temax	10	Yucatán
Tumbisca	16, 17, 22	Michoacán
Villamaza	8, 17, 18	Sinaloa
Total individuos	38	

## **B MÉTODOS**

#### 1 Obtención de extracto metanólico

La extracción de compuestos fenólicos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Gomez-Romero y col (2010), con algunas modificaciones. Se pesaron 200 mg de muestra liofilizada y se mezcló con 2 mL de metanol, posteriormente se sonicó por 20 min, seguido de una centrifugación a 8000 rpm durante 20 min; el sobrenadante se recuperó y el residuo se extrajo dos veces más para posteriormente mezclar los sobrenadantes, los cuales fueron pasados a través de un filtro de jeringa (PVDF membrane HPLC certified, Pall Corporation, EUA). Los extractos fueron barridos bajo corriente de nitrógeno para posteriormente ser almacenados a -20 °C protegidos de la luz.

## 2 Perfil de compuestos fenólicos

# a Separación e Identificación

La separación de los compuestos fenólicos se realizó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) modelo ACCELA dotado con un detector de arreglo de diodos (DAD) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA). Se inyectó una alícuota de 5 µL del extracto metanólico y la separación se realizó en una columna FORTIS C18 (3µm, 50 x 2.1 mm) (Fortis Technologies Ltd., Cheshire, Inglaterra) utilizando como fases móviles agua:ácido fórmico (1%) (Solvente A) y acetonitrilo (Solvente B) a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min. Se utilizó un gradiente de elución iniciando con 99.5% del solvente A y 0.5% del solvente B hasta alcanzar un 40% de A y 60% de B al minuto 40. Finalmente, la columna fue

equilibrada con 100% del solvente A durante 5 minutos con un tiempo de secuencia total de 45 minutos. La detección se realizó a 280, 320 y 350 nm. Estándares comerciales de ácido protocatecuico y daidzeína fueron utilizados como estándares internos.

La identificación de los compuestos fenólicos se realizó a partir de la comparación de los tiempos de retención y espectros UV visible con los de estándares comerciales (ácido clorogénico y rutina), así como por espectrometría de masas (MS).

Posterior a la separación por HPLC-DAD, los compuestos fenólicos fueron analizados en un espectrómetro de masas LTQ-XL (Thermo Scientific, Waltham, EUA) utilizando una fuente de ionización por electrospray operando en modo positivo/negativo con voltaje y temperatura del capilar de 35 V y 300°C, respectivamente. La adquisición de los datos se llevó a cabo con ayuda del software Xcalibur versión 2.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) en modo de escaneo completo utilizando una relación *m/z* de 110 hasta 2000. Este análisis permitió conocer el peso molecular y los fragmentos generados de los compuestos.

#### b Cuantificación

La cuantificación de los compuestos fenólicos de los extractos metanólicos se realizó por HPLC empleando curvas de calibración obtenidas a partir de la separación de concentraciones conocidas (0.5-60 µg/mL) de estándares comerciales de rutina y ácido clorogénico, para flavonoides y ácidos fenólicos, respectivamente. Los resultados fueron expresados como mg/100 g b.h.

# 3 Asociación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los extractos metanólicos

Se realizaron análisis de correlación de Pearson y de componentes principales a partir del contenido de los compuestos fenólicos analizados por HPLC en el presente estudio y la actividades antioxidantes por los métodos ORAC, ABTS y DPPH evaluadas previamente por Sicairos-Medina (2013).

# 4 Actividad antioxidante de fracciones y estándares de compuesto fenólicos a Método ABTS

El ABTS\*\* (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) es un radical libre generado por una reacción que puede ser química (persulfato de potasio), enzimática (peroxidasa) o electroquímica. Este método mide la actividad antioxidante de compuestos de varias polaridades, incluyendo carotenoides, compuestos fenólicos, y algunos antioxidantes del plasma.

El radical catiónico ABTS\*+ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm. El método se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical catiónico ABTS\*+, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones (Re y col 1999), expresándose como porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm.

# 1) Evaluación de las principales fracciones de compuestos fenólicos encontradas en el extracto metanólico de tomate

Los compuestos fenólicos presentes en 5 µL del extracto metanólico fueron separados mediante HPLC y recolectados individualmente para evaluar su actividad

antioxidante. Se realizaron 20 corridas de HPLC y los volúmenes recolectados de cada fracción se secaron en un concentrador al vacío a una temperatura de 30°C. Los compuestos de cada fracción fueron resuspendidos en el volumen total inyectado en la columna (100 µL) para evaluarlos a la misma proporción encontrada en el extracto original. Para la evaluación de la actividad antioxidante, las fracciones se diluyeron cuatro veces.

### 2) Evaluación de estándares comerciales

A partir de los perfiles de compuestos fenólicos en los extractos se seleccionaron algunos de los más abundantes con base en su correlación con la actividad antioxidante del extracto y su disponibilidad comercial, con la finalidad de realizar evaluaciones tanto de forma individual como en mezclas para determinar su contribución a la actividad antioxidante de la muestra. Los compuestos fenólicos seleccionados fueron: ácido caféico (por no contar con un estándar de cafeoil hexosa), ácido clorogénico y rutina. Los valores de actividad antioxidante de los compuestos fenólicos individuales se tomaron en cuenta para calcular mediante su suma el valor de actividad antioxidante teórico o esperado de las mezclas, de tal manera que los valores teóricos y observados fueron comparados con el fin de determinar si las mezclas presentaban algún tipo de interacción: a) sinérgica, si el valor observado era significativamente mayor que el esperado; b) antagónica, si el valor observado era menor que el esperado; y c) aditiva, si el valor observado fue igual que el esperado. Los estándares comerciales de ácido caféico, ácido clorogénico y rutina fueron evaluados a la misma concentración encontrada en las fracciones de los extractos metanólicos (18.06, 84.04 y 25.29 µM, respectivamente).

# 3) Evaluación de la actividad antioxidante e interacción de los principales compuestos fenólicos encontrados en tomate silvestre

Para el ensayo de actividad antioxidante por ABTS se hizo una adecuación del método para realizarse en microplaca. El radical ABTS<sup>\*+</sup> se generó utilizando 5 ml de una disolución de ABTS (7 mM en agua) y 1 mL de persulfato de potasio (140 mM). La mezcla se mantuvo en oscuridad y en reposo durante 16 h a temperatura ambiente. La disolución de ABTS<sup>\*+</sup> fue diluida con PBS (pH 7.4, 10 mM) hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 ( $\pm$  0.02) a 734 nm ( $\lambda_{máx}$ ).

Se mezclaron 292.5 μl de la disolución de ABTS<sup>++</sup> con 7.5 μL de muestra (fracciones del extracto, estándares individuales o mezclados) en los pozos de la microplaca. Como blanco se utilizó una mezcla de 7.5 μL de metanol y 292.5 μL de disolución de ABTS<sup>++</sup>. La lectura de la absorbancia se ajustó a cero con 300 μL de PBS. La microplaca se incubó a 37°C durante 10 min para posteriormente tomar lectura de la absorbancia a 655 nm con un lector de microplacas 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Se construyó una curva de calibración de trolox y los resultados fueron expresados como μM Equivalentes de Trolox (μM ET).

Para determinar el tipo de interacción entre los principales estándares de ácido caféico, ácido clorogénico y rutina, los valores observados de actividad antioxidante de las mezclas fueron contrastados con los esperados mediante un análisis unifactorial y una comparación de medias con la prueba de Fisher.

#### **b Método DPPH**

Se evaluaron estándares comerciales de ácido caféico, ácido clorogénico y rutina a la misma concentración que fueron evaluadas las fracciones correspondientes de los extractos metanólicos (18.06, 84.04 y 25.29 μM, respectivamente). La actividad se determinó para los compuestos individuales y en sus diferentes combinaciones. Para el ensayo se utilizaron 10 μL de cada estándar, de tal manera que en la evaluación de los compuestos individuales y de las mezclas de solo dos componentes el volumen se ajustó a 30 μL con metanol.

La capacidad captadora de radicales libres de los extractos se determinó por el grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH mediante el método de Brand-Williams y col (1995), con algunas modificaciones. El ensayo se realizó en microplaca en la cual se mezclaron 270 μL del radical DPPH (150 mM en metanol) y 30 μL de muestra (estándares o mezcla de ellos). Como blanco se utilizó una mezcla de 30 μL de metanol y 270 μL del radical. La microplaca se dejó en reposo por 30 min a 37°C en oscuridad y posteriormente se tomó lectura de la absorbancia a 550 nm usando un lector de microplacas modelo 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Se construyó una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como μM Equivalentes de Trolox (μM ET).

### 5 Análisis estadístico

Los datos de cuantificación de compuestos fenólicos y de actividad antioxidante se analizaron mediante un ANOVA de una sola vía y la comparación de medias se realizó con una prueba Fisher con un nivel de significancia del 0.05. También se realizaron análisis de correlación de Pearson y componentes principales. Todos los análisis se realizaron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc, Virginia, EUA).

## VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# A PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EXTRACTOS METANÓLICOS DE TOMATE SILVESTRE

### 1 Identificación de compuestos fenólicos

El perfil de compuestos fenólicos en extractos metanólicos de 18 accesiones de tomate var. *cerasiforme* se obtuvo mediante cromatografía líquida de alta resolución con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). La identificación de los compuestos fenólicos se realizó por comparación con el tiempo de retención y espectro UV-visible de estándares comerciales, así como el peso molecular y fragmentos obtenidos mediante el análisis de espectrometría de masas (MS).

En la **Figura 3** se muestra como ejemplo el perfil de compuestos fenólicos del exctracto metanólico de la accesión Tumbisca 17. De manera general, este mismo perfil lo presentaron las 18 accesiones evaluadas. El análisis por HPLC-DAD mostró la presencia de siete picos principales, los cuales pueden incluirse en dos familias de compuestos fenólicos de acuerdo con el espectro UV presentado; una de ellas, del grupo ácidos fenólicos, principalmente derivados del ácido hidroxicinámico, y la otra, con compuestos que pertenecen a la familia de los flavonoides.

De acuerdo con la literatura los compuestos del grupo de las flavonas y flavonoles presentan dos principales picos de absorción en la región de 200 a 400 nm, referidos comúnmente como banda I (300-380 nm), la cual está asociada con la absorción atribuida al anillo B del sistema cinnamoil, y banda II (240-280 nm) atribuida a la absorción del sistema del anillo A benzoil (**Figura 4**).

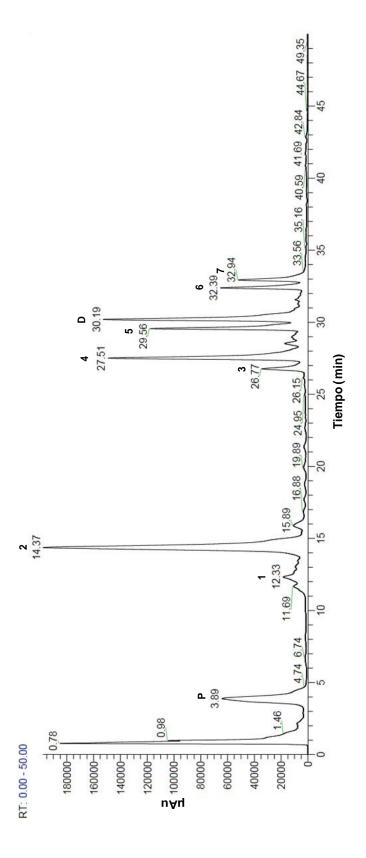
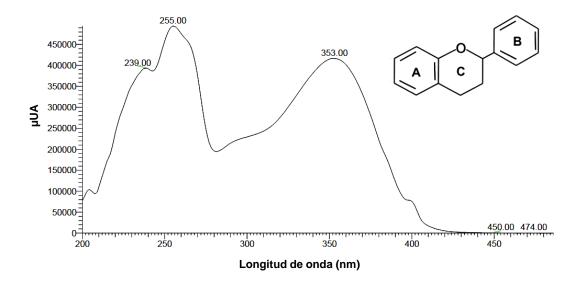
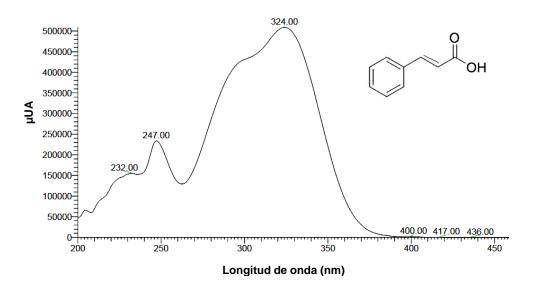


Figura 3. Perfil de compuestos fenólicos de la accesión de tomate Tumbisca 17. P: Ácido protocatecuico, D: Daidzeína, 1: Cafeoil hexosa I, 2: Ácido clorogénico, 3: Rutina pentósido, 4: Rutina, 5: Ácido dicafeoilquínico, 6: Ácido tricafeoilquínico, 7: No identificado.





В



**Figura 4.** Espectros UV-visible característicos de flavonoides **(A)** y ácidos fenólicos **(B)** observados en los extractos metanólicos de tomate.

La estructura de los derivados del ácido hidroxicinámico contiene un sistema cinamoilo, el cual es responsable de la banda I de absorción (310-325 nm) en el espectro UV (Abad-García y col 2009), lo que coincide con lo observado en los extractos metanólicos (**Figura 4**).

En el **Cuadro 6** se muestran los iones moleculares y fragmentos generados durante la identificación por espectrometría de masas (MS) de los principales picos separados por HPLC en los extractos metanólicos de tomate silvestre.

El pico 1 presentó un peso molecular de 341, apareciendo un fragmento con una relación m/z = 179, el cual corresponde a la masa molecular del ácido caféico; al analizar este ión por  $MS^2$  en modo negativo generó otro de m/z = 135, mostrando una pérdida de m/z = 44 correspondiente al  $CO_2$  del grupo carboxilo. Moco y col (2007) reportaron este peso molecular para tres isómeros de cafeoil hexosa. El peso molecular del pico 1, así como los fragmentos generados coinciden con lo reportado por Gomez-Romero y col (2010) para el compuesto cafeoil hexosa I.

En cuanto al pico 2, éste fue identificado como ácido clorogénico mediante comparación con su estándar comercial (tiempo de retención y espectro UV), así como por su fragmentación en MS. El espectro en modo negativo mostró un ión molecular de m/z = 353 y su fragmentación generó un ión de m/z = 191, el cual corresponde al peso molecular del ácido quínico. El peso molecular y el fragmento generado coinciden con lo previamente encontrado por Vallverdú-Queralt y col (2011b).

Cuadro 6. Identificación por ESI-MS de los principales compuestos fenólicos presentes en extractos metanólicos de tomate silvestre.

				ESI-MS	
Pico <sup>a</sup>	t <sub>R</sub>	UV A <sub>máx</sub>	[M-H] <sup>-</sup> m/z	m/z (% Abundancia Relativa)	Identidad Tentativa
<del>-</del>	12.18	245, 289	341	$MS^2 341 \rightarrow 179(100) [M-H-hex]$ 179 $\rightarrow 135 (48.47) [M-H-CO_2]$	Cafeoil hexosa I
7	14.24	324	353	$MS^2 353 \rightarrow 191(100) [quin—H]$	Ácido clorogénico*
ю	26.62	255, 352	741	MS² 741→609 (22) [M-H-132]-, 301(5) [M-H-132-308] <sup>-</sup> ,	Rutina pentósido (quercetin 3-O-pentosil- rutinósido)
4	27.38	255, 353	609	MS² 609→301(100)	Rutina*
2	29.46	326	515	MS² 515→353 (51.66) [M-H-162(caf-H₂O)]⁻, 179 (11.35) [caf-H]⁻	Ácido dicafeoilquínico
Ø	32.39	326	229	$MS^2 677 \rightarrow 515 (42.20) [M-H-162(caf-H2O)]^2,$ 353 (9.81) [quin-H]°,	Ácido tricafeoilquínico
7	32.82	366	•	•	Z

<sup>a</sup> El número de pico asignado corresponde al orden de elución; NI: No identificado; \*Identificación confirmada con estándares comerciales.

# Rutina pentósido

 $R_1 = H$ ;  $R_2 = Pentosa$ 

# Rutina

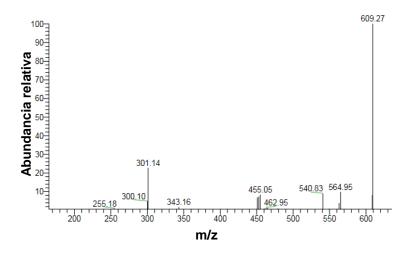
**Figura 5**. Estructura de los compuestos fenólicos identificados en extractos metanólicos de tomate silvestre.

El ión molecular m/z = 741 del pico 3 generó dos fragmentos: m/z = 609 y m/z = 301, correspondientes a la pérdida de los restos de pentosil [M-H-132]<sup>-</sup> y rutinosil [M-H-132-308]<sup>-</sup>, respectivamente. De esta forma, el pico 3 fue identificado como rutina pentósido (quercetin 3-*O*-pentosil-rutinósido) de acuerdo con lo reportado por Barros y col (2012).

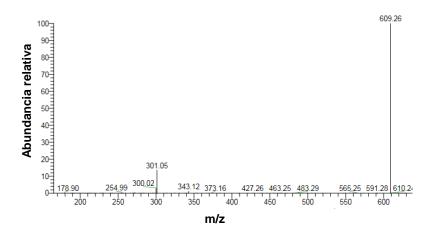
El pico 4 fue identificado como rutina debido a la comparación con su estándar comercial, coincidiendo el tiempo de retención, espectro UV, así como la fragmentación del ión molecular de m/z = 609 que generó un fragmento de m/z = 301 tanto para el estándar comercial como el pico desconocido (**Figura 6**). Moco y col (2007), Gomez-Romero y col (2010), Vallverdú-Queralt y col (2011b) y Barros y col (2012) observaron la presencia de rutina en cultivares de tomate, reportando los mismos fragmentos que se observaron en este estudio para el pico 4.

Los picos 5 y 6 fueron identificados como ácidos di- y tri-cafeoilquínico, respectivamente. La fragmentación del ión molecular de m/z = 515 para el pico 5 en modo negativo generó dos fragmentos: m/z = 353 y m/z = 179 correspondientes a la pérdida del ácido caféico. El ion molecular m/z = 677 del pico 6 genera los fragmentos m/z = 515 y m/z = 353, correspondientes al ácido caféico y quínico, respectivamente. El peso molecular así como los fragmentos generados coinciden con lo observado previamente por Moco y col (2007) y Ribas-Agustí y col (2012) para ácidos di- y tricafeoilquínicos en frutos de tomate.

Α



В



**Figura 6.** Espectro de masas  $MS^2$  del ión m/z= 609 de rutina. (**A)** Muestra y (**B)** Estándar comercial.

Por otro lado, el pico 7 observado en la separación de los compuestos fenólicos de tomate no pudo ser identificado; su espectro UV visible difiere de los correspondientes a compuestos tipo ácido fenólico y flavonoide, lo que sugiere que se trata de otro tipo de compuesto. El patrón de masas tampoco permitió su identificación, por lo que se requiere analizarlo mediante otras herramientas analíticas.

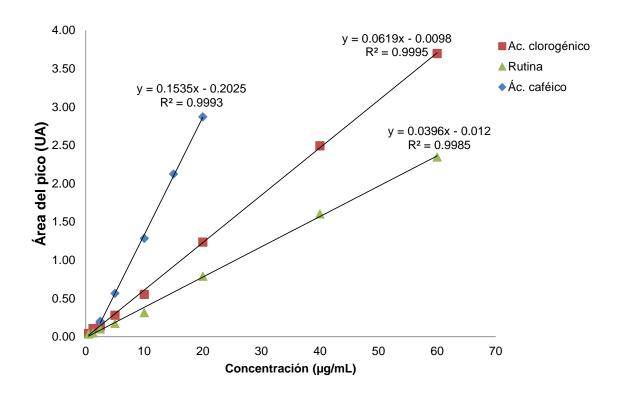
Los compuestos identificados en las accesiones de tomate analizadas (Cuadro 6, Figura 5) corresponden a los reportados previamente para extractos de tomate. Gomez-Romero y col (2010) analizaron el perfil de metabolitos presentes en el extracto metanólico de tomate de tres diferentes variedades (Daniela, Raf y Rambo), el ácido hidroxicinámico y sus derivados fueron los principales fenólicos del fruto, representando desde el 58% al 81%. Los principales compuestos encontrados en este grupo fueron cafeoil hexosa I, ácido cumárico hexosa I, ácido clorogénico y ácido 5-cafeoilquínico; mientras que en el grupo de compuestos del tipo flavonoide los principales metabolitos encontrados fueron rutina y rutina pentósido, representando alrededor del 80% del total de los flavonoides en los cultivares Raf y Rambo. En el cultivar Daniela, además de rutina y rutina pentósido, se encontraron principalmente floretina dihexósido, naringenina compuestos como ٧ chalconaringenina.

Por otro lado, Barros y col (2012) al analizar el contenido de compuestos fenólicos de cuatro variedades diferentes de tomate identificaron a rutina pentósido como el principal compuesto flavonoide, y a los derivados del ácido hidroxicinámico del grupo de ácidos fenólicos.

### 2 Cuantificación de compuestos fenólicos

Una estrategia a seguir cuando no se cuenta con estándares disponibles comercialmente es cuantificar mediante el uso de un estándar externo cuya estructura sea parecida al compuesto en cuestión (Gomez-Romero y col 2010). De esta manera, la cuantificación de los compuestos fenólicos identificados se realizó empleando curvas de calibración de estándares comerciales de compuestos relacionados con la misma familia (Figura 7); el compuesto identificado como cafeoil hexosa I fue cuantificado por referencia a ácido caféico, los demás compuestos de tipo ácido fenólico fueron cuantificados por referencia a ácido clorogénico, mientras que los compuestos de tipo flavonoide por referencia a rutina.

En cuanto a la cuantificación de los compuestos identificados, cafeoil hexosa I se encontró en un rango de 0.35-1.28 mg/100 g b.h., siendo la menor concentración para la accesión Temax 10 y la mayor para Rincón 13 (**Figura 8**). Estos valores son superiores al contenido de ácido caféico encontrado por (Hernandez y col 2007) (0.11-0.14 mg/100 g b.h) pero similares a los reportados por (Martinez-Valverde y col 2002) quienes encontraron un rango de 0.14-1.30 mg/100 g b.h. de ácido caféico en 5 cultivares de tomate y variedades comerciales de tomate, respectivamente.



**Figura 7**. Curvas de calibración de estándares de ácido caféico, ácido clorogénico y rutina utilizadas en la cuantificación de compuestos fenólicos.

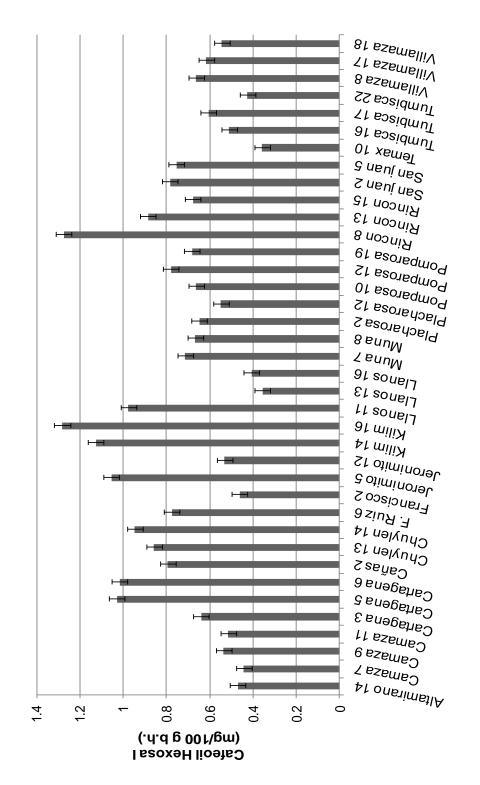


Figura 8. Contenido de cafeoil hexosa I de las accesiones de tomate evaluadas. Las barras verticales

indican LSD=0.172 ( $\alpha$ =0.05).

El contenido de ácido clorogénico varió de 0.0 a 26.27 mg/100 g b.h. (**Figura 9**). Este compuesto fue uno de los compuestos fenólicos más abundantes en las accesiones estudiadas, con excepción del individuo Camaza 9, donde no fue detectado. El individuo Kilim 16 mostró el mayor contenido de ácido clorogénico superando hasta 4 veces lo reportado para tomate cherry (5.44 mg/100 g b.h.) (Raffo y col 2006). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Sicairos-Medina (2013) para accesiones de tomate silvestre y por Barros y col (2012), quienes de manera general observaron que en frutos de tomate los ácidos fenólicos fueron más abundantes que los flavonoides.

El contenido de rutina pentósido varió entre 1.53-5.48 mg/100 g b.h. para los individuos Llanos 13 y Kilim 16, respectivamente (Figura 10). En un estudio realizado por Barros y col (2012) en cuatro variedades de tomate se observó que el principal flavonoide presente en las variedades analizadas fue rutina pentósido, encontrando valores que van desde 0.34 hasta 4.76 μg/g b.h., los cuales de manera general coinciden con los encontrados en el presente estudio en las 18 accesiones de tomate silvestre estudiadas.

El contenido de rutina entre las accesiones varió de 2.1 a 21.54 mg/100 g b.h. (**Figura 11**), valores que comprenden los reportados previamente por Sicairos-Medina (2013) (4.69-18.76 mg/100 g b.h.) en 10 accesiones de tomate silvestre de México. El individuo Rincón 15 fue el que presentó el mayor contenido de rutina (21.54 mg/100 g b.h.), superando hasta por 3 veces lo reportado para tomate tipo Cherry (6.61 mg/100 g b.h.) (Raffo y col 2006).

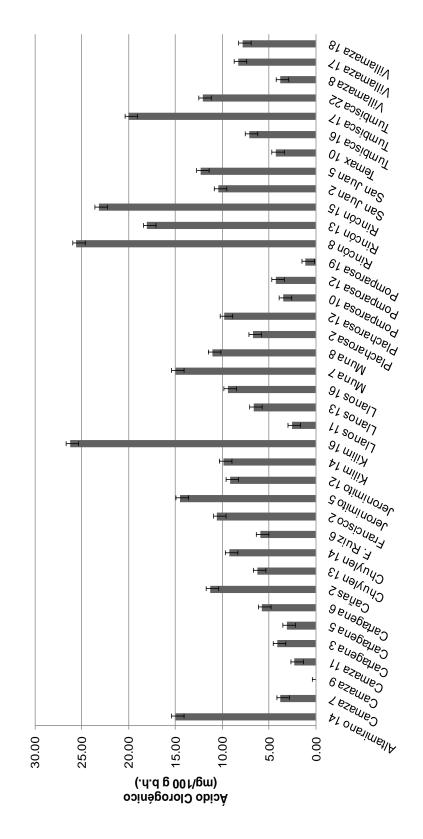


Figura 9. Contenido de ácido clorogénico de las accesiones de tomate evaluadas. Las barras verticales indican LSD=0.890 ( $\alpha$ =0.05).

54

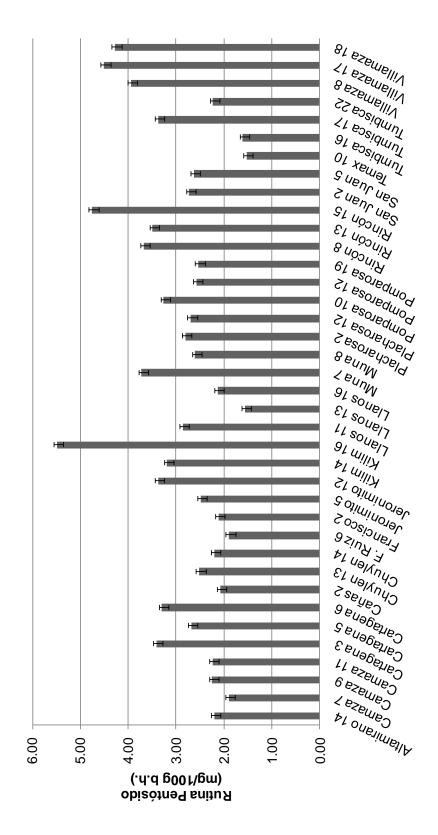


Figura 10. Contenido de rutina pentósido de las accesiones de tomate evaluadas. Las barras verticales

indican LSD=0.132 (α=0.05).

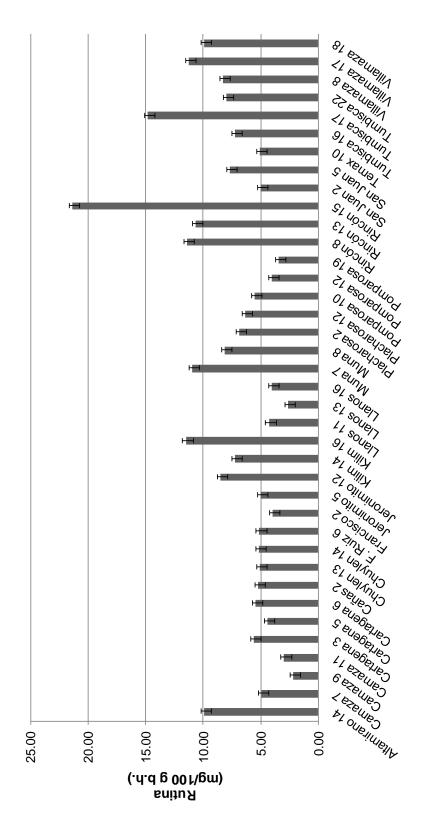


Figura 11. Contenido de rutina de las accesiones de tomate evaluadas. Las barras verticales indican LSD= $0.604 (\alpha=0.05)$ .

El contenido de ácido dicafeoilquínico varió entre 0.36 y 14.76 mg/100 g b.h (Figura 12), mientras que el de ácido tricafeoilquínico presentó un rango de 0.58 a 8.71 mg/100 g b.h. (Figura 13). Estos valores se encuentran dentro del rango reportado por Boches y col (2011), quienes al evaluar una colección de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* en cuanto a su contenido de compuestos fenólicos, registraron concentraciones de ácidos cafeoilquínicos en el rango de 1 a 17 mg/100 g b.h.

La variabilidad observada en el contenido de compuestos fenólicos, el cual en algunos casos supera lo reportado para materiales comerciales, sugiere el potencial que tienen estos materiales como fuente de germoplasma en programas de mejoramiento de variedades cultivadas.

## 3 Análisis de componentes principales

Con el fin de conocer la contribución de los compuestos fenólicos a la variabilidad observada en las accesiones se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Este análisis tiene como propósito generar nuevas variables que expresen la información original, con lo cual se puede reducir la dimensión y dar una mejor estructura al conjunto de datos analizados. Para que este procedimiento estadístico tenga sentido, es necesario que entre las variables de estudio haya una correlación, es decir, es necesario que las variables que han sido observadas estén relacionadas entre sí. Las nuevas variables generadas se denominan componentes principales (Raykov y Marcoulides 2008; Shewhart y Wilks 2008).

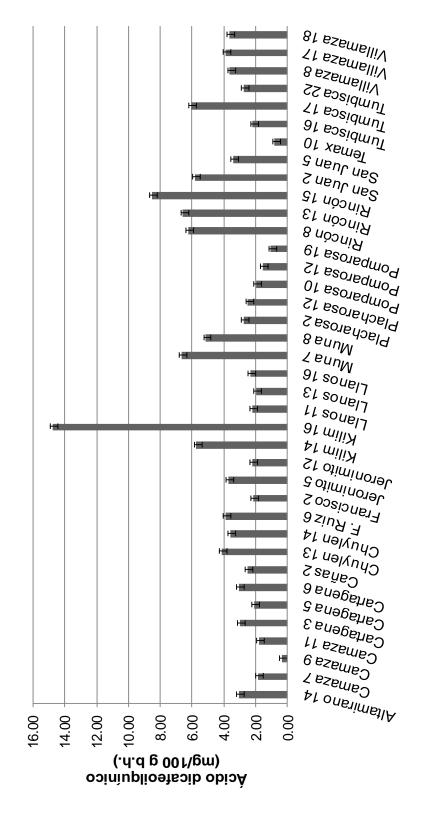


Figura 12. Contenido de ácido dicafeoilquínico de las accesiones de tomate evaluadas. Las barras

verticales indican LSD=0.318 (α=0.05).

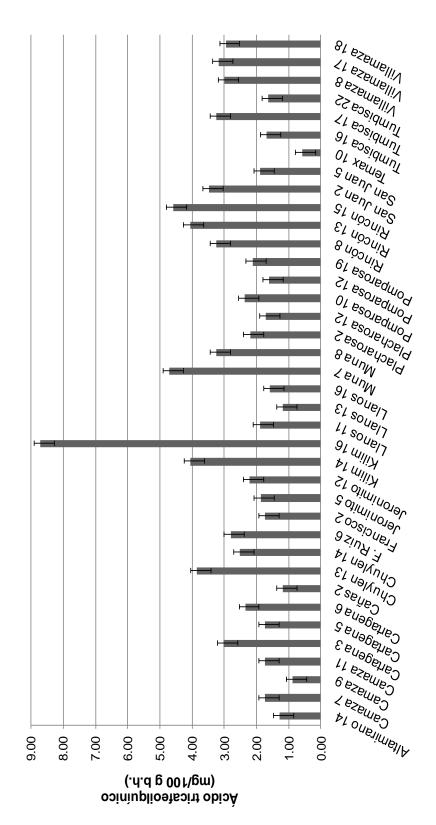


Figura 13. Contenido de ácido tricafeoilquínico de las accesiones de tomate evaluadas. Las barras verticales

indican LSD=0.419 ( $\alpha$ =0.05).

El ACP de los perfiles obtenidos en las accesiones de tomate silvestre reveló que los tres primeros componentes explican el 92.63% de la variación total observada en los datos originales (**Cuadro 7**), destacando el componente 1 que contribuyó con el 69.35% y presentó un valor propio muy superior a 1.

Para el caso del componente 1, el peso que tiene cada compuesto sobre la variación explicada se estableció en la siguiente ecuación: 0.392156\*Ác. clorogénico (Cafeoilquínico) + 0.393329\*Rutina + 0.30802\*Cafeoil hexosa I + 0.419037\*Rutina pentósido + 0.466302\* Ác. dicafeoilquínico + 0.451219\*Ác. tricafeoilquínico, donde se puede observar que los compuestos fenólicos que tienen mayor contribución son rutina y ácido clorogénico con sus derivados.

El ACP puede ser utilizado como herramienta para determinar el nivel de asociación que existe entre diferentes poblaciones. En este sentido, la **Figura 14** muestra la distribución de accesiones de tomate silvestre de acuerdo al primer componente del análisis. Se puede observar que destaca un grupo de 6 individuos correspondientes a las accesiones Kilim, Rincón, Muna y Tumbisca que poseen valores del componente mayores de 2. Estos materiales resultan promisorios como fuente de mejora debido a su alto contenido de compuestos fenólicos, aunque se requiere relacionar estos compuestos con actividades biológicas como la antioxidante.

**Cuadro 7.** Valores propios y porcentaje de varianza explicada de los componentes principales generados a partir del análisis del contenido de compuestos fenólicos en las accesiones de tomate silvestre.

Componente	Valor propio	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado
1	4.16077	69.346	69.346
2	0.942708	15.712	85.058
3	0.454086	7.568	92.626
4	0.31725	5.287	97.914
5	0.110504	1.842	99.755
6	0.0146779	0.245	100



Figura 14. Análisis de componentes principales a partir del contenido de compuestos fenólicos en las

accesiones de tomate silvestre.

# B ASOCIACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS ACCESIONES DE TOMATE SILVESTRE

En un estudio previo, Sicairos Medina (2013) encontró una correlación positiva entre el contenido de compuestos fenólicos totales y la actividad antioxidante medida por los métodos ABTS (r = 0.86), DPPH (r = 0.79) y ORAC (r = 0.39) en extractos metanólicos de las accesiones de tomate silvestre estudiadas.

En el presente estudio se analizó la correlación de estas actividades con los componentes fenólicos identificados en los perfiles y los resultados se muestran en el **Cuadro 8**. Los compuestos fenólicos individuales cuantificados por HLPC se correlacionaron positivamente con la actividad antioxidante con excepción del compuesto no identificado ( $t_R = 32.82 \text{ min}$ ,  $\lambda_{\text{máx}} = 366 \text{ nm}$ ), el cual no presentó correlación para ninguno de los métodos utilizados. En el método de ORAC, solamente rutina pentósido presentó una correlación altamente significativa. La mayor correlación se observó para el caso de la actividad antioxidante determinada por los métodos ABTS y DPPH, destacando rutina que presentó la correlación más alta, seguido del ácido clorogénico y los ácidos di- y tricafeoilquínico.

Los valores de correlación más altos con el método de DPPH fueron los presentados por rutina (r = 0.715), seguido de ácido clorogénico (r = 0.691) y ácido dicafeoilquínico (r = 0.689). Con el método de ABTS, el más alto fue nuevamente rutina, seguido de ácido clorogénico y rutina pentósido. De acuerdo a estos resultados, los compuestos fenólicos más prometedores en cuanto al papel que desempeñan en la actividad antioxidante fueron rutina y ácido clorogénico, mismos que destacaron por encontrarse de forma abundante en los extractos metanólicos.

**Cuadro 8.** Análisis de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de extractos metanólicos de tomate silvestre

Componente	Actividad antioxidante por		
	ORAC	DPPH	ABTS
Cafeoil hexosa I	0.206*	0.432**	0.396**
,			
Acido clorogénico (ácido 3-cafeoilquínico)	0.127	0.691**	0.709**
Rutina pentósido (quercetin 3-0-pentosil-	0.466**	0.609**	0.669**
rutinósido)			
Rutina	0.217*	0.715**	0.803**
Ácido dicafeoilquínico	0.150	0.689**	0.606**
Ácido tricafeoilquínico	0.217*	0.611**	0.530**
Desconocido	-0.015	0.034	-0.015

<sup>\*</sup>p≤ 0.05; \*\*p≤0.01

Debido a que varios de los compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos presentaron correlación significativa con la actividad antioxidante por ABTS y DPPH, se realizó el ACP para visualizar de mejor manera las accesiones de tomate más promisorias tomando en cuenta los perfiles de fenólicos y las actividades antioxidantes. Este análisis reveló que los tres primeros componentes explican el 88.6% de la variación total observada en los datos originales (**Cuadro 9**), destacando el componente 1 que contribuyó con el 68.7%.

Para el caso del componente 1, el peso que tiene cada compuesto sobre la variación explicada se estableció en la siguiente ecuación: 0.36515\*DPPH + 0.360785\*ABTS + 0.349828\*Ác. clorogénico (Cafeoilquínico) + 0.359223\*Rutina + 0.267067\*Cafeoil hexosa I + 0.357075\*Rutina pentósido + 0.388725\*Ác. dicafeoilquínico + 0.36762\*Ac. tricafeoilquínico, donde se puede observar que con excepción de cafeoil hexosa I, el resto de las variables contribuyen de manera similar.

En la **Figura 15** se muestra la distribución de accesiones de tomate silvestre de acuerdo al primer componente del análisis. Se puede observar que destaca un grupo de 5 individuos correspondientes a las accesiones Kilim, Rincon y Tumbisca que poseen valores del componente mayores de 2. De estos materiales promisorios se seleccionó tumbisca 17 para identificar los compuestos fenólicos individuales responsables de su actividad antioxidante. La selección de este material se debió a que fue el que presentó el segundo valor más alto de fenolicos totales y actividad antioxidante por ABTS y DPPH (Sicairos Medina 2013), además de contar con material suficiente para los análisis subsecuentes.

**Cuadro 9**. Valores propios y porcentaje de varianza explicada de los componentes principales generados a partir del análisis del contenido de compuestos fenólicos en las accesiones de tomate silvestre.

Componente	Valor propio	Porcentaje de	Porcentaje	
		varianza	acumulado	
1	5.49872	68.734	68.734	
2	0.987573	12.345	81.079	
3	0.601922	7.524	88.603	
4	0.456707	5.709	94.311	
5	0.248288	3.104	97.415	
6	0.116227	1.453	98.868	

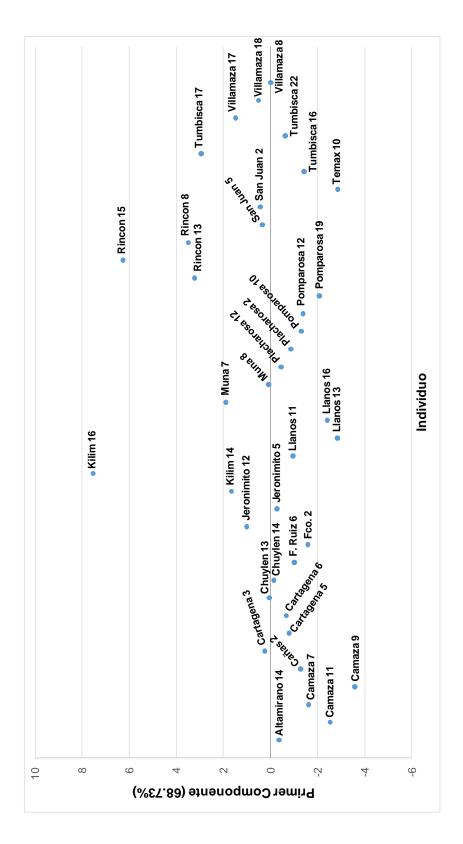


Figura 15. Análisis de componentes principales a partir del contenido de compuestos fenólicos y actividad

antioxidante por ABTS y DPPH en las accesiones de tomate silvestre.

C ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE TOMATE SILVESTRE

## 1 Actividad antioxidante de las fracciones correspondientes a los compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos de tomate silvestre

De acuerdo con el análisis por HPLC-DAD el extracto metanólico de tomate silvestre tiene como principales componentes a cafeoil hexosa I, ácido clorogénico, rutina, rutina pentósido y derivados del ácido quínico (**Cuadro 10**). Para conocer la contribución de cada uno de estos componentes a la actividad antioxidante del fruto de tomate, se colectaron individualmente las fracciones y se evaluó su actividad antioxidante por ABTS a la misma dilución utilizada para el extracto. La concentración final de cada fracción en el ensayo y los resultados de actividad antioxidante se muestran en el **Cuadro 10**. Cabe destacar que solo se muestran los resultados de los 6 picos identificados y que pudieron ser cuantificados apropiadamente por HPLC a partir de las curvas de estándares.

Los resultados de este analisis revelaron que la mayor actividad antioxidante correspondió a la fracción de rutina (45.87 µM ET), mientras que el valor más bajo se observó en la fracción correspondiente al ácido tricafeoilquínico (19.04 µM ET). Si bien las fracciones fueron evaluadas a la misma dilución que el extracto metanólico, la suma de ellas da un valor de actividad antioxidante superior al obervado en dicho extracto, lo que demuestra que la interacción entre los compuestos fenólicos presentes en el extracto afecta la actividad antioxidante total.

**Cuadro 10.** Actividad antioxidante por el método ABTS de las fracciones correspondientes a compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos

Compuesto	[µM]	[µM ET]	ET
Cafeoil hexosa I	9.50	26.60 ± 0.45	2.92
Ác. clorogénico	83.96	32.21 ± 3.71	0.38
Rutina pentósido	4.01	$33.39 \pm 0.08$	8.33
Rutina	24.90	45.87 ± 2.99	1.81
Ácido dicafeoilquínico	18.66	19.52 ± 3.10	1.05
Ácido tricafeoilquínico	6.81	19.04 ± 2.41	2.08
Extracto metanólico		122.18 ± 1.84	

En cuanto a la actividad específica de los compuestos de cada fracción indicada en el **Cuadro 10** como Equivalentes de Trolox (ET), se puede observar que el flavonoide rutina pentósido fue el que presentó el valor más alto con un valor de 8.33 veces la actividad del trolox. Es importante destacar como este compuesto presentó una actividad específica 4.6 veces mayor que la de rutina.

El ácido clorogénico (cafeoilquínico) fue el compuesto que presentó la menor actividad específica con un valor de 0.38; sin embargo, este ácido fenólico también fue el más abundante y es por ello que tiene una importante contribución a la actividad total. Es importante destacar que en relación a la actividad específica del ácido clorogénico, la actividad de su derivado dicafeoilquínico se incrementó casi tres veces y del derivado tricafeoilquínico aproximadamente 5.5 veces. La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos depende del número de grupos hidroxilo en la molécula (Rice-Evans y col 1996). En particular, los hidroxilos del grupo catecol del cafeoil se han asociado con una buena capacidad antioxidante, por lo que es de esperarse que al aumentar el numero de grupos catecol en los derivados di y tricafeoilquínico aumente la actividad antioxidante de la molécula, lo cual corresponde con lo observado en el presente estudio (Cuadro 10). El otro compuesto que presentó una actividad específica sobresaliente fue cafeoil-hexosa.

## 2 Actividad antioxidante de estándares comerciales de compuestos fenólicos presentes en el extracto metanólico

A partir de los perfiles obtenidos se seleccionaron los compuestos fenólicos más abundantes y que presentaron correlación con la actividad antioxidante, además

de estar disponibles comercialmente para realizar evaluaciones en forma individual y combinada para determinar su contribución a la actividad antioxidante de la muestra. Los compuestos fenólicos seleccionados fueron: ácido caféico (por no contar con un estándar de cafeoil hexosa), ácido clorogénico y rutina. Los valores de actividad antioxidante (ABTS y DPPH) de los estándares de fenólicos individuales se sumaron para obtener el valor teórico o esperado de las mezclas, el cual fue contrastado con el valor observado para determinar el tipo de interacción de la mezcla de compuestos (aditividad, sinergismo o antagonismo). Los resultados de estos análisis se muestran en los **Cuadros 11** y **12**.

En el caso de la actividad de los estándares evaluados por ABTS a la misma concentración de las fracciones del extracto metanólico (**Cuadro 11**), se puede observar que rutina fue el que presentó el valor más alto (42.35 μM ET), valor ligeramente inferior al obtenido para esa misma fracción en el extracto metanólico que fue de 45.87 μM ET (**Cuadro 10**). De manera similar, en el caso del ácido clorogénico se observó un valor inferior en el caso del estándar con respecto a la fracción de extracto. Sin embargo, la proporción de los valores de actividad rutina/ácido clorogénico fue similar en ambos casos por lo que reflejan de buena manera lo observado en la muestra. Las diferencias observadas podrían ser atribuidas a una subestimación de la concentración de las fracciones y por lo tanto los estándares se probaron a una concentración ligeramente menor que la de los extractos.

**Cuadro 11**. Actividad antioxidante por ABTS y DPPH de estándares de compuestos fenólicos evaluados a la concentración del extracto metanólico de tomate.

ABTS				
Compuesto	Observado [µM ET]	Esperado [µM ET]	Tipo de Interacción	
Ác. caféico [18.01 μM]	16.84±3.53			
Ác. clorogénico [83.96 μM]	25.81±1.34			
Rutina [24.90 μM]	42.35±4.35			
Combinación				
Ác. clorogénico-Rutina	62.96±0.71 <sup>a</sup>	68.15±4.55 <sup>a</sup>	Aditiva	
Ác. clorogénico-Ác. caféico	40.34±4.01 <sup>a</sup>	42.65±3.78 <sup>a</sup>	Aditiva	
Rutina-Ác. caféico	53.98±2.87 <sup>a</sup>	59.19±7.88 <sup>a</sup>	Aditiva	
Ác. clorogénico-Rutina-Ác. caféico	66.61±0.29 <sup>b</sup>	85.00±7.99 <sup>a</sup>	Antagónica	
DPPH				
Ác. caféico [18.01 μM]	1.98±0.56			
Ác. clorogénico [83.96 μM]	25.66±0.52			
Rutina [24.90 μM]	10.49±0.22			
Combinación				
Ác. clorogénico-Rutina	37.65±4.00 <sup>a</sup>	36.16±0.74 <sup>a</sup>	Aditiva	
Ác. clorogénico-Ác. caféico	29.56±0.25 <sup>a</sup>	27.65±1.08 <sup>a</sup>	Aditiva	
Rutina-Ác. caféico	15.69±0.23 <sup>a</sup>	12.46±0.78 <sup>b</sup>	Sinérgica	
Ác. clorogénico-Rutina-Ác. caféico	39.05±1.63 <sup>a</sup>	38.14±1.31 <sup>a</sup>	Aditiva	

Otra posibilidad es que en las fracciones hayan co-eluido otros compuestos en mucha menor proporción pero que podrían estar contribuyendo a la actividad antioxidante de las mismas.

En el caso de las combinaciones de los estándares, los valores de actividad antioxidante por ABTS de las mezclas de dos compuestos no fueron significativamente diferentes de las esperadas a partir de la suma de las actividades de cada compuesto, indicando que sus efectos fueron aditivos (**Cuadro 11**). Estos resultados corresponden con lo observado por Heo y col (2007), quienes midieron la actividad antioxidante por ABTS de varios fenólicos comunmente encontrados en frutas y hortalizas, dentro de los cuales se incluyeron el ácido clorogénico y la rutina.

Con respecto a la combinación de los tres estándares, el valor de actividad anitoxidante obtenido fue significativamente menor que el esperado, por lo que en este caso se observó una interacción antagónica. Este resultado corresponde con lo observado en el extracto metanólico, cuyo valor de actividad antioxidante por ABTS fue menor a la suma de las actividades de las fracciones.

Se han reportado varias hipótesis para explicar los efectos sinergísticos y antogónicos de la combinación de antioxidantes. Peyrat-Maillard y col (2003) describen una interacción antogónica en el sentido de que un antioxidante fuerte estaría regenerando uno débil, disminuyendo de esta forma la capacidad antioxidante de la mezcla. El potencial reductor de los compuestos fenólicos también se ha utilizado para tratar de explicar sus interacciones, ya que una molécula con menor potencial reductor es más probable que done sus electrones y lo haría a la molécula con el siguiente valor de potencial mas alto (Freeman y col 2010). Para el caso del presente estudio, los tres estándares pueden ordenarse de la siguiente

manera: rutina > ácido cafeico > ácido clorogénico (Jovanovic y col 1994; Foley y col 1999; Chobot y col 2013). Esto sugiere que a concentraciones equimolares rutina siempre donaría sus electrones a caféico, luego seguiría clorogénico y finalmente el radical utilizado en el ensayo.

Otras de las variables que puede influir en la actividad antioxidante de las mezclas de compuestos es la concentración, por lo que se decidió probar la actividad de los tres estándares por ABTS a una concentración de 50 mg/L (Cuadro 12). Si bien esta concentración no es equimolar para cada uno de los compuestos, se consideró que permitiría observar si las interacciones se mantienen. Como se indica en el **Cuadro 12**, las interacciones entre mezclas de dos compuestos fueron aditivas, mientras que la de los tres estándares fue antagónica, lo cual corresponde con lo observado previamente cuando los estándares se evaluaron a la concentración del extracto (**Cuadro 11**).

Los reportes de actividad antioxidante *in vitro* de mezclas de compuestos fenólicos son en su mayoría contrastantes dependiendo del ensayo utilizado, lo cual podría deberse a los diferentes mecanismos mediante los cuales estos compuestos son capaces de inhibir a los diferentes radicales. En este sentido, los resultados de interacción obtenidos en el presente estudio para el método DPPH difieren en parte de los encontrados para ABTS (**Cuadro 11**).

**Cuadro 12**. Actividad antioxidante por ABTS de estándares de compuestos fenólicos evaluados a la misma concentración (50 mg/L).

Compuesto	Observado [µM ET]	Esperado [µM ET]	Tipo de Interacción
Ác. caféico [27.75 μM]	79.36±0.42		
Ác. clorogénico [141.12 μM]	34.02±3.63		
Rutina [81.90 μM]	69.13±0.26		
Combinación			
Ác. clorogénico-Rutina	116.52±3.93 <sup>a</sup>	103.15±3.37 <sup>a</sup>	Aditiva
Ác. clorogénico-Ác. caféico	110.17±0.60 <sup>a</sup>	113.37±4.05 <sup>a</sup>	Aditiva
Rutina-Ác. caféico	147.49±1.05 <sup>a</sup>	148.49±0.15 <sup>a</sup>	Aditiva
Ác. clorogénico-Rutina-Ác. caféico	161.83±1.44 <sup>b</sup>	182.51±3.78 <sup>a</sup>	Antagonista

#### **VIII CONCLUSIONES**

- Las accesiones de tomate silvestre evaluadas presentaron una amplia variabilidad en el contenido de compuestos fenólicos, siendo superiores Kilim, Rincón, Muna y Tumbisca, las que resultan promisorias para el desarrollo de mejores variedades genéticas.
- Los principales compuestos fenólicos encontrados en los extractos metanólicos fueron ácido clorogénico y rutina, los cuales presentaron una correlación significativa con la actividad antioxidante y además sus estándares presentaron una actividad similar a la fracción correspondiente del extracto.
- El compuesto correspondiente a rutina pentósido presentó la mayor actividad antioxidante por el método de ABTS, al relacionar esta actividad con la abundancia presentada por este compuesto en el extracto.
- La actividad del extracto por ABTS fue menor que la suma de las fracciones individuales, lo que sugiere una interacción antagonista entre los compuestos.
- El análisis de actividad antioxidante por ABTS de estándares de ácido clorogénico, ácido cafeico y rutina reveló un efecto antagonista en la mezcla de los tres compuestos, lo que sugiere que la actividad de los extractos metanólicos está dada por interacciones antagónicas entre los principales compuestos fenólicos que los conforman.

### IX BIBLIOGRAFÍA

- Abad-García B, Berrueta LA, Garmón-Lobato S, Gallo B, Vicente F. 2009. A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216(28):5398-5415.
- Adalid AM, Rosello S, Nuez F. 2010. Evaluation and selection of tomato accessions (*Solanum* section *Lycopersicon*) for content of lycopene, beta-carotene and ascorbic acid. Journal of Food Composition and Analysis 23(6):613-618.
- Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK, Bhargav VK. 2014. Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. Journal of Food Science and Technology-Mysore 51(10):2568-2575.
- Bai Y, Lindhout P. 2007. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? Annals of Botany 100(5):1085-1094.
- Barros L, Duenas M, Pinela J, Carvalho AM, Buelga CS, Ferreira IC. 2012. Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum L.*) farmers' varieties in northeastern Portugal homegardens. Plant Foods for Human Nutrition 67(3):229-234.
- Bergougnoux V. 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. Biotechnology Advances 32(1):170-189.
- Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Diez MJ, Nuez F. 2012. Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. PLoS One 7(10):e48198.

- Blasiak J, Petrovski G, Vereb Z, Facsko A, Kaarniranta K. 2014. Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. BioMed Research International 2014:768026.
- Boches P, Peterschmidt B, Myers JR. 2011. Evaluation of a Subset of the *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme Core Collection for Horticultural Quality and Fruit Phenolic Content. Hortscience 46(11):1450-1455.
- Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Almenar Pertejo M, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeyen M, Hughes S, Santos-Buelga C, van Tunen A. 2002. High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *C1*. Plant Cell 14(10):2509-2526.
- Bovy A, Schijlen E, Hall RD. 2007. Metabolic engineering of flavonoids in tomato (*Solanum lycopersicum*): the potential for metabolomics. Metabolomics 3(3):399-412.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. Food Science and Technology 28(1):25-30.
- Cortes-Olmos C, Leiva-Brondo M, Rosello J, Raigon MD, Cebolla-Cornejo J. 2014.

  The role of traditional varieties of tomato as sources of functional compounds.

  Journal of the Science of Food and Agriculture 94(14):2888-2904.
- Crisanto-Juarez AU, Vera-Guzman AM, Chavez-Servia JL, Carrillo-Rodriguez JC. 2010. Calidad de frutos de tomate silvestres (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme Dunal) de Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana 33:7-13.
- Crozier J, Clifford MN 2006. Phenols, polyphenols and tannins: An overview. En: Crozier, A, Clifford MN, editor. Plant Secondary Metabolites and the Human Diet. Blackwell Publishing. p. 1-31.
- Chang CH, Lin HY, Chang CY, Liu YC. 2006. Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. Journal of Food Engineering 77(3):478-485.

- Chen KY, Cong B, Wing R, Vrebalov J, Tanksley SD. 2007. Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. Science 318(5850):643-645.
- Chobot V, Kubicova L, Bachmann G, Hadacek F. 2013. Versatile Redox Chemistry Complicates Antioxidant Capacity Assessment: Flavonoids as Milieu-Dependent Antiand Pro-Oxidants. International Journal of Molecular Sciences 14(6):11830-11841.
- Davies JN, Hobson GE. 1981. The constituents of tomato fruit the influence of environment, nutrition, and genotype. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 15(3):205-280.
- Di Lecce G, Martinez-Huelamo M, Tulipani S, Vallverdu-Queralt A, Lamuela-Raventos RM. 2013. Setup of a UHPLC-QqQ-MS method for the analysis of phenolic compounds in cherry tomatoes, tomato sauce, and tomato juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61(35):8373-8380.
- Donovan EL, McCord JM, Reuland DJ, Miller BF, Hamilton KL. 2012. Phytochemical activation of Nrf2 protects human coronary artery endothelial cells against an oxidative challenge. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2012:132931.
- Esquinas J, Nuez F. 1995. Situación taxonómica, domesticación y difusión. En: Nuez, F, editor. El cultivo del tomate. Madrid: Ediciones Mundi Prensa. p. 14-42.
- FAO. 2015. Food and Agriculture Organization. Statistical Database. Disponible en <a href="http://faostat.fao.org">http://faostat.fao.org</a>. Consultado el 17 de Noviembre de 2015.
- FDA. 2015. Food and Drug Administration. Appendix F: Calculate the Percent Daily Value for the Appropriate Nutrients. Disponible en <a href="http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/default.htm">http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/default.htm</a>. Consultado el 08 de Diciembre de 2015.

- Foley S, Navaratnam S, McGarvey DJ, Land EJ, Truscott TG, Rice-Evans CA. 1999. Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. Free Radical Biology & Medicine 26(9-10):1202-1208.
- Foolad MR. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. International journal of plant genomics 2007:64358.
- Freeman BL, Eggett DL, Parker TL. 2010. Synergistic and Antagonistic Interactions of Phenolic Compounds Found in Navel Oranges. Journal of Food Science 75(6):C570-C576.
- George B, Kaur C, Khurdiya DS, Kapoor HC. 2004. Antioxidants in tomato (*Lycopersium esculentum*) as a function of genotype. Food Chemistry 84(1):45-51.
- Giovannucci E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. Journal of the National Cancer Institute 91(4):317-331.
- Gomez-Romero M, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A. 2010. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. Phytochemistry 71(16):1848-1864.
- Guil-Guerrero JL, Rebolloso-Fuentes MM. 2009. Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. Journal of Food Composition and Analysis 22(2):123-129.
- Hanson PM, Yang RY, Wu J, Chen JT, Ledesma D, Tsou SCS, Lee TC. 2004. Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato. Journal of the American Society for Horticultural Science 129(5):704-711.
- Heo HJ, Kim YJ, Chung D, Kim D-O. 2007. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. Food Chemistry 104(1):87-92.

- Hernandez M, Rodriguez E, Diaz C. 2007. Free hydroxycinnamic acids, lycopene, and color parameters in tomato cultivars. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(21):8604-8615.
- Hobson GE, Grierson D. 1993. Tomato. En: Seymour GB, TJ, Tucker GA, editor. Biochemistry of fruit ripening. London, England: Chapman & Hall. p. 405-442.
- lijima Y, Suda K, Suzuki T, Aoki K, Shibata D. 2008. Metabolite profiling of chalcones and flavanones in tomato fruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 77(1):94-102.
- Ilahy R, Hdider C, Lenucci MS, Tlili I, Dalessandro G. 2011. Antioxidant activity and bioactive compound changes during fruit ripening of high-lycopene tomato cultivars. Journal of Food Composition and Analysis 24(4-5):588-595.
- Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. 1994. Flavonoids as Antioxidants. Journal of the American Chemical Society 116(11):4846-4851.
- Kavitha P, Shivashankara KS, Rao VK, Sadashiva AT, Ravishankar KV, Sathish GJ. 2014. Genotypic variability for antioxidant and quality parameters among tomato cultivars, hybrids, cherry tomatoes and wild species. Journal of the Science of Food and Agriculture 94(5):993-999.
- Lee J, Koo N, Min DB. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3(1):21-33.
- Luthria DL, Mukhopadhyay S, Krizek DT. 2006. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. Journal of Food Composition and Analysis 19(8):771-777.
- Madhavi DL, Salunkhe DH. 1998. Tomato. En: Salunkhe, DK,Kadam, SS, editores. Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage and processing. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 171-201.

- Mariani S, Lionetto L, Cavallari M, Tubaro A, Rasio D, De Nunzio C, Hong GM, Borro M, Simmaco M. 2014. Low prostate concentration of lycopene is associated with development of prostate cancer in patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. International Journal of Molecular Sciences 15(1):1433-1440.
- Martinez-Valverde I, Periago MJ, Provan G, Chesson A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). Journal of the Science of Food and Agriculture 82(3):323-330.
- Melendez AJ, Fraser PD, Bramley PM. 2010. Accumulation of health promoting phytochemicals in wild relatives of tomato and their contribution to in vitro antioxidant activity. Phytochemistry 71(10):1104-1114.
- Moco S, Capanoglu E, Tikunov Y, Bino RJ, Boyacioglu D, Hall RD, Vervoort J, De Vos RC. 2007. Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. Journal of Experimental Botany 58(15-16):4131-4146.
- NRCS-USDA. 2015. Natural Resources Conservation Service-United States Department of Agriculture. Disponible en <a href="http://plants.usda.gov">http://plants.usda.gov</a>. Consultado el 08 de Diciembre de 2015.
- OMS. 2015. Organización Mundial de la Salud. Health Statistics and Informatics Department. Disponible en <a href="http://www.who.int/evidence/bod">http://www.who.int/evidence/bod</a>. Consultado el 10 de Noviembre de 2015.
- Palafox-Carlos H, Gil-Chavez J, Sotelo-Mundo RR, Namiesnik J, Gorinstein S, Gonzalez-Aguilar GA. 2012. Antioxidant Interactions between Major Phenolic Compounds Found in 'Ataulfo' Mango Pulp: Chlorogenic, Gallic, Protocatechuic and Vanillic Acids. Molecules 17(11):12657-12664.
- Paran I, van der Knaap E. 2007. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. Journal of Experimental Botany 58(14):3841-3852.

- Peralta Iris E, Spooner David M. 2007. History, Origin and Early Cultivation of Tomato (Solanaceae). Genetic Improvement of Solanaceous Crops Volume 2. Science Publishers. p. 1-24.
- Peyrat-Maillard MN, Cuvelier ME, Berset C. 2003. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. Journal of the American Oil Chemists' Society 80(10):1007-1012.
- Pinelo M, Manzocco L, Nuñez MJ, Nicoli MC. 2004. Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(5):1177-1180.
- Powell AL, Nguyen CV, Hill T, Cheng KL, Figueroa-Balderas R, Aktas H, Ashrafi H, Pons C, Fernandez-Munoz R, Vicente A, Lopez-Baltazar J, Barry CS, Liu Y, Chetelat R, Granell A, Van Deynze A, Giovannoni JJ, Bennett AB. 2012. Uniform ripening encodes a Golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. Science 336(6089):1711-1715.
- Raffo A, Leonardi C, Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro L, Bugianesi R, Giuffrida F, Quaglia G. 2002. Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(22):6550-6556.
- Raffo A, Malfa GL, Fogliano V, Maiani G, Quaglia G. 2006. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). Journal of Food Composition and Analysis 19(1):11-19.
- Ranc N, Munos S, Santoni S, Causse M. 2008. A clarified position for *solanum lycopersicum* var. cerasiforme in the evolutionary history of tomatoes (*solanaceae*). BMC Plant Biology 8:130.
- Rao AV, Agarwal S. 1999. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. Nutrition Research 19(2):305-323.

- Raykov T, Marcoulides GA. 2008. An Introduction to Applied Multivariate Analysis New York, NY.: Taylor & Francis Group 477 p.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 26(9-10):1231-1237.
- Ribas-Agustí A, Cáceres R, Gratacós-Cubarsí M, Sárraga C, Castellari M. 2012. A Validated HPLC-DAD Method for Routine Determination of Ten Phenolic Compounds in Tomato Fruits. Food Analytical Methods 5(5):1137-1144.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine 20(7):933-956.
- Riso P, Visioli F, Erba D, Testolin G, Porrini M. 2004. Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. European Journal of Clinical Nutrition 58(10):1350-1358.
- Rodriguez-Munoz E, Herrera-Ruiz G, Pedraza-Aboytes G, Loarca-Pina G. 2009. Antioxidant capacity and antimutagenic activity of natural oleoresin from greenhouse grown tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). Plant Foods for Human Nutrition 64(1):46-51.
- Rodriguez E, Vargas D, J. S, Lépiz R, Rodríguez A, Ruiz J, Puente P, Miranda R. 2009. Etnobotánica de *Solanum lycopersicum* var. cerasiforme en el occidente de México. Naturaleza y Desarrollo 7(2):45-57.
- Sanchez-Pena P, Oyama K, Nunez-Farfan J, Fornoni J, Hernandez-Verdugo S, Marquez-Guzman J, Garzon-Tiznado JA. 2006. Sources of resistance to whitefly (*Bemisia* spp.) in wild populations of *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme (Dunal) spooner GJ Anderson et RK Jansen in Northwestern Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution 53(4):711-719.

- Shewhart W, Wilks S. 2008. Wiley Series in Probability and Statistics. Hoboken, NJ, USA: Wiley & Sons, Inc.
- SIAP. 2015. Producción agrícola. México, D.F.: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en <a href="http://siap.sagarpa.gob.mx">http://siap.sagarpa.gob.mx</a> Consultado el 27 de Diciembre de 2015.
- Sicairos-Medina L. 2013. Evaluación del potencial antioxidante y antimutagénico de tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme). [Tesis de Maestría]. Culiacán, Sin., México: Universidad Autónoma de Sinaloa. 127 p.
- Slimestad R, Verheul M. 2005. Seasonal variations in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(8):3114-3119.
- Slimestad R, Verheul M. 2009. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. Journal of the Science of Food and Agriculture 89(8):1255-1270.
- Smith AF. 1994. The tomato in America: Early History, Culture, and Cookery Columbia, S.C: University of South Carolina Press.
- Spooner DM, Peralta IE, Knapp S. 2005. Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]. Taxon 54(1):43-61.
- Subahir MN, Shah SA, Zainuddin ZM. 2009. Risk factors for prostate cancer in Universiti Kebangsaan Malaysia medical centre: a case-control study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 10(6):1015-1019.
- Sueishi Y, Hori M, Ishikawa M, Matsu-Ura K, Kamogawa E, Honda Y, Kita M, Ohara K. 2014. Scavenging rate constants of hydrophilic antioxidants against multiple reactive oxygen species. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition 54(2):67-74.

- Tanksley SD. 2004. The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. Plant Cell 16:S181-S189.
- Tedeschi P, Coisson JD, Maietti A, Cereti E, Stagno C, Travaglia F, Arlorio M, Brandolini V. 2011. Chemotype and genotype combined analysis applied to tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) analytical traceability. Journal of Food Composition and Analysis 24(2):131-139.
- Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Di Lecce G, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. 2011a. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). Food Chemistry 129(3):877-883.
- Vallverdú-Queralt A, Medina-Remon A, Martinez-Huelamo M, Jauregui O, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventos RM. 2011b. Phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(8):3994-4001.
- Willits MG, Kramer CM, Prata RT, De Luca V, Potter BG, Steffens JC, Graser G. 2005. Utilization of the genetic resources of wild species to create a nontransgenic high flavonoid tomato. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(4):1231-1236.
- Yan L-J. 2014. Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. Redox Biology 2(0):165-169.
- Zanfini A, Corbini G, La Rosa C, Dreassi E. 2010. Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and alpha-tocopherol in synthetic mixtures. Lwt-Food Science and Technology 43(1):67-72.

#### **ABREVIATURAS**

ABTS 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfóxido)

ACP Análisis de componentes principales

ANOVA Análisis de varianza

b.h. Base húmeda

DAD Detector de arreglos de diodos

DPPH 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

e.g. Ejemplo

ESI Inonización por electroasperjado, por sus siglas en inglés

ET Equivalentes de trolox

HPLC Cromatografía de líquidos de alta resolución

m/z Masa/carga

mM Milimolar

MS Espectrometría de masas

nm Nanómetro

ORAC Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PBS Amortiguador de sodio y fosfato

ROS Especies reactivas de oxígeno

TEAC Capacidad antioxidante equivalente de trolox

UA Unidades de absorbancia

UV Ultra violeta

μL Microlitro

μM Micromolar