Universidad Autónoma de Sinaloa

Facultad de Ciencias Químico-Biológicas

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Identificación de metabolitos asociados con tolerancia inducida al daño por frío en tomate

TESIS

Que presenta

IBQ. ALEXIS LANDEROS SANCHEZ

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIA
Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Directores

Dr. José Ángel López Valenzuela

Dr. Francisco Delgado Vargas

Culiacán, Sinaloa, Junio de 2018

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular y en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, 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 Nancy Yareli Salazar Salas, Gabriela López Angulo, 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. Alexis Landeros Sánchez recibió Beca de Estudios de Maestría por parte de CONACYT.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 18 del mes de junio del año 2018, el (la) que suscribe IBQ. Alexis Landeros Sánchez, alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 01566403-1, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Angel López Valenzuela y Dr. Francisco Delgado Vargas y cede los derechos del trabajo titulado "Identificación de metabolitos asociados con tolerancia inducida al daño por frío en tomate", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

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. Alexis Landeros Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me apoyaron durante mis estudios de Maestría en Ciencia y Tecnologia de Alimentos en la Universidad Autonoma de Sinaloa, en especial a los Drs. José Angel López Valenzuela y Francisco Delgado Vargas, así como también a la Dra. Nancy Yareli Salazar Salas por dedicarme su tiempo y paciencia para poder culminar esta etapa de mi vida.

Agradecer a mi familia por apoyarme en esta etapa, los cuales no dudaron de mi y me alentaron a iniciar y terminar mi maestría. Le tengo que agradecer muchísimo a mi novia en esa etapa y ahora esposa en mi presente por apoyarme en todo momento, por ayudarme a estudiar, por estar conmigo, animarme y sobre todo por no rendirse junto conmigo y asi culminar esta etapa, ella es todo para mi y con su fuerza pudimos culminar la maestría.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS iv

ÍNDICE DE CUADROS v

I. RESUMEN 1

ABSTRACT 3

II. INTRODUCCIÓN 5

III. REVISIÓN DE LITERATURA 8

A. TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) 8

1. Generalidades 8

2. Importancia económica 8

3. Aspectos botánicos 11

4. Taxonomía 13

5. Composición química y valor nutricional 13

6. Maduración y poscosecha 16

B. DAÑO POR FRÍO 19

1. Mecanismo del daño por frío 20

a. Alteraciones en la conformación y estructura de la membrana celular 20

b. Estrés oxidativo 21

c. Tratamientos que brindan tolerancia al daño por frío 22

d. Cambios en la abundancia de metabolitos relacionados con el daño por frío 24

C. METABOLÓMICA 27

1. Metabolómica del tomate 30

2. Metabolitos y actividad antioxidante en tomate 34

IV. JUSTIFICACIÓN 38

V. HIPÓTESIS 39

VI. OBJETIVOS 40

A. OBJETIVO GENERAL 40

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 40

VII. MATERIALES Y MÉTODOS 41

A. MATERIAL BIOLÓGICO 41

B. MÉTODOS 41
1. Preparación del extracto metanólico 41
2. Contenido de compuestos fenólicos totales 42
3. Perfil de metabolitos 42
a. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (EM) 42
b. Análisis por cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas (EM) 43
4. Actividad antioxidante 44
a. Método ABTS 44
b. Método DPPH 46
5. Análisis estadístico 46
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 47
A. EFECTO DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO (TH) Y EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO SOBRE EL CONTENIDO Y PERFIL DE METABOLITOS EN FRUTOS DE TOMATE 47
1. Fenólicos totales 47
2. Separación e identificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-EM 50
3. Contenido de compuestos fenolicos 56
a. Efecto del almacenamiento en frío sobre el perfil de fenólicos 61
b. Efecto del tratamiento hidrotérmico sobre el perfil de fenólicos 63
4. Análisis de metabolitos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) 65
a. Efecto del almacenamiento en frío y el tratamiento hidrotérmico sobre el perfil de metabolitos de baja polaridad 66
B. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SU ASOCIACIÓN CON EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA TOLERANCIA AL DAÑO POR FRÍO 75
1. Actividad antioxidante por ABTS 75
2. Actividad antioxidante por DPPH 79

3. Asociación entre el contenido de metabolitos y la actividad antioxidante 81
IX. CONCLUSIONES 84
X. BIBLIOGRAFÍA 85
ABREVIATURAS 100

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Estructura fisiológica del fruto de tomate	12
2	Efecto del tratamiento hidrotérmico sobre el contenido de fenólicos totales en frutos de tomate durante el almacenamiento a 5 °C y maduración a 21°C	48
3	Cromatograma del HPLC típico de los extractos metanólicos de tomate cv. Imperial	51
4	Espectro UV-visible característico de flavonoides (A) y ácidos fenólicos (B) observado en los extractos metanólicos analizados	52
5	Espectro de masas MS^2 del ión *m/z*= 609 de rutina	54
6	Curvas de calibración de estándares utilizadas en la cuantificación de compuestos fenólicos	57
7	Cromatograma del CG típico de los extractos metanólicos de tomate cv. Imperial	67
8	Modificaciones del grupo 3β-hidroxilo de los esteroles vegetales	73
9	Cambio de fases de la membrana	76
10	Efecto del tratamiento hidrotérmico (TH) sobre la actividad antioxidante por ABTS en frutos de tomate durante el almacenamiento a 5 °C y maduración a 21 °C	77
11	Efecto del tratamiento hidrotérmico (TH) sobre la actividad antioxidante por DPPH en frutos de tomate durante el almacenamiento a 5 °C y maduración a 21 °C	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Principales países productores de tomate	9
2	Principales estados productores de tomate en México	10
3	Clasificación taxonómica del tomate	14
4	Composición química del fruto de tomate en estado maduro	15
5	Descripción de las etapas de maduración del fruto de tomate	18
6	Principales metabolitos identificados en extractos de frutos de tomate	31
7	Clasificación de compuestos fenólicos	35
8	Identificación por ESI-MS de los principales compuestos fenólicos en extractos metanólicos de tomate	55
9	Contenido de compuestos fenólicos en frutos de tomate control (C) y con tratamiento hidrotérmico (TH)	58
10	Contenido relativo de alcaloides en fruto de tomate cv. Imperial sometido a tratamiento hidrotérmico (TH) y condiciones de daño por frío	60
11	Identidad de los metabolitos analizados por CG-EM en fruto de tomate	68
12	Contenido relativo de metabolitos analizados por CG-MS en tomate con tratamiento hidrotérmico (TH) y sometidos a daño por frío y maduración	69
13	Metabolitos que presentaron una correlación significativa con la actividad antioxidante de extractos metanólicos de tomate cv. Imperial	82

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, cuando este fruto es almacenado a temperaturas inferiores a 12 °C desarrolla un desorden fisiológico conocido como daño por frío (DF), el cual afecta su calidad y puede resultar en grandes pérdidas económicas. Diversos tratamientos se han empleado para inducir tolerancia al DF (*i.e.,* aplicación de fitohormonas, ceras, calentamiento gradual y tratamientos térmicos). Entre éstos, el tratamiento hidrotérmico (TH) induce una protección significativa contra el DF, siendo fácil de aplicar y de bajo costo. Por ello el objetivo del presente trabajo fue Identificar metabolitos asociados con la tolerancia inducida al DF mediante TH en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Imperial. Se analizaron extractos metanólicos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (EM) y cromatografía de gases (CG) – EM; también se les determinó la actividad antioxidante *in vitro* mediante los métodos de ABTS y DPPH. El análisis por HPLC-EM identificó 26 compuestos (20 fenólicos y 6 alcaloides) y 11 fenólicos variaron en respuesta al TH. CG-EM detectó 21 metabolitos (5 azúcares, 1 aminoácido, 1 alcohol, 6 ácidos orgánicos, 3 ácidos grasos y 4 triterpenos), de los cuales 7 variaron en respuesta al TH. El daño por frío de los frutos control se relacionó con un menor contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, así como la liberación de compuestos asociados a la membrana como esteroles y ácidos grasos que son indispensables para el funcionamiento de la misma. Los frutos con TH presentaron una mayor actividad antioxidante asociada con una mayor acumulación de compuestos como

ácido clorogénico y otros cafeoilquínicos, ácido cafeico, cafeoil-hexosa I, rutina y rutina hexósido. La tolerancia al daño por frío inducida por el TH parece estar asociada con una mayor acumulación de compuestos antioxidantes que protegen la membrana del estrés oxidativo.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most highly consumed vegetables worldwide and it is very important in the human diet, representing a rich source of compounds with biological actitivity. However, fruit stored at temperatures below 12 °C develops a physiological disorder known as chilling injury (CI), which affects the fruit quality and can lead to great economical losses. Several treatments have been used to induce CI tolerance (*i.e.*, application of phytohormones, wax, gradual heating and thermal treatments). Hot water treatment (HWT) induces a significant protection against CI and it is easy to apply at low cost. The objective of the present study was to identity metabolites associated with CI tolerance induced by HWT in tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv Imperial. Methanol extracts were prepared and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to mass spectrometry (MS) and by gas chromatography (GC)-MS; they were also analyzed for *in vitro* antioxidant activity by ABTS and DPPH methods. The HPLC-MS analyses identified 26 compounds (20 phenolics and 6 alkaloids) and 11 phenolics varied in response to HWT. GC-MS detected 21 metabolites (5 sugars, 1 amino acid, 1 alcohol, 6 organic acids, 3 fatty acids and 4 triterpenoids) and 7 varied in response to HWT. The CI of the control fruit was associated with a smaller content of phenolic compounds and antioxidant activity, as well as the release of compounds associated with the membrane such as sterols and fatty acids that are very important for the proper function of the membrane. HWT fruit showed higher antioxidant activity associated with a higher accumulation of compounds that included chlorogenic acid and other caffeoylquinic acis, caffeic acid, caffeoyl-hexose I, rutin, and rutin-hexoside.

The CI tolerance induced by the HWT appears to be associated with a greater accumulation of antioxidant compounds that protect the membrane from the oxidative stress.

II. INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras son de gran importancia en la dieta humana por ser una fuente importante de compuestos bioactivos, tales como vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos. Estos compuestos se han relacionado con una menor probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares (Willcox y col 2003) (Gómez-Romero y col 2007). El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) destaca entre otras frutas por su gran disponibilidad durante todo el año, precios accesibles y además de contener este tipo de compuestos. El tomate es un fruto climatérico, por lo que el inicio de la maduración está acompañado de un aumento en la velocidad de respiración y biosíntesis de etileno (Lelievre y col 1997). Por ello, normalmente es almacenado y distribuido bajo refrigeración para controlar la maduración, pero las temperaturas utilizadas no deben ser inferiores a 12 °C ya que es susceptible a un desorden fisiológico conocido como daño por frío (DF) (Crisosto y col 2002).

El DF es un trastorno complejo que afecta la calidad de los frutos tropicales y subtropicales y a menudo conduce a graves pérdidas económicas (Sevillano y col 2009). Los frutos expuestos a temperaturas bajas sin llegar al punto de congelación presentan una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que se asocian con una incapacidad para madurar normalmente; éstos incluyen superficie rugosa, decoloración, aumento de la tasa de respiración y pérdida de agua (Saltveit y Morris, 1990). Si bien los síntomas del DF pueden desarrollarse durante el almacenamiento a bajas temperaturas, la mayoría son visibles después de que el fruto frío se expone a temperatura de no refrigeración (20 °C) durante unos días (Saltveit y Morris, 1990).

Uno de los primeros cambios fisiológicos asociados al DF es el aumento en la permeabilidad de la membrana, induciendo un incremento en la fuga de iones desde el interior de las células hacia el espacio intercelular (Saltveit, 2005). Recientemente, la sintomatología del DF se ha asociado al estrés oxidativo en los tejidos (Hodges y col 2004).

Estudios previos han demostrado que frutos tratados térmicamente (40-50 °C) previo al enfriamiento desarrollan menos síntomas de DF. El beneficio de este tratamiento en la calidad de los frutos se ha asociado con sobre-expresión de proteínas específicas, principalmente proteínas de choque térmico (Saltveit, 2005), del sistema antioxidante y del metabolismo energético (Salazar-Salas y col 2017).

Sin embargo, los estudios sobre la respuesta metabólica de frutos de tomate al DF y a la tolerancia inducida por diversos tratamientos poscosecha, como los térmicos, son insuficientes. Luengwilai y col (2012) mostraron que frutos de tomate cv. Micro-Tom tratados térmicamente son más resistentes al DF. Estudios de cromatografía de gases-masas identificaron metabolitos asociados a esta tolerancia, entre ellos hubo incrementos de alanina, alantoína, asparagina, ácido cítrico, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato, ácido mirístico y putrecina; mientras que ácido clorogénico, fructosa, GABA y valina disminuyeron. También relacionaron el DF con un aumento en los niveles de arabinosa, ácido cítrico, ácido dehidroascórbico, fructosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato, ramnosa y valina, mientras que los contenidos de ácido glutámico y ácido shikímico disminuyeron. El mencionado estudio se realizó con un fruto modelo y solo después de 14 días de almacenamiento en frío, lo que nos da una visión limitada del efecto del DF en el perfil de metabolitos del fruto, y de los

tratamientos que ayudan a disminuir su impacto. En esta investigación se utilizó el genotipo de tomate *Solanum lycopersicum* cv. Imperial, cultivar de importancia comercial, para identificar metabolitos relacionados con la tolerancia al daño por frío de frutos tratados hidrotérmicamente y sometidos a diferentes tiempos de almacenamiento a bajas temperaturas y un periodo posterior de maduración para el desarrollo de síntomas visibles de este desorden.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

A. TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)

1. Generalidades

El jitomate o tomate es originario de la región andina en América del Sur, particularmente de los países de Perú, Ecuador, Bolivia y Chile, Sin embargo, México es considerado como el sitio de domesticación o sitio de origen secundario (Bai y Lindhout 2007). El nombre de jitomate procede del náhuatl xictli, ombligo y tomatl, tomate, que significa tomate de ombligo. Las especies silvestres de tomate se han desarrollado en hábitats muy variados, lo que ha contribuido al incremento de su biodiversidad (Nakazato y Housworth 2011). Sin embargo, a partir de 1890 inició el mejoramiento genético del tomate mediante cruzas para tener variedades con mejores características agronómicas, sin considerar las nutricionales, y que han llevado a una pérdida de biodiversidad (Orzolek y col 2004).

2. Importancia económica

El tomate es uno de los vegetales más ampliamente cultivados para el consumo humano, ocupando el onceavo lugar en importancia económica después del maíz, arroz, trigo, papa, soya y caña. En el año 2016 datos de la FAO (Food and Agriculture Organization) mostraron una producción mundial de tomate de aproximadamente 177,042.3 millones de toneladas, siendo China el principal productor mientras que México se ubicó en el décimo sitio con una producción de 4.04 millones (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Principales países productores de tomate

País	Producción (Ton)
China	56,308,914
India	18,399,000
Estados Unidos de América	13,038,410
Turquía	12,600,000
Egipto	7,943,285
Italia	6,437,572
Irán	6,372,633
España	4,671,807
Brasil	4,167,629
México	4,047,171
Resto	43,048,00

FAOSTAT (2018)

Cuadro 2. Principales estados productores de tomate en México

Estado	**Producción (Ton)**
Sinaloa	745,000
San Luis potosí	334,000
Michoacan	211,000
Zacatecas	192,000
Jalisco	179,000
Baja california	145,000
Puebla	122,000
Sonora	115,000
Morelos	108,000
Resto	597,000

SIAP (2018)

Ese mismo año, el estado de Sinaloa ocupó el primer lugar de producción nacional con 745 millones, seguido de San Luis Potosí y Michoacan, respectivamente (**Cuadro 2**) (SIAP 2018). Las variedades que más se producen en Sinaloa son saladette con 63.4% de la producción total y tomate bola con 28.9% (FAOSTAT 2018, SIAP 2018). 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 (SAGARPA 2018).

3. Aspectos botánicos

El tomate es un fruto (Bergougnoux 2013) proveniente de una planta herbácea perenne pero cultivada generalmente como anual en las regiones templadas debido a que es sensible a las heladas (Jones 1999). El fruto es una baya, generado de un ovario sincárpico, presenta dos o más cavidades loculares con placenta carnosa que contiene numerosas semillas en forma de riñón rodeadas de parénquima de textura gelatinosa. Los frutos también poseen una piel o exocarpio complejo, formada por una capa de células pequeñas, con una prominente cutícula (epidermis) y dos a cuatro capas de células colenquimatosas (hipodermis) que le proporcionan una gran resistencia física y baja permeabilidad puesto que no presenta estomas (**Figura 1**). El color de los frutos maduros (*i.e.*, rojo, rosa, naranja, amarillo) depende de la variedad y de la degradación de la clorofila e incremento en el contenido de carotenoides (amarillo-anaranjados), siendo licopeno el principal en los frutos de color rojo (Madhavi y Salunkhe 1998).

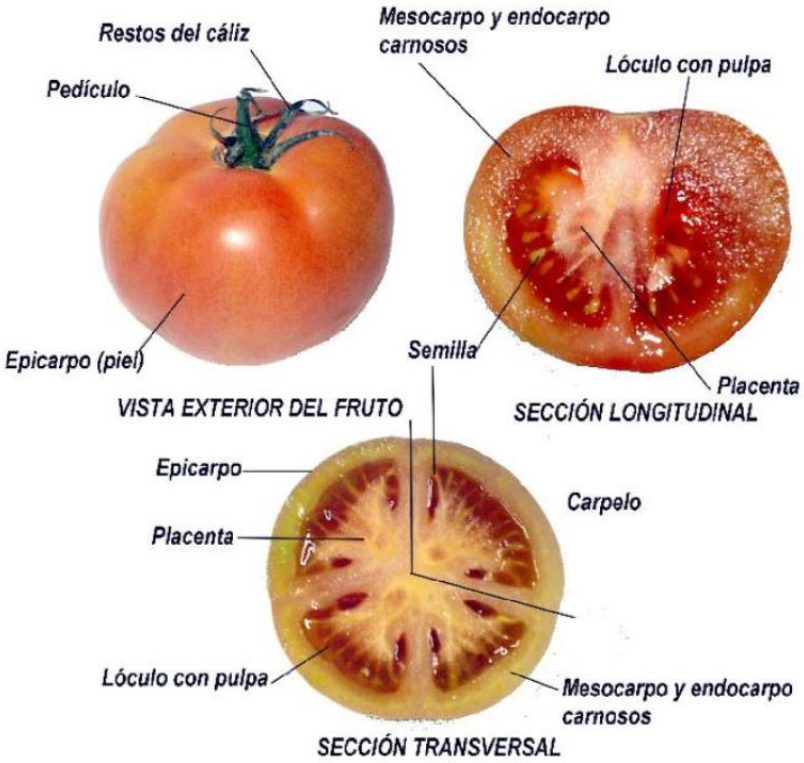


Figura 1. Estructura fisiológica del fruto de tomate.

Fuente: Osuna (2015)

4. Taxonomía

Tomando en cuenta relaciones filogenéticas, durante muchos años se discutió la pertenencia del tomate a los géneros *Solanum* y *Lycopersicum* (**Cuadro 3**). Sin embargo, datos morfológicos y moleculares lo ubicaron dentro del género *Solanum* (Spooner y col 2005), concordando con la clasificación original de Linnaeus en 1753, y el nombre científico actual del tomate cultivado es *Solanum lycopersicum* (Foolad 2007).

5. Composición química y valor nutricional

La composición química y el valor nutricional del tomate (**Cuadro 4**) varían según el genotipo, condiciones de cultivo y clima; así como con el grado de madurez, el tiempo y condiciones de almacenamiento, entre otros aspectos. El tomate contiene principalmente agua (94%), seguido de azúcares libres y ácidos orgánicos que le proporcionan su textura y sabor característicos (Coronel y Castillo, 2009). Con base en la materia seca de tomate, el 60% son azúcares, principalmente glucosa y fructosa, mientras que los ácidos cítrico y málico representan más del 10% (Rosello 2011).

El tomate verde maduro sólo contiene α- y β-caroteno, mientras que β-caroteno y licopeno contribuyen con el 7 y 87% de los carotenoides en el tomate rojo normal (Madhavi y Salunkhe 1998). El tomate presenta un contenido medio de proteínas, aminoácidos y lípidos muy bajo. Sin embargo, el tomate es considerado un alimento funcional debido a los componentes nutracéuticos que presenta (Rosello 2011).

Cuadro 3. Clasificación taxonómica del tomate

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

NRCS-USDA (2017)

Cuadro 4. Composición química del fruto de tomate en estado maduro

Componente	**Contenido por 100 g de tejido fresco**
Componentes mayoritarios (g)	
Agua	94.52
Proteína (N x 6.25)	0.88
Lípidos	0.20
Ácidos grasos saturados	0.028
Ácidos grasos insaturados	0.114
Cenizas	0.50
Hidratos de carbono (por diferencia)	3.89
Fibra dietaria total	1.20
Azúcares totales	2.63
Glucosa	1.25
Fructosa	1.37
Aminoácidos (g)	
Ácido glutámico	0.431
Ácido aspártico	0.135
Ácidos orgánicos (g)	
Cítrico	0.43
Málico	0.08
Vitaminas (mg)	
Vitamina C (ácido ascórbico total)	13.7
Ácido nicotínico	0.594
Vitamina E (α-tocoferol)	0.540
Ácido pantoténico	0.089
Vitamina B6	0.080
Tiamina	0.037
Riboflavina	0.019
Vitamina A (UI)	833
Minerales (mg)	
Potasio	237
Fósforo	24
Magnesio	11
Calcio	10
Sodio	5
Otros (µg)	
Licopeno	2573
β-caroteno	449

Fuente: USDA (2014)

Algunos carotenoides del fruto de tomate presentan actividad provitamina A y la mayoría son antioxidantes, y evidencia científica y epidemiológica los ha asociado con la prevención de enfermedades degenerativas relacionadas con la edad, el cáncer, cataratas y enfermedades cardiovasculares. El β-caroteno presenta la mayor actividad provitamina A y se ha demostrado que contribuye a disminuir el daño que generan los radicales libres. El licopeno también ha sido asociado con beneficios a la salud debido a su capacidad para secuestrar moléculas de oxígeno singulete y radicales peroxilo, así como desactivar especies reactivas que dañan la cadena de ADN (Collins y col 2006).

La fracción lipídica del tomate está compuesta de triglicéridos, esteroles libres y esterificados, ácidos grasos libres e hidrocarburos. Los ácidos grasos más abundantes en el fruto son linoléico, linolénico, oleico, estéarico, palmítico y mirístico (Madhavi y Salunkhe 1998).

6. Maduración y poscosecha

La maduración es un proceso metabólico complejo el cual culmina en cambios en color, textura, sabor y aroma en los frutos frescos que los hacen aptos para el consumo humano. El tomate es un fruto climatérico; presenta tasa respiratoria relativamente elevada (10, 15, 22, 35 y 43 mg CO_2 h^{-1} kg^{-1} a 5, 10, 15, 20 y 25 °C, respectivamente) y emisión de etileno moderada, de unos 5 a 8 µL de etileno kg^{-1} h^{-1} a 12 °C en frutos rompientes (algo inferior en frutos verdes y superior en los maduros) y de unos 3 a 10 µL de etileno kg^{-1} h^{-1} a 20 °C (Artés 2007). Algunos de los cambios ligados a la respiración y producción de etileno de tomate son la modificación de la estructura y composición de las paredes celulares, afectando la

firmeza del fruto, el metabolismo de ácidos y azúcares, la degradación de clorofila y la biosíntesis de licopeno (Madhavi y Salunkhe 1998).

La calidad final del fruto de tomate depende en gran medida del manejo adecuado durante la cosecha y poscosecha. El grado de madurez más adecuado para la cosecha de tomate varía con las preferencias del mercado (Cornejo, 2009). Las etapas de madurez de este fruto son siete, dependientes del cambio de color externo del fruto, y fueron definidas de acuerdo con los estándares de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (**Cuadro 5**).

La vida poscosecha de los productos vegetales se define como el periodo en el cual un producto mantiene un nivel predeterminado de calidad bajo condiciones específicas de almacenamiento (Shewfelt 1986). El tomate es un fruto altamente perecedero y un buen manejo poscosecha disminuye las pérdidas relacionadas con la senescencia del fruto, daño mecánico, almacenamiento inadecuado, manipulación y transporte incorrecto (Ferreira y col 2005). El tomate normalmente es transportado, almacenado y distribuido a temperaturas entre 10 y 12 °C para controlar la maduración y mantener las características de calidad, ya que es susceptible a un desorden conocido como daño por frío que se presenta cuando los frutos son expuestos a temperaturas inferiores. Sin embargo, el periodo máximo de almacenamiento a 10 y 12 °C es de 14 días, reduciendo la factibilidad de comercializarlo en países distantes (Crisosto y col 2002).

Cuadro 5. Descripción de las etapas de maduración del fruto de tomate

Clase	Etapa de madurez	Descripción	Apariencia física
1	Verde	Superficie del fruto completamente verde, variando desde tenue a oscuro	
2	Rompiente	Cambio definido de verde a amarillo, rosa o rojo en no más del 10% del fruto	
3	Cambiante	10 a 30% de la superficie se muestra amarilla, rosa, roja o una combinación de éstos	
4	Rosa	30 a 60% del color superficial ha cambiado de verde a rosa o rojo	
5	Rojo ligero	60 a 90% ha cambiado a rojo-rosado o rojo	
6	Rojo maduro	>90% de la superficie es de color rojo	

Fuente: Adaptado de Grierson y Kader (1986).

B. DAÑO POR FRÍO

El almacenamiento de frutas y hortalizas a temperaturas cercanas al punto de congelación es una de las tecnologías poscosecha más efectivas para mantener su calidad y extender la vida de anaquel. Sin embargo, la calidad de productos tropicales y subtropicales almacenados a bajas temperaturas se ve comprometida por el daño por frío (DF), trastorno complejo que disminuye su calidad y conduce a graves pérdidas económicas (Sevillano y col 2009). El DF es uno de los principales factores que retrasa el crecimiento y desarrollo de cultivos, reduce su productividad, puede causar la muerte de la planta, y limita la comercialización de frutas y hortalizas (Paull 1990; Park y col 2004).

El tomate es un cultivo subtropical y cuando es expuesto a bajas temperaturas es susceptible al DF, presentando una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos, incluyendo incapacidad para madurar normalmente, superficie rugosa, decoloración, aumento de la tasa de respiración y pérdida de agua (Morris, 1982; Saltveit y Morris, 1990a). El DF se presenta normalmente cuando el fruto es almacenado a temperaturas por debajo de su temperatura crítica (13 °C) por más de dos semanas (Aghdam y col 2012; McDonald y col 1999). La temperatura crítica varía entre productos y se refiere a la temperatura mínima que es segura para el almacenamiento sin que se desarrollen síntomas de DF (Malacrida y col 2006; Wills y col 1989). Los síntomas visibles de DF en el fruto de tomate incluyen el desarrollo irregular del color y maduración, pudrición y picaduras en la epidermis del fruto, áreas sudadas, deterioro acelerado y una mayor susceptibilidad al ataque por

patógenos como *Alternaria tenuis* (McColloch y Worthington 1952; Morris 1982; Luengwilai y col 2012).

1. Mecanismos del daño por frío

Los síntomas del DF se pueden clasificar en dos categorías: los síntomas de desarrollo o metabólicos con carácter cuantitativo como maduración anormal, pobre sabor y aroma; y los síntomas fisiológicos como picaduras, decoloración, descomposición interna, susceptibilidad a daños mecánicos y ataque de hongos (Sevillano y col 2009).

a. Alteraciones en la conformación y estructura de la membrana celular

Los cambios en la conformación y estructura de las membranas son considerados los primeros eventos a nivel molecular del DF y afectan su permeabilidad (Lyons 1973, Raison 1990). Las diferentes formas de DF en las membranas celulares se han demostrado con el aumento en la fuga de electrolitos, así como cambios en la composición lipídica durante el almacenamiento a bajas temperaturas, los cuales son similares a los que ocurren durante la senescencia (Marangoni 1996; Yang y col 2009); entre estos cambios los más significativos son la peroxidación de lípidos, aumento en el índice de saturación de los ácidos grasos, la degradación de fosfolípidos y glicolípidos y aumento en la proporción de esteroles/fosfolípido (Lee SH 2005). Estos cambios en los lípidos de la membrana disminuyen su fluidez, afectan negativamente su funcionalidad, así como la de las proteínas membranales (Marangoni 1996), y finalmente provocan su ruptura, dando lugar a la fuga de agua, iones y de metabolitos desde el interior de la célula (Lyons 1973). De esta manera, una de las formas recomendadas para evaluar el daño a las membranas es midiendo

la lixiviación de electrolitos (Marangoni y col 1995, Zhao y col 2009). Otro buen indicador del daño de membranas celulares es el nivel de malondialdehído (MDA), producto final de la peroxidación de ácidos grasos de la membrana (Wise Naylor 1987; Hodges y col 1999).

Por más de un cuarto de siglo, la hipótesis básica en el estudio del DF ha sido el cambio de fase de las membranas (Lyons 1973). Sin embargo, Saltveit (2000) indica que son varios los mecanismos involucrados en el desarrollo de los síntomas de DF. Estudios comparativos sobre la transición de fase de los lípidos en membranas de dos especies de tomate, *Solanum lycopersicum* (sensible al DF) y *Lycopersicon hirsutum* (especie silvestre tolerante al DF), revelaron que la transición de fase de los lípidos totales aislados de mitocondrias, cloroplastos, hojas enteras y frutos ocurrían a temperaturas similares en las dos especies. Por lo tanto, se puede concluir que la transición de fase de los lípidos, *per se*, no parece ser la causa principal de los síntomas del DF (Venema y col 2005).

b. Estrés oxidativo

El efecto de las bajas temperaturas sobre la organización molecular de los lípidos de membrana se ha asociado con procesos oxidativos. El almacenamiento a bajas temperaturas genera estrés que incrementa la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), las que a su vez inducen la peroxidación de lípidos. El aumento anormal del contenido de ROS proviene principalmente de los cambios en el proceso de foto-respiración y la fotosíntesis. Entre las ROS más importantes se tienen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y al radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$)

(Scandalios 1997); éstas atacan las biomoléculas de la célula (*i.e.,* lípidos, proteínas y DNA), rompen la homeostasis y pueden conducir a la muerte celular (Mittler 2002).

Las plantas se protegen del estrés oxidativo mediante la sobre-expresión de genes cuyos productos inactivan las ROS. Este sistema antioxidante es complejo e incluye metabolitos liposolubles como α-tocoferoles y carotenoides, agentes reductores solubles como glutatión y ascorbato, así como enzimas redox como catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX) y superóxido dismutasa (SOD) (Aghdam y col 2013; Malacrida 2006).

El sistema antioxidante de plantas también incluye metabolitos derivados de la ruta de los fenilpropanoides (*i.e.*, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos), vitaminas y terpenoides (Yanishlieva y col 2006). Diversas investigaciones han mostrado el aumento de algunos de estos metabolitos por efecto de la exposición a bajas temperaturas (Bohnert y col 1995; Gusta y col 1996, Hannah y col 2006, Kaplan y col 2004; Kishitani y col 1994). Las modificaciones en los niveles de metabolitos por efecto del DF son importantes para entender este proceso y para mejorar el manejo de frutos subtropicales, aumentar su valor de mercado y disminuir pérdidas.

c. Tratamientos que brindan tolerancia al daño por frío

Los tratamientos que protegen del DF incluyen tratamientos físicos y el uso de aditivos químicos. Entre los primeros se tienen tratamientos térmicos, hidrotérmicos (TH) y enfriamiento gradual. Recientemente se ha demostrado que tratamientos hidrotérmicos del fruto de tomate inducen tolerancia al DF (Cárdenas-Torres 2013; Ding y col 2001; Lurie y Klein 1991; Lurie y col 1997; Saltveit, 2005), retrasan el

proceso de maduración (Akbudak y col 2007; Vega-Espinoza 2010) y previenen el desarrollo de pudriciones (Fallik 2004).

Cárdenas-Torres (2013) evaluó el efecto de un TH (42 °C, 5 min) en frutos de tomate cv. Imperial almacenados a 5 °C y 12 °C, encontrando que el TH indujo tolerancia al DF evidenciado por un menor desarrollo de síntomas y una mejor retención de la calidad de los frutos, esto es, la pérdida de peso y la firmeza no sufrieron modificaciones importantes por efecto del TH y el color sólo se modificó en frutos almacenados a 5 °C; además, la aplicación del TH causó un menor daño en las membranas y una menor peroxidación de lípidos, así como un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX), confiriéndole a los frutos una mayor tolerancia al DF.

Luengwilai y col (2012) reportaron que la aplicación de un TH (40 °C, 7 min) en frutos de tomate cv. Micro-Tom verde-maduro previo al almacenamiento a 2.5 °C por 14 días, resultó en un menor desarrollo de síntomas de DF, así como un menor daño en las membranas, lo cual fue evidenciado por una reducción en la lixiviación de electrolitos.

Lurie y col (1997) evaluaron la magnitud del DF en tomates cv. Daniella tratados con aire caliente (38, 42 y 46 °C, 48 h) y almacenados a 2 °C por 7 días, en contraste con tomates sin tratamiento térmico. Los autores encontraron que los tomates sin tratamiento térmico presentaron mayor daño, infecciones fúngicas y un mayor deterioro con respecto a los tratados.

Saltveit (2000) evaluó el desarrollo de síntomas de daño por frío en las plantas de semillero de arroz, pepino y tomate después de tratarlos con agua a 45 °C por 15 min y almacenarlos a 2 °C de 4 a 7 días, observando una disminución en los síntomas del DF, tomando gradualmente los índices de fuga de iones en tomate en diferentes días de almacenamiento.

d. Cambios en la abundancia de metabolitos relacionados con el daño por frío

El éxito de las plantas en un ecosistema depende de su habilidad para responder al estrés ambiental (biótico o abiótico), y esto viene definido por sus características genéticas que a su vez determinan los productos que se generan de su expresión (proteoma y metaboloma).

En *Arabidopsis thaliana* se indujo tolerancia al DF mediante la aplicación de un tratamiento térmico. La planta en respuesta al choque térmico incrementó su tolerancia al DF, lo que fue asociado con un aumento en el contenido de alanina, asparagina, β-alanina, fructosa, ácido γ-aminobutírico (GABA), glicerol, malato, maltosa, manosa, putrescina, rafinosa, succinato, prolina, sacarosa y trehalosa. La persistencia en la exposición de la planta a baja temperatura dio lugar a mayores cantidades de estos metabolitos y produjo la acumulación de aún más metabolitos con propiedades similares, como sorbitol, succinato y trehalosa, los cuales ejercen efectos aditivos o sinérgicos durante el proceso de aclimatación y durante la inducción de termotolerancia (Kaplan y col 2004).

En un estudio similar, Cuevas y col (2008) observaron la acumulación de putrescina en plantas de *Arabidopsis* bajo estrés por frío indicando que es esencial para la

aclimatación y sobrevivencia a temperaturas bajas, lo cual correspondió con el hecho de que mutaciones de los genes ADC1 y ADC2 en *Arabidopsis* disminuyen la biosíntesis de putrescina y reducen la tolerancia a la congelación en comparación con las plantas normales.

Por otra parte, la planta *Lolium perenne*se expuesta a bajas temperaturas presentó una mayor acumulación de rafinosa; carbohidrato que tiene funciones de crioprotección al estabilizar el fotosistema II en las células vegetales y que disminuye el impacto de las bajas temperaturas (Knaupp y col 2011). En este sentido, también se demostró que un genotipo de *Arabidopsis* tolerante a las heladas acumulaba cuatro veces más rafinosa cuando se exponía a DF en comparación con un genotipo susceptible (Klotke y col 2004).

Otro estudio mostró que frutos de mango (*Mangifera indica* L. cv. Wacheng) tratados con un choque de frío (0 °C, 4 h), previo a su refrigeración, inducía tolerancia al DF, fenómeno que fue asociado a una reducción notable de la fuga de electrolitos, un aumento en la actividad de enzimas detoxificadoras de ROS como la catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (GR); así como un incremento en los niveles de ácido ascórbico, glutatión y compuestos fenólicos (Zhao y col 2006).

La aplicación de brasinoesteroides (BRs) en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) redujo efectivamente los efectos del daño por frío (DF), como la fuga de electrolitos, resultando en un aumento en los niveles de compuestos fenólicos y prolina (Aghdam 2012). Estos resultados sugieren que el tratamiento con BRs induce tolerancia al DF mediante el incremento en los fenoles totales.

La fruta calabacín de la variedad Sinatra se sometió a tratamiento hidrotérmico con el objetivo de estudiar los efectos durante el almacenamiento en frío (Carvajal y col 2015). Los frutos tratados presentaron menor pérdida de peso y electrolitos, así como una menor peroxidación de lípidos en relación con los no tratados. La resistencia al DF se asoció con un aumento en las concentraciones de prolina y expresión de enzimas antioxidantes; sin embargo, registraron una disminución de la putrescina, que otros estudios han mostrado su importancia contra el estrés por frío.

Kim y col (2009) identificaron algunos polifenoles (ácido gálico y galotaninos) en mango cv. Tommy Atkins que se vieron modificados por la aplicación de tratamiento hidrotérmico; los cambios en los niveles de los metabolitos se relacionaron con la modificación de la actividad antioxidante del fruto.

Luengwilai y col (2012) identificaron metabolitos asociados con la tolerancia al DF inducida por un tratamiento de choque térmico en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Micro-Tom). El perfil metabólico por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) mostró 363 compuestos en el pericarpio del fruto y se identificaron solamente 65. La tolerancia al DF inducida por el choque térmico fue asociada a un incremento en las concentraciones de arabinosa, fructosa-6-fosfato, valina y ácido shikímico.

Algunos metabolitos y fitohormonas juegan un papel crucial en la modulación de múltiples procesos de desarrollo y en las respuestas celulares a estrés biótico y abiótico. Recientemente se ha demostrado que alteraciones en los niveles de metabolitos relacionados con arginina (poliaminas libres o prolina) se producen en

respuesta al tratamiento con metil jasmonato (MeJA) en tomate (Biondi y col 2001; Chen y col 2006; Haggag y Abd-El-Kareem, 2009). La arginasa hidroliza la arginina a urea y ornitina, ésta última es precursor de putrescina y prolina que juegan un papel importante en la tolerancia al DF (Akiyama and Jin 2007; Yadegari y col 2007; Zhang y col 2009).

La putrescina y prolina estabilizan la membrana a bajas temperaturas, lo que es importante en la resistencia de las plantas al estrés por frío. En particular, se ha sugerido que la actividad antioxidante de la Pro juega un papel importante en la inactivación de especies reactivas de oxígeno y en la protección contra el DF (Zhang y col 2009). En el caso de las poliaminas, a pH fisiológico son policatiónicas, pueden unirse fuertemente a sitios aniónicos de componentes celulares y estabilizar membranas, lo que justificaría su impacto positivo contra diversos tipos de estrés abiótico, incluyendo el DF (Groppa y Benavides, 2008).

C. METABOLÓMICA

El termino metabolómica fue usado por primera vez por Oliver y col (1998) para describir el conjunto de metabolitos sintetizados por un organismo de forma análoga al genoma y proteoma. El metaboloma de un organismo consiste en todos los metabolitos asociados a una célula/organismo/tejido en una condición específica. Por lo tanto, el metaboloma es dinámico y por lo tanto sólo es una foto instantánea de los procesos que se presentan en la muestra viva estudiada bajo las condiciones y tiempo específicos. Un tejido/organismo vivo es muy complejo y el empleo de estrategias "ómicas" para su estudio genera información que adecuadamente

interpretada da una visión más completa de lo que ocurre en la muestra estudiada (Fiehn y col, 2000).

La metabolómica identifica y cuantifica moléculas pequeñas producidas por el metabolismo primario o secundario en los sistemas biológicos, estudia cómo cambian los perfiles metabólicos dentro de un organismo en respuesta a diversas situaciones tales como enfermedades, estrés biótico o abiótico (Dunn y col 2005).

Dependiendo del campo de estudio, la metabolómica hace uso de diferentes estrategias: (a) Análisis dirigido, donde el estudio se enfoca sobre la identificación y cuantificación de metabolitos específicos; (b) Perfiles metabólicos, analiza el conjunto de metabolitos que se producen en estados específicos de la muestra y que los distinguen de otros estados; (c) fingerprinting (huella dactilar), análisis de metabolitos intracelulares con importancia bioquímica, un análisis global para clasificar la muestra de acuerdo a su origen o estatus (caso/control, saludable/enfermo) (Fiehn 2002).

El estudio de los metabolomas es complicado por su enorme complejidad y dinamismo. Una técnica analítica ideal debería realizarse directamente sobre las muestras, sin la necesidad de pretratamiento, además debería ser rápida, reproducible, robusta, sensible y precisa, pero a la fecha no hay una que proporcione todas estas características. Las principales técnicas analíticas que se emplean en metabolómica están basadas en espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN). La EM es la metodología que tradicionalmente se ha utilizado para los estudios de metabolómica, primero basados en la cromatografía de

gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), que estaba limitada a muestras volátiles. Posteriormente, se desarrollaron métodos para el estudio de muestras de mayor polaridad y por lo tanto menos volátiles, mediante la introducción de técnicas más suaves de ionización y el uso de otros tipos de cromatografía, como la de líquidos (HPLC) acoplada a EM (HPLC-EM). La RMN es una técnica muy robusta y versátil, el proceso de acondicionamiento de muestra para RMN es sencillo, facilita el análisis de un gran número de metabolitos de forma fiable y repetitiva, y está altamente automatizada. La mayor sensibilidad se obtiene con la EM pero es una prueba destructiva, la RMN requiere de menos procesamiento de muestra pero es menos sensible.

La electroforesis capilar (CE) acoplada a masas (EM) se ha presentado como una alternativa prometedora, al igual que la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). También se han utilizado ensayos enzimáticos en la determinación de metabolitos (Zhang y col. 2012).

En años recientes se han realizado una gran cantidad de investigaciones sobre el metaboloma de algunas plantas/frutos en diversas condiciones y estados de desarrollo para establecer asociaciones entre estas variables. Por ejemplo, en pera (*Pyrus communis* L. 'La France') se identificaron variaciones en la composición/contenido de metabolitos asociadas al desarrollo y maduración de los frutos. En particular, 250 metabolitos fueron cuantificados y se clasificaron en seis grupos en función de sus patrones específicos de variación durante el desarrollo y maduración (Oikawa y col. 2015). Estos datos metabólicos proporcionan información

fundamental que es útil para la comprensión de la fisiología de la fruta y la mejora de las características nutricionales de los nuevos cultivares.

El almacenamiento del fruto de tomate a bajas temperaturas le induce estrés y la metabolómica representa una buena herramienta para entender la respuesta metabólica del fruto a esta condición.

1. Metabolómica del tomate

El metaboloma del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) fue estudiado y presentado en la base de datos Metaboloma de tomate (MoTo DB). Fue desarrollado para la detección a gran escala e identificación de metabolitos en las plantas de tomate y su incorporación de estos a los datos en el MoTo DB. La HPLC-EM permitió la detección e identificación de metabolitos, principalmente de polaridad intermedia (Moco y col 2006). Estudiaron 96 variedades de tomates rojo maduro, con mesocarpio naranja, redondo y tipo cherry en diferentes etapas de maduración, así como algunos tomates con piel púrpura para el análisis de antocianinas. La estrategia utilizada para la investigación antes mencionada nos da una referencia clara que la HPLC-EM es una metodología muy buena para identificar metabolitos en la presente investigación.

En el **Cuadro 6** se muestran los principales metabolitos identificados en extractos de frutos de tomate. Al igual que en otros frutos y vegetales, el tomate contiene compuestos fenólicos como el ácido ferulico, ácido cafeico, naringenina y ácido clorogénico que se han relacionado con actividades biológicas y a los cuales se asocian beneficios sobre la salud humana (Minoggio y col 2003).

Cuadro 6. Principales metabolitos identificados en extractos de frutos de tomate**.**

COMPONENTE	FÓRMULA
Ácido *p*-hidroxibenzóico	$C_7H_6O_3$
Ácido salicílico	$C_7H_6O_3$
Ácido *p*-cumárico	$C_9H_8O_3$
Ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$
Kaempferol	$C_{15}H_1O_6$
Tomatidina	$C_{27}H_{45}NO_2$
Naringinina	$C_{15}H_{12}O_5$
Licoperósido H	$C_{50}H_{83}NO_{22}$
Ácido cafeico	$C_9H_8O_4$
Naringenín chalcona	$C_{15}H_{12}O_5$
Rutina	$C_{27}H_{30}O_{16}$
Ácido cinámico	$C_9H_8O_2$
Ácido vanílico	$C_8H_8O_4$
Tomatina	$C_{33}H_{55}NO_7$
Isoquercitrina	$C_{21}H_{20}O_{12}$
Ácido clorogénico	$C_{16}H_{18}O_9$
Ácido ferúlico	$C_{10}H_{10}O_4$

Fuente: Moco y col (2006)

Quercetina y kaempferol son compuestos polifenólicos que se encuentran en los alimentos *O*-glicosilados con el azúcar unido, comúmente, al hidroxilo en la posición 3 de la estructura del flavonoide (C6-C3-C6) y se ha sugerido que su consumo tiene efectos benéficos en la salud.

Gómez Romero y col (2010) analizaron el metaboloma de extractos metanólicos de las variedades de tomate Daniela (rojo maduro), Raf (verde a medio madurar) y Rambo (ranuras verdes medio madurar), originarias de España y cultivadas en Almería, para lo cual realizaron la caracterización por HPLC-DAD (DAD, detector de arreglo de diodos) y espectrometría de masas. Los autores identificaron 135 compuestos de diferentes clases estructurales y los más abundantes fueron fenólicos. La variedad Daniela presentó un mayor contenido de fenólicos y ocho de éstos no fueron detectados en las otras variedades (ácido gentísico, ácido homovanílico hexosa III, naringenina dihexosa I y II, apigenina acetilhexosida, eriodictiol, eriodictiol chalcona y quercetina). En todas las variedades estudiadas, el ácido hidroxicinámico y sus derivados son la familia más abundante de fenoles en el fruto: Daniela 58%, Raf 78%, y Rambo 81%.

Cataldi y col (2005) reportaron que muchas plantas de la familia Solanaceae, incluyendo al tomate, producen metabolitos tóxicos conocidos como glicoalcaloides esteroidales, los cuales contienen nitrógeno en su estructura unido con una cadena de azúcar (tres o cuatro unidades) y un resto esteroidal (aglicona) unido al grupo 3-hidroxilo, posiblemente como una defensa contra bacterias, hongos, virus e insectos (Friedman 2013). La α-tomatina y dehidrotomatina son las principales saponinas que se producen en el tomate, aunque varios estudios han cuantificado pequeñas

cantidades de otros glicoalcaloides en tomate, como esculósidos A y B o licoperósidos (Dall'Asta y col 2009).

Gall y col (2003) transformaron plantas de tomate con los factores de transcripción de maíz C1 y LC para aumentar la producción de flavonoles en los frutos, los perfiles metabólicos se analizaron en diferentes etapas de maduración mediante RMN. En relación con los frutos de plantas no transformadas, se observaron diferencias significativas en el contenido de los seis principales glucósidos de flavonoides, principalmente kaempferol-3-*O*-rutinósido, con incrementos adicionales en kaempferol-3,7-di-*O*-glucósido, kaempferol-3-*O*-rutinósido-7-*O*-glucósido, kaempferol-3-*O*-glucósido, dihidro-kaempferol-*O*-hexósido, y la naringenín-7-*O*-glucósido.

Osorio y col (2012) estandarizaron la CG-EM para establecer el perfil metabolómico de tomate con la finalidad de detectar e identificar metabolitos polares, entre los que se encontraron ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, alcoholes, compuestos fosforilados y compuestos lipofílicos, lo que indicó que CG acoplada a EM sería de utilidad en nuestra investigación para identificar metabolitos que mediante HPLC-EM no son detectados.

A pesar de lo anterior, hasta el momento no se cuenta con suficiente información sobre las modificaciones de los metabolitos del tomate con relación a la tolerancia o sensibilidad al DF. El tomate es muy importante para la agricultura y economía de Sinaloa y uno de los cultivares más importantes es el Imperial; por lo tanto, resulta

interesante investigar cambios en los niveles de metabolitos del fruto relacionados con la tolerancia al DF inducida por tratamiento hidrotérmico.

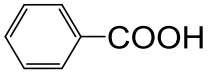
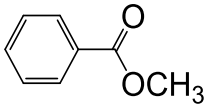
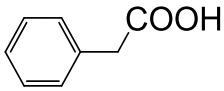
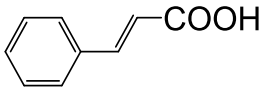
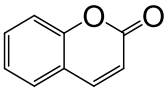
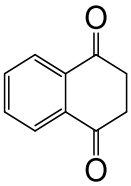
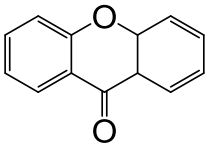
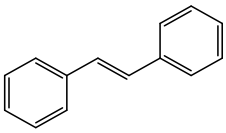
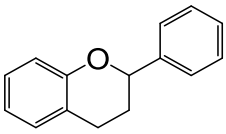
2. Metabolitos y actividad antioxidante en tomate

Diversos estudios han establecido que los compuestos fenólicos son los principales responsables de la actividad antioxidante del tomate. En este sentido, un aumento de estos metabolitos inducido por algún tipo de estrés correspondería a un incremento en la capacidad antioxidante del fruto. En el **Cuadro 7** 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).

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 eran quercetina y ácido clorogénico. Además, encontraron que algunos compuestos fenólicos individuales están relacionados con la capacidad antioxidante mostrada, entre ellos los ácidos ferúlico y cafeico.

Raffo y col (2002) evaluaron la actividad antioxidante por el método ABTS de las fracciones hidrofílicas y lipofílicas de tomate cherry (cv. Naomi F1). La fracción hidrofílica (ácido ascórbico y compuestos fenólicos) mostró los mayores valores de actividad antioxidante (174-270 µM equivalentes de Trolox/ 100 g de peso fresco) en comparación con la fracción lipofílica (15-36 µM equivalentes de Trolox/ 100 g de peso fresco), la cual a su vez presentó una correlación positiva ($p \leq 0.05$) con la actividad antioxidante.

Cuadro 7. Clasificación de compuestos fenólicos

Número de carbonos	Esqueleto	Clasificación	Estructura básica
7	C_6-C_1	Ácidos fenólicos	
8	C_6-C_2	Acetofenonas	
8	C_6-C_2	Ácido fenilacético	
9	C_6-C_3	Ácidos hidroxicinámicos	
9	C_6-C_3	Cumarinas	
10	C_6-C_4	Naftoquinonas	
13	C_6-C_1-C_6	Xantonas	
14	C_6-C_2-C_6	Estilbenos	
15	C_6-C_3-C_6	Flavonoides	

Fuente: Crozier (2006)

Sin embargo, de los componentes de la fracción hidrosoluble solamente el ácido cafeico mostró una correlación significativa ($r = 0.933$, $p \leq 0.05$) con la actividad antioxidante, lo que sugiere que la actividad antioxidante total depende también de los efectos sinérgicos entre todos los antioxidantes solubles en agua y su interacción con otros componentes de la fracción.

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 ($p < 0.01$) con el contenido de fenólicos totales (FRAP $r = 0.92$, DPPH $r = 0.94$) y flavonoides totales (FRAP $r = 0.96$, DPPH $r = 0.95$).

Gómez y col (2009) evaluaron la actividad antioxidante por el método DPPH en tomate Micro-Tom almacenado en condiciones óptimas y en condiciones de daño por frío; para frutos en estado rompiente concluyeron que los cambios en actividad antioxidante y contenido de fenólicos en las diferentes fracciones obtenidas están relacionados, y que los fenólicos contribuyen considerablemente a la actividad antioxidante de tomate Micro-Tom. Resultados similares fueron obtenidos por Toor y

Savage (2005), en frutos de tomate cv. Excell, Tradiro y Flavourine; el 92% de la actividad antioxidante total en los tomates corresponde a la fracción soluble, la cual puede atribuirse en un 62-72% a compuestos fenólicos solubles.

En este contexto resulta interesante establecer los cambios en perfiles metabólicos, y específicamente en fenólicos, y en la actividad antioxidante de frutos de tomate cultivar Imperial almacenados a temperatura de daño por frío durante diferentes periodos. Esto permitirá mejorar el entendimiento de la respuesta metabólica del fruto de tomate al estrés y para el desarrollo futuro de mejores estrategias de manejo poscosecha.

IV. JUSTIFICACIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes en el mundo y como la mayoría de los frutos subtropicales es susceptible de daño por frío (DF). El DF se presenta cuando el fruto se expone a temperaturas inferiores a los 12 °C durante su manejo poscosecha. La aplicación de tratamiento hidrotérmico (TH) en el fruto de tomate reduce los síntomas de DF y mantiene su calidad.

A la fecha no existen reportes sobre la variación de metabolitos relacionados con la tolerancia al DF inducida por TH en frutos de tomate cv. Imperial, un genotipo de gran importancia económica en el estado de Sinaloa. Por ello, en el presente estudio se planteó identificar los metabolitos asociados con la tolerancia inducida al DF en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Imperial) tratados hidrotérmicamente antes de ser sometidos a temperaturas de DF (5 °C). Los resultados obtenidos contribuyen al entendimiento de los mecanismos implicados en la tolerancia al DF inducida por el TH.

V. HIPÓTESIS

El tratamiento hidrotérmico en fruto de tomate induce cambios en metabolitos específicos que están asociados a una mayor tolerancia al daño por frío.

VI. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Identificar metabolitos asociados con la tolerancia inducida al daño por frío mediante tratamiento hidrotérmico en tomate cv. Imperial (*Solanum lycopersicum* L.).

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el efecto del tratamiento hidrotérmico y del almacenamiento a temperatura de daño por frío de frutos de tomate cv. Imperial sobre su contenido y perfil de metabolitos.
- Identificar los principales metabolitos asociados con la tolerancia al daño por frío inducida por el tratamiento hidrotérmico de frutos de tomate.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y su relación con los metabolitos y tolerancia al daño por frío.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó pericarpio congelado (-70 °C) de frutos de tomate cv. Imperial que previamente fueron almacenados a temperatura de daño por frío (DF) (5 °C) de 0 a 20 días, seguido de un periodo de maduración a 21 °C por 7 días. La mitad de los frutos recibieron un tratamiento hidrotérmico (TH) (42 °C, 5 min) previo al almacenamiento en frío, mientras que la otra mitad sin tratamiento se utilizó como control.

B. MÉTODOS

1. Preparación del extracto metanólico

La extracción de los metabolitos se realizó siguiendo la metodología reportada por Gómez-Romero y col (2007) con algunas modificaciones. Se pesaron 500 mg de tejido liofilizado y se mezclaron con 5 mL de metanol, la mezcla se agitó con un vórtex durante 10 s, posteriormente se sonicó durante 15 min a 25 °C, seguido de una centrifugación a 10,000 *g* por 15 min; el sobrenadante se recuperó y se transfirió a un vial ámbar. Esta extracción se realizó por triplicado hasta un volumen aproximado de 15 mL. El disolvente se eliminó al vacío (40 °C) con un evaporador rotatorio (BÜCHI Labortechnick AG, Suiza) y el extracto obtenido se resuspendió en 2 mL de metanol, se sonicó por 5 min y finalmente se mezcló vigorosamente por 5 min utilizando un vórtex. El extracto se pasó por un filtro de 0.45 µM.

2. Contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de polifenoles totales se midió utilizando la metodología de Singleton y col (1999). El extracto (24 µL) se mezcló con 220 µL del reactivo de Folin-Ciocalteau y se dejó reposar 3 min, se le añadieron 60 µL de carbonato de sodio al 7% (p/v) y se mezcló cuidadosamente, se dejó incubar a 40 °C por 30 min y se determinó la absorbancia a 750 nm. La cuantificación se basó en una curva estándar de ácido gálico (AG) (1.18-250 µg AG/mL). Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de AG por 100 gramos de muestra en base húmeda (mg EAG/100 g b.h.)

3. Perfil de metabolitos

a. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (EM)

La separación de metabolitos se realizó siguiendo la metodología reportada por Gómez-Romero y col (2010) utilizando un equipo HPLC modelo Accela con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Se inyectó una alícuota de 10 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 un 40% de A y 60% de B al minuto 40. Finalmente, la columna fue equilibrada con 100% del solvente A durante 5 min, el tiempo total de corrida fue de 45 min. La

detección se realizó a 280, 320 y 350 nm. Se utilizaron como estándares internos ácido protocatecuico y daidzeína.

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó empleando curvas de calibración obtenidas por inyección de concentraciones conocidas de estándares comerciales de los ácidos cafeico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico y clorogénico para ácidos fenólicos; así como de rutina, quercetina, kaempferol y naringenina para flavonoides. Los resultados fueron expresados como mg/100 g b.h. En el caso de alcaloides, sus niveles se expresaron como valores relativos con respecto al control al día cero de almacenamiento en frío.

El cromatógrafo de líquidos se acopló a un espectrómetro de masas de trampa de iones lineal LTQ-XL (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Los metabolitos se identificaron siguiendo la metodología reportada por Gómez-Romero y col (2010) utilizando una fuente de ionización por electroasperjado (ESI) 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) en modo de escaneo completo utilizando una relación *m/z* de 110 hasta 2000. Este análisis permitió conocer el peso molecular y fragmentos generados de los compuestos, información que se usó para su identificación.

b. Análisis por cromatografía de gases (CG) y espectrometría de masas (EM)

Los extractos metanolicos se derivatizarón siguiendo la metodología reportada por Wang y Zuo (2011) con algunas modificaciones. Una alícuota de 50 µL del extracto

metanólico se mezcló con los agentes derivatizantes, 50 µL de piridina y 50 µL de BSTFA + 1% TMSCl. Al tubo con la mezcla se le evacuó el oxígeno con una corriente de N_2 (g). La reacción de derivatización se llevó a cabo a 70 °C durante 2 h. La mezcla derivatizada se analizó mediante un cromatógrafo de gases HP6890 acoplado con un espectrómetro de masas 5973N (Agilent Technologies, EUA). Los compuestos se separaron en una columna capilar QUADREX 007 CARBOWAX 20M (30 m x 0.25 mm i.d., espesor de película 0.25um). La separación se realizó con un gradiente de temperatura: 60 °C durante 1 min, 5 °C/min hasta 200 °C y posteriormente 10 °C/min hasta 275 °C, permaneciendo asi por el resto del análisis. La temperatura de inyección se fijó en 250 °C mientras que la interface se fijó en 300 °C. El gas acarreador fue helio a un flujo de 0.9 mL/min.

La EM se hizo funcionar en el modo de ionización por impacto de electrones (IE) con energía electrónica de 70 eV. Los componentes se identificaron por comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST espectros de masas (NIST08.LIB) y la cantidad relativa de cada componente se determinó dividiendo el área de su pico entre el área del pico del ácido palmítico que no presentó cambios significativos durante el almacenamiento.

4. Actividad antioxidante

a. Método ABTS

El $ABTS^{\bullet+}$ (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 $ABTS^{\bullet+}$ es un cromóforo que tiene las máximas absorbancias a longitudes de onda de 645, 734 y 815 nm. El método cuantifica la decoloración del $ABTS^{\bullet+}$ debida a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones (Re y col 1999); y los resultados se expresan como porcentaje de inactivación del radical. El ensayo de actividad antioxidante se realizó mediante una adecuación en microplaca del método de Re y col (1999). El radical $ABTS^{\bullet+}$ se generó mezclando 5 mL de una disolución de ABTS (7 mM en agua desionizada) y 5 mL de persulfato de potasio (2.45 mM). La mezcla se mantuvo en oscuridad y en reposo durante 16 h a temperatura ambiente. La disolución de $ABTS^{\bullet+}$ fue diluida con PBS (pH 7.4, 10 mM) hasta obtener un valor de absorbancia de 0.70 (± 0.02) a 734 nm.

Para el ensayo se mezclaron 292.5 µl de la disolución de $ABTS^{\bullet+}$ con 7.5 µl de muestra. Como blanco se utilizó una mezcla de 7.5 µL de metanol y 292.5 µL de disolución de $ABTS^{\bullet+}$. La lectura de la absorbancia se ajustó a cero con 300 µL de PBS. Las microplacas fueron incubadas en una estufa a 37 °C durante 10 min para posteriormente tomar lectura de la absorbancia a 655 nm usando un lector de microplacas 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Los resultados fueron comparados con una curva estándar de Trolox y se expresaron como equivalentes de Trolox (µmol ET/ 100 g b.h.). El porcentaje de inhibición se obtuvo con la siguiente fórmula: $[(Abs_{blanco} – Abs_{muestra})/Abs_{blanco}] \times 100$.

b. Método DPPH

La evaluación se realizó de acuerdo al método propuesto por (Brand-Williams y col 1995) con pequeñas modificaciones. El compuesto 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) es un radical estable. La deslocalización del electrón del DPPH le confiere a la solución un color azul-violeta intenso. El DPPH en solución al reaccionar con una sustancia capaz de donar un átomo de hidrógeno o un electrón es reducido y presenta un color amarillo pálido. El ensayo se realizó en microplaca en la cual se mezclaron 280 µL del radical DPPH (150 mM en metanol) y 20 µL de muestra. Como blanco se utilizó una mezcla de 20 µL de metanol y 280 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 540 nm usando un lector de microplacas 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Los resultados se compararon con una curva estándar de Trolox y se expresaron como µmol ET/ 100 g b.h. El porcentaje de inhibición se obtuvo con la siguiente fórmula: $[(Abs_{blanco} – Abs_{muestra})/Abs_{blanco}] \times 100$.

5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de dos factores: tratamiento poscosecha (Control, TH) y condiciones de almacenamiento en frío (0 y 20 días) más maduración (7 días). Se realizó una comparación de medias entre los tratamientos utilizando la prueba de Fisher (LSD) con un α= 0.05. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico Design Expert 10.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. EFECTO DEL TRATAMIENTO HIDROTÉRMICO (TH) Y EL ALMACENAMIENTO EN FRÍO SOBRE EL CONTENIDO Y PERFIL DE METABOLITOS EN FRUTOS DE TOMATE

1. Fenólicos Totales

El contenido de fenólicos totales de los frutos control y con TH almacenados a baja temperatura (5 °C) se muestra en la **Figura 2**. El valor obtenido para el control al día 0 fue de 128 mg EAG/100 g, el cual cae dentro del rango de valores reportados en otros cultivares comerciales como Comprido (85 mg EAG/100 g) y Batateiro (294.2 mg EAG/100 g) (Barros y col 2012). Los frutos almacenados por 20 días 5 °C presentaron un aumento significativo de los fenólicos totales, comparado con el contenido de frutos del día 0 (control y TH). Estudios previos en plantas de tomate han mostrado que el estrés por calor y frío inducen la producción de fenólicos (Rivero y col 2001). Probablemente, el estrés incrementa la expresión de la fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave en la síntesis de fenólicos. Gómez y col (2009) registraron resultados similares encontrando que frutos de tomate cv. Micro-Tom almacenados a 6 °C por 20 días incrementaron su contenido de fenólicos totales.

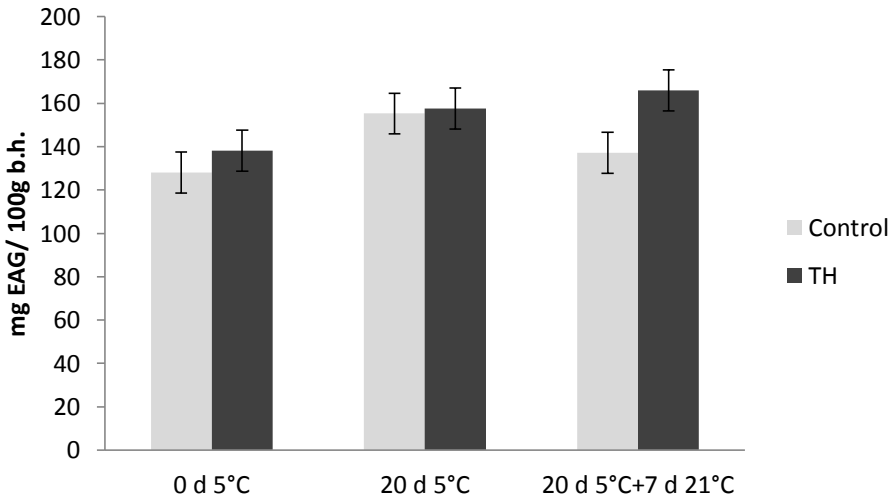


Figura 2. Efecto del tratamiento hidrotérmico sobre el contenido de fenólicos totales en frutos de tomate durante el almacenamiento a 5 °C y maduración a 21 °C. Los valores son la media de tres réplicas y las barras indican LSD=18.91 mg EAG/ 100 g b.h.

En los frutos sometidos a DF y maduración (20+7) (**Figura 2**), los fenólicos totales de los frutos control disminuyeron ligeramente ($p>0.05$) con respecto a los que sólo se sometieron a 5 °C por 20 días. Esta disminución podría deberse a la pérdida de la integridad de la membrana vacuolar y/o disminución de su síntesis debido al estrés por frío. En relación con los frutos sometidos a TH, éstos presentaron mayor contenido de fenólicos que los frutos control ($p<0.05$) (**Figura 2**). Este comportamiento sugiere que el TH indujo una mayor síntesis de compuestos fenólicos y corresponde con lo reportado por otros autores, quienes consideran a la PAL como una enzima clave para la aclimatación celular contra el estrés térmico en las plantas (Bharti y col 1997; Dixon y col 1995; Chen y col 2008). Asimismo, indica que el fruto llegó a esta etapa de maduración sin daños considerables por el frío, manteniendo la integridad de las membranas de cloroplastos, así como de vacuolas, favoreciendo la maduración regular del fruto y aumento en la síntesis de fenólicos. Un aumento en los fenólicos totales podría indicar que la actividad antioxidante del fruto aumenta, lo cual sería clave para contrarrestar de mejor manera el estrés oxidativo generado por el estrés al que está sometido el fruto. Como se mostrará más adelante, se encontró una correlación significativa entre el contenido de fenólicos totales y la actividad antioxidante *in vitro* evaluada por dos métodos.

2. Separación e identificación de compuestos fenólicos por HPLC-DAD-EM

En la **Figura 3** se muestra un cromatograma típico del extracto del fruto de tomate. De los 26 picos numerados, 20 correspondieron a compuestos fenólicos (7 flavonoides y 13 ácidos fenólicos) y 6 corresponden a compuestos alcaloides. Los compuestos fueron identificados por comparación con su estándar comercial, tiempo de retención, espectro UV y por la fragmentación generada en el análisis con espectrometría de masas (MS).

La literatura registra que flavonas y flavonoles presentan dos principales picos de absorción en la región de 200 y 400 nm. Éstos son referidos comúnmente como banda I (300-380 nm), la cual está asociada con la absorción atribuida al anillo B del sistema cinamoilo, y banda II (240-280 nm), atribuida a la absorción del sistema A del anillo benzoilo (**Figura 4**)**.** 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-Garcia y col 2009), lo cual coincide con algunos de los componentes de los extractos metanólicos.

Los compuestos 2 y 5 presentaron el mismo ión molecular *m/z* 341 y un patrón de fragmentación similar, caracterizado por la pérdida de un hexósido (162 Da) y generando un pico base de *m/z* 179 que corresponde a la masa molecular del ácido cafeico y otros dos fragmentos con *m/z* 161 [ácido cafeico–H–H_2O]$^-$ y *m/z* 135 [ácido cafeico–H–CO_2]$^-$. El patrón de fragmentación corresponde al reportado por Vallverdú-Queralt y col (2011) y los compuestos fueron identificados como cafeoil hexosa I y II.

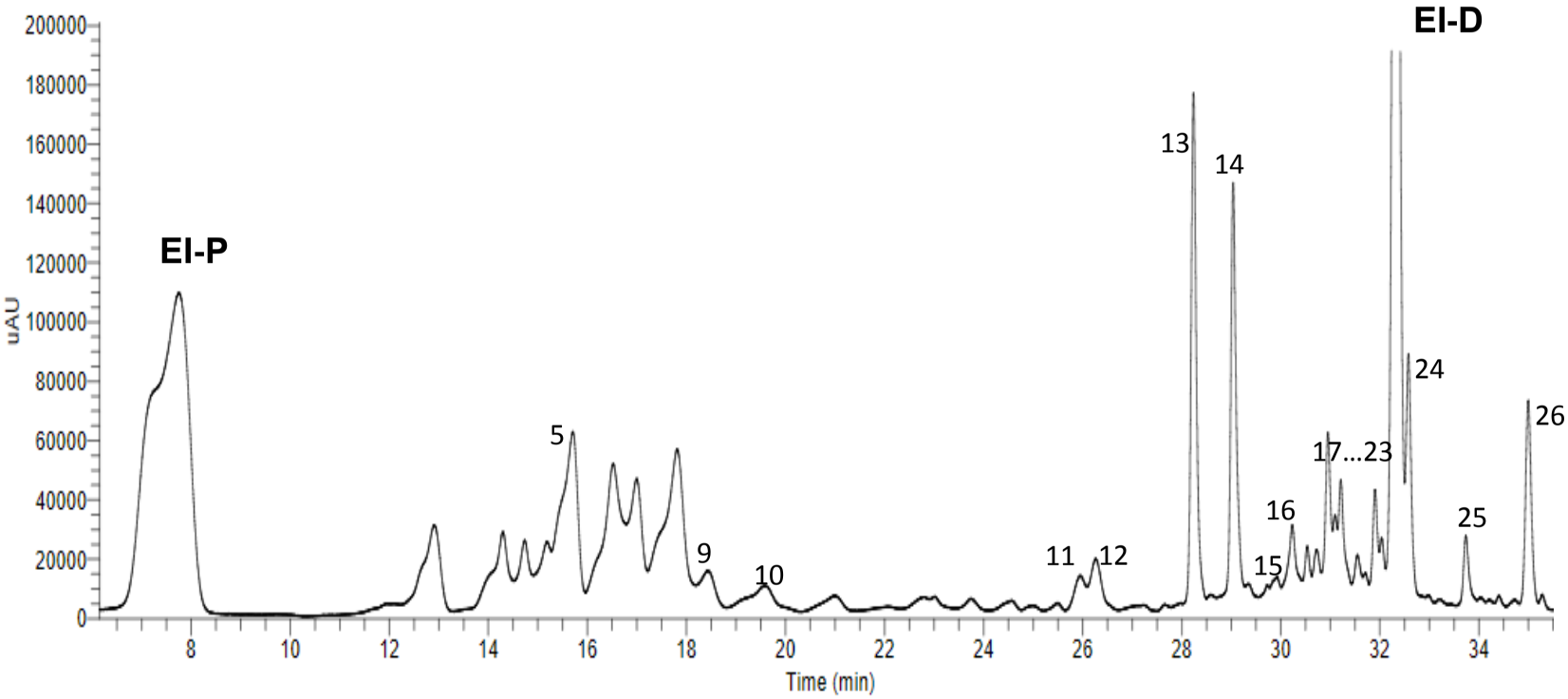
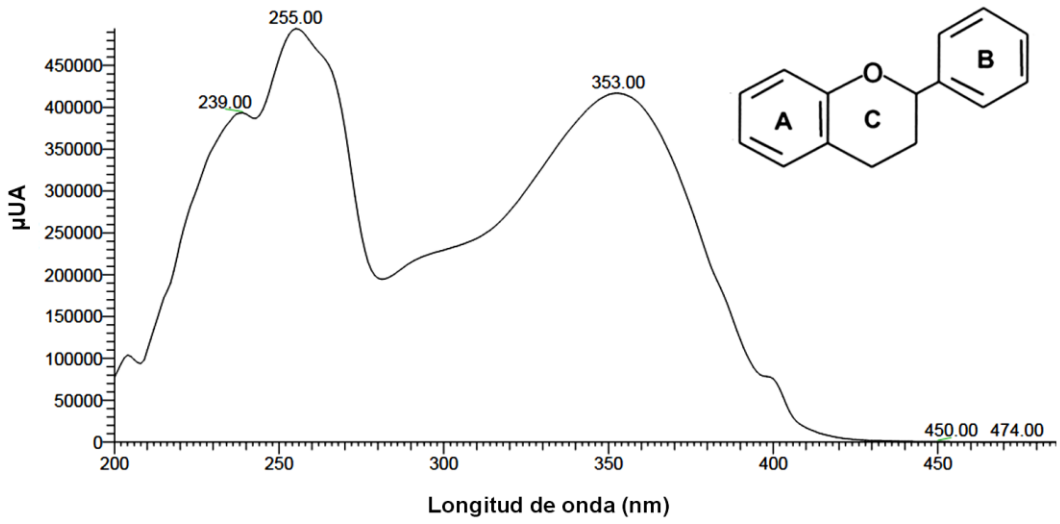


Figura 3. Cromatograma del HPLC típico de los extractos metanólicos de tomate cv. Imperial. Estándar interno protocatecuico (EI-P), estándar interno daidzeina (EI-D). La identidad de los picos numerados se indica en los Cuadros 8 y 10.

A



B

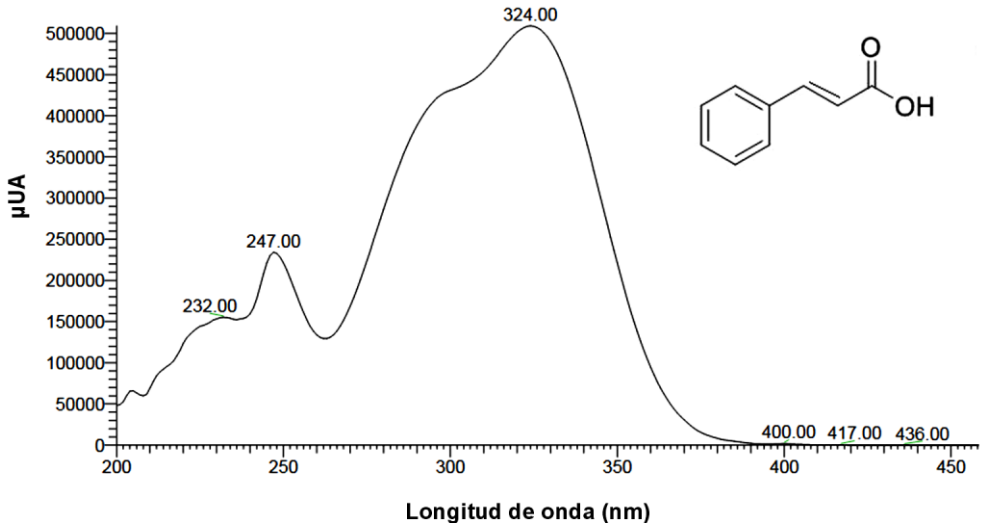


Figura 4. Espectro UV-visible característico de flavonoides **(A)** y ácidos fenólicos **(B)** observado en los extractos metanólicos analizados.

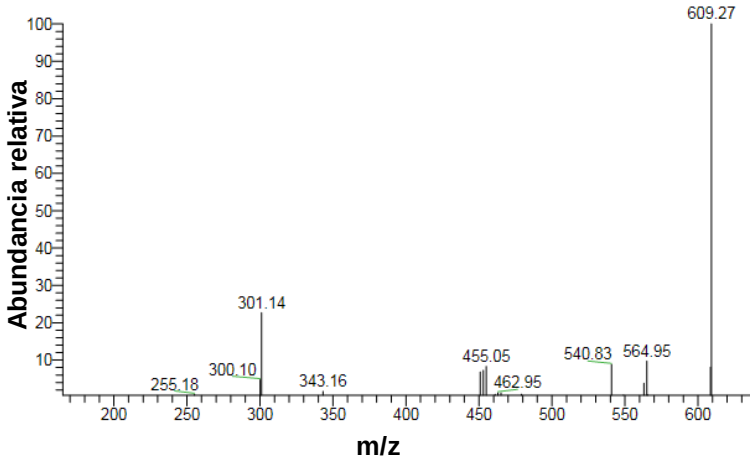
El espectro de masas en modo negativo del pico 8 mostró el ión molecular *m/z* 353 $[M–H]^–$, cuyo MS^2 generó un ión *m/z* 191 que corresponde al ácido quínico. El compuesto 8 fue identificado como ácido clorogénico, y el peso molecular y patrón de fragmentación corresponde al registrado por Vallverdú-Queralt y col (2011).

El pico 12 presentó un ión molecular *m/z* 741 $[M–H]^–$ del que se derivaron los fragmentos *m/z* 609 y *m/z* 301, debido a la pérdida de pentosilo $[M–H–132]^-$ y rutinosilo $[M–H–132–308]^-$, respectivamente. De esta forma el pico 12 fue identificado como rutina pentósido (quercetín-3-*O*-pentosil-rutinósido) de acuerdo con lo reportado por Barros y col (2012).

El espectro de masas del pico 13 coincide con el del estándar comercial rutina, caracterizado por el ión molecular *m/z* 609 $[M–H]^–$ y su fragmento *m/z* 301 (**Figura 5**). Moco y col (2007), Gomez-Romero y col (2010), Vallverdú-Queralt y col (2011), y Barros y col (2012) observaron previamente la presencia de rutina en diferentes cultivares de tomate, reportando los mismos fragmentos que se observaron en este estudio.

El pico 15 se identificó como ácido dicafeoilquínico por la presencia del ión molecular *m/z* 515 $[M–H]^–$ y del fragmento *m/z* 353 $[M–H–162]^-$, correspondiente a la pérdida de ácido cafeico. Los datos espectrométricos son iguales a los registrados previamente por Vallverdú-Queralt y col (2011). En el **Cuadro 8** se muestra el resumen de la identificación de los compuestos fenólicos.

A



B

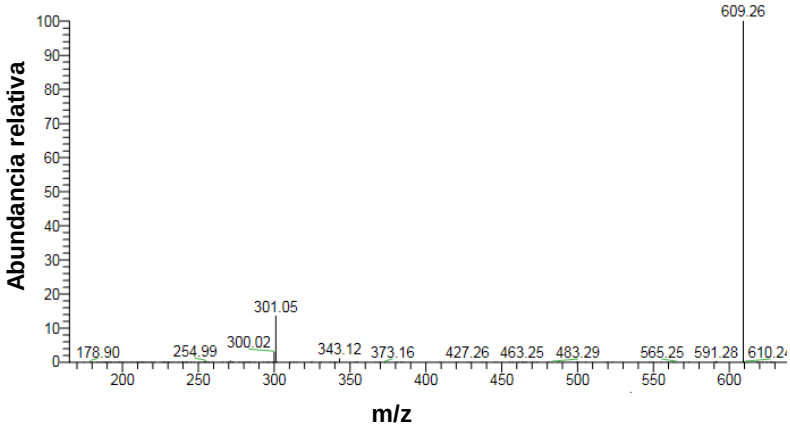


Figura 5. Espectro de masas MS^2 del ión *m/z*= 609 de rutina. (**A)** Muestra y (**B)** Estándar comercial.

Cuadro 8. Identificación por ESI-MS de los principales compuestos fenólicos en extractos metanólicos de tomate

Pico[a]	t_R	UV $\lambda_{máx}$	$[M-H]^-$ m/z	m/z (% Abundancia Relativa)	Identidad Tentativa
1	12.9	274	403	241(75),197(50),179(15),137(7)	Derivado de ácido siríngico hexósido
2	14.3	328	341	179(100), 161(40), 135(40)	Cafeoil hexosa I
3	14.73	256, 268, 280, 352	741	609(80),301(45)	Quercetín-3-rutinósido-7-hexosa
4	15.19	298	325	163(38),119(28)	P-coumároil hexosa II
5	15.7	320	341	179(40), 161(18), 135(16)	Cafeoil hexosa II
6	16.52	326	353	191(100), 179(36), 173(15), 161(21), 135(16)	Ácido 5-cafeoilquínico
7	16.99	245,289	341	179(100)	Ác. cafeico
8	17.81	324	353	179(46), 135(19)	Ác. clorogénico
9	18.43	324	353	193(65), 175(60), 161(17), 135(19)	Feruloil hexosa I
11	25.95	-----	416	398((85),273(38),255(44)	Ácido siríngico hexósido
12	26.26	274	359	197(75), 153(50), 135(15)	Feruoil tiramina
13	28.24	255,352	741	609(90), 301(18)	Rutína pentósido
14	29.04	255,352	609	609(100)	Rutina
15	30.23	255,353	593	609(70), 301(50)	Kaempferol 3-*O*-rutinósido
17	30.73	267, 326	515	515(100), 353(90), 191(40), 179(65)	Dicafeoilquínico II
20	31.21	255,352	887	300(15)	Quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa
23	31.9	-----	677	677(100), 515(15), 353(10), 173(10)	Tricafeoilquínico II
24	32.03	255, 268, 295	887	741(38), 723(30), 300(10), 179(25)	Quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa Ácido p-coumárico
25	33.74	-----	677	677(100), 515(90), 353,(50) 191(15)	Tricafeoilquínico I
26	34.99	308, 366	271	---	Naringenina chalcona

[a] El número de pico asignado corresponde al orden de elución; NI: No identificado; *Identificación confirmada con estándares comerciales.

3. Contenido de compuestos fenólicos

La cuantificación de los compuestos fenólicos para los cuales no se tuvo estándar se realizó empleando curvas de calibración de estándares con estructura similar (**Figura 6**). Cafeoil hexosa I y II fueron cuantificados como equivalentes de ácido cafeico, los ácidos fenólicos como equivalentes de ácidos siríngico, ferúlico, *p*-cumárico y clorogénico, mientras que los flavonoides se expresaron como equivalentes de rutina, quercetina, kaempferol y naringenina.

Cabe mencionar que en la literatura no se encontró información de la concentración de estos compuestos bajo condiciones similares a las del presente estudio, por lo que la comparación se realizó entre frutos control y con TH para observar los cambios que pudo inducir el tratamiento durante el almacenamiento en frío y después de la maduración.

El análisis del día 0 mostró que el TH diminuyó la concentración de algunos metabolitos importantes como rutina y ácido clorogénico, e incrementó el de compuestos derivados del ácido cafeico como la cafeoil hexosa I y el ácido 5-cafeoilquínico (**Cuadro 9**). Estos cambios podrían deberse a la conversión de rutina y ácido clorogénico a sus derivados, los cuales podrían ser más estables bajo el estrés. El ácido clorogénico fue el más abundante en los frutos control y presentó el valor más alto al día 0 (4.281 mg/ 100 g b.h.), valor superior a lo reportado por Zanfini y col (2017) en cinco cultivares de tomate (0.886-1.754 mg/ 100 g b.h.). Gomez y col (2009) también observaron que la mayor concentración de ácido clorogénico se presenta en la etapa temprana de maduración.

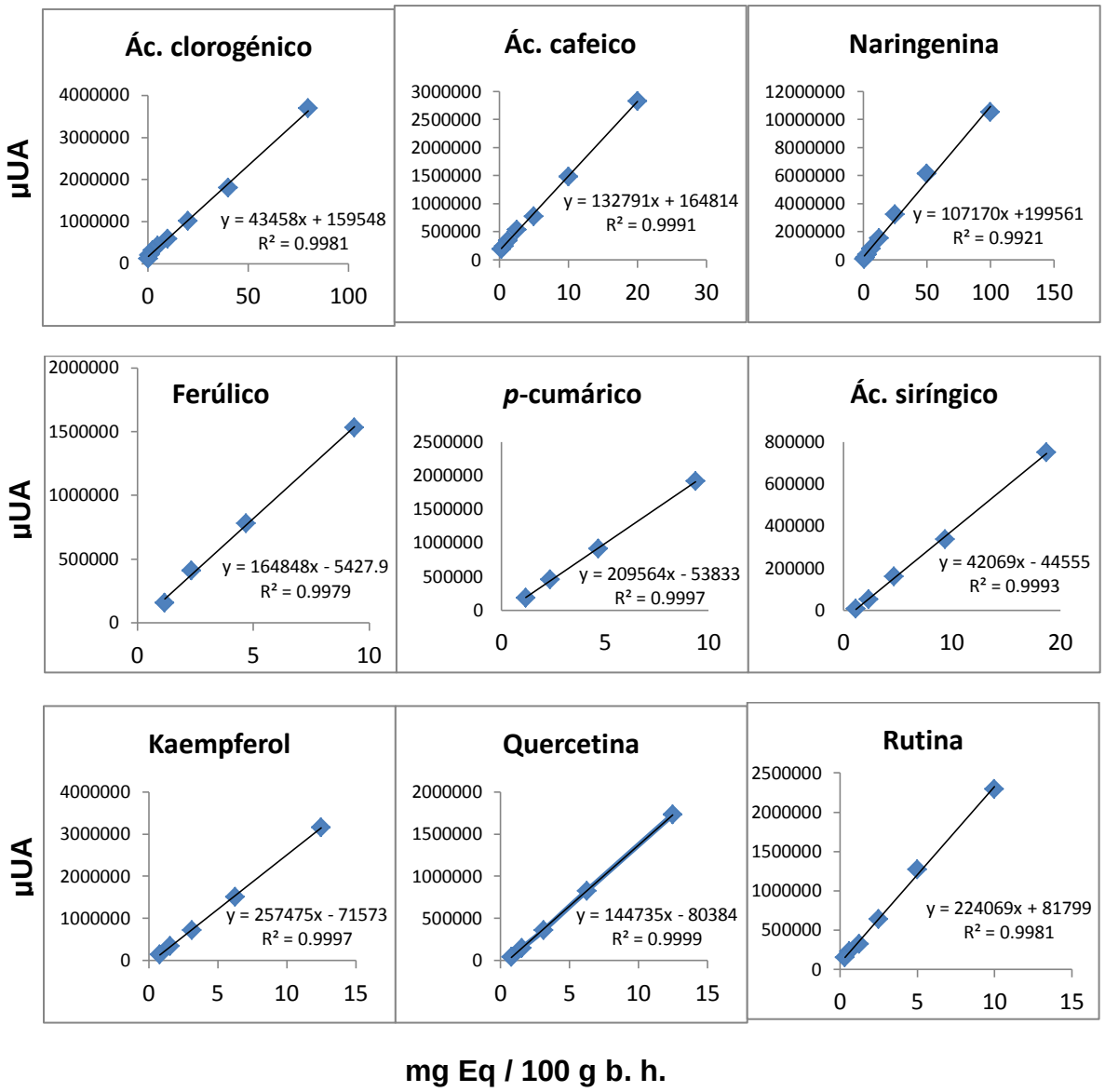


Figura 6. Curvas de calibración de estándares utilizadas en la cuantificación de compuestos fenólicos.

Cuadro 9. Contenido de compuestos fenólicos en frutos de tomate control (C) y con tratamiento hidrotérmico (TH)[1]

Pico[2]	Identidad	Trat	Días a 5°C /días de maduración (21°C)		
			0/0	20/0	20/7
1	Derivado de ácido siríngico hexósido	TH	1.53 ± 0.12^{aA}	1.17 ± 0.02^{aC}	1.34 ± 0.12^{aB}
		C	1.25 ± 0.09^{bA}	0.80 ± 0.06^{bC}	1.10 ± 0.05^{bB}
2	Cafeoil hexosa I	TH	0.44 ± 0.04^{aB}	0.09 ± 0.01^{bC}	0.50 ± 0.02^{aA}
		C	0.13 ± 0.01^{bC}	0.22 ± 0.02^{aA}	0.18 ± 0.01^{bB}
3	Quercetín-3-rut-7-hexósido (Rutin-hex)	TH	0.29 ± 0.01^{aC}	0.22 ± 0.01^{aB}	0.42 ± 0.02^{aA}
		C	0.29 ± 0.02^{aA}	0.23 ± 0.01^{aB}	0.26 ± 0.01^{bC}
4	*p*-Coumaroil hexosa II	TH	0.12 ± 0.01^{bC}	0.15 ± 0.01^{bB}	0.31 ± 0.02^{aA}
		C	0.15 ± 0.01^{aC}	0.18 ± 0.01^{aB}	0.21 ± 0.01^{bA}
5	Cafeoil hexosa II	TH	0.15 ± 0.01^{aC}	0.19 ± 0.02^{bB}	0.29 ± 0.01^{aA}
		C	0.14 ± 0.01^{aB}	0.28 ± 0.01^{aA}	0.29 ± 0.02^{aA}
6	Ácido 5-cafeoilquínico	TH	1.18 ± 0.15^{aA}	0.58 ± 0.04^{bB}	1.17 ± 0.03^{aA}
		C	0.66 ± 0.12^{bB}	0.78 ± 0.02^{aB}	0.94 ± 0.01^{bA}
7	Ác. cafeico	TH	0.32 ± 0.02^{aB}	0.25 ± 0.01^{bC}	0.44 ± 0.05^{aA}
		C	0.32 ± 0.05^{aB}	0.48 ± 0.01^{aA}	0.31 ± 0.02^{bB}
8	Ác. clorogénico	TH	1.74 ± 0.04^{bA}	0.87 ± 0.05^{aB}	1.56 ± 0.10^{aA}
		C	4.28 ± 0.03^{aA}	0.78 ± 0.06^{aB}	0.86 ± 0.06^{bB}
9	Feruloil hexosa I	TH	0.06 ± 0.01^{bC}	0.09 ± 0.01^{aB}	0.24 ± 0.03^{aA}
		C	0.13 ± 0.01^{aB}	0.01 ± 0.01^{aC}	0.16 ± 0.01^{bA}
11	Ácido siríngico hexósido	TH	0.27 ± 0.02^{bB}	0.34 ± 0.02^{aA}	ND^{aC}
		C	0.37 ± 0.02^{aA}	0.34 ± 0.03^{aA}	ND^{aB}
12	Feruloil tiramina	TH	0.08 ± 0.01^{aB}	0.08 ± 0.01^{aB}	0.32 ± 0.02^{aA}
		C	0.08 ± 0.01^{aB}	0.10 ± 0.01^{aB}	0.28 ± 0.03^{bA}
13	Rutína pentósido	TH	0.11 ± 0.01^{aC}	0.32 ± 0.02^{aA}	0.24 ± 0.01^{aB}
		C	0.12 ± 0.01^{aC}	0.31 ± 0.01^{aA}	0.20 ± 0.02^{aB}
14	Rutina	TH	0.08 ± 0.01^{bB}	0.24 ± 0.01^{2aA}	0.26 ± 0.02^{aA}
		C	0.14 ± 0.01^{aAB}	0.15 ± 0.01^{bB}	0.13 ± 0.01^{bAB}
15	Kaempferol-3-*O*-rutinósido	TH	0.07 ± 0.01^{bCB}	0.08 ± 0.01^{bB}	0.20 ± 0.02^{aA}
		C	0.09 ± 0.01^{aB}	0.10 ± 0.01^{aB}	0.18 ± 0.01^{bA}
17	Dicafeoilquínico II	TH	ND^{bC}	0.05 ± 0.02^{bB}	0.17 ± 0.01^{aA}
		C	0.15 ± 0.01^{aA}	0.09 ± 0.01^{aB}	0.10 ± 0.01^{bB}
20	Quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa	TH	0.17 ± 0.01^{aB}	0.18 ± 0.01^{bB}	0.29 ± 0.01^{aA}
		C	0.18 ± 0.01^{aB}	0.22 ± 0.01^{aA}	0.22 ± 0.02^{bA}
23	Tricafeoilquínico II	TH	ND^{aC}	0.10 ± 0.01^{aB}	0.57 ± 0.05^{bA}
		C	ND^{aC}	0.11 ± 0.03^{aB}	0.75 ± 0.03^{aA}
24	Quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa-ácido p-coumárico	TH	0.09 ± 0.01^{bC}	0.11 ± 0.01^{bB}	0.14 ± 0.01^{aA}
		C	0.10 ± 0.01^{aB}	0.12 ± 0.01^{aA}	ND^{bC}
25	Tricafeoilquínico I	TH	ND^{aC}	0.03 ± 0.01^{bB}	0.08 ± 0.01^{bA}
		C	ND^{aC}	0.11 ± 0.01^{aB}	0.26 ± 0.02^{aA}
26	Naringenín chalcona	TH	0.29 ± 0.02^{aC}	0.36 ± 0.02^{bB}	0.97 ± 0.06^{aA}
		C	0.28 ± 0.01^{aB}	0.91 ± 0.06^{aA}	0.92 ± 0.01^{aA}

[1]Los valores están expresados en mg/100 g b.h. y son la media de tres réplicas. ND: No detectado. Para cada compuesto letras mayúsculas distintas en un renglón indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre días de almacenamiento y letras minúsculas distintas en un mismo dia significan diferencia significativa entre tratamientos ($p<0.05$). [2]El número de pico asignado corresponde al orden de elución del equipo de HPLC (Figura 3).

Los frutos sometidos a DF (20 días 5 °C) presentaron menores concentraciones de algunos compuestos fenolicos como el ácido cafeico y de sus derivados cafeoil hexosa I y II; así como de la flavanona naringenín chalcona; mientras que aumentaron los niveles de rutina y del ácido siríngico hexósido (**Cuadro 9**).

Los frutos tratados con DF y madurados (20 + 7) incrementaron su contenido para la mayoría de los analitos identificados, resaltando el ácido clorogénico y algunos isómeros como el ácido 5-cafeoilquínico, así como el ácido cafeico y rutina. Estos metabolitos han mostrado actividad antioxidante y podrían participar en la eliminación de radicales libres generados en la etapa de maduración. El ácido cafeico mostró la mayor concentración después de la maduración (0.439 mg/ 100 g b.h.). Gautier y col 2008 observaron que este metabolito y sus derivados alcanzaron niveles máximos en tomates rojos maduros. El valor reportado encontrado en el presente estudio es superior al reportado por Zanfini y col (2017) en cinco variedades comerciales de tomate (0.001-0.132 mg/100 g b.h.).

Además de los compuestos fenólicos, el análisis por HPLC-DAD-MS (**Figura 3**) también identificó seis compuestos alcaloides en los frutos de tomate (**Cuadro 10**), aunque presentaron pocos cambios en respuesta al TH y al almacenamiento en frío.

Cuadro 10. Contenido relativo de alcaloides en fruto de tomate cv. Imperial sometido a tratamiento hidrotérmico (TH) y condiciones de daño por frío[1]

Pico[2]	t_R	UV $\lambda_{máx}$	$[M-H]^-$	Nombre	Trat	Días 5°C /días maduración (21°C)		
						0/0	20/0	20/7
10	19.58	(201, 317)	1078.54	Alfa-Tomatina FA	TH	0.75 ± 0.14^{bB}	0.69 ± 0.08^{aB}	1.20 ± 0.16^{aA}
					C	1.00 ± 0.00^{aA}	0.63 ± 0.08^{aB}	0.96 ± 0.09^{bA}
16	30.53	(206, 363)	1032	Dehidrolicoperósido G	TH	1.02 ± 0.33^{aB}	0.87 ± 0.16^{aB}	1.60 ± 0.17^{aA}
					C	1.00 ± 0.00^{aA}	0.98 ± 0.16^{aA}	1.04 ± 0.08^{bA}
18	30.95	(222,251)	1136.54	(Licoperósido A) FA	TH	0.44 ± 0.02^{bB}	0.72 ± 0.11^{aA}	0.69 ± 0.10^{aA}
					C	1.00 ± 0.00^{aA}	0.61 ± 0.10^{aB}	0.70 ± 0.03^{aB}
19	31.1	(210, 324)	1314.59	(Licoperósido F) FA	TH	0.38 ± 0.12^{bC}	0.63 ± 0.11^{aB}	0.96 ± 0.10^{aA}
					C	1.00 ± 0.00^{aA}	0.66 ± 0.02^{aB}	0.68 ± 0.14^{bB}
21	31.55	(213, 383)	1076.53	Dehidroxitomatina	TH	0.53 ± 0.18^{bA}	0.50 ± 0.13^{aA}	0.69 ± 0.12^{aA}
					C	1.00 ± 0.00^{aA}	0.64 ± 0.11^{aB}	0.78 ± 0.15^{aA}
22	31.7	(209, 383)	1108.55	Hidroxi-licoperósido A	TH	0.98 ± 0.68^{aA}	0.93 ± 0.52^{aA}	ND^{aB}
					C	1.00 ± 0.00^{aA}	1.13 ± 0.61^{aA}	ND^{aB}

[1]Valores relativos al fruto control en el día 0. Los valores son la media de tres réplicas. ND: No detectado. Para cada compuesto letras mayúsculas distintas en un renglón indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre días de almacenamiento y letras minúsculas distintas en un mismo día significan diferencia significativa entre tratamientos ($p<0.05$). [2]El número de pico asignado corresponde al orden de elución del equipo de HPLC (Figura 3).

a. Efecto del almacenamiento en frío sobre el perfil de fenólicos

El análisis comparativo entre el perfil de metabolitos de los frutos control al día 0 y después de 20 días a 5 °C reveló que cinco compuestos no variaron significativamente, seis disminuyeron y nueve aumentaron durante el estrés por frío. Los metabolitos que disminuyeron durante el almacenamiento en frío fueron un ácido siríngico hexósido, quercetín-3-rut-7-hexósido, *p*-coumaroil hexosa II, ácido clorogénico, feruloil hexosa I y dicafeoilquínico II. Gómez y col (2008) reportaron de manera similar que el ácido clorogénico disminuyó conforme el fruto de tomate cv. Micro-Tom fue almacenado a bajas temperaturas (6 °C/27 días). Este comportamiento podría deberse a que este metabolito, así como feruloil hexosa I y *p*-coumaroil hexosa II son precursores en la síntesis de compuestos capaces de proteger al fruto del estrés. En ese sentido, Van der Rest y col (2006) propusieron al ácido clorogénico como una forma de almacenamiento para usarse como precursor, cuando se requiera, para la síntesis de lignina u otros compuestos fenólicos importantes en la protección del fruto.

Los metabolitos que aumentaron durante el frío fueron cafeoil hexosa I, cafeoil hexosa II, ácido cafeico, rutina pentósido, quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa, quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa, ácido *p*-coumárico, naringenín chalcona, tricafeoilquínico II y tricafeoilquínico I. Este aumento podría deberse a que estos compuestos son potentes antioxidantes capaces de contrarrestar los radicales que se pudieran estar generando por el estrés inducido por el frío.

Moore y col (2005) propusieron que algunos compuestos fenólicos como el ácido 3,4,5 tri-*O*-galoilquínico protegían las membranas contra la desecación por frío, intercalándose en la bicapa lipídica y produciendo una reducción de la temperatura de transición entre las fases cristalina líquida y gel de la membrana (Tm). El ácido tricafeoilquínico encontrado en el presente estudio tiene similtud estructural con el ácido 3,4,5 tri-*O*-galoilquínico y podría estar realizando una función similar. Por otro lado, el ácido cafeico y sus derivados han sido reportados como potentes captadores de radicales libres que inician la peroxidación lipídica, por lo que en conjunto con otros compuestos fenólicos podría estar contribuyendo de manera directa a inducir tolerancia al daño por frío.

Los cinco metabolitos cuyos niveles se mantuvieron sin variaciones significativas durante el estrés por frío son ácido 5-cafeoilquinico, ácido siríngico hexósido, feruloil tiramina, rutina y kaempferol 3-*O*-rutinósido, los cuales al parecer no son susceptibles a cambios ambientales y también se mantienen estables conforme avanza la maduración.

Después del periodo de almacenamiento en frío y maduración (20 + 7), el análisis del contenido de metabolitos mostró que 9 aumentaron, 5 disminuyeron, y 6 se mantuvieron estables. Tsantili y col (2010) estudiaron melocotón almacenado a 6 °C por 28 días y una etapa de maduración de 2 días a 21 °C y registraron un aumento significativo en los fenólicos presentes. Antunes y col (2006) sugieren que el aumento en la concentración de algunos metabolitos durante el almacenamiento en frío podría deberse a la pérdida de masa de las frutas.

b. Efecto del tratamiento hidrotérmico sobre el perfil de fenólicos

El TH del fruto (día 0) indujo la disminución en el contenido de 8 fenólicos: *p*-coumaroil hexosa II, ácido clorogénico, feruloil hexosa I, ácido siríngico hexósido, rutina, quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa, ácido *p*-coumárico, kaempferol 3-*O*-rutinósido y dicafeoilquínico II; quizá como consecuencia del efecto del calor. La aplicación de tratamientos térmicos interrumpe la síntesis normal de proteínas y reduce la acumulación de PAL y la síntesis de fenólicos (Vicente y col 2002). Sin embargo, se ha reportado que las proteínas de choque térmico aumentan con el TH en tomate (Salazar-Salas y col 2017) y estas juegan un papel importante en el plegamiento, ensamblaje y degradación de proteínas durante los procesos celulares. Esto nos indicaría que la PAL podría retomar de nuevo su función después del tratamiento térmico debido a la ayuda de las proteínas de choque térmico, iniciando de nueva cuenta la síntesis de compuestos fenólicos necesarios para contrarrestar especies reactivas de oxigeno causantes de la peroxidación de lípidos y lisis celular.

Por otro lado, en respuesta al TH se observó un incremento en ácido 5-cafeoilquínico, cafeoil hexosa I, y un derivado de ácido siríngico hexósido. El aumento de estos compuestos pudiera deberse al hecho de que algunos de sus isómeros disminuyeron, como es el caso del ácido clorogénico, ácido 5-cafeoilquinico y ácido siríngico hexósido, los cuales podrían ser más termosensibles.

Los fenólicos que se mantuvieron estables al TH fueron quercetina-3-rutinósido-7-hexósido, cafeoil hexosa II, ácido cafeico, feruloil tiramina, rutina pentósido, quercetina-hexosa-deoxihexosa pentosa, y naringenín chalcona. La estabilidad de estos compuestos podría reflejar su gran importancia en la célula al contribuir en la

tolerancia a condiciones de estrés, tal es el caso de la quercetina que tiene una función protectora contra el estrés oxidativo mediante la reducción de la lesión oxidativa a las células durante el tratamiento con H_2O_2 (Nijveldt y col 2001). La rutina pentósido es un flavonoide con una fuerte actividad antioxidante (Radhakrishna y col 2011). La actividad antioxidante de los flavonoides puede aumentar la tolerancia al estrés térmico, Teklemariam y Blake (2003) demostraron que plántulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) irradiadas con luz UV incementaban los niveles de flavonoides glucosilados de naringenina y quercetina, lo que disminuyó la degradación oxidativa de los lípidos de la membrana.

En los frutos TH y almacenados en condiciones de DF (20), el contenido de 11 compuestos disminuyó en relación con los frutos control: *p*-coumaroil hexosa II, quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa ácido *p*-coumarico, kaempferol 3-*O*-rutinósido, dicafeoilquínico II, cafeoil hexosa I, cafeoil hexosa II, ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa, naringenín chalcona y tricafeoilquínico I. También se observó el incremento de un derivado de ácido siríngico hexósido y rutina, mientras que siete compuestos no presentaron cambios; *i.e.*, feruloil tiramina, quercetina-3-rutinósido-7-hexósido, ácido clorogénico, feruloil hexosa I, ácido siríngico hexósido, rutina pentósido, tricafeoilquínico II. La disminución de algunos de estos compuestos podría deberse a que el TH indujo la síntesis de compuestos de mayor peso molecular utilizando algunos precursores de estas moléculas. Yun y col (2013) indujeron tolerancia al daño por frío en mandarinas cv. Kamei con un tratamiento térmico (52 °C/2 min), observando un aumento en el contenido de lignina y una disminución de sus precursores.

En los frutos con TH en condiciones de DF y maduración (20+7), en relación con los frutos control, 13 compuestos aumentaron (derivado de ácido siríngico hexóxido, cafeoil hexosa I, quercetín-3-rutinósido-7-hexósido, *p*-coumaroil hexosa II, ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico, ácido clorogénico, feruloil hexosa I, feruloil tiramina, rutina, kaempferol-3-O-rutinósido, dicafeoilquínico II, quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa), 3 disminuyeron (tricafeoilquínico II, quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa-ácido p-coumárico, tricafeoilquínico I) y 4 se mantuvieron estables (cafeoil hexosa II, ácido siríngico hexóxido, rutina pentósido, naringenín chalcona). Tremocoldi y col (2014) y Yun y col (2013) estudiaron el efecto del almacenamiento a temperatura de DF en frutos de aguacate y mandarina con TH y madurados después del estrés por frío, encontrándose un aumento considerable en los fenólicos, y sugieren que podría deberse a que el fruto llega a esta etapa de maduración sin daños en la membrana de organelos clave para la síntesis de estos metabolitos como cloroplastos y vacuola.

4. Análisis de metabolitos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)

Los compuestos se identificaron por comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST (NIST08.LIB) y la cantidad relativa de cada uno se determinó dividiendo el área de su pico entre el área del pico del ácido palmítico que no presentó cambios significativos durante el almacenamiento.

En la **Figura 7** se muestra un cromatograma típico de CG-EM de los extractos metanólicos de fruto de tomate donde se detectaron 14 compuestos; sin embargo, en dicho cromatograma no se muestran 7 metabolitos que solamente se presentaron en frutos control almacenados en frío por 20 días y madurados 7 días a 21 °C. En el **Cuadro 11** se indican los 21 compuestos detectados, teniendo 5 azúcares, 1 aminoácido, 1 alcohol, 1 vitamina, 6 ácidos orgánicos, 3 ácidos grasos y 4 triterpenos. Al igual que con fenólicos, se realizó un análisis estadístico bifactorial para evaluar el efecto del TH y del almacenamiento en frío sobre el contenido de estos compuestos (**Cuadro 12**).

a. Efecto del almacenamiento en frío y el tratamiento hidrotérmico sobre el perfil de metabolitos de baja polaridad

El TH del fruto (día 0) incrementó los niveles de ácido málico, ácido isocítrico y glucofuranosa. El comportamiento del ácido málico fue inverso en el día 20, además de una muy marcada disminución en la etapa de maduración del fruto. Esto podría deberse a que este metabolito es un ácido orgánico que se consume durante la respiración del fruto, lo que sugiere que el tratamiento térmico induce un aumento en el metabolismo basal, que acelera la tasa de consumo de este ácido orgánico. Luengwilai y col (2012) reportaron un aumento en la respiración del fruto de tomate cv. Micro-Tom sometido a un tratamiento hidrotérmico.

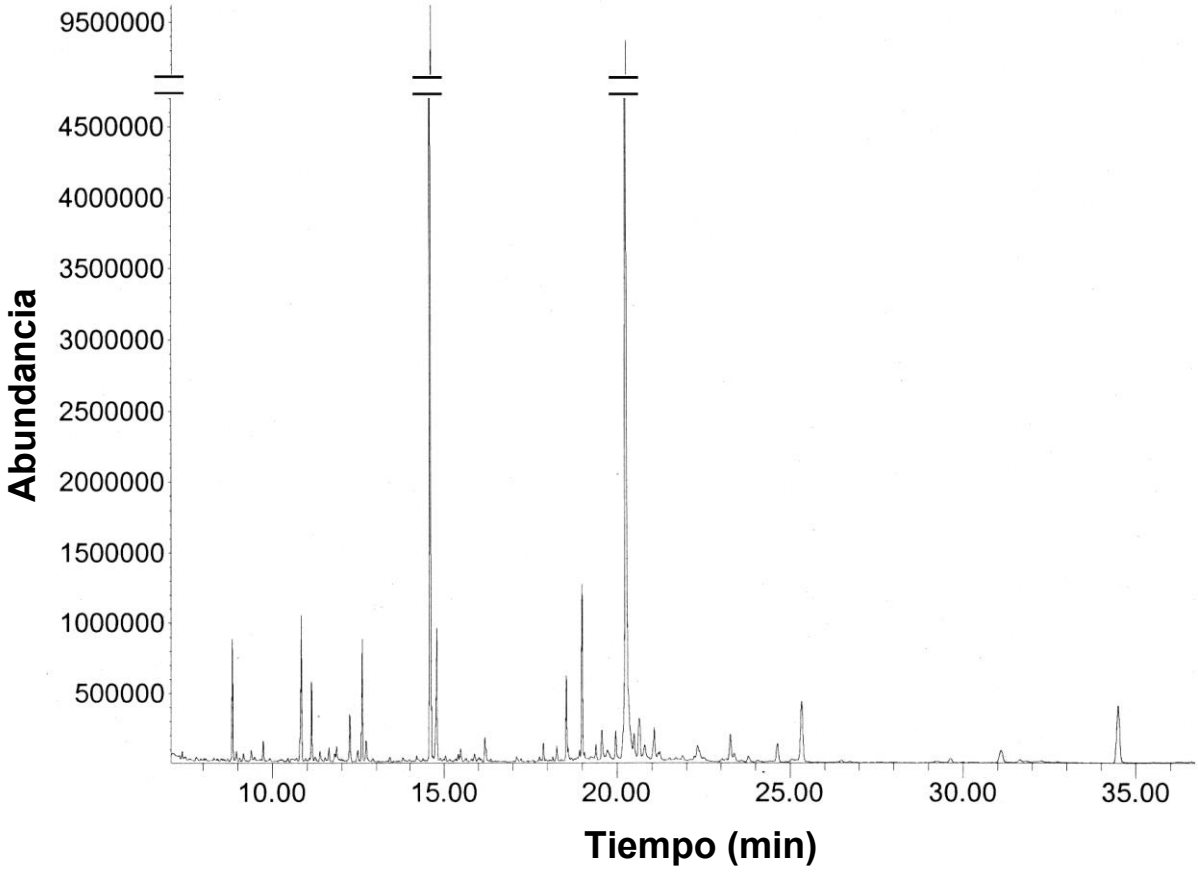


Figura 7. Cromatograma de CG típico de los extractos metanólicos de tomate cv. Imperial. La identidad y contenido de cada compuesto se muestra en el Cuadro 12.

Cuadro 11. Identidad de los metabolitos analizados por CG-EM en fruto de tomate

Azúcar	Alcohol	Aminoácido	Ácido orgánico	Ácido graso	Triterpeno	Vitamina
Glucofuranósido	Glicerol	L-prolina	Ác. succínico	Ác. esteárico	Campesterol*	α-tocoferol*
D-fructosa			Ác. malónico	Ác. oleico*	c-Sitosterol*	
d-xilosa			Ác. málico	Ác. propiónico*	α-Amirina*	
Glucofuranosa			Ác. isocítrico		Germanicol*	
Talosa			Ác.L-ascórbico			
			Ác. isovalérico*			

*Compuestos identificados solo en frutos control después de 20 días a 5 °C + 7 d a 21 °C.

Cuadro 12. Contenido relativo de metabolitos analizados por CG-MS en tomate con tratamiento hidrotérmico (TH) y sometidos a daño por frío y maduración[1]

				Días a 5 ºC / Días a 21 ºC		
Pico[2]	t_R	Nombre	Trat	0/0	20/0	20/7
1	10.817	Glicerol	C	0.40 ± 0.06^{aA}	ND^{bB}	ND^{aB}
			TH	ND^{bB}	0.64 ± 0.05^{aA}	ND^{aB}
2	11.115	Ácido succínico	C	0.55 ± 0.08^{aA}	0.35 ± 0.04^{aB}	ND^{bC}
			TH	0.44 ± 0.06^{aBC}	0.33 ± 0.03^{aC}	0.79 ± 0.08^{aA}
3	12.576	Ácido malónico	C	0.77 ± 0.13^{aB}	0.94 ± 0.14^{aAB}	ND^{aC}
			TH	0.75 ± 0.04^{aB}	0.78 ± 0.15^{aB}	0.16 ± 0.01^{aC}
4	14.578	Ácido málico	C	9.73 ± 1.53^{bA}	12.02 ± 0.76^{aA}	ND^{bB}
			TH	12.58 ± 0.98^{aB}	10.66 ± 1.99^{aB}	3.26 ± 0.25^{aC}
5	14.761	L-prolina	C	0.65 ± 0.10^{aC}	2.51 ± 0.30^{aA}	ND^{bD}
			TH	0.70 ± 0.04^{aB}	0.74 ± 0.08^{bB}	0.77 ± 0.09^{aB}
6	19.947	Glucofuranósido	C	ND^{aC}	0.49 ± 0.09^{aA}	ND^{bC}
			TH	ND^{aB}	ND^{bB}	0.49 ± 0.06^{aA}
7	20.242	Ácido isocítrico	C	0.62 ± 0.04^{aC}	$17.83\pm0.2.53^{aA}$	ND^{aC}
			TH	2.54 ± 0.45^{aC}	7.10 ± 1.26^{bB}	1.79 ± 0.12^{aC}
8	20.475	D-fructosa	C	ND^{aB}	0.53 ± 0.10^{aA}	ND^{bB}
			TH	ND^{aC}	0.56 ± 0.10^{aB}	2.37 ± 0.20^{aA}
9	20.773	d-xilosa	C	ND^{aB}	0.38 ± 0.02^{aA}	ND^{aB}
			TH	ND^{aA}	ND^{bA}	ND^{aA}
10	21.047	Glucofuranosa	C	ND^{bC}	0.62 ± 0.04^{aB}	ND^{bC}
			TH	0.28 ± 0.06^{aB}	0.55 ± 0.09^{aA}	0.36 ± 0.05^{aB}
11	23.254	Ácido L-ascórbico	C	ND^{aB}	0.35 ± 0.02^{aA}	ND^{aB}
			TH	ND^{aA}	ND^{bA}	ND^{aA}
12	25.058	Talosa	C	ND^{aA}	ND^{aA}	ND^{bA}
			TH	ND^{aB}	ND^{aB}	1.42 ± 0.17^{aA}
13	31.121	Ácido palmítico	C	1	1	1
			TH	1	1	1
14	34.466	Ácido esteárico	C	1.16 ± 0.04^{aA}	1.24 ± 0.21^{aA}	ND^{bB}
			TH	1.21 ± 0.12^{aA}	1.01 ± 0.13^{aA}	1.27 ± 0.04^{aA}

[1]Los valores son relativos al contenido de ácido palmítico. [2]El número de pico corresponde al orden de elución (Figura 7); t_R: tiempo de retención; ND: No detectado; Los valores son la media de tres replicas para cada compuesto. Letras mayúsculas distintas en un renglon indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre días de almacenamiento y letras minúsculas distintas en un mismo dia significan diferencia significativa entre tratamientos ($p<0.05$).

En frutos sometidos a DF (día 20) se observó el nivel más alto del aminoácido prolina en frutos control con respecto al día 0. La prolina se ha reportado que actúa como un regulador osmótico celular entre el citoplasma y la vacuola e inactiva las ROS, protegiendo así la integridad de la membrana y estabilizando las enzimas antioxidantes (Zhao y col 2009). En el mismo día de almacenamiento se puede observar que en frutos con TH los niveles de prolina fueron iguales al día 0 y mucho menores que los del control, lo que podría deberse a que en este punto el fruto se encuentra protegido por la acumulación de diversos metabolitos capaces de prevenir el estrés oxidativo.

El ácido isocítrico y el ácido ascórbico, también al día 20, aumentaron en frutos control con respecto a lo observado al día 0, pero en los frutos con TH el nivel del primero fue mucho menor, mientras que el segundo no fue detectado. Foyer y col (1991) reportaron un aumento del ácido ascórbico durante el enfriamiento en dos cultivares de tomate, indicando que juega un clave papel central en la desintoxicación de radicales libres ya que puede inactivar directamente las ROS superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, y el oxígeno singulete. Alternativamente, el ácido ascórbico puede reaccionar indirectamente mediante la regeneración de α-tocoferol o en la síntesis de zeaxantina en el ciclo xantofila. Por otro lado, el ácido isocítrico es un intermediario del ciclo de Krebs y se genera por la isomerización estereoespecífica de citrato por la enzima aconitasa (EC 4.2.1.3), lo que sugiere que algunas enzimas del ciclo de Krebs se ven afectadas en sus actividades por el efecto de las bajas temperaturas o el daño que esten causando los

radicales libres a las estructuras de las proteínas, lo cual llevaría a la acumulación de algunos metabolitos como es el caso del ácido isocítrico.

En los frutos sometidos a DF y maduración (20 + 7), los metabolitos en los frutos control fueron totalmente diferentes a los registrados en los frutos con TH o en los días previos. Los metabolitos de frutos con TH que variaron durante la maduración fueron: ácido succínico, glicerol, ácido malónico, ácido málico, ácido isocítrico, glucofuranósido, fructosa, glucofuranosa y talosa; destaca el incremento de ácido succínico y de manera muy significativa de fructosa y talosa. Olien (1967) demostró que los carbohidratos en el apoplasto interfieren con el crecimiento del cristal de hielo y la lesión mecánica reducida asociada con la congelación. Crowe y col (1984) demostraron que trehalosa funcionalmente reemplaza agua ligada a membranas y proteínas y así confiere estabilidad estructural durante la desecación por frío; también mencionaron que los azúcares pueden interactuar con los fosfolípidos de la membrana y disminuir la Tm dándole estabilidad a las bajas temperaturas, además de que parece más probable que la interacción ocurra durante los procesos de congelación, cuando el fosfolípido y el azúcar están concentrados mucho más allá de sus concentraciones de la fase nativa. La presencia de ácido isocítrico, aunque en menor cantidad que al final del almacenamiento en frío, podría deberse a la actividad de la enzima aconitasa en el citosol durante la maduración; el citrato en el citosol se genera en la mitocondria por la inhibición de la aconitasa mitocondrial en etapas tempranas de maduración (Degu y col 2011). La presencia de los azúcares fructosa, glucofuranósido, glucofuranosa y talosa solamente en la etapa de maduración podría deberse a que su acumulación se reprimió durante el enfriamiento, observándose un

aumento cuando este culmina e inicia la etapa de maduración regular del fruto. Esto es posible si el fruto fue protegido por el tratamiento hidrotérmico y pudo madurar normalmente, generando los metabolitos necesarios para esta etapa que naturalmente genera estrés.

Los metabolitos que sólo se observaron en los frutos control en el día 20 + 7 fueron ácido propiónico, ácido oleico y ácido isovalérico, campesterol, c-sitosterol, α-amirina, α-tocoferol y germanicol. El contenido de estos compuestos no pudo compararse con los mostrados en el **Cuadro 12** porque en estos frutos no se registró el ácido palmítico. Tomando como referencia la suma de las áreas de estos compuestos, la mayor proporción la ocupó α-tocoferol (34.2%) seguido de c-sitosterol (21.3%) y α-amirina (11.9%). El metabolismo de estos últimos esteroles se ha relacionado con factores estresantes ambientales y químicos de las plantas, incluido el estrés por frío (Moreau y col 2002). En las plantas, estos compuestos abarcan una gran variedad de funciones diferentes y se pueden presentar en la forma libre. Los esteroles vegetales pueden aparecer como compuestos “conjugados”, en los cuales el grupo 3β-OH del esterol está esterificado por ácidos grasos, o bien glicosilados (**Figura 8**). Los ésteres con ácidos grasos están presentes en la mayoría de las plantas y constituyen cerca del 50% del total de esteroles en algunos alimentos.

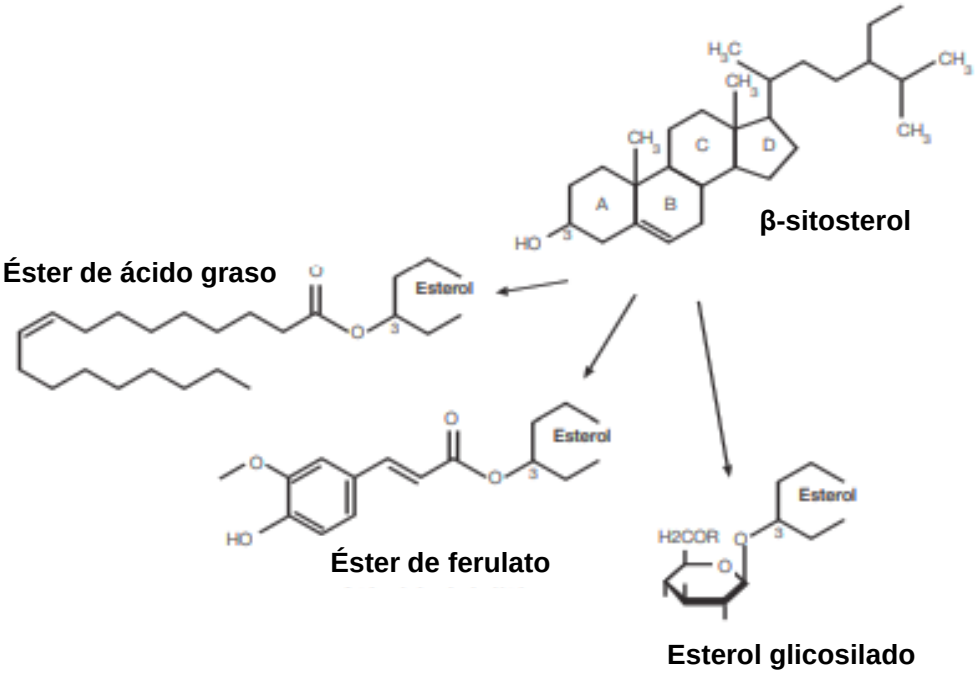


Figura 8. Modificaciones del grupo 3β-hidroxilo de los esteroles vegetales.

Fuente: Oliver y col (2005).

El núcleo alifático plano y el grupo 3-hidroxilo de los fitoesteroles permiten su incorporación en membranas de fosfolípidos en células, donde su rol crítico es controlar la fluidez o rigidez de la membrana. Las estructuras químicas de los fitoesteroles están perfectamente adaptadas a su función fisiológica: la flexible cadena lateral alifática del sitosterol y campesterol, dos de los fitosteroles más abundantes, pueden apilarse de manera ordenada en las membranas, aumentando su rigidez, pero el doble enlace trans en la cadena lateral del stigmasterol interfiere con el orden de la membrana y promueve una mayor fluidez (Dufourc y col 2008).

Whitaker (1991) reportó el aumento del contenido total de esteroles durante el almacenamiento a 2 °C por 12 días y los esteroles con mayor acumulación por el daño por frío fueron los esteroles libres. Esto lo relacionó con el hecho de que el fruto de tomate en estado inmaduro ya cuenta con las reservas de ácido mevalónico para la síntesis de esteroles y carotenoides. Por lo tanto, quizás solo hace falta el paso final de la vía biosintética isoprenoide que se podría dar en la etapa de maduración del fruto. Además, observó una mayor acumulación de ácidos grasos libres como el linoleico y el linolénico.

En el presente estudio se observó la presencia de estos compuestos en frutos control con síntomas más severos de daño por frío, lo cual sugiere que las membranas sufrieron rupturas pudiendo liberar estos compuestos esenciales para el funcionamiento correcto de las mismas. Wang y col (2015) reportaron al ácido isovalérico como un compuesto volátil del fruto de tomate que se genera en la etapa de maduración del fruto. El ácido graso oleico posiblemente sea parte del desprendimiento por la ruptura de la membrana celular.

Compuestos como el sitosterol y estigmasterol nos podrían indicar en que estado se encuentra el funcionamiento de las membranas del fruto dependiendo de la proporcion en la que se encuentran (**Figura 9**) (Dufourc 2008). Este autor menciona que cuando hay más estigmasterol que sitosterol la membrana se encuentra en un estado llamado gel, cuando el estigmasterol se encuentra en la misma proporción que el sitosterol es llamado estado basal de la membrana y cuando el estigmasterol es menor que el sitosterol le llamó estado líquido desordenado. En los dos puntos extremos hay una pérdida de funcionalidad de la membrana lo que nos indica que la célula está en condiciones de estrés.

B. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SU ASOCIACIÓN CON EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y LA TOLERANCIA AL DAÑO POR FRÍO

1. Actividad antioxidante por ABTS

Los resultados del análisis de actividad antioxidante (AA) por ABTS se muestran en la **Figura 10**. La AA tanto de los frutos control como de los TH incrementó significativamente ($p<0.05$) durante el periodo de almacenamiento en frío (0-20 días a 5 °C), pero sin diferencias de actividad entre ambos tratamientos. Este mismo comportamiento se observó en el contenido de fenólicos totales (**Figura 2**) y se podría relacionar con el incremento en ambos casos de algunos de los compuestos fenólicos identificados en los extractos metanólicos, destacando rutina pentósido, narigenín chalcona, cafeoil hexosa II y ácidos tricafeoilquínicos (**Cuadro 10**), los cuales se ha demostrado previamente son buenos antioxidantes.

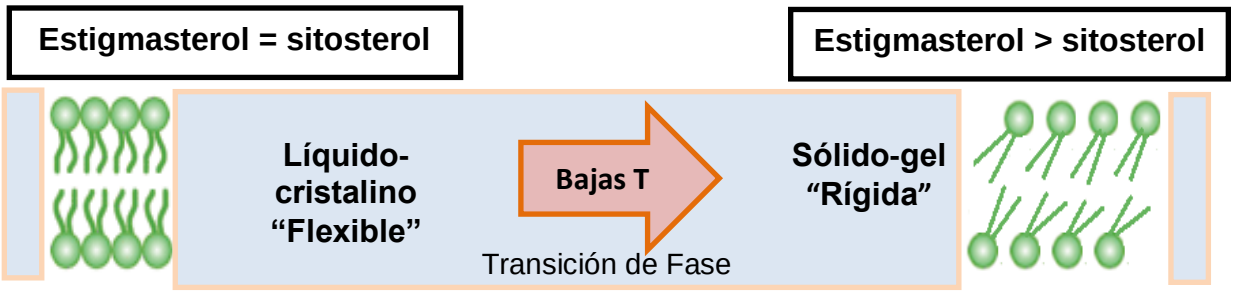


Figura 9. Cambio de fases de la membrana

Fuente: Lyons (1973); Nishida y Murata (1996); Hodges y col (2004).

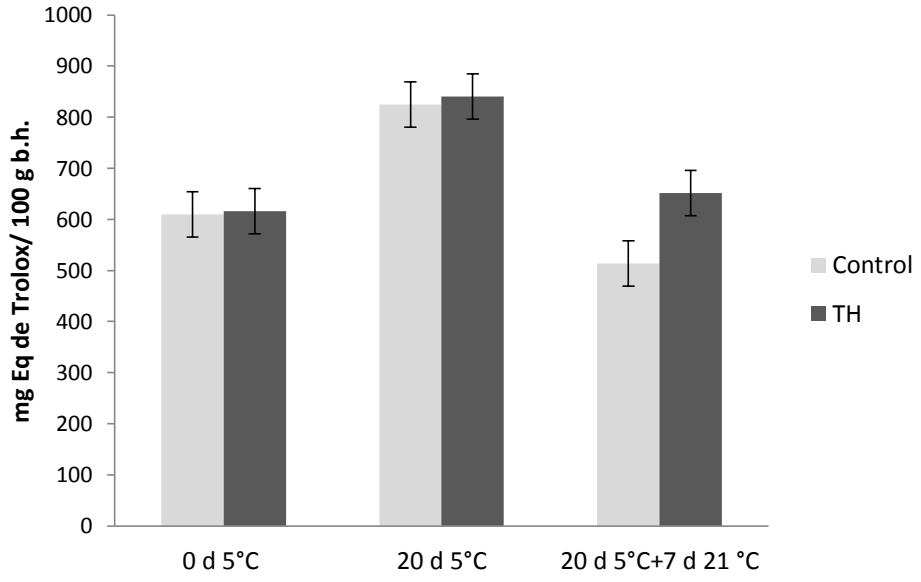


Figura 10. Efecto del tratamiento hidrotérmico (TH) sobre la actividad antioxidante por ABTS en frutos de tomate durante el almacenamiento a 5 °C y maduración a 21 °C. Los valores son la media de tres réplicas y las barras indican LSD=88.61 mg EAG/ 100g b.h.

Después del periodo de maduración se observó una disminución significativa en la AA por ABTS, pero ésta fue más pronunciada en el caso de los frutos control, los cuales presentaron una actividad significativamente menor que los frutos con TH (**Figura 10**). La menor AA en frutos control con respecto a los tratados corresponde con lo observado para fenólicos totales (**Figura 2**) y en el perfil de fenólicos (**Cuadro 10**), donde varios compuestos presentaron una mayor acumulación en frutos con TH con respecto al control. Dentro de estos compuestos se encuentran el ácido clorogénico y otros ácidos cafeoilquínicos, ácido cafeico, cafeoil-hexosa I, rutina y rutina hexósido. Estos compuestos antioxidantes podrían estar protegiendo a los frutos con TH del estrés oxidativo y por lo tanto contribuir a su tolerancia al daño por frío.

Tremocoldi y col (2014) aplicaron TH (5, 10, 15 y 20 min a 45 °C) a fruto de aguacate y lo almacenaron bajo condiciones DF y observaron un comportamiento similar al del presente estudio, observando diferencias significativas en la AA entre frutos control y tratados hasta después de una etapa de maduración de 2 días a 21 °C.

Gómez y col (2009) también observaron que la AA es directamente proporcional al contenido de fenólicos totales en tomate cv. Micro-Tom. Toor y col (2005) reportaron que el 92% de la actividad antioxidante total en tomate corresponde a la fracción soluble, la cual esta constituida en 62-72% de compuestos fenólicos.

2. Actividad antioxidante por DPPH

En el caso del método DPPH se encontraron diferencias significativas entre los frutos control y TH al día 0, siendo mayor la AA en los frutos TH (**Figura 11**). Esto contrasta con lo observado por ABTS (**Figura 10**) y en fenólicos totales (**Figura 2**), pero sugiere que algunos de los compuestos que se incrementaron como respuesta inmediata al TH podrían tener mayor actividad antioxidante por DPPH. Entre estos compuestos se encuentran el ácido 5-cafeoilquínico, cafeoil hexosa I y un derivado de ácido siríngico hexósido.

Del día 0 al 20 de almacenamiento en DF sólo hubo un incremento significativo en la AA por DPPH en los frutos control, lo cual podría atribuirse al incremento en estos frutos de compuestos como cafeoil hexosa I y II, ácido cafeico, ácido 5-cafeoilquínico y naringenín chalcona. Al final del almacenamiento en frío la AA de los frutos control fue ligeramente mayor que la de los tratados, pero sin diferencias significativas.

Después del periodo de maduración se observó una disminución en la AA de los frutos control con respecto al almacenamiento en frío, siendo significativamente menor que la AA de los frutos con TH (**Figura 11**). La menor AA en frutos control con respecto a los TH corresponde con el contenido de fenólicos, donde varios compuestos presentaron una mayor acumulación en frutos con TH con respecto al control. Dentro de estos compuestos se encuentran el ácido clorogénico y otros ácidos cafeoilquínicos, ácido cafeico, cafeoil-hexosa I, rutina y rutina hexósido. Estos compuestos antioxidantes podrían estar contribuyendo en la protección de los frutos con TH del estrés oxidativo y por lo tanto en la tolerancia al daño por frío.

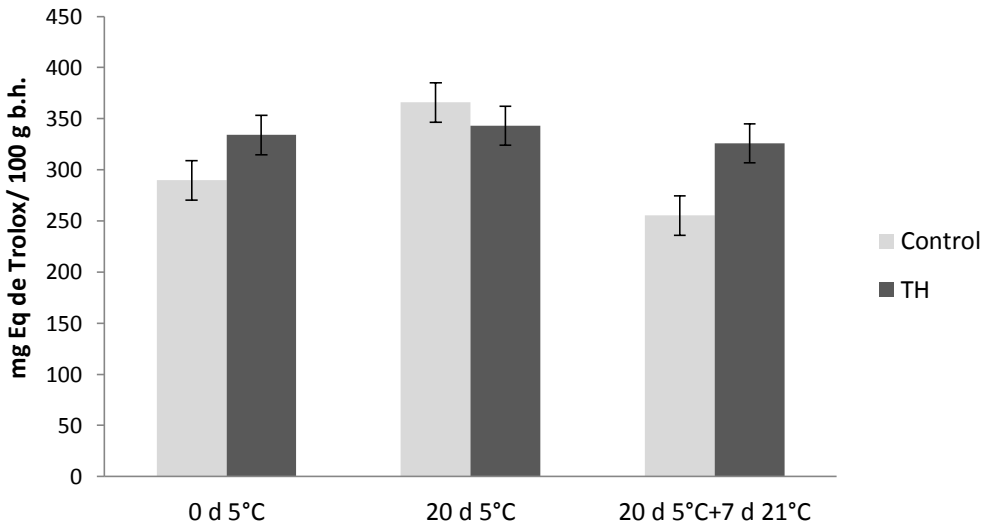


Figura 11. Efecto del tratamiento hidrotérmico (TH) sobre la actividad antioxidante por DPPH en frutos de tomate durante el almacenamiento a 5 °C y maduración a 21 °C. Los valores son la media de tres réplicas y las barras indican LSD=38.48 mg EAG/ 100g b.h.

3. Asociación entre el contenido de metabolitos y la actividad antioxidante

Los compuestos fenólicos podrían jugar un papel relevante en la tolerancia al estrés por bajas temperaturas debido su potencial como eliminadores de radicales libres (antioxidantes) (Rice-Evans y col 1997), siendo capaces de retrasar o inhibir la oxidación de lípidos u otras moléculas. Estudios previos en tomate han demostrado una correlación positiva entre los niveles de estos compuestos y la actividad antioxidante de extractos metanólicos en tomate evaluada por los métodos ABTS y DPPH (Delgado-Vargas y col 2018), por lo que en el presente estudio se realizaron correlaciones de Pearson para determinar si existe esta correlación con fenólicos y otros metabolitos que pudieran sugerir su posible participación en la tolerancia inducida al daño por frío por el TH (**Cuadro 13**).

Como se esperaba, se encontró una correlación moderada pero significativa entre el contenido de fenólicos totales y la AA por ambos métodos, sugiriendo una importante contribución de estos compuestos. En cuanto a compuestos fenólicos individuales, se encontró una asociación significativa entre el contenido de rutina pentósido y un derivado de quercetina con la AA de ambos métodos, mientras que el ácido siríngico hexósido sólo mostró asociación con la AA por ABTS; estos compuestos han sido reportados como antioxidantes importantes en tejidos vegetales. La correlación entre la AA por ABTS y DPPH con rutina pentósido fue reportada previamente en accesiones de *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* de México (Delgado-Vargas y col 2018). Sin embargo, cabe aclarar que la ausencia de correlación con otros compuestos fenólicos no descarta su contribución a la actividad antioxidante global del fruto.

Cuadro 13. Metabolitos que presentaron una correlación significativa con la actividad antioxidante de extractos metanólicos de tomate cv. Imperial.

Componente	**Actividad antioxidante**	
	ABTS	**DPPH**
Fenólicos totales	0.557*	0.568*
Rutina Pentósido	0.736**	0.477*
Quercetina-hexosa-deoxihexosa-pentosa	0.611**	0.732**
ácido *p*-coumárico		
Ácido siríngico hexósido	0.557*	
Ácido ascórbico		0.530**
Ácido esteárico	0.464**	0.562**
Ácido malónico	0.726**	
Ácido málico	0.652**	
Prolina	0.740**	
Ácido isocítrico	0.801**	

Correlación de Pearson; * $p<0.05$, ** $p<0.001$.

Con respecto a metabolitos de menor polaridad determinados por CG-EM, se observó correlación significativa entre el contenido de ácido ascórbico y ácido esteárico con la AA por DPPH, mientras que tres ácidos orgánicos y prolina mostraron asociación con la AA de ABTS.

VIII. CONCLUSIONES

- El análisis por HPLC-MS permitió la identificación de 20 compuestos fenólicos en extractos metanólicos de tomate y 11 variaron significativamente en respuesta al tratamiento hidrotérmico.
- El análisis por CG-MS permitió la identificación de 21 compuestos, de los cuales 7 variaron significativamente en respuesta al tratamiento hidrotérmico.
- El daño por frío de los frutos control se relacionó con una menor acumulación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, así como con la liberación de compuestos asociados a la membrana como esteroles y ácidos grasos que son indispensables para el funcionamiento de la misma.
- Los frutos con tratamiento hidrotérmico presentaron una mayor actividad antioxidante asociada con una mayor acumulación de compuestos como ácido clorogénico y otros ácidos cafeoilquínicos, ácido cafeico, cafeoil-hexosa I, rutina y rutina hexósido.
- La tolerancia al daño por frío inducida por el TH parece estar asociada con una mayor acumulación de compuestos antioxidantes que protegen la membrana del estrés oxidativo.

IX. BIBLIOGRAFIA

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

Aghdam M, Asghari M, Khorsandi O, Mohayeji M. 2012. Alleviation of postharvest chilling injury of tomato fruit by salicylic acid treatment. Journal of Food Science and Technology 51(10): 2815–2820.

Akbudak B, Akbudak N, Sniz V, Eris A. 2007. Sequential treatments of hot water and modified atmosphere packaging in cherry tomatoes. Journal of Food Quality 30: 869-910.

Akiyama T, Jin S. 2007. Molecular cloning and characterization of an argininedecarboxylase gene up-regulated by chilling stress in rice seedlings. Journal of Plant Physiology 164: 645–654.

Antunes L, Gonçalvez E, Trevisan R. Alterações de compostos fenólicos e pectina em póscolheita de frutos de amora-preta. Revista Brasileira de Agrociência, 12:57-61.

Artés F, Artés F. 2007. Tratamientos Postrecolección del Tomate Fresco. Tendencias e Innovaciones. Grupo de Postrecolección y Refrigeración. Departamento de Ingeniería de Alimentos, Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España.

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. 2013. The history of tomato: from domestication to biopharming. Biotechnology Advances 32:170-189.

Bharti A, Khurana J, 1997. Mutant of Arabidopsis as tools to understand the regulation of phenylpropanoids pathway and UVB protection mechanism. Journal of Photochemistry and Photobiology 65:765–776

Biondi S, Scaramagli S, Capitani F, Altamura M, Torrigiani P, 2001. Methyljasmonate upregulates biosynthetic gene expression, oxidation and conjugation of polyamines, and inhibits shoot formation in tobacco thin layers. Journal of Experimental Botany 52:231–242.

Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. Plant Cell 7: 1099–1111.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology 28(1): 25-30.

Cárdenas-Torres F. 2013. Cambios fisiológicos y de actividad de enzimas del sistema antioxidante en frutos de tomate con tolerancia inducida al daño por frío. [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 142 p.

Carvajal F, Palma F, Jamilena M, Garrido D. 2015. Cell wall metabolism and chilling injury during postharvest cold storage in zucchini fruit. Postharvest Biology and Technology 108: 68-77.

Cataldi Tommaso R, Lelario F, Bufo S. 2005. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19: 3103-3110.

Chen H, Jones D, Howe A. 2006. Constitutive activation of the jasmonate signalingpathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. FEBS Letters 580: 2540–2546.

Chen J, He L, Jiang Y, Wang Y, Joyce D, Ji Z, Lu W. 2008. Role of phenylal anine ammonia -lyase in heat pretreatme nt-induced chilling tolerance in banana fruit. Physiologia Plantarum 132: 318–328.

Collins JK, Perkins-Veazie P, Roberts W. 2006. Lycopene: from plants to humans. HortScience 41:1135-1144

Cornejo C. 2009. Evaluación de la respuesta agronómica bajo cubierta de dos híbridos de tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*), de crecimiento indeterminado Dominique y Michaella, en la parroquia San José de Alluriquín. Santo Domingo, Ecuador. [Documento en línea]. Disponible: http:// repositorio. espe. edu. ec / bitstream /21000 /2525 / 1/ T-ESPE-IASA % 20II00 – 2300 .pdf. [Consulta: 12-03-16].

Coronel J. Castillo P. 2009. Alternativas de mejora en el manejo postcosecha de tomate riñón cultivado en la provincia de Santa Elena. Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. [Documento en línea]. Disponible: http:// www. dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/11926. [Consulta: 11-03-16].

Crisosto CH, Garner D, Crisosto G. 2002. High carbon dioxide atmosphere affect stored 'Thompson Seedles' table grape. HortScience 37:1074-1078.

Crowe J, Crowe L, Carpenter J, Rudol A, Wistrom C, Spargo B, Anchordoguy T. 1984. Interaction of sugars with membranes. Biochimestry and Biophysics. 947:367–384

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.

Cuevas J, López-Cobollo R, Alcázar R, Zarza X, Kroncz C, Altabella T, Salinas J, Tiburcio A, Ferrando A. 2008. Putrescine is involved in Arabidopsis freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. Plant Physiology 148(2): 1094-105.

Dall'Asta C, Falavigna C, Galaverna G, Sforza S, Dossena A, Marchelli R. 2009. A multiresidual method for the simultaneous determination of the main glycoalkaloids and flavonoids in fresh and processed tomato (Solanum lycopersicum L.) by LC-DAD-MS/MS Journal of Separation Science 32:3664–3671.

Degu A, Hatew B, Nunes-Nesi A, Shlizerman L, Zur N, Katz E, Fernie AR, Blumwald E, Sadka A. 2011. Inhibition of aconitase in citrus fruit callus results in a metabolic shift towards amino acid biosynthesis. Planta 234: 501–513.

Delgado-Vargas F, Sicairos-Medina LY, Luna-Mandujan AG, Lopez-Angulo G, Salazar-Salas NY, Heredia JB, Vega-Garcia MO, Lopez-Valenzuela JA. 2018. Phenolic profiles, antioxidant and antimutagenic activities of Solanum lycopersicum var. cerasiforme accessions from Mexico. CyTA - Journal of Food (En prensa). https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1481146

Ding C, Wang C, Gross K, Smith D. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. Plant Science 161: 1153–1159

Dixon R, Choudhary A, Dalkin D, Edwards R, Fahrendorf T, Gowri G, Harrison M, Lamb C, Loake G, Maxwell C, Or Jr, Paiva N, 1992 Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa, in: H.A. Stafford, R.K. Ibrahim (Eds.), Phenolic Metabolism in Plants, Plenum press, New York, pp. 91–138.

Dufourc EJ. 2008. The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. Plant Signaling & Behavior. 2: 133-134

Dunn W, Bailey N, Johnson H, 2005. Measuring the metabolome: current analytical technologies. The Analyst 130: 606-625.

Fallik E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing). Postharvest Biology and Technology 32:125-134.

FAOSTAT. 2017. Food and Agriculture Organization. Statistical Database. Disponible en: http://faostat.fao.org (Consultado el 10 de Marzo de 2016).

Ferreira MD, Franco TOA, Kasper RF, Ferraz ACO, Honório SL, Tavares M. 2005. Post-harvest quality of freshmarketed tomatoes as a function of harvest periods. Scientia Agricola 62(5):446-451.

Fiehn, O. 2002. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. Plant Molecular Biology 48:155-17.

Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. 2000 Metabolite profiling for plant functional genomics. Nature Biotechnology 18: 1157–116.

Fiehn O, Wohlgemuth G, Scholz M, Kind T, Lee D, Lu Y, Moon S, Nikolau B. 2008. Quality control for plant metabolomics: reporting MSI-compliant studies. Plant Journal 53: 691–704.

Foolad MR. 2007. Genome mapping and molecular breeding of tomato. International Journal of Plant Genomics 2007:64358.

Foyer C, Lelandais M, Edwards E, Mullineaux P. 1991. The role of ascorbate in plants, interactions with photosynthesis and regulatory significance. En: Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism. American Society of Plant Physiologists. p 131-144.

Friedman M. 2013. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, a-tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 9534–9550.

Gautier H, Diakou-Verdin V, Bénard C, Reich M, Buret M, Bourgaud F, poëssel J, Caris-Veyrat C, Génard M. 2008. How Does Tomato Quality (Sugar, Acid, and Nutritional Quality) Vary with Ripening Stage, Temperature, and Irradiance?. Journal of Agriculture and Food Chemistry 56:1241–1250

Gomez P, Ferrer M, Fernandez-Trujillo J, Calderon A, Artes F, Egea-Cortines M, Weiss J. 2009. Structural changes, chemical composition and antioxidant activity of cherry tomato fruits (cv. Micro-Tom) stored under optimal and chilling conditions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 89: 1543–1551.

Gómez-Romero S, Carretero F, Gutierrez. 2010. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. Phytochemistry 71(16): 1848-1864.

González-Agüero M, Pavez L, Ibáñez F, Pacheco I, Campos-Vargas R, Meisel L, Orellana A, Retamales J, Silva H, González M, Cambiazo V. 2008. Identification of woolliness response genes in peach fruit after post-harvest treatments. Journal of Experimental Botany 59:1973–1986.

Grierson D, Kader AA. 1986. Fruit ripening and quality. En Atherton, JC, Rudich J, editores. The tomato crop. A scientific basis for improvement. New York, USA: Chapman and Hall Ltd. p 241-80.

Groppa M, Benavides M, Tomaro ML. 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheatleaf discs under cadmium or copper stress. Plant Science161:481–488.

Gross K, Wallner S, 1979. Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. Plant Physiology 63: 117–120.

Gusta LV, Wilen RW, Fu P. 1996. Low-temperature stress tolerance: the role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins. Hortscience 31: 39–46.

Guy CL. 1990. Cold-acclimation and freezing stress tolerance – role of proteinmetabolism. Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41: 187–223.

Haggag W, Abd-El-Kareem F, 2009. Methyl jasmonate stimulates polyamines biosynthesis and resistance against leaf rust in wheat plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection 42: 16–31.

Hannah M, Wiese D, Freund S, Fiehn O, Heyer A, Hincha D. 2006. Natural genetic variation of freezing tolerance in Arabidopsis. Plant Physiology 142: 98–112.

Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. Planta 207:604 –611.

Hodges DM, Lester GE, Munro KD, Toivonen PMA. 2004. Oxidative stress: importance for postharvest quality. HortScience 39:924-929.

Jones JB. 1999. Tomato plant culture: in the field, greenhouse and home garden. Boca Raton, FL: CRC Press. 199 p.

Kader A, 1986. Effects of postharvest handling procedures on tomato quality. Acta Horticulture 190: 209–221.

Kaplan F, Kopka J, Haskell D, Zhao W, Schiller K, Gatzke N, Sung D, Guy C, 2004. Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. Plant Physiology 136: 4159–4168.

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.

Kim Y, Singleton A, Talcott S. 2009. Antioxidant phytochemical and quality changes associated with hot water immersion treatment of mangoes (*Mangifera indica* L.). Food Chemistry 115: 989-993.

Kishitani S, Watanabe K, Yasuda S, Arakawa K, Takabe T. 1994. Accumulation of glycinebetaine during cold-acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. Plant Cell and Environment 17: 89-95.

Klotke J, Kopka J, Gatzke N, Heyer AG. 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessionsof Arabidopsis thaliana with contrasting cold adaptation—evidencefor a role of raffinose in cold acclimation. Plant Cell and Environment 27:1395–1404

Knaupp M, Mishra KB, Nedbal L, Heyer AG. 2011. Evidence for a roleof raffinose in stabilizing photosystem II during freeze–thaw cycles. Planta 234:477–486.

Le Gall G. 2003. Metabolite profiling of tomato (Lycopersicon esculentum) using 1H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51(9): 2447-2456.

Lee SH, Ahn SJ, Im YJ, Cho K, Chung GC, Cho BH, 2005. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots. Biochemical and Biophysical Research Communications 330:1194–1198

Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC. 1997. Ethylene and fruit ripening. Plant Physiology 101:727–39.

Luengwilai K, Saltveit M. Beckles D. 2012. Metabolite content of harvested Micro-Tom tomato (Solanum lycopersicum L.) fruit is altered by chilling and protective heat-shock treatments as shown by GC–MS metabolic profiling. Postharvest Biology and Technology 63(1):116-122.

Luna-Mandugan A. 2016. Identificación de compuestos fenólicos relacionados con la actividad antioxidante del tomate silvestre (*Solanum lycopersicum* var. c*erasiforme*). [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 87 p.

Lurie S, Sabehat A. 1997. Prestorage temperature manipulations to reduce chilling injury in tomatoes. Postharvest Biology and Technology 1:57-62.

Lyons JM, Chilling injury in plants. 1973. Annual Reviews in Plant Physiology 24:445–466.

Madhavi DL, Salunkhe DH, Salunkhe DK, Kadam SS. 1998. Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage and processing. New York: Marcel Dekker, Inc. p 171-201.

Malacrida C, Valle EM, Boggio SB. 2006. Postharvest chilling induces oxidative stress response in the dwarf tomato cultivar Micro-Tom. Physiologia Plantarum 127:10-18.

Marangoni AG, Palma T, Stanley D. 1996 Membrane effects in postharvest physiology. Postharvest Biology Technology 7:193–217.

Martínez-Romero D, Valero D, Serrano M, Burló F, Carbonell A, Burgos L, Riquelme F. 2000. Exogenous polyamines and gibberellic acid effects on peach (Prunus persica L.) storability improvement. Journal of Food Science 65: 288–294.

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 82:323-330.

McColloch LP, Worthington JT. 1952. Low temperature as a factor in the susceptibility of mature-green tomatoes to Alternaria rot. Phytopathology Journal 42:425-427.

McDonald RE, McCollum TG, Baldwin EA. 1999. Temperature of water heat treatments influences tomato fruit quality following low-temperature storage. Postharvest Biology and Technology 16:147-155.

Minoggio M, Bramati L, Simonetti P, Gardana C, Iemoli L, Santangelo E. Mauri P, Spigno P, Soressi G, Pietta P. 2003. Polyphenol pattern and antioxidant activity

of different tomato lines and cultivars. Annals of Nutrition and Metabolism 47(2): 64-69.

Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7:405–410.

Moco S, Bino RJ, Vorst O, Verhoeven HA, de Groot J, van Beek TA, Vervoort J, de Vos CHR. 2006. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. Plant Physiology 141: 1205–1218.

Moore J, Westall K, Ravenscroft N, Farrant J, Lindsey G, Brandt W. 2005. The predominant polyphenol in the leaves of the resurrection plant Myrothamnus flabellifolius, 3,4,5 tri-O-galloylquinic acid, protects membranes against desiccation and free radical-induced oxidation. Biochemical Journal 385:301–308.

Moreau R, Powell M, Whitaker B, Bailey B, Anderson J. 1994. Xylanase treatment of plant cells induces glycosylation and fatty acylation of phytosterols. Physiologia Plantarum 91: 575–580.

Moreau, R, Whitaker, B, Hicks, K, 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and healthpromoting uses. Progress in Lipid Research 41: 457‑500.

Morris LL. 1982. Chilling injury of horticultural crops: An overview. HortScience 17:161-162.

Nakazato T, Housworth EA. 2011. Spatial genetics of wild tomato species reveals roles of the Andean geography on demographic history. American Journal of Botany 98:88–98.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American Journal of Clinical Nutrition 74:418–425.

Nishida I, Murata N. 1996. Chilling sensitivity in plants and cyanobacteria: the crucial contribution of membrane lipids. Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology 47:541–568.

Oikawa A, Otsuka T, Nakabayashi R, Jikumaru Y, Isuzugawa K, Murayama H, Saito K, Shitarake K. 2015. Metabolic Profiling of Developing Pear Fruits Reveals

Dynamic Variation in Primary and Secondary Metabolites, Including Plant Hormones. PLoS One 10(7): e0131408.

Olien R. 1967. Freezing stresses and survival. Annual Review of Plant Physiology 18:387–408

Oliver AP, Segura CP, Piña ML, Vara PO, Vich FS, Guerrero AM, Riutort JR. 2005. El libro blanco de los esteroles vegetales. 2da. Edición. España Unilever Foods S.A. 173 p

Oliver S, Winson M, Kell D, Baganz F. 1998. Systematic functional analysis of the yeast genome. Trends in Biotechnology 16: 373-378.

Orzolek MD, Greaser GL, Harper. 2004. Agricultural alternatives. Tomato Production. U.S. Departament of Agriculture.Extension Service. College of Agricultural sciences. Agricultural Research and Coperative Extension. Disponible en: http://agalternatives.cas.psu.edu (Consultado en marzo 2016).

Osorio, Do S, Thi P, Alisdiar R. 2012. Profiling primary metabolites of tomato fruit with gas chromatography/mass spectrometry. Methods in Molecular Biology 860: 101-109.

Park EJ, Jeknic Z, Sakamoto A, DeNoma J, Yuwansiri R, Murata N, Chen THH. 2004. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants and flowers from chilling damage. Plant Journal 40:474-487.

Paull RE. 1990. Chilling injury of crops of tropical and subtropical origin. En: Wang CY, (Eds.). Chilling injury of horticultural crops. Boca Raton, FL. CRC Press, Inc. p 17-36.

Radhakrishna Shetty R, Jensen JD. 2011. Silicon-induced changes in antifungal phenolic acids, flavonoids and Key phenylpropanoid pathway genes during the interaction between miniature roses and the biotrophic pathogen podosphaera pannosa. Plant Physiology 157:2194–2205.

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.

Raison JK and Orr GR. 1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury, in Chilling Injury of Horticultural Crops, ed. by Wang CY. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 145–164.

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.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant Science 2:152– 159.

Rivero R, Ruiz J, García P, López-Lefebre L, Sánchez E, Romero L, 2001. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. Plant Science 160:315–321.

Rodríguez, l, López, l, García, M. 2010. Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consume habitual en Colombia, mora (Rubus glaucus B.), maracuyá (Passiflra edulis S.), guayaba (Psidium guajava L.) y papaya (Carica cundinamarcensis J.). Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos 1 (21):16-34.

Rosello S, Adalid A, Cebolla J, Nuez F. 2011. Evaluation of the genotype, environment and their interaction on carotenoid and ascorbic acid accumulation in tomato germplasm. Journal of the Science of Food and Agriculture 91(6): 1014-1021.

Ruiz-Sola MA, Rodríguez-Concepción M. 2012. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: a colorful pathway. The Arabidopsis book; e0158. http://dx.doi.org/10.1199/tab.0158.

Saltveit ME Jr, Morris L. 1990. Overview on chilling injury of horticultural crops. En: Wang CY, editores. Chilling injury of horticultural crops. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc. P 3-15.

Saltveit ME. 2000. Discovery of chilling injury. En: Kung SD, Yang SF, editores. Discoveries in plant biology. Vol III. Singapore: World Scientific Publishing Co. p 423-448.

Saltveit, M, 2005. Influence of heat shocks on the kinetics of chilling-induced ion leakage from tomato pericarp discs. Postharvest Biology and Technology 36: 87–92.

Scandalios JG. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. Plant Physiology 101:7–12.

Sevillano L, Sanchez B, Romojaro F. Francisco B. 2009. Physiological, hormonal and molecular mechanisms regulating chilling injury in horticultural species. Postharvest technologies applied to reduce its impact. Journal of the Science of Food and Agriculture 89(4): 555-573.

Singleton V, Orthoref R, Lamuela-Raventos R. 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in Enzymology 299: 152-178.

Shewfelt RL.1986. Postharvest treatment for extending the shelf life of fruits and vegetables. Food Technology 40:70-80.

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.

Teklemariam, T, and Blake T. 2003. Effect of UV-B preconditioning on heat tolerance of cucumber (Cucumis sativus L.). Environmental and Experimental Botany 50:169-182.

Toor R, Savage P, 2005. Antioxidant activities in different fractions of tomato. Food Research International 38:487–494.

Tremocoldi M. A., Daiuto E, Matias de Alencar S, Vieites R. 2014. Effect of hydrothermally ´Hass´ avocado about antioxidant capacity, total phenolic content and coloration. Agrarian Sciences 35(3): 1279-1290.

Tsantili E, Shin Y, Nock J, Watkins C. 2010. Antioxidant concentrations during chilling injury development in peaches. Postharvest Biology and Technology 57:27–34.

USDA. 2014. U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory

Home Page. Disponible en: http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl (Consultado el 11 de Marzo de 2016).

Valenzuela Ponce ML. 2016. Evaluación de parámetros fisiológicos e identificación de proteínas asociadas con tolerancia inducida al daño por frío en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Imperial. [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 144 p.

Vallverdú-Queralt A, Jáuregui O, Di Lecce G, Andrés-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM. 2011. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). Food chemistry 129(3):877-883.

Van der Rest B, Danoun S, Boudet A, Rochange S. 2006. Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (Solanum lycopersicum L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. Journal of Experimental Botany 57:1399–1411.

Vega-Espinoza A. 2010. Aplicación de métodos secuenciales para la conservación postcosecha de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Imperial. [Tesis de Maestría]. Culiacán, México: Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. 176 p.

Venema JH, Linger P, Van Heusden AW, Hasselt PR, Brüggenmann W. 2005. The inheritance of chilling tolerance in tomato (*Lycopersicon spp*.). Plant Biology 7:118-130.

Vicente A, Martínez GA, Civello PM, & Chaves, AR. 2002. Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage. Postharvest Biology and Technology 25:59–71.

Wang C, Zuo Y. 2011. Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. Food Chemistry 128: 562–568.

Wang L, Baldwin EA, Zhao W, Plotto A, Sun X, Wang Z, Brecht J, Bai J, Yu Z. 2015. Suppression of volatile production in tomato fruit exposed to chilling

temperature and alleviation of chilling injury by apre-chilling heat treatment. Food Science and Technology 62:115-121.

Weichmann J. 1987. Postharvest Physiology of vegetables. New York: Ed Marcel Decker. 597.

Whitaker BD. 1991. Changes in lipids of tomato fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. Phytochemistry 3: 757-761.

Willcox J, Catignani G, Lazarus S. 2003. Tomatoes and cardiovascular health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 43: 1–18.

Wills RBH, McGlasson WB, Graham D, Lee TH, Hall EG. 1989. Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit and vegetables. Hong Kong, China: BSP Professional Books, 174 p.

Wise RR, Naylor AW. 1987. Chilling-enhanced photophylls. Chilling-enhanced photooxidation the peroxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. Plant Physiology 83:272–277.

Yadegari L, Heidari R, Carapetian J, 2007. The influence of cold acclimation on proline, malondialdehyde (MDA), total protein and pigments contents insoybean (Glycine max) seedlings. Journal Biological Science 7: 1436–1441.

Yang J, Fu M, Zhao Y, Mao L. 2009. Reduction of chilling injury and ultraestructural damage in cherry tomato fruits after hot water treatment. Agricultural Science in China 8(3):304-310.

Yanishlieva N, Marinova E, Pokorny J. 2006. Natural antioxidant from herbs and spices. European Journal of Lipid Science and Technology 108:776-793.

Yun Z, Gao H, Liu P, Liu S, Luo T, Jin S, Xu Q, Xu J, Cheng Y, Deng X. 2013. Comparative proteomic and metabolomic profiling of citrus fruit with enhancement of disease resistance by postharvest heat treatment. BMC Plant Biology 13:44.

Zanfini A, Corbini G, Franchi G, Massarelli P, Dreassi E. 2017. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in five tomato (lycopersicon esculentum mill.) cultivars. Italian Journal of Food Science. 29: 90-99

Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. 2012. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. The Analyst 137: 293–300.

Zhang W, Jiang B, Li W, Song H, Yu Y, Chen J. 2009. Polyamines enhancechilling tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.) through modulating antioxidative system. Scientia Horticulturae 122: 200–208.

Zhao D, Shen L, Fan B, Yu M, Zheng Y, Lv Sa, Sheng J. 2009. Ethylene and cold participate in the regulation of LeCBF1 gene expression in postharvest tomato fruits. FEBS Letters 583: 3329–3334.

Zhao Z, Jiang W, Cao J, Zhao Y, Gu Y. 2006. Effect of cold-shock treatment on chilling injury in mango (Mangifera indica L. cv. 'Wacheng') fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture 86(14): 2458-2462.

ABREVIATURAS

DF	Daño por frío
TH	Tratamiento hidrotérmico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
EM	Espectrometría de masas
CG	Cromatografía de gases
ABTS	2,2´-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracilo
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
FAO	Organización para la Alimentación y Agricultura
SIAP	Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
CAT	Catalasa
GR	Glutatión reductasa
APX	Ascorbato peroxidasa
SOD	Superóxido dismutasa
BRs	Brasinoesteroides
MeJA	Metil jasmonato
RMN	Resonancia magnética nuclear
CE	Electroforesis capilar
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
DB	Base de datos
DAD	Detector de arrreglo de diodos
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
b.h.	Base húmeda
AG	Ácido gálico
ESI	Electroasperjado
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
TMSCl	Clorhidrato metilsilil
IE	Impacto de electrones

EAG	Equivalente de ácido gálico
PAL	Fenilalanina amonio liasa
UV	Ultravioleta
EI	Estándar Interno
Ac	Ácido
C	Control
ND	No detectado
tR	Tiempo de retención
Trat	Tratamiento
Tm	Temperatura de transición
AA	Actividad antioxidante
T	Temperatura