



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Biotecnología

Extracción de antioxidantes de genotipos nativos de achiote (*Bixa Orellana* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) mediante métodos no convencionales y determinación de su actividad funcional *in vitro* e *in vivo*

Tesis para la obtención del grado de
Doctor en Biotecnología

Presenta

M.Bt. Darío Rafael Gómez Linton

Directora

Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Asesores

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Marzo, 2020

**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además
cuenta con apoyo del mismo Consejo”**

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

Extracción de antioxidantes de genotipos nativos de achiote (*Bixa Orellana* L.) y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) mediante métodos no convencionales y determinación de su actividad funcional *in vitro* e *in vivo*

que presentó

Darío Rafael Gómez Linton

Comité Tutorial:

Director: Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Asesor: Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Asesor: Dr. Arturo Navarro Ocaña

Jurado:

Presidente: Dr. Silvestre de Jesús Alavez Espidio

Secretario: Dr. Arturo Navarro Ocaña

Vocal: Dra. Angélica Román Guerrero

Vocal: Dr. José Ramón Verde Calvo

“A la construcción del conocimiento”

“Si me ofrecieran una infinidad de deseos me bastaría con pedir uno solo, pues si pudiera pedir el saberlo toda, nada me sería imposible y todo me sería sencillo”

DRGL

“(La educación)... no es sólo para los jóvenes, ese es otro de los problemas de la educación, que se cree que es para los jóvenes y la gente piensa que la educación es algo que tiene un final y lo que es peor, que cuando la terminan es una suerte de rito de pasaje a la madurez...”

...-Yo terminé la escuela, ya no soy más un niño- y por eso, todo aquello que te recuerda la escuela como leer libros, tener ideas, hacer preguntas, son cosas de niños. Ahora ya eres un adulto, ya no haces ese tipo de cosas...

...Y todo niño sabe eso, todo niño sabe que por eso está la escuela, porque eres pequeño y eres débil, y de hecho si logran terminar o abandonar la escuela antes entonces será visto como un adulto...”

Fragmento de una entrevista realizada a Isaac Asimov por la BBC respecto a su opinión acerca del futuro de las educaci3n, sólo un pequeño recordatorio de que aprender debería ser parte permanente de la vida y no una etapa.

La realizaci3n de este trabajo de investigaci3n fue posible gracias al apoyo de las instituciones Universidad Aut3noma Metropolitana (UAM) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradecimientos especiales a los involucrados en el desarrollo del mismo, Dr. Arturo Navarro Ocaña y Dr. Silvestre Alavez, quienes compartieron conmigo parte de su conocimiento y que ayudaron a mejorar la calidad de este trabajo y a mejorarme a mí como investigador y como persona. Igualmente, agradezco de manera particular a la Dra. Laura Pérez por haber aceptado tomarme como alumno y por guiarme en esta etapa tan importante; por todo su apoyo, por el aprendizaje que tuve trabajando con ella, por su apoyo, por las oportunidad que me ha brindado y por la calidad humana que siempre nos demostró, a mis compañeros y a mí.

Finalmente, agradecimientos infinitos a las personas que formaron y forman todavía parte de mi entorno personal, mi familia y amigos; la etapa que ahora concluyo es una pequeña parte de la vida que ustedes me ayudan a construir todos los días.

Resumen

Los radicales libres (RL) son moléculas altamente reactivas, actuando como oxidantes en medios biológicos. La formación de RL y otras ERO es parte inevitable del metabolismo de los organismos aerobios y actualmente son parte integral para su correcto funcionamiento. El interés en su estudio se debe a su posible implicación en el desarrollo de algunas enfermedades crónico-degenerativas; en años recientes, también se incluye entre estas al envejecimiento. Debido a su importancia biológica, las ERO requieren de un control preciso y bien regulado, este control está dado por los sistemas antioxidantes endógenos y exógenos. Evidencia científica sugiere que intervenciones dietéticas capaces de aumentar los mecanismos de respuesta al estrés (ej. estrés oxidante) podrían ser eficaces para prevenir el desarrollo de enfermedades degenerativas y promover un envejecimiento más saludable. Esto se podría conseguir mediante el consumo de compuestos bioactivos presentes en plantas. Las semillas de achiote (*Bixa orellana*) contienen grandes cantidades de los carotenoides bixina y norbixina, además de ser la mayor fuente de δ -tocotrienol conocida. Por su parte, los frutos de jitomate (*Solanum lycopersicum*) de variedades rojas son ricos en licopeno, además de contener cantidades considerables de β -caroteno y ser una fuente rica de α -tocoferol. En este trabajo se estudiaron distintos métodos de obtención de extractos ricos en carotenoides y vitamina E de semillas de achiote y de frutos de jitomates nativos, con la finalidad de aprovechar estos materiales como fuente de compuestos bioactivos, pero utilizando métodos de extracción que disminuyan el impacto en el ambiente generado por este tipo de procesos. En línea con esto, y con la promoción de la salud de la población, se ensayaron solventes verdes para reemplazar a los solventes orgánicos comúnmente usados. Estos solventes verdes, además de ser biodegradables son más seguros para usuarios y consumidores. Adicionalmente, la funcionalidad de los extractos obtenidos se evaluó en el modelo de *Caenorhabditis elegans*, el cual es ampliamente utilizado con este fin. Dentro de los resultados se observó que la aplicación de sonicación por sonda es una herramienta que permite reducir el tiempo de extracción, la cantidad de solvente usado, y la cantidad de energía necesaria en comparación con los métodos de maceración, extracción con equipo Soxhlet o sonicación en baño, siendo así la tecnología más eficiente para la obtención de extractos de semillas de achiote, además de ser una tecnología sencilla de aplicar. Los solventes verdes que se probaron en este trabajo mostraron ser una opción viable para la obtención de los extractos funcionales, destacando al acetato de isopropilo. Para la obtención de extractos de jitomate, la aplicación de enzimas digestivas, en combinación

con la sonicación y el uso del solvente acetato de isopropilo generó los extractos con mayor actividad funcional a nivel *in vitro* y mayor contenido de compuestos funcionales. Los extractos así obtenidos, tanto de achiote como de jitomate, fueron probados en los nematodos. Se observó que los extractos fueron capaces de extender la vida del nematodo, así como incrementar su resistencia a estrés térmico, oxidante y por radiación UV en la cepa nativa de *C. elegans*. Estos efectos protectores no estuvieron relacionados con la disminución en la fertilidad ni con la restricción calórica. Además, en el caso de los extractos de achiote fueron dependientes de la vía de la insulina, pero independientes de la actividad de los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1. Estos resultados sugieren que el extracto de achiote puede modular la resistencia a estrés y la longevidad de manera directa, posiblemente evitando el daño oxidante debido a su alto contenido de carotenoides y vitamina E, pero también mediante la interacción con los mecanismos reguladores de la respuesta endógenos, como la vía de señalización de insulina. Los extractos de jitomate mostraron capacidad para extender la vida y la resistencia al estrés en la cepa nativa, en la mutante MEV-1 y en mutantes de la vía de insulina de *C. elegans*, sin embargo, no tuvieron el mismo efecto en mutantes de los factores de transcripción DAF-16, HSF-1 y SKN-1. Este comportamiento, principalmente lo ocurrido con las mutantes, fue contrario a lo que ocurrió con los extractos de achiote. A pesar de que los compuestos presentes en los extractos de cada tipo de material estudiado pertenecían a las mismas familias (carotenoides y vitamina E), los efectos que se presentaron en los gusano (efectos observados en la cepa nativa) parecen estar mediados por distintos mecanismos entre sí (según los resultados observados en las pruebas sobre mutantes del nematodo). Estos resultados son interesantes debido a que en la literatura hay mucha información sobre la actividad antioxidante de carotenoides y vitamina E, sin embargo esta es mucho más relacionada con su actividad directa como neutralizadores de radicales libres que con su capacidad para modular las vías de señalización de respuesta a estrés. De esta forma, se aportaron evidencias de la capacidad de los extractos de achiote y jitomate nativo para reforzar las respuestas antiestrés del nematodo *C. elegans*; debido a la similitud inter-especie en las vías de señalización que intervienen en estos mecanismos de respuesta, es posible pensar que los resultados presentados en *C. elegans* pueden ser relevantes para mamíferos e incluso para seres humanos, con lo que se podría dar un nuevo uso a estos productos sub-valorados en nuestro país, además del efecto positivo que podría llegar a tener en la salud de la población.

Abstract

Free radicals (FR) are highly reactive molecules, acting as oxidants in biological medium. The formation of FR and other ROS is an inevitable part of the metabolism of aerobic organisms and is actually an integral part of their functioning. The interest in its study is due to its possible participation in the development of some degenerative diseases; in recent years, aging is also included among these. Due to their biological importance, ROS require precise and well regulated controls, these controls are given by endogenous and exogenous antioxidant systems. Scientific evidence suggests that dietary interventions that increase stress response mechanisms (eg oxidative stress) could effectively prevent the development of degenerative diseases and promote healthier aging. This could be achieved by consuming plants bioactive compounds. Annatto seeds (*Bixa orellana*) contain high amounts of carotenoids bixin and norbixin, in addition to being the major source of δ -tocotrienol known. On the other hand, the tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits of red varieties are rich in lycopene, besides, contain considerable amounts of β -carotene and highly quantities of α -tocopherol. In this work, different methods of obtaining extracts rich in carotenoids and vitamin E from achiote seeds and native tomatoes fruits were studied in order to take advantage of these materials as sources of bioactive compounds, using environmentally friendly extraction methods. In line with this, and with the population health promotion, green solvents were tested to replace commonly used organic solvents. These green solvents, in addition to being biodegradable, are safer for users and consumers. The functionality of the extracts obtained was evaluated in the *Caenorhabditis elegans* model, which is widely used for this purpose. Within the results, it was observed that the application of probe sonication is a tool that allows reducing the extraction time, the amount of solvent used, and the amount of energy needed, comparing to the methods of maceration, extraction with Soxhlet equipment or bath sonication, being the most efficient technology for obtaining the extracts, as well as being simple to apply. The green solvents that were tested in this work proved to be a viable option for obtaining functional extracts, highlighting isopropyl acetate. In order to obtain tomato extracts, the application of digestive enzymes, in combination with probe sonication and the use of isopropyl acetate as solvent, generated extracts with the greatest functional activity at *in vitro* level and highest content of functional compounds. The extracts thus obtained, both from achiote and tomato, were tested in the nematodes. It was observed that the extracts were able to extend the life of the nematode, as well as increase its resistance to thermal stress, oxidant and UV radiation stress in the native strain of *C. elegans*. These protective

effects were not related to decrease in fertility or caloric restriction. In addition, in the case of achiote extracts, they were dependent on the insulin pathway, but independent of the activity of the transcription factors DAF-16, HSF-1 and SKN-1. These results suggest that achiote extract can modulate stress resistance and longevity directly, possibly avoiding oxidative damage due to its high content of carotenoids and vitamin E, but also through interaction with endogenous response regulatory mechanisms, such as the insulin signaling pathway. Tomato extracts showed the ability to extend life and stress resistance in the native strain, in the MEV-1 mutant and in mutants of the insulin pathway; however, they did not had the same effect in DAF-16, HSF-1 and SKN-1 mutants. This behavior, mainly that happened with the mutants, was contrary to what happened with the achiote extracts. Although the compounds present in the extracts of each type of material studied belonged to the same families (carotenoids and vitamin E), the effects that conducted in the worm (in native strain) seem to be mediated by different mechanisms each other (seem in mutants). These results are interesting because in the literature there is much information about the antioxidant activity of carotenoids and vitamin E, however, this activity is related to its direct activity as free radical neutralizers, and rarely to its ability to modulate anti-stress signaling pathways. In this way, evidence was provided of the ability of the extracts of achiote and native tomato to increase the anti-stress responses of the *C. elegans* nematode. Due to the inter-species similarity in the signaling pathways involved in the effects, it is possible to think that the results presented in *C. elegans* may be relevant for mammals and even for humans, which could give a new use these undervalued products in our country, in addition to the positive effect that could have on the health of the population.

Contenido

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Radicales libres y ERO..... | 1 |
| 1.2 Generación de ERO en organismos aerobios | 2 |
| 1.3 ERO como moléculas de señalización..... | 3 |
| 1.4 Modificación de biomoléculas por ERO..... | 4 |
| 1.4.1 Modificación de proteínas | 4 |
| 1.4.2 Modificación de lípidos..... | 5 |
| 1.4.3 Modificación de ácidos nucleicos | 7 |
| 1.4.4 Participación de ERO en enfermedades crónico-degenerativas y envejecimiento | 7 |
| 1.5 Mecanismos de defensa antioxidante | 9 |
| 1.5.1 Mecanismos de defensa enzimáticos | 10 |
| 1.5.2 Mecanismos de defensa no enzimáticos | 13 |
| 1.6 Achiote y Jitomate como fuentes de compuestos funcionales..... | 21 |
| 1.7 Extracción de compuestos funcionales | 25 |
| 1.8 Determinación de la actividad antioxidante | 29 |
| 1.8.1 Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> | 30 |
| 1.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vivo</i> | 33 |
| 2. Justificación | 36 |
| 3. Hipótesis | 38 |
| 4. Objetivos | 38 |
| 4.1 General..... | 38 |
| 4.2 Particulares..... | 38 |
| 5. Materiales y Métodos | 39 |
| 5.1 Achiote y jitomate..... | 39 |
| 5.2 Obtención de extractos..... | 39 |
| 5.2.1 Extractos de achiote | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2.2 Extractos de jitomate | 43 |
| 5.3 Caracterización de los extractos de achiote y jitomate | 44 |
| 5.3.1. Determinación del contenido de polifenoles totales..... | 44 |
| 5.3.2 Determinación de carotenoides totales por espectrofotometría | 45 |
| 5.3.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS | 45 |
| 5.3.4 Cuantificación de carotenoides por HPLC | 46 |
| 5.3.5 Cuantificación de tococromanos mediante HPLC..... | 46 |
| 5.4 Evaluación de la actividad funcional <i>in vivo</i> de los extractos de achiote y jitomate en el modelo <i>C. elegans</i> | 46 |
| 5.4.1 Cepas y mantenimiento de los nematodos | 47 |
| 5.4.2 Efecto de los extractos en la curva de sobrevivencia | 47 |
| 5.4.3 Efecto de los extractos sobre la tolerancia a estrés..... | 47 |
| 5.4.4 Efecto de los extractos sobre la fertilidad..... | 48 |
| 5.5 Análisis estadístico..... | 48 |
| 6. Resultados y discusión de resultados..... | 51 |
| 6.1 Extractos de achiote..... | 51 |
| 6.1.1 Obtención de extractos de seis accesiones de achiote mediante métodos convencionales | 51 |
| 6.1.2 Extractos obtenidos por sonicación en baño..... | 57 |
| 6.1.3 Obtención de extractos de achiote con el método convencional de referencia aplicando un diseño Taguchi | 63 |
| 6.1.4 Obtención de extractos mediante sonicación con sonda | 70 |
| 6.1.5 Determinación de bixina y δ -tocotrienol en extractos de la accesión 42 obtenidos mediante espectrofotometría y HPLC..... | 73 |
| 6.1.6 Medición del efecto de los extractos de achiote sobre <i>C. elegans</i> | 75 |
| 6.2 Extractos de jitomate..... | 83 |
| 6.2.1 Experimento factorial. Enzimas y medio de reacción enzimática | 83 |
| 6.2.2 Experimento factorial fraccionado. Condiciones de reacción enzimática..... | 86 |
| 6.2.3 Experimento factorial fraccionado. Combinación de métodos no convencionales | 89 |
| 6.2.4 Determinación del contenido de carotenoides y tocoferoles por HPLC | 92 |
| 6.2.5 Efecto del extracto de jitomate en la resistencia a estrés y en la sobrevivencia del nematodo <i>C. elegans</i> | 95 |

| | |
|-----------------------------|------------|
| 7. Conclusiones..... | 101 |
| 8. Referencias..... | 103 |

Índice de Cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1.- Principales ERO y sus características..... | 1 |
| Cuadro 2. Condiciones de sonicación en baño para obtener extractos de achiote usa DCM como solvente..... | 58 |
| Cuadro 3. Factores y niveles analizados en el diseño Taguchi..... | 63 |
| Cuadro 4. Arreglo de las corridas experimentales del diseño Taguchi..... | 64 |
| Cuadro 5. Niveles óptimos para la obtención de bixina..... | 67 |
| Cuadro 6. Niveles óptimos para la actividad antioxidante..... | 69 |
| Cuadro 7. Condiciones para la sonicación con sonda para obtener extractos de semillas de achiote usando AIP..... | 71 |
| Cuadro 8. Contenido de bixina y actividad antioxidante en extractos de achiote obtenidos por sonicación de sonda con y sin enfriamiento..... | 72 |
| Cuadro 9. Contenido de bixina y de δ -tocotrienol determinados por HPLC y actividad antioxidante de extractos de achiote de la accesión 42 obtenidos mediante métodos convencionales y por sonicación con sonicación..... | 74 |
| Cuadro 10.- Enzimas probadas para la extracción de compuestos funcionales de jitomate..... | 83 |
| Cuadro 11.- Factores y niveles evaluados del diseño factorial..... | 83 |
| Cuadro 12.- Análisis de Varianza para carotenoides y actividad antioxidante..... | 85 |
| Cuadro 13.- Factores y niveles estudiados para la reacción enzimática..... | 86 |
| Cuadro 14. Arreglo del diseño factorial fraccionado, reacción enzimática..... | 86 |
| Cuadro 15.- Niveles óptimos para los factores del experimento de condiciones de reacción enzimática..... | 88 |
| Cuadro 16.- Factores estudiados en la combinación de métodos de extracción no convencionales..... | 89 |
| Cuadro 17.- Arreglo del diseño factorial fraccionado, combinación de métodos de extracción..... | 89 |
| Cuadro 18.- Niveles óptimos para los cuatro factores estudiados en el experimento de combinación de métodos no convencionales..... | 91 |
| Cuadro 19.- Contenido de carotenoides en los extractos de jitomates nativos..... | 93 |
| Cuadro 20. Contenido de tocoferoles en los extractos de jitomates nativos..... | 93 |
| Cuadro 21. Correlaciones entre los distintos compuestos de interés y la actividad antioxidante..... | 94 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Reacciones que conducen a la formación de RL y ERO..... | 3 |
| Figura 2. Reacciones durante la oxidación de lípidos..... | 6 |
| Figura 3. Clasificación de los antioxidantes..... | 9 |
| Figura 4. Sitios de acción de los sistemas antioxidantes dentro de la célula..... | 10 |
| Figura 5. Actividad de las enzimas antioxidantes. a) Esquema resumido b) diagrama en la célula..... | 11 |
| Figura 6. Ciclo ascorbato-glutatión..... | 12 |
| Figura 7. Conversión de los compuestos ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico..... | 14 |
| Figura 8. Estructura química de los tococromanos..... | 14 |
| Figura 9. Estructura de carotenoides | 15 |
| Figura 10. Estructuras químicas de los flavonoides..... | 18 |
| Figura 11. a) Ácido benzoico y b) ácido cumárico..... | 18 |
| Figura 12. Estructura del resveratrol..... | 19 |
| Figura 13. Estructura del matairesinol (lignina)..... | 19 |
| Figura 14. a) Árbol, b) frutos y c) semillas de achiote..... | 21 |
| Figura 15. Estructura química trans- de bixina y norbixina..... | 22 |
| Figura 16. Estructura química del δ -tocotrienol..... | 22 |
| Figura 17. a) Plantación de jitomate comercial, b) frutos de jitomates nativo tipo arriñonado..... | 23 |
| Figura 18. Ejemplos de guías de selección e solventes verdes..... | 26 |
| Figura 19.- a) Equipo de sonicación por sonda para flujo continuo, b) acercamiento al tratamiento por sonicación, c) equipo para extracción por microondas..... | 27 |
| Figura 20. Reacción de neutralización del radical DPPH..... | 30 |
| Figura 21. Reacción de neutralización del radical ABTS..... | 31 |
| Figura 22. Complejo neocuproína-cobre utilizado en el método CUPRAC..... | 31 |
| Figura 23. Vista al microscopio del nematodo <i>C. elegans</i> | 33 |
| Figura 24. Ciclo de vida del nematodo <i>C. elegans</i> | 34 |
| Figura 25. a) Contenido de bixina en los extractos de las distintas accesiones de achiote estudiadas obtenidos por el método de referencia o con reflujo en equipo | |

| | |
|---|----|
| Soxhlet (42 S y E S); b) Contenido de norbixina en los extractos de las distintas accesiones de achiote estudiadas obtenidos por agitación..... | 51 |
| Figura 26. Cuantificación de los compuestos polifenólicos totales en las distintas accesiones estudiadas..... | 53 |
| Figura 27. Espectro de absorción representativo de los extractos de achiote obtenidos con el método de referencia..... | 54 |
| Figura 28. Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos de achiote a) extracto hidrofílico y b) extracto hidrofóbico medidos por tres métodos diferentes..... | 55 |
| Figura 29. Actividad antioxidante determinada mediante el método del radical ABTS en extractos a) hidrofílicos y b) hidrofóbicos de achiote..... | 56 |
| Figura 30. a) Contenido de bixina y b) contenido de norbixina en extractos obtenidos por agitación (barras oscuras) y por sonicación (barras claras) de las distintas accesiones de achiote..... | 59 |
| Figura 31. Contenido de compuestos polifenólicos totales presentes en semillas de achiote de distintas accesiones extraídas mediante agitación (barras oscuras) y mediante sonicación (barras claras)..... | 60 |
| Figura 32. Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS de extractos obtenidos mediante agitación (barras oscuras) y mediante sonicación en baño (barras claras). a) Fracciones hidrofílicas y b) fracciones hidrofóbicas..... | 61 |
| Figura 33. Contenido de bixina y Actividad antioxidante de los extractos de achiote obtenidos por sonicación en baño usando DCM y solventes verdes..... | 62 |
| Figura 34. Valores de a) bixina y b) actividad antioxidante en extractos de semillas de achiotes obtenidos mediante agitación aplicando el diseño Taguchi..... | 66 |
| Figura 35. Diagrama de Pareto para el contenido de bixina en los extractos obtenidos con el diseño Taguchi..... | 66 |
| Figura 36. Efecto de los factores y niveles analizados en el diseño Taguchi sobre el contenido de bixina en los extractos de achiote de las accesiones E y YUC..... | 67 |
| Figura 37. Diagrama de Pareto para la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con el diseño Taguchi..... | 68 |
| Figura 38. Efecto de los factores y niveles analizados en el diseño Taguchi sobre la actividad antioxidante en los extractos de achiote de las accesiones E y YUC..... | 69 |
| Figura 39. Efecto de tres concentraciones de extracto de achiote en la sobrevivencia de <i>C. elegans</i> cepa N2. a) Curvas de Kaplan-Meier, b) Efecto del extracto de achiote (0-170 µg/mL) en la vida media y máxima de las poblaciones de N2..... | 75 |

| | |
|--|----|
| Figura 40. Respuesta de la cepa nativa a a) estrés oxidante b) estrés térmico y c) estrés UV después del tratamiento con extracto de achiote..... | 77 |
| Figura 41. Efecto del extracto de achiote a concentraciones de 60 y 170 µg/mL en: a) tasa de reproducción y b) tamaño total de la progenie en la cepa N2 de <i>C. elegans</i> | 78 |
| Figura 42. Respuesta de la cepa N2 a a) estrés oxidante y UVC b) estrés térmico después de aplicar los tratamientos de bixina (Bix, 30 µg/mL), δ-tocotrienol (d-T3, 10 µg/mL) o de su mezcla (Bix+d-T3)..... | 79 |
| Figura 43. Efecto del extracto de achiote en el periodo de vida de cepas mutantes de <i>C. elegans</i> | 81 |
| Figura 44. Efecto de 100 µg/mL de extracto de achiote sobre la resistencia a a) estrés oxidante y b) térmico en mutantes de <i>C. elegans</i> | 82 |
| Figura 45. Contenido de carotenoides (A y C) y Actividad antioxidante (B y D) en extractos de jitomate comercial obtenidos empleando distintos cocteles enzimáticos y diferentes medios de reacción..... | 84 |
| Figura 46. a) Contenido de carotenoides y b) Actividad antioxidante en extractos de jitomate aplicando cocteles enzimáticos y distintos medios de reacción..... | 85 |
| Figura 47. a) Contenido de carotenoides y b) Actividad antioxidante de extractos obtenidos en distintas condiciones de reacción enzimática..... | 87 |
| Figura 48. Diagrama de Pareto del experimento de reacción enzimática..... | 87 |
| Figura 49. a) Contenido de carotenoides y b) Actividad antioxidante en extractos de jitomates nativos obtenidos con la aplicación de enzimas digestivas y sonicación, según un diseño factorial fraccionado del tipo 2^{4-1} | 90 |
| Figura 50. Diagramas de Pareto para a) el contenido de carotenoides y para b) la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante la aplicación de enzimas digestivas y sonicación según el diseño factorial fraccionado..... | 91 |
| Figura 51. Efecto del extracto de jitomate a distintas concentraciones en el a) estrés oxidante y b) estrés térmico..... | 95 |
| Figura 52. Efecto del extracto de jitomate sobre a) la tasa de reproducción y b) la cantidad total de larvas producidas por los nematodos..... | 96 |
| Figura 53. Efecto del extracto de jitomate sobre la curva de sobrevivencia de la cepa nativa..... | 96 |
| Figura 54. Resistencia a estrés oxidante inducido por H ₂ O ₂ de las mutantes de <i>C. elegans</i> con tratamiento control y tratamiento de 450 µg/mL de extracto de jitomate..... | 97 |
| Figura 55. Resistencia a estrés térmico de las mutantes de <i>C. elegans</i> con el tratamiento control y con extracto de jitomate en concentración de 450 µg/mL..... | 99 |

| | |
|---|-----|
| Figura 56. Curvas de sobrevivencia, vida media y vida máxima para las mutantes, tratamiento control y 450 µg/mL de extracto de jitomate. | 100 |
| Diagrama 1.- Métodos y pruebas empleados para el estudio de las semillas de achiote y sus propiedades..... | 49 |
| Diagrama 2.- Métodos y pruebas empleados para el estudio de los frutos de jitomate y sus propiedades..... | 50 |

1. Introducción

1.1 Radicales libres y ERO

La historia de los radicales libres (RL) como intermediarios de reacciones químicas se inicia con los experimentos realizados por Gomberg en 1900, cuando logró obtener el radical trifenil-metilo en solución; a partir de entonces se comenzaron a estudiar una gran variedad de reacciones químicas que involucraban la formación de RL con un gran impulso en la etapa de la Segunda Guerra Mundial, donde se utilizaban estas reacciones para la producción de polímeros (Konigsberg, 2008).

Los RL son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, es decir que no tienen pareja con spin opuesto que lo estabilice. Debido a esto son altamente reactivos actuando como oxidantes (capturando electrones) en medios biológicos (Halliwell, 2011 ; Caroch y Ferreira, 2013).

La formación de RL es parte del metabolismo aerobio, siendo las mitocondrias (y cloroplastos en plantas) el principal sitio de formación de RL y las especies reactivas de oxígeno (ERO, que además de RL incluyen precursores de estos) las más abundantes, aunque también existen especies reactivas de nitrógeno (ERN) y de azufre (ERA) (Hekimi et al., 2011). En el cuadro 1 se presentan las características de las ERO más importantes. Estas especies reactivas tienen una vida media muy corta (fracciones de segundo) debido a su alta reactividad.

Cuadro 1.- Principales ERO y sus características.

| ERO | Nombre | Características |
|------------------------|-----------------------|---|
| $\cdot\text{O}_2$ | Superóxido | Es muy reactivo en medio hidrofílico, pero no puede atravesar libremente las membranas; puede transformarse en H_2O_2 |
| $\cdot\text{OH}$ | Hidroxilo | Es el más reactivo, se ha relacionado con el daño sufrido directamente en ADN, proteínas y lípidos. |
| H_2O_2 | Peróxido de hidrógeno | No es un radical, pero puede generarlos al estar en contacto con metales como el hierro y el cobre; también produce oxidación. |
| $\text{ONOO}\cdot$ | Peroxinitrito | Se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico, se le relaciona con varias patologías. |
| $^1\text{O}_2$ | Oxígeno singulete | Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido y durante la lipoperoxidación. |

En condiciones basales, la vida media del $O_2\cdot$ mitocondrial es 10^{-4} s, del $O_2\cdot$ citosólico 10^{-3} s, del H_2O_2 0.1 s, del $\cdot OH$ 10^{-9} s y del 1O_2 10^{-6} s. Las ERO más abundantes en las mitocondrias son el $O_2\cdot$ y el H_2O_2 , con concentraciones de 1×10^{-10} y 5×10^{-9} M, respectivamente. Si estas concentraciones se incrementan se favorece la generación del radical hidroxilo ($HO\cdot$), que es el más dañino para las biomoléculas y las células en general (Konigsberg, 2008; Carocho y Ferreira, 2013).

El interés por los RL se ha visto incrementado de manera importante durante las últimas décadas, debido a su posible implicación en algunas enfermedades crónico-degenerativas que en la actualidad representan las principales enfermedades que son causas de mortalidad principalmente en países occidentales, tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares (Rodríguez y Sastre, 1999). Son tres grandes factores relacionados a los RL los que influyen en la salud, la primera es su formación, la segunda son los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), y la tercera son metales de transición que funcionan como los co-factores de enzimas. La comprensión de estos tres factores podría ayudar a prevenir o reducir la incidencia de un gran número de padecimientos, disminuir los costos en salud pública por su tratamiento y mejorar la calidad de vida de las personas (Carocho y Ferreira, 2013).

1.2 Generación de ERO en organismos aerobios

La aparición de los organismos fotosintéticos produjo un aumento en la concentración de oxígeno en la atmósfera (hasta alcanzar el 21% actual) e hizo necesario que los organismos adquirieran la capacidad de sobrevivir en estas condiciones, llegando incluso a involucrarlo en su metabolismo; sin embargo, su participación llevó a la formación de ERO como parte inevitable del mismo.

En las células de los organismos, las ERO se producen en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, en cloroplastos (en plantas), en peroxisomas en el metabolismo de ácidos grasos, en el retículo endoplásmico (complejo citocromo P_{450}) durante el metabolismo de xenobióticos, por la NADPH oxidasa membranal, así como por otras reacciones enzimáticas como la de la xantina oxidasa en la degradación de purinas (Carocho y Ferreira, 2013). En estas reacciones se generan principalmente $O_2\cdot$ y H_2O_2 (Fig 1). Mientras que los procesos oxidantes en las mitocondrias de las células generalmente dan lugar a la transferencia de electrones al O_2 para formar agua sin liberación de intermediarios, inevitablemente se forma un pequeño número de RL;

aproximadamente el 0.5% de los electrones que se transfieren durante la cadena respiratoria terminan en la formación de RL. En los peroxisomas se oxidan los ácidos grasos y otros compuestos por transferencia de electrones desde el FADH_2 al O_2 con formación de peróxido de hidrógeno, el cual se convierte fácilmente en radical hidroxilo. El sistema del citocromo P_{450} localizado en el retículo endoplasmático también puede producir ERO (Konigsberg, 2008); este sistema es encargado de metabolizar compuestos extraños al organismo tales como contaminantes, medicamentos, etc. Lo que hace el sistema es modificar a los compuestos mediante reacciones de hidroxilación para volverlos más solubles, favoreciendo con ello su eliminación, aunque en ocasiones, como al metabolizar el H_2O_2 , produce especies más tóxicas (en este caso el $\text{O}_2\cdot^-$) (Crespo, 2006).

El cobre y hierro son importantes en la formación de ERO, debido a su capacidad para aceptar o donar electrones, lo que los hace elementos prooxidantes; al interactuar con el $\cdot\text{O}_2$ o el H_2O_2 generan $^1\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$ (Konigsberg, 2008; Caroch y Ferreira, 2013).

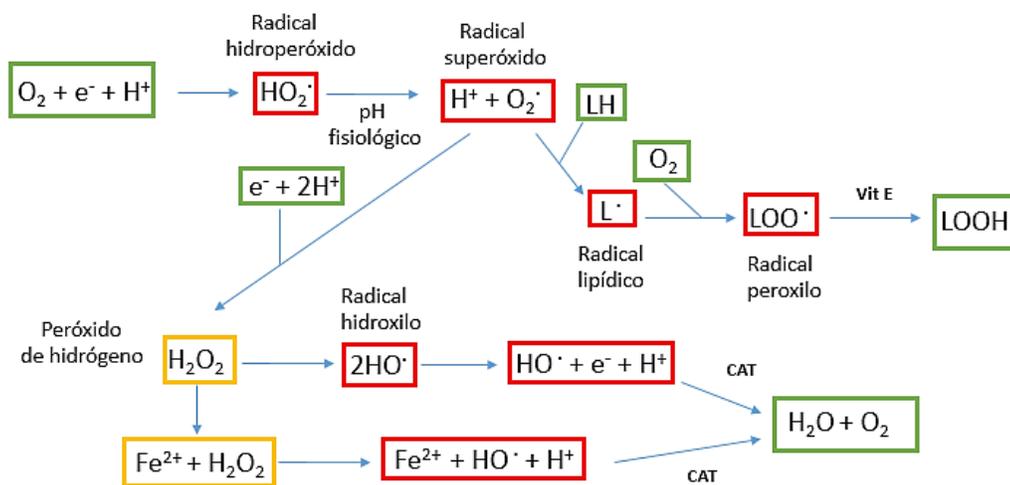


Figura 1. Reacciones que conducen a la formación de RL y ERO.

1.3 ERO como moléculas de señalización

La presencia de los ERO en la actualidad no es sólo natural sino necesaria en los organismos para promover ciertas respuestas celulares; en años recientes se ha reportado que en concentraciones adecuadas, las ERO funcionan como moléculas de

señalización, desencadenando procesos como la fosforilación de proteínas, la activación de factores de transcripción, la proliferación y diferenciación celular, la apoptosis, la maduración de homocigotos, la inmunidad celular y las defensas contra microorganismos (Konigsberg, 2008; Hekimi et al., 2011; Rajendran et al., 2014). Se ha propuesto a las proteínas ricas en grupos tiol (-SH) de residuos de cisteína como las responsables de censar la presencia de ERO debido a que estos grupos son fácilmente oxidables y sufren transiciones tiol-disulfuro, que llevan a cambios conformacionales que las activan o que las inhiben (Konigsberg, 2008).

Como ejemplos, entre los factores de transcripción activados por ERO en mamíferos se encuentran el NF- κ B que regula la transcripción de genes para citosinas, factores de crecimiento, receptores inmunológicos, moléculas de adhesión, proteínas antiapoptóticas y el Nrf2, un factor de transcripción que ha cobrado gran importancia en los últimos años por su capacidad para regular la expresión de diversas proteínas con función antioxidante y detoxificante, teniendo importancia en la carcinogénesis, la respuesta inflamatoria y neuroprotección entre otros procesos (Konigsberg, 2008). En plantas, las ERO generadas por la NADPH oxidasa promueven la entrada de calcio a la célula, induciendo el crecimiento de raíces (Foreman et al., 2003; Swanson y Gilroy, 2010).

1.4 Modificación de biomoléculas por ERO

Los RL y ERO al acumularse producen oxidación en distintas biomoléculas, entre las que figuran las proteínas como las más propensas a sufrir modificaciones por ser las más abundantes en los seres vivos, además de lípidos y ácidos nucleicos (Hekimi et al., 2011). Recientemente se ha prestado gran interés a este fenómeno y los sistemas antioxidantes como reguladores celulares, debido a su participación en el desarrollo de un gran número de enfermedades degenerativas (Ciešlik et al., 2006; Helmja et al., 2008; Preedy, 2014). Se cree que la modificación de biomoléculas está implicada en la relación del daño oxidante con las enfermedades degenerativas, aunque podría no ser la única conexión entre ellos.

1.4.1 Modificación de proteínas

Debido a que las proteínas son las moléculas más abundantes y diversas en cualquier sistema biológico, son las más afectadas por los RL; sin embargo, su modificación suele tener poco impacto en la célula al corto plazo debido a que estas moléculas están sometidas a mecanismos rápidos de reparación y degradación, que incluso pueden verse

estimulados por la presencia de un ambiente oxidante (Konigsberg, 2008). Es en el largo plazo donde se pueden formar agregados proteicos insolubles resistentes a la degradación, que participan en el desarrollo de enfermedades cardiacas y neurodegenerativas (Alavez y Lithgow, 2011).

El radical hidroxilo es muy reactivo con las proteínas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos; en particular ataca a la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína, formando entrecruzamientos e induce la fragmentación (de Teresa-Galván et al., 2008). Diversas reacciones de oxidación pueden convertir algunos residuos de aminoácidos, como la prolina, arginina y lisina a derivados con grupos carbonilo (González et al., 2000; de Teresa-Galván et al., 2008). La presencia de este grupo químico se ha utilizado para determinar el nivel de oxidación en proteínas (Clancy y Birdsall, 2013). De esta manera, se ha estimado que 2 nM de grupos carbonilo en personas jóvenes representa un daño de 10% del total de las proteínas celulares, mientras que en ancianos este porcentaje se duplica o triplica (González et al., 2000; Stadtman y Levine, 2000).

Cabe señalar que, mientras más avanzada sea la edad del individuo, la eficacia de los sistemas de reparación y degradación de proteínas disminuye, con la consecuente formación y acumulación de proteínas entrecruzadas y agregadas, que son características de enfermedades relacionadas con el envejecimiento (Finkel y Holbrook, 2000; Konigsberg, 2008).

1.4.2 Modificación de lípidos

Los lípidos tienen el segundo lugar como las biomoléculas más frecuentemente afectadas por los RL. La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones en la permeabilidad o la pérdida de la integridad de las membranas (Pisoschi y Pop, 2015). Los fosfolípidos, principalmente poliinsaturados, presentes en las membranas plasmáticas y de organelos son propensos a sufrir peroxidación lipídica, una reacción de RL en cadena iniciada por el radical hidroxilo (Fig 2). Los radicales lipídicos resultantes sufren un rearrreglo de dieno conjugado, el cual reacciona con oxígeno molecular para formar radicales peróxido-lipídicos junto con malondialdehídos e hidroperóxidos. Estos compuestos pueden reaccionar con metales de transición como el cobre y el hierro y formar nuevos radicales hidroxilo, en un fenómeno de expansión en la etapa denominada propagación. Durante estos procesos, denominados en conjunto lipoperoxidación, se

forman otros compuestos no radicales, principalmente hidroxialquenos, que pueden fácilmente reaccionar con el ADN, inhiben la transcripción de ARN y la síntesis de proteínas e impiden la reparación del ADN; además se pueden unir al glutatión disminuyendo su actividad protectora (González et al., 2000; Birben et al., 2012). Los lípidos son a menudo blanco de las ERO porque muchas de las enzimas que las producen están integradas en las bicapas lipídicas y porque el enlace C–H bis alílico en los ácidos grasos poliinsaturados es relativamente inestable en comparación con otros enlaces C–H (Traber y Stevens, 2011).

Una consecuencia de esta oxidación se observa en las “manchas de la edad” en las personas ancianas. Estas aparecen por la presencia del pigmento lipofusina que se cree es una mezcla de lípidos entrecruzados y productos de la peroxidación. Además, una consecuencia más grave debido a alteración de la permeabilidad de las membranas es la acumulación de iones dentro de la célula produciendo inflamación y llegando a desencadenar apoptosis (González et al., 2000; Devlin, 2004).

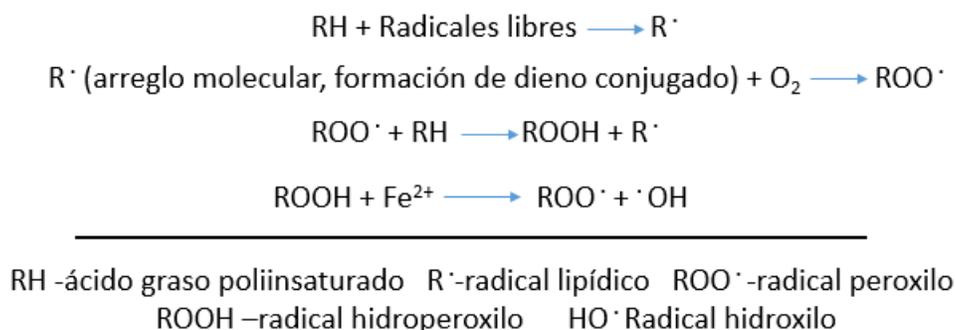


Figura 2. Reacciones durante la oxidación de lípidos. Adaptado de González et al., 2000.

Además de los lípidos de las membranas, los RL pueden afectar los lípidos que se encuentran en el citoplasma, como las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Su oxidación presenta las mismas características generales descritas en los procesos que ocurren en los lípidos de las membranas (Pérez-Guerra, 2007). Los ácidos grasos presentes en las LDL pueden originar peróxidos, hidropéroxidos, productos similares a las prostaglandinas (isoprostanos), aldehídos e hidrocarburos; también se pueden originar productos de oxidación del colesterol, la lisofosfatidilcolina y otros productos de oxidantes de los fosfolípidos (Carvajal-Carvajal, 2015). Todas estas están relacionadas con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares degenerativas como la aterosclerosis (Pérez-Guerra, 2007).

1.4.3 Modificación de ácidos nucleicos

Finalmente, las modificaciones realizadas en el ADN por las ERO tienen el mayor potencial de ser graves o fatales, por sus implicaciones en el funcionamiento celular. Dichas modificaciones se presentan por la reacción de las ERO con las bases nitrogenadas y/o con la desoxirribosa (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). El daño por el radical HO· a bases nitrogenadas puede generar mutaciones que modifican el reconocimiento de los factores de transcripción, alterando la expresión génica y pueden causar carcinogénesis, apoptosis, necrosis y enfermedades hereditarias (Konigsberg, 2008). La desoxirribosa, al oxidarse produce el rompimiento del enlace azúcar-fosfato, provocando la ruptura de la cadena sencilla, esta afectación puede repararse por enzimas ligasas; una ruptura de la doble cadena podría implicar un daño irreparable al ADN (González et al., 2000; Crespo, 2006).

La molécula más utilizada como referente para conocer el nivel de oxidación del ADN es la 8-hidroxidesoxiguanosina que se deriva de la modificación de la guanosina por el radical HO·. Una molécula similar, la 8-hidroxiguanosina es usada para conocer la oxidación del ARN. La razón de que este indicador sea utilizado es que la guanosina presenta el potencial de ionización más bajo, por lo que es más fácilmente afectada por las ERO (Konigsberg, 2008). Es conocido que el ARN es oxidado más frecuentemente debido a que está presente en zonas más cercanas a la generación de los ERO (Pisoschi y Pop, 2015). De la misma forma, el ADN mitocondrial es más susceptible a ser modificado que el ADN nuclear (Devlin, 2004). Se calcula que el número de ataques de ERO sobre el ADN por célula por día en humanos es cercano a 10 mil, siendo el radical hidroxilo el único que ha demostrado alterar los ácidos nucleicos (Crespo, 2006).

1.4.4 Participación de ERO en enfermedades crónico-degenerativas y envejecimiento

La acumulación de ERO se ha relacionado con una gran cantidad de enfermedades entre las que se pueden mencionar Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, pérdida de la memoria, diabetes tipo II, depresión, enfermedades cardiovasculares, desordenes pulmonares e incluso enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide y enfermedades renales, desarrollo de tumores, cáncer y recientemente se incluye en esta lista al envejecimiento (Rajendran et al., 2014).

El proceso de envejecimiento se puede definir como la acumulación de daños en los organismos vivos hasta un punto crítico en que conducen al organismo a su colapso final (Argyropoulou et al., 2013). Estos daños no reparados en conjunto llevan a la disminución en las funciones fisiológicas y de la capacidad de respuesta a estrés, lo que conduce a la aparición de fragilidad, enfermedades y finalmente la muerte (Preedy, 2014). Entre las reacciones que conducen a la acumulación de daños, las reacciones de RL y otras ERO así como errores aleatorios en el procesamiento de ácido nucleicos son las principales causas (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2014).

Algunos experimentos realizados con células humanas en cultivo han comprobado que los fibroblastos diploides presentan una sobrevivencia extendida cuando se cultivan en condiciones de bajo nivel de oxígeno; en contraste, cuando se les cultiva en altas concentraciones de oxígeno la sobrevivencia disminuye, interviniendo procesos de aceleramiento de senescencia de las células. Resultados similares se han observado cuando las células son expuestas a concentraciones no letales de peróxido de hidrógeno (Finkel y Holbrook, 2000). Estos resultados indican que la presencia de oxígeno y peróxido de hidrógeno en concentraciones elevadas aceleran los procesos que llevan a la senescencia y muerte celular.

Se ha postulado la hipótesis de que el envejecimiento y la oxidación causada por las ERO están altamente relacionados, aunque no se ha comprobado una relación causa-efecto entre ellos (Hekimi et al., 2011). Muchos estudios han mostrado una tendencia de acumulación de daño oxidante en organismos envejecidos en comparación con organismos jóvenes, y lo que es más, diversos mecanismos que han mostrado prolongar la vida de organismos modelos, presumiblemente retrasando el proceso de envejecimiento, han mostrado incrementar su resistencia a distintos tipos de estrés, entre los que destacan el estrés oxidante y el estrés térmico (Ristow y Schmeisser, 2011; Kim et al., 2014; Moreno-Arriola et al., 2014). En general, los mecanismos de respuesta a estos dos tipos de estrés están relacionados y comparten algunos intermediarios posiblemente porque el cambio de conformación producida por calor en ciertas proteínas podría promover el incremento en la generación de ERO y el mal funcionamiento de los sistemas antioxidantes (Johnson et al., 2000).

Recientemente se plantea que el papel de las ERO en el envejecimiento y en varias de las enfermedades relacionadas con éste está ligado a su influencia en el estado redox de las células (relación entre biomoléculas en su estado nativo y en estado oxidado,

resultante del balance entre ERO y los sistemas antioxidantes), el cual regula una gran cantidad de procesos celulares (crecimiento, reproducción, sobrevivencia, apoptosis), más allá de la mera oxidación sobre las biomoléculas cercanas (Jones, 2015).

Las intervenciones dietéticas o farmacológicas capaces de aumentar los mecanismos de respuesta al estrés (ej. estrés oxidante) podrían ser eficaces para prevenir el desarrollo de enfermedades degenerativas (Kim et al., 2014; Kim et al., 2015; Rathor et al., 2017). Este tipo de intervenciones suelen estar mediadas por la modulación de vías de señalización intracelulares como la vía de señalización de insulina/factor de crecimiento similar a la insulina (IIS), la vía del blanco de la rapamicina (TOR) o la autofagia (McColl et al., 2010; Partridge, 2014; López-Otín et al., 2016).

1.5 Mecanismos de defensa antioxidante

Los organismos aerobios desarrollaron mecanismos de defensa contra ERO (Fig 3), que comprenden la prevención de su formación, la captura de intermediarios dañinos, la inhibición de su propagación y la reparación de los daños, estos mecanismos pueden ser enzimáticos y no enzimáticos (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006; González et al., 2000). Estos mecanismos son de vital importancia para los organismos y están relacionados con su longevidad y sobrevivencia a condiciones de estrés; el desarrollo de diversos trastornos implica además de la generación de ERO, la reducción de los sistemas anti-estrés, propiciando un desbalance entre estos dos factores (Epel y Lithgow, 2014).

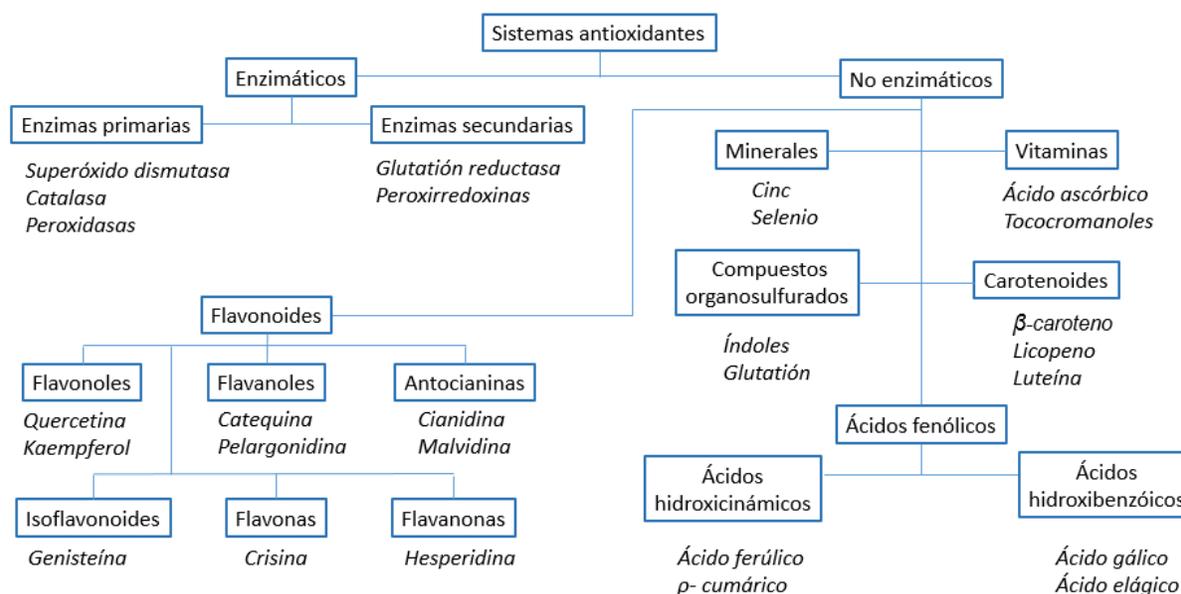


Figura 3. Clasificación de los antioxidantes. Adaptado de Carocho y Ferreira, 2013

Los mecanismos antioxidantes se pueden dividir en tres niveles. El primer nivel está compuesto principalmente por enzimas y su función es evitar la formación de ERO a través del secuestro de sus precursores o promotores. La segunda línea consiste en compuestos antioxidantes como son las vitaminas C y E o el glutatión. Esta línea de defensa actúa neutralizando los radicales una vez formados e impidiendo su propagación. La tercera línea consiste en un amplio número de enzimas encargadas de la reparación de moléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que han sido afectadas (Pokorny et al., 2001).

Según su naturaleza química, los antioxidantes pueden actuar en distintos organelos celulares, dependiendo de la afinidad con el medio que los rodea. De tal forma, la vitamina E, los carotenoides y otros compuestos hidrofóbicos, actúan a nivel de membranas mientras que enzimas, glutatión, vitamina C, metales y compuestos polifenólicos actúan en el citoplasma (Fig 4) (de Teresa-Galván et al., 2008).

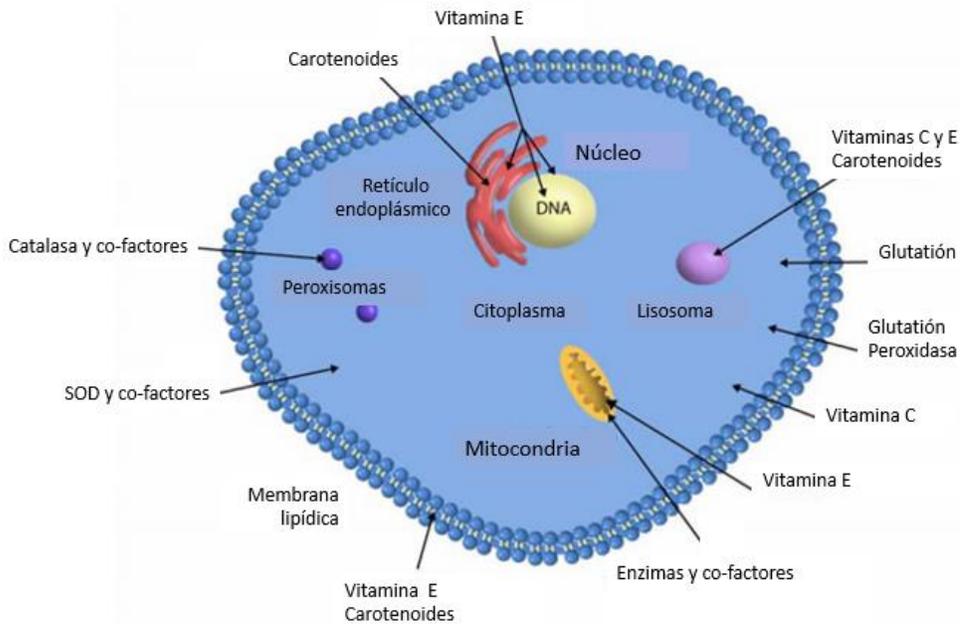


Figura 4. Sitios de acción de los sistemas antioxidantes dentro de la célula.

1.5.1 Mecanismos de defensa enzimáticos

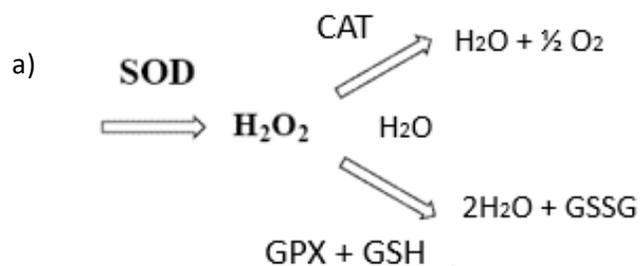
Entre los mecanismos de defensa enzimáticos destacan los que se describen a continuación. Cabe mencionar que los mecanismos enzimáticos son siempre endógenos

y son los principales mecanismos que mantienen el estado redox en sus niveles normales (Halliwell, 2011).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la transformación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. Existen dos isoformas de esta enzima, una citoplasmática y una mitocondrial; la SOD-Cu/Zn actúa en el citoplasma mientras la SOD-Mn se encuentra en la mitocondria (Fig 5) (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

La glutatión peroxidasa (GPX) es una enzima dependiente de selenio que cataliza la reducción del H_2O_2 usando glutatión reducido (GSH) y generando como productos agua y glutatión oxidado (GSSG); actúa en concentraciones de peróxido bajas (Peng et al., 2014). Existen isoenzimas de GPX en citoplasma, mitocondria y membrana plasmática (Fig 5) (Konigsberg, 2008; Hekimi et al., 2011; Halliwell, 2011).

La catalasa (CAT) es una enzima con alta tasa de renovación. Se localiza principalmente en peroxisomas y mitocondrias (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006). También tiene actividad peroxidasa, que se desarrolla principalmente en los peroxisomas. Actúa en condiciones de concentraciones de H_2O_2 elevadas cuando la GPX, que tiene mayor afinidad por el sustrato, es superada (Fig 5) (González et al., 2000).



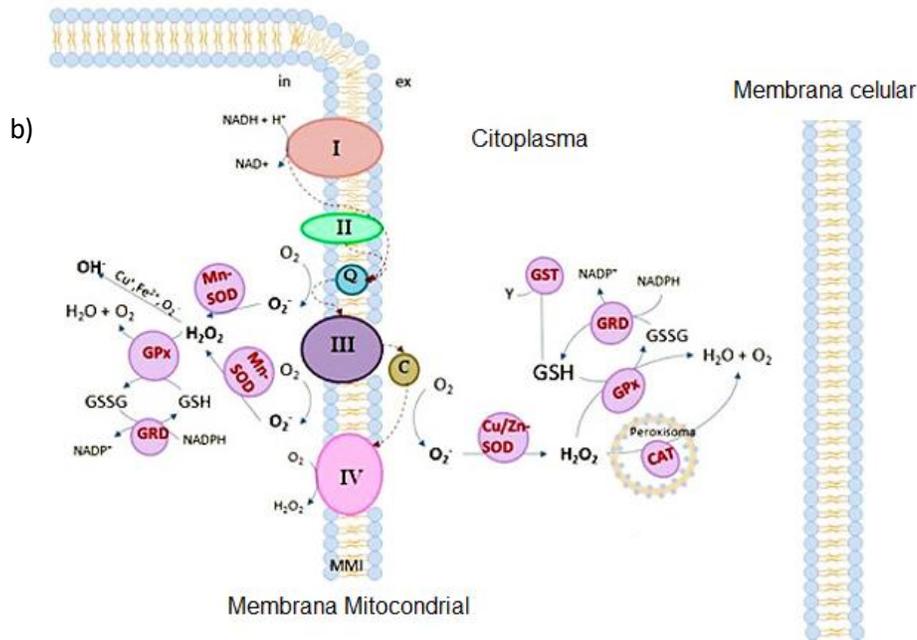


Figura 5. Actividad de las enzimas antioxidantes. a) Esquema resumido, b) diagrama en la célula, Tomado de Díaz-Huang et al., 2015.

La enzima glutatión reductasa (GR) reduce al GSSG regenerando la forma reducida (GSH), usando la coenzima NADPH (Carocho y Ferreira, 2013). La GR forma parte, con las enzimas ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y dehidroascorbato reductasa (DHAR), del sistema antioxidante conocido como ciclo ascorbato-glutatión (Fig 6). En este proceso el ascorbato reduce al H₂O₂ a agua en la reacción catalizada por APX (Foyer y Noctor, 2011). La vitamina C participa también en la regeneración de Vitamina E (Lázaro et al., 2013).

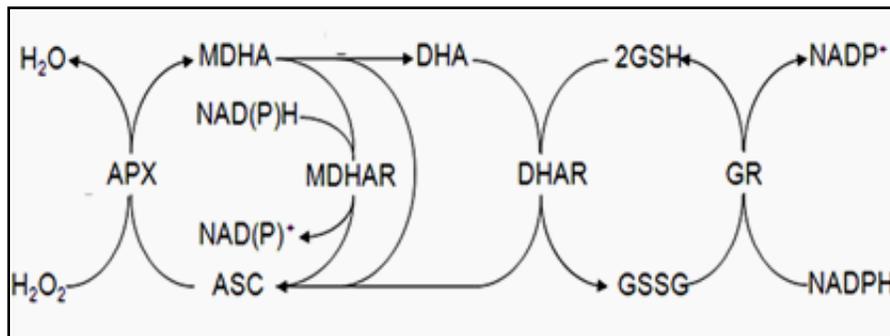


Figura 6. Ciclo ascorbato-glutatión. Tomado de Lázaro et al., 2013.

Las tioredoxinas peroxidadas (Trx-P) son una familia de enzimas distribuidas en varios puntos de la célula, y dependiendo del punto en que se encuentren será la función que

realicen. Dentro de este grupo se encuentran las peroxirredoxinas (Prx). Su función antioxidante se debe a la secuencia de aminoácidos con poder reductor derivado de la presencia de grupos tiol por lo que tienen un residuo N-terminal muy conservado. Este residuo es oxidado por el H_2O_2 . La función antioxidante de otras tiorredoxinas deriva de su capacidad de mantener a las Prx en su forma reducida, reducir a las glutatión peroxidasa oxidadas e inducir algunos tipos de superóxido dismutasa (Konigsberg, 2008).

Otras enzimas que participan en los mecanismos de defensa son la glutatión-S-transferasa (GST), el polipéptido reductor tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR), una enzima dependiente de selenio que reduce a la Trx oxidada (Cárdenas-Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006).

1.5.2 Mecanismos de defensa no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos son sustancias que a concentraciones bajas inhiben el proceso de oxidación, oxidándose ellas mismas (Rajendran et al., 2014). Pueden actuar por distintos mecanismos, inhibiendo RL y ERO, a través de la quelación de metales pro-oxidantes, activando la expresión de genes anti-estrés, extinguiendo los radicales superóxido y previniendo la formación de otros ERO, rompiendo la reacción en cadena de oxidación, así como reduciendo la concentración de O_2 (Oroian y Escriche, 2015). Estos pueden ser endógenos o exógenos, siendo estos últimos los más numerosos en animales.

El GSH es el antioxidante no enzimático más importante, es un tripéptido no proteico (glu-cis-gli) sintetizado en el citosol resistente a proteasas debido al enlace peptídico poco común que se da entre los aminoácidos que lo componen; esto le ayuda a que su concentración sea alta en todo momento. Es un antioxidante muy importante en los organismos; la enzima GPX utiliza GSH para reducir al H_2O_2 a agua (Konigsberg, 2008). Su importancia para el balance redox celular es tal que la relación GSH/GSSH es uno de los principales parámetros indicativos del nivel de oxidación celular (Birben et al., 2012).

Los alimentos que son fuente de compuestos bioactivos, entre los que figuran los antioxidantes exógenos, son llamados alimentos funcionales. El Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI por las siglas en inglés de "International Life Sciences Institute") considera que un alimento es funcional si se ha demostrado que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la mejoría de la salud, el bienestar y/o

la reducción del riesgo de enfermarse (Ashwell, 2002). Los principales beneficios que se observan derivados de los alimentos funcionales son el mantenimiento de la homeostasis en los organismos y la reducción de los riesgos de contraer enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión, cáncer, anemia, entre otros (Abuajah et al., 2015). Es posible que muchos de estos beneficios estén relacionados con los antioxidantes presentes en los alimentos funcionales (Pokorny et al., 2001). Además, los antioxidantes naturales también se utilizan en la conservación de alimentos para prevenir la oxidación de sus componentes (Falowo et al., 2014). Los antioxidantes naturales obtenidos de los alimentos se pueden dividir en cuatro grandes grupos: vitaminas, carotenoides, polifenoles y minerales (Carocho y Ferreira, 2013; Ginter et al., 2014; Oroian y Escriche, 2015).

Vitaminas. A este grupo pertenecen dos de los antioxidantes de mayor importancia, la vitamina C y la vitamina E. La vitamina C es llamada también ácido ascórbico, y existen dos especies activas, ácido L-ascórbico y L-dehidroascórbico (Fig 7). Esta vitamina es absorbida a nivel gastrointestinal en los humanos y actúa inhibiendo a las ERO, además de regenerar otros antioxidantes como al glutatión y a la vitamina E (Carocho y Ferreira, 2013). Durante el desarrollo evolutivo, los primates incluyendo al hombre, perdieron la capacidad de sintetizar este compuesto por lo que tienen que consumirlo en la dieta, sin embargo, muchos animales son capaces de hacerlo (Ginter et al., 2014). En condiciones celulares, la eficiencia del ascorbato es alta a bajas concentraciones, donde una molécula puede neutralizar dos moléculas del radical peróxido, pero a altas concentraciones su eficiencia puede disminuir hasta 0 (Oroian y Escriche, 2014).



Figura 7. Conversión de los compuestos ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico.

La vitamina E es un grupo de compuestos conocidos como tocoferoles y tocotrienoles (Abuajah et al., 2015). Existen ocho isoformas, cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles (Fig 8). De estos el α -tocoferol es la forma más abundante en los sistemas biológicos por tener mayor tiempo de permanencia dentro de los organismos, aunque son los tocotrienoles los de mayor actividad biológica. Es la cabeza del grupo cromo lo que

confiere la actividad antioxidante a estos compuestos, siendo la cola alifática neutra en esta función, pero importante en la forma con que interactúan en el medio en que están inmersos, principalmente con las membranas lipídicas. Actúa donando el hidrogeno del grupo fenílico y aunque el resultado es un radical tocoferoxilo, este es poco reactivo con lo que se detienen las reacciones de oxidación (Carocho y Ferreira, 2013).

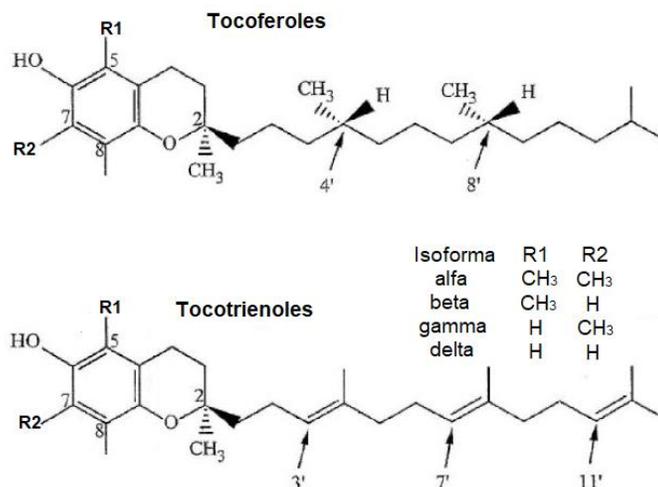


Figura 8. Estructura química de los tococromanoles.

A este grupo de vitaminas también pertenece la vitamina K. Es un grupo de compuestos liposolubles cuya actividad es convertir enlaces glutamatos de diversas proteínas en carboxiglutamatos. Su estructura de 1,4-naftoquinona le confiere su actividad biológica (Carocho y Ferrerira, 2013).

Carotenoides. Los carotenoides son pigmentos naturales liposolubles (Abuajah et al., 2015); podemos encontrar dos subgrupos, los carotenos que contemplan a los -carotenos así como al licopeno y el segundo grupo son los hidroxí carotenoides (xantofilas), como la luteína y la zeaxantina (Fig 9) (Oroian y Escrache, 2015). Estos pueden actuar mediante tres diferentes mecanismos: transferencia de electrones, abstracción de hidrógeno y adición de radicales (Pisoschi y Pop, 2015).

El mejor conocido de estos compuestos es el β -caroteno el cual es precursor de la Vitamina A. Es un antioxidante muy potente, el cual es capaz de extinguir la presencia del oxígeno singülete, inhibir la oxidación de los lípidos a través de la protección contra radicales libres (Ginter et al., 2014; Oroian y Ferreira, 2013).

Por otro lado, el licopeno ha demostrado en los últimos años tener una mayor capacidad antioxidante que el β - caroteno y la vitamina E (Pisoschi y Pop, 2015). Es un eficiente neutralizador de radicales libres y de especies de oxígeno, siendo el principal carotenoide presente en el plasma y otros tejidos. Además, está involucrado en la modulación de las vías de señalización de los procesos redox aumentando la sensibilidad de las células a la presencia de ERO's, afectando la actividad enzimática y la activación de factores de transcripción (Ginter et al., 2014).

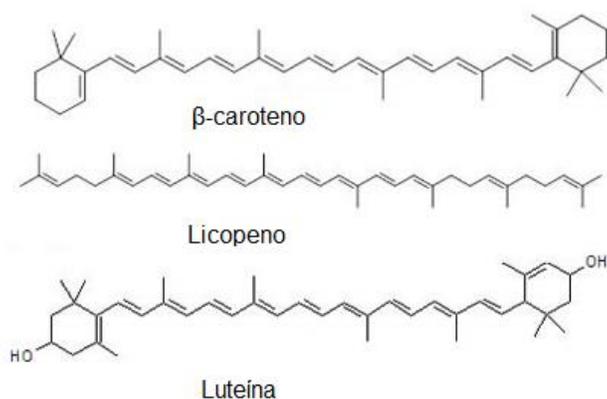


Figura 9. Estructura de carotenoides. Tomado de Pisoschi y Pop, 2015.

Por el lado de las xantofilas, la luteína es el compuesto de principal importancia. Es un potente antioxidante capaz de neutralizar especies reactivas de oxígeno. Es de especial importancia para tejidos de los ojos ya que es la zona en la que se acumula principalmente tras su absorción (Ginter et al., 2014).

Compuestos fenólicos. El grupo de compuestos fenólicos es el más numeroso. Más de 10, 000 compuestos polifenólicos se han identificado en plantas y se encuentran en prácticamente todos sus tejidos, desde las raíces hasta las hojas, flores y frutos (Li et al., 2014).

Se caracterizan por la presencia de uno o más grupos hidroxilo (OH) unidos a un anillo bencénico (Abuajah et al., 2015). Son metabolitos secundarios de las plantas involucrados en toda clase de funciones, desde el crecimiento, lignificación, pigmentación, polinización, hasta resistencia contra estrés agentes patógenos y depredadores (Fraga et al., 2010).

A gran escala los compuestos fenólicos pueden ser divididos en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides (Fraga et al., 2010), esto dependiendo de la cantidad de

anillos fenólicos, así como los grupos unidos a estos anillos. Además, los compuestos no flavonoides se pueden dividir en ácidos fenólicos, estilbenos y ligninas (Li et al., 2014).

Los flavonoides son el grupo más amplio y estudiado, incluye más de 5 mil compuestos, se encuentran principalmente en las partes aéreas de las plantas, muchos de ellos como pigmentos (Konigsberg, 2007; Ginter et al., 2014; Oroian y Escriche, 2015). Tienen una estructura común de C6-C3-C6 formada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una estructura de tres carbonos, usualmente organizada como un heterociclo oxigenado (C) (Fig 10). Pueden ser divididos en seis subgrupos según la oxigenación del heterociclo: flavanoles, flavanonas, flavonas, flavonoles (esencialmente flavan-3-ol), isoflavonas y antocianinas. Desde una estructura básica sencilla, las rutas metabólicas de las plantas introducen diferentes grupos hidroxilo, metilo y azúcares para formar distintos compuestos. En algunos casos, oligomerización y polimerización de los flavonoides puede ocurrir, dando lugar a taninos condensados (procianidinas) y taninos hidrolizables (Fraga et al., 2010).

Hoy en día se conoce bien su síntesis en vegetales: el anillo A proviene de la vía de la malonilcoenzima A mientras que el anillo B y los carbonos que forman parte del anillo C vienen de la vía del ácido shikímico. Un tricétido se cicla y se condensa con una molécula de ácido p-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la vía del malonilCoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas, estas a su vez son precursoras del resto de los flavonoides (Konigsberg, 2008).

Por su estructura podemos describir cada uno de los subgrupos de la siguiente forma (Oroian y Escriche, 2015; Sandoval-Acuña et al., 2014):

-*Flavonoles*: son identificados por la localización del grupo alcohol y el grupo carbonilo en el anillo C. Con frecuencia se encuentran unidos a azúcares como. Los principales flavonoles en la dieta son la quercetina, mircitina, rutina y kaempferol.

-*Flavonas*: químicamente pueden ser identificadas por la ausencia del grupo hidroxilo y la presencia de un grupo carbonilo en el anillo oxigenado. La mayor parte de las flavonas son sintetizadas a partir de dos flavanonas, la naringenina y la pinocembrina. Pueden ser encontrados en todas las partes de las plantas, por encima y por debajo de la tierra. Algunos ejemplos son la luteolina, apigenina, caicaleina, hispidulina.

-*Flavononas*: son encontrados como O-glucósidos, especialmente abundantes en cítricos. Tiene un grupo carbonilo en el C4 pero carece de grupo OH en el anillo C. Presentan un insaturación menos en el anillo heterocíclico. En este grupo se encuentran la naringenina, pinocembrina, eriodictiol.

-*Flavanoles*: se identifican por la ausencia de doble ligadura y grupo carbonilo en el anillo oxigenado, aunque sí se presenta un grupo OH. Como ejemplo tenemos a la catequina, epigallocatequina, epicatequina.

-*Isoflavanoles*: es un grupo perteneciente a los fitoesteroides. Comúnmente unidos a azúcares, se reconocen por que el anillo B está unido al C en la posición meta con respecto al átomo de oxígeno y no en orto como en el resto de los flavonoides. Los principales ejemplos son la deidzeina, genisteina y glicitenina.

-*Antocianinas*: las antocianinas son el grupo de pigmentos naturales más grande y mayormente distribuidos. Están formados por una estructura de antocianidina (ion flavilio) unido a uno o más azúcares, siempre en la posición 3 de la estructura principal. El ion flavilio se distingue por la presencia de una insaturación entre los carbonos 3 y 4 en el anillo C. Encontramos en este grupo la cianidina, delfedina, malvidina, entre otras.

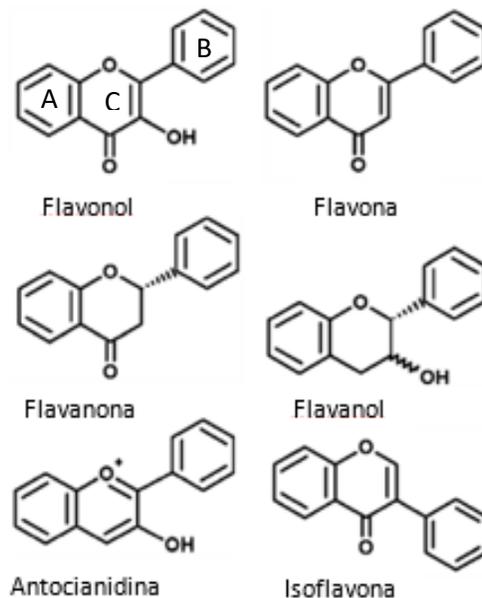


Figura 10. Estructuras químicas de los flavonoides. Tomado de Sandoval-Acuña et al., 2014

Los ácidos fenólicos son las estructuras más sencillas de esta familia de compuestos. Existen dos subclases, los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico. Consisten en un anillo bencénico unido a un grupo carboxilo en el caso de los ácidos benzoicos y sus derivados, o al ácido propanéico en el caso de los derivados del ácido cinámico (Fig 11). Dentro de los más importantes derivados del ácido benzoico están los ácidos gálico, hidroxibenzoico, protocatequico, vainillínico y siríngico. Del lado de los derivados del cinámico están los ácidos caféico, ferúlico, cúmarico y sinápico. Estos por lo general se encuentran unidos a otros grupos a través de enlaces éster y raras veces se encuentran libres (Oroian y Escriche, 2015; Li et al., 2014). Tienen actividad antioxidante como quelantes de metales y como secuestradores de radicales libres, con especial impacto sobre los radicales hidroxilo y peroxilo, los aniones superóxido y peroxinitritos (Carocho y Ferreira, 2013).

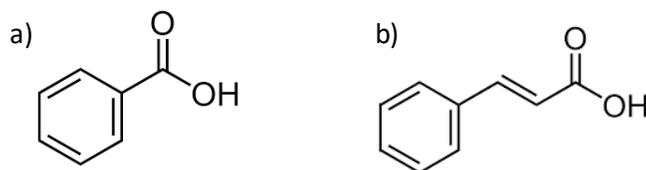


Figura 11. a) Ácido benzoico y b) ácido cumárico.

Los estilbenos son compuestos formados por dos anillos aromáticos unidos por un puente de eteno. Pueden presentarse en forma monomérica u oligomérica. Su importancia radica en que sus beneficios a la salud pueden verse aun cuando están presentes en bajas concentraciones en comparación con otros polifenoles (Oroian y Escriche, 2015). El resveratrol es el estilbeno más importante (Fig 12), debido a su actividad antioxidante, a través de diversos mecanismos entre los que están neutralizar especies reactivas de oxígeno, quelante de metales y modulador de enzimas (Pisoschi y Pop, 2015). Este compuesto es principalmente producido en la piel de uvas rojas cuando son infectadas con enfermedades fúngicas (Oroian y Escriche, 2015), posiblemente como una respuesta protectora del fruto.

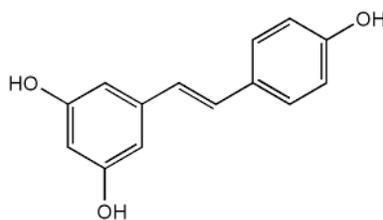


Figura 12. Estructura del resveratrol.

Las ligninas son compuestos presentes en plantas y partes no comestibles de frutas y vegetales (Fig 13). Son de bajo peso molecular, formados por el acoplamiento oxidativo de unidades p-hidroxi fenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno (Konisberg, 2007).

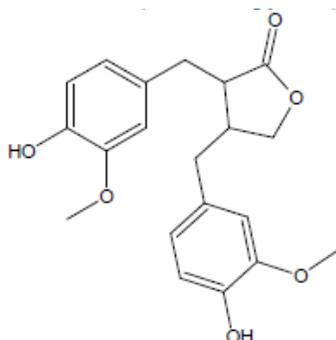


Figura 13. Estructura del matareisinol (lignina).

Las propiedades de los polifenoles se adjudican a la presencia de grupos hidroxilo como sustituyentes en anillos bencénicos, que les permite actuar como agentes reductores (donadores de hidrogeno o electrones). Además, interactúan a nivel celular con enzimas antioxidantes, reducen los radicales del tocoferol, inhiben oxidasas, mitigan el estrés producido por el óxido nítrico e incrementan la cantidad de ácido úrico (Carocho y Ferreira, 2013). Aunque la neutralización de RL en las células conduce muchas veces a la formación de un nuevo radical llamado aroxilo (debido a que procede de una molécula aromática), estas moléculas sufren fenómenos de deslocalización electrónica a través de resonancia, por lo que son radicales menos reactivos que el original (Fraga et al., 2010).

Además de su actividad como antioxidantes, los polifenoles tienen una gran cantidad de beneficios comprobados a la salud, entre los que se pueden mencionar actividad como prebióticos, sobre todo en sus formas glucosidadas, activación de factores de transcripción, interacción con receptores de membranas, múltiples funciones regulatorias en mitocondria (ATPasa, potencial de membrana, cadena de electrones), tratamiento de enfermedades cardíacas, protección contra cáncer y tumores, actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, neuroprotectora, actividad antialérgica, actividad estrogénica y contra el envejecimiento celular (Li et al., 2014; Fraga et al., 2010; Ginter et al., 2014; Konigsberg, 2008; Sandoval-Acuña et al., 2014; Del Rio et al., 2010; Joseph et al., 2014).

Minerales. Los metales, a pesar de sólo encontrarse a nivel de traza en organismos vivos, juegan un importante papel en el metabolismo. Son dos los minerales de

importancia antioxidante, el selenio y el zinc. El selenio puede ser encontrado en forma tanto orgánica como inorgánica dentro del cuerpo humano, y aunque no tiene interacción directa con los radicales es parte estructural fundamental de enzimas antioxidantes (Carocho y Ferreira, 2013). El Zinc, por su parte, es también un cofactor de enzimas, principalmente de la superóxido dismutasa. Además, puede prevenir la oxidación de los lípidos catalizada por cobre y hierro (Pisoschi y Pop, 2015). Así, la principal actividad de estos metales en el cuerpo en lo relacionado a la protección contra radicales libres, es actuando como cofactores de enzimas antioxidantes y competir por sitios de unión de la célula con metales pro-oxidantes como Cu^{+1} y Fe^{+2} .

1.6 Achiote y Jitomate como fuentes de compuestos funcionales

El achiote (*Bixa orellana*), también conocido como annatto, es un arbusto nativo de la América tropical. Se valora como condimento y es una de las principales fuentes de pigmentos naturales para las industrias alimentaria, cosmética y textil (Barrozo et al. 2013). América Latina proporciona casi el 60% de la producción global de achiote, con Perú, Brasil y México entre los principales productores (Smith 2006); dentro de México, la península de Yucatán es una de las zonas de mayor producción (<https://www.gob.mx/snics>).



Figura 14. a) Árbol, b) frutos y c) semillas de achiote.

Es un árbol perenne que puede crecer hasta nueve metros y cuyos frutos son capsulas globulares (Fig 14). Cada cápsula contiene entre 30 y 45 semillas cubiertas por una capa delgada color rojo-naranja (Fonnegra y Jiménez, 2007). Las semillas son las que tienen una gran importancia económica debido a que son utilizadas como condimento en la cocina de diversos países además de ser la fuente de pigmentos naturales. El extracto crudo de pigmentos es conocido como annatto; contiene grandes cantidades de bixina y/o

norbixina dependiendo del tipo de extracción aplicada; también contiene pequeñas cantidades de β -caroteno, otros apo-carotenoides y algunos compuestos volátiles (Yolmeh et al., 2014). Los distintos tipos de colorante que se obtienen en de las semillas tienen amplia aplicación en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica llegando a posicionarse como el segundo colorante natural más importante del mundo.

Los extractos tanto de hojas, tallos, raíces y semillas de achiote han sido utilizados dentro de la medicina tradicional en distintas partes del mundo, principalmente para aliviar molestias relacionadas con quemaduras, dolores estomacales, fiebre, asma e incluso infecciones y tumores (Villar et al., 1997; Silvia et al., 2010; de Araújo et al., 2014). Además de estas propiedades tradicionales, otras actividades biológicas como bactericida, anti-fúngico, antiinflamatorio, actividad anti convulsionante, antioxidante, anti carcinogénica, activador de la movilidad intestinal y actividad como analgésico han sido estudiadas en extractos de achiote (Shadi-ul-Islam et al., 2015).

La bixina y la norbixina (Fig 15) son los principales pigmentos carotenoides presentes en las semillas de achiote, representan aproximadamente el 95% del contenido total de carotenoides y comúnmente componen entre 1 y 5% del peso total de la semilla (Giorgi et al., 2013; Shahid-ul-Islam et al., 2016). Son apocarotenoides lineales provenientes del licopeno compuestos de 25 átomos de carbono y 9 dobles enlaces conjugados (Bouvier et al., 2003; Ramamoorthy et al., 2010). Se sintetizan y almacenan en células especializadas llamadas células de almacenamiento de carotenoides (Louro y Santiago, 2016).

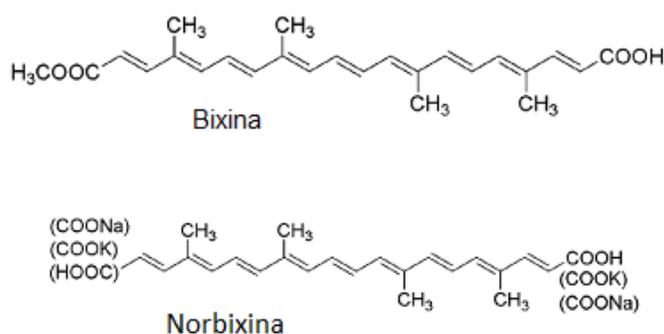


Figura 15. Estructura química trans- de bixina y norbixina.

El achiote es también la principal fuente natural conocida de tocotrienoles, principalmente δ -tocotrienol (Fig 16), y es prácticamente libre de tocoferoles (Watson y Preedy 2009). Curiosamente, la presencia de δ -tocotrienol en la naturaleza es bastante rara (Frega et

al., 1998). Se ha reportado que los tocotrienoles presentan una mayor actividad antioxidante que los tocoferoles (Ahsan et al. 2015; Sen et al. 2006).

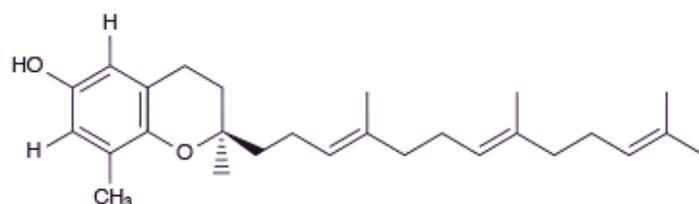


Figura 16. Estructura química del δ -tocotrienol.

En México la Red Temática de Achiote (REMEFI) ha identificado 40 accesiones, de las cuales 20 han sido caracterizadas morfológicamente y en cuanto a su contenido de bixina.

El fruto del jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una hortaliza muy popular en todo el mundo, por su color y aroma atractivos, su valor nutritivo y su versatilidad de uso, ya que se consume fresco o procesado (Hobson y Grierson, 1993). Pertenece a la familia de las solanáceas. Las evidencias moleculares sugieren que se originó en la zona de los Andes, ya que en esta región se encuentran gran diversidad de variedades primitivas de jitomate, así como especies silvestres cercanas (Casas y Caballero, 1995), sin embargo, México se considera un sitio de domesticación. El término jitomate proviene de la palabra náhuatl *xítomatl* (fruto gordo con ombligo), este nombre, así como los reportes de los cronistas españoles de su venta en el gran mercado de Tenochtitlán y su consumo en la dieta de los indígenas, apoyan la propuesta de que México es un sitio de domesticación. El jitomate se llevó a España y de ahí se distribuyó al resto de Europa y del mundo; en el siglo XVIII se incorporó a la dieta europea y los agricultores italianos contribuyeron a su mejoramiento convirtiéndolo en el fruto de color rojo intenso y jugoso que conocemos (Long, 2001). México es el décimo productor y se encuentra entre los tres primeros exportadores de jitomate en fresco en el mundo (FAOSTAT, 2013; SAGARPA, 2014). Por su elevado consumo, el jitomate es una fuente importante de fibra, potasio, magnesio y antioxidantes como los carotenoides licopeno y β -caroteno y las vitaminas C y E (α -tocoferol, principalmente) (Yilmaz, 2001; Causse et al., 2003; Meléndez-Martínez et al., 2010).



Figura 17. a) Plantación de jitomate comercial, b) frutos de jitomates nativo tipo arriñonado.

La maduración del fruto de jitomate es un proceso complejo, altamente coordinado; se acompaña por cambios en el color, textura, sabor (gusto y aroma) e incluye la síntesis de antioxidantes como el licopeno que da a los frutos su color rojo característico (Sanz et al., 1997; Baldwin et al., 2000).

El fruto de jitomate se ha mejorado para satisfacer las preferencias y características prácticas para las actividades humanas, aunque desde el punto de vista biológico, los frutos carnosos evolucionaron para atraer a los organismos dispersores de las semillas que contienen en su interior (Gómez et al., 2014; Rambla et al., 2014). En años recientes, los consumidores se han quejado del sabor de los frutos de jitomate (Baldwin et al., 2000). Parte de esta insatisfacción está asociada con el comercio de híbridos seleccionados con los criterios de aumentar el rendimiento, la resistencia a enfermedades, a condiciones de transporte, así como mejorar las características físicas externas y hacer más lenta la maduración, dejando de lado atributos de calidad no evidentes como el sabor y el contenido de compuestos funcionales. Es hasta años recientes en que se le ha dado relevancia en los programas de mejoramiento a estos parámetros de calidad (Zanor et al., 2009; Klee y Tieman, 2013; Piombino et al., 2013). México como centro de domesticación posee una gran diversidad de genotipos, esta riqueza genética requiere ser caracterizada para ampliar la base genética y detectar características particulares de interés (Lobato-Ortiz et al., 2012). Entre estas características se encuentran el contenido de compuestos funcionales como los carotenoides licopeno y β -caroteno.

Diversos estudios han relacionado el consumo de jitomate con la disminución de la incidencia en algunas enfermedades crónico-degenerativas y cáncer (Agarwa y Rao, 2000; Giovannucci et al., 2002; Sesso et al., 2003), esta actividad posiblemente está relacionada con la regulación del estado redox celular promovida por compuestos antioxidantes como los carotenoides y la vitamina E (Guil-Guerrero y Reboloso-Fuentes, 2009). Por otro lado, se ha reportado que algunas variedades nativas de jitomate presentan contenidos mayores de compuestos funcionales como polifenoles y licopeno,

así como mayor capacidad antioxidante *in vitro* que las variedades comerciales (Figueroa-Cares et al., 2018).

1.7 Extracción de compuestos funcionales

Existen distintas metodologías aplicables para la extracción de compuestos de matrices vegetales. La mayoría de ellas se enfoca en la aplicación de calor y/o agitación combinados con la adecuada selección de solventes para optimizar la transferencia de materia y con ello mejorar la eficiencia de la extracción (Aspé y Fernández, 2011). Entre las técnicas más comunes se encuentran la maceración, la hidrodestilación y el método de Soxhlet (Sánchez-Ávila et al., 2007). Sin embargo, estos métodos requieren el uso de una gran cantidad de solventes, consumen mucho tiempo y los compuestos podrían sufrir degradación debido a la temperatura, siendo en consecuencia poco eficientes (Ruiz-Montañez et al., 2014).

El solvente es uno de los factores que más impacta en la eficacia y eficiencia de la extracción. Los más utilizados son agua, metanol y etanol para extraer compuestos polares y acetato de etilo, acetona, hexano y cloroformo para compuestos no polares. También se utilizan combinaciones de ambos tipos de solventes, con lo que se ha visto un incremento en los rendimientos de extracción (Strati y Oreopoulou, 2014). Sin embargo, varios de estos solventes orgánicos presentan el gran inconveniente de ser tóxicos y/o carcinogénicos por lo que su uso se ha restringido cada vez más (Byrne et al., 2016).

Debido a la creciente demanda de compuestos funcionales obtenidos de fuentes naturales, el desarrollo de metodologías de obtención que generen menor impacto al ambiente, con bajo consumo de recursos y que sean más seguras para los operarios y consumidores es uno de los campos de la tecnología que demanda mayor atención y que posiblemente tendrá mayor impacto por parte de las regulaciones ambientales internacionales, principalmente en los países desarrollados.

El objetivo primordial del desarrollo tecnológico desde el punto de vista de la ingeniería química radica en lograr que los procesos sean sustentables y seguros para los operarios (ACS Editorial, 2007). Dentro de las principales vías para lograrlo se encuentra el desarrollo y utilización de solventes verdes que generen menor impacto ambiental y menores riesgos a los usuarios. La importancia de los solventes radica en que gran parte de los residuos de las industrias pertenecientes al ramo de la química, más del 50%, son desechos de solventes, que en muchas ocasiones no se pueden reutilizar y en otras no

son biodegradables y son altamente contaminantes, por lo que el impacto al medio ambiente es muy grande (Constable, 2013). Aun en los procesos donde el medio de extracción usado es agua, se requiere una gran cantidad de ésta para obtener los rendimientos deseados, por lo que tampoco es una forma sustentable para realizarlos.

Sobre este tema se han logrado diversos avances, sin embargo, la selección de un solvente para un proceso determinado requerirá de una evaluación específica para las finalidades buscadas. Actualmente existen guías de selección de solventes (Fig 18), donde se evalúan diversos parámetros orientados a la elección de solventes verdes, incorporando información sobre la seguridad en su uso y para la salud de los usuarios. Los solventes verdes, además de las características antes mencionadas, incluyen aquellos solventes que han sido producidos de manera renovable, es decir que no son derivados del petróleo, como los producidos mediante fermentación e incluyen también los fluidos supercríticos y los líquidos iónicos (Capello et al., 2007; Micăle et al, 2015).

| Guía simple de selección de disolventes | | |
|---|-------------------|----------------------|
| Preferred | Usable | Undesirable |
| Water | Cyclohexane | Pentane |
| Acetone | Heptane | Hexane(s) |
| Ethanol | Toluene | Di-isopropyl ether |
| 2-Propanol | Methylcyclohexane | Diethyl ether |
| 1-Propanol | TBME | Dichloromethane |
| Ethyl Acetate | Isooctane | Dichloroethane |
| Isopropyl acetate | Acetonitrile | Chloroform |
| Methanol | 2-MeTHF | NMP |
| MEK | THF | DMF |
| 1-Butanol | Xylenes | Pyridine |
| i-Butanol | DMSO | DMAc |
| | Acetic Acid | Dioxane |
| | Ethylene Glycol | Dimethoxyethane |
| | | Benzene |
| | | Carbon tetrachloride |

K. Alfonsi, J. Colberg, P. J. Dunn, T. Fevig, S. Jennings, T. A. Johnson, H. P. Kleine, C. Knight, M. A. Nagy, D. A. Perry and M. Stefaniak
Green Chemistry, 2008, 10, 3136

CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents†

Denis Prat,^{a*} Andy Wells,^b John Hayler,^c Helen Sneddon,^c C. Robert McElroy,^d Sarah Abou-Shehada^d and Peter J. Dunn^e

Guía completa de selección de disolventes (fragmento)

| Family | Solvent | BP (°C) | FP (°C) | Worst H3xx ^d | H4xx | Safety score | Health score | Env. score | Ranking by default | Ranking after discussion ^e |
|---------------|---------------------|----------------|---------|-------------------------|------|--------------|--------------|------------|--------------------|---------------------------------------|
| Water | Water | 100 | na | None | None | 1 | 1 | 1 | Recommended | Recommended |
| Alcohols | MeOH | 65 | 11 | H301 | None | 4 | 7 | 5 | Problematic | Recommended |
| | EtOH | 78 | 13 | H319 | None | 4 | 3 | 3 | Recommended | Recommended |
| | i-PrOH | 82 | 12 | H319 | None | 4 | 3 | 3 | Recommended | Recommended |
| | n-BuOH | 118 | 29 | H318 | None | 3 | 4 | 3 | Recommended | Recommended |
| | t-BuOH ^f | 82 | 11 | H319 | None | 4 | 3 | 3 | Recommended | Recommended |
| | Benzyl alcohol | 206 | 101 | H302 | None | 1 | 2 | 7 | Problematic | Problematic |
| Ketones | Ethylene glycol | 198 | 116 | H302 | None | 1 | 2 | 5 | Recommended | Recommended |
| | Acetone | 56 | -18 | H319 | None | 5 | 3 | 5 | Problematic | Recommended |
| | MEK | 80 | -6 | H319 | None | 5 | 3 | 3 | Recommended | Recommended |
| | MIBK | 117 | 13 | H319 | None | 4 | 2 | 3 | Recommended | Recommended |
| | Cyclohexanone | 156 | 43 | H332 | None | 3 | 2 | 5 | Recommended | Problematic |
| | Esters | Methyl acetate | 57 | -10 | H302 | None | 5 | 3 | 5 | Problematic |
| Ethyl acetate | | 77 | -4 | H319 | None | 5 | 3 | 3 | Recommended | Recommended |
| i-PrOAc | | 89 | 2 | H319 | None | 4 | 2 | 3 | Recommended | Recommended |
| n-BuOAc | | 126 | 22 | H336 | None | 4 | 2 | 3 | Recommended | Recommended |
| Ethers | Diethyl ether | 34 | -45 | H302 | None | 10 | 3 | 7 | Hazardous | HH |
| | Diisopropyl ether | 69 | -28 | H336 | None | 9 | 3 | 5 | Hazardous | Hazardous |
| | MTBE | 55 | -28 | H315 | None | 8 | 3 | 5 | Hazardous | Hazardous |
| | THF | 66 | -14 | H351 | None | 6 | 7 | 5 | Problematic | Problematic |
| | Me-THF | 80 | -11 | H318 | None | 6 | 5 | 3 | Problematic | Problematic |
| | 1,4-Dioxane | 101 | 12 | H351 | None | 7 | 6 | 3 | Problematic | Hazardous |
| | Anisole | 154 | 52 | None | None | 4 | 1 | 5 | Problematic | Recommended |
| | DME | 85 | -6 | H360 | None | 7 | 10 | 3 | Hazardous | Hazardous |
| Hydrocarbons | Pentane | 36 | -40 | H304 | H411 | 8 | 3 | 7 | Hazardous | Hazardous |
| | Hexane | 69 | -22 | H361 | H411 | 8 | 7 | 7 | Hazardous | Hazardous |
| | Heptane | 98 | -4 | H304 | H410 | 6 | 2 | 7 | Problematic | Problematic |
| | Cyclohexane | 81 | -17 | H304 | H410 | 6 | 3 | 7 | Problematic | Problematic |
| | Me-cyclohexane | 101 | -4 | H304 | H411 | 6 | 2 | 7 | Problematic | Problematic |
| | Benzene | 80 | -11 | H350 | None | 6 | 10 | 3 | Hazardous | HH |
| | Toluene | 111 | 4 | H351 | None | 5 | 6 | 3 | Problematic | Problematic |
| | Xylenes | 140 | 27 | H312 | None | 4 | 2 | 5 | Problematic | Problematic |
| Halogenated | DCM | 40 | na | H351 | None | 1 | 7 | 7 | Hazardous | Hazardous |
| | Chloroform | 61 | na | H351 | None | 2 | 7 | 5 | Problematic | HH |
| | CCl ₄ | 77 | na | H351 | H420 | 2 | 7 | 10 | Hazardous | HH |
| | DCE | 84 | 13 | H350 | None | 4 | 10 | 3 | Hazardous | HH |
| | Chlorobenzene | 132 | 29 | H332 | H411 | 3 | 2 | 7 | Problematic | Problematic |
| Aprotic polar | Acetonitrile | 82 | 2 | H319 | None | 4 | 3 | 3 | Recommended | Problematic |

Figura 18. Ejemplos de guías de selección e solventes verdes

Por otro lado, se han aplicado tecnologías no convencionales con la finalidad de aumentar tanto la eficacia como la eficiencia de los métodos de extracción, permitiendo así un mejor aprovechamiento de los recursos disponibles. Entre estas tecnologías se pueden mencionar tres que destacan por estas ventajas: extracción con ultrasonido, extracción con microondas y extracción asistida con enzimas (Zuorro et al., 2011; Ruiz-Montañez et al., 2014). La extracción con ultrasonido y con microondas son técnicas sencillas desarrolladas para mejorar las eficiencias de extracción y evitar la degradación por calor de los compuestos (Aspé y Fernández, 2011). El método de ultrasonido se basa en el fenómeno de cavitación, que aumenta la transferencia de masa, facilitando la entrada del solvente a las células así como el contacto entre los compuestos de interés y el solvente. Esto debido a que se forman burbujas de vacío que al hacer implosión dañan los tejidos celulares y permiten la penetración del solvente. La técnica asistida por microondas se basa en el calentamiento intracelular de agua en las muestras. Cuando el agua se evapora produce una presión interna en la pared celular que termina por romperla, facilitando la lixiviación de los compuestos hacia el solvente. Ambas técnicas se ven

afectadas por el tiempo de tratamiento y en general disminuyen la eficacia cuando se usan tiempos largos (Aspé y Fernández, 2011).

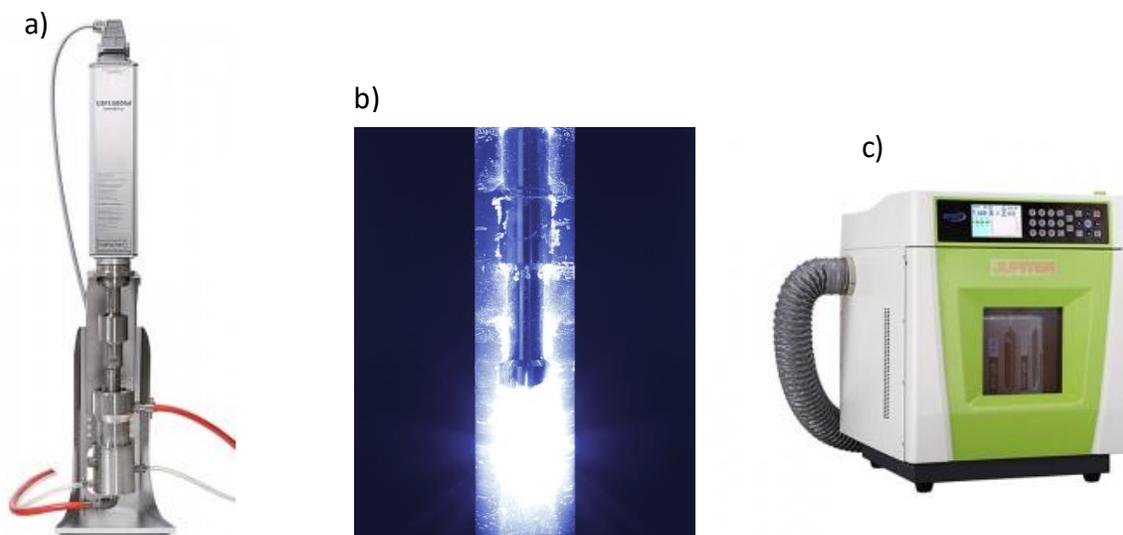


Figura 19.- a) Equipo de sonicación por sonda para flujo continuo, b) acercamiento al tratamiento por sonicación, c) equipo para extracción por microondas.

Estos métodos se han aplicado exitosamente para la obtención de diversos compuestos de fuentes vegetales como son aceites esenciales de hojas de romero, taxanos de biomasa de *Taxus* así como para la extracción de limonoides relacionados con la azadiractina de semillas de neem. Igualmente se reportó su uso para la extracción de polifenoles y cafeína de hojas de té verde (Pan et al., 2003). En el trabajo realizado por Pan y colaboradores (2003) los autores eligen etanol:agua como el mejor solvente para realizar la extracción de polifenoles y cafeína y determinan un tiempo de extracción óptimo de 4 min, que es significativamente menor al usado en las metodologías tradicionales, obteniendo los mismos rendimientos de extracción. En el trabajo publicado por Aspé y Fernández (2011) compararon la extracción de compuestos fenólicos de corteza de pino por los métodos de maceración, Soxhlet, extracción asistida por microondas y asistida por ultrasonido utilizando una mezcla de acetona y agua (7:3 v/v) como solvente concluyendo que el método más eficiente es el de extracción asistida por microondas. Por otro lado, en el trabajo publicado por Ruiz-Montañez y colaboradores (2014) en el que extrajeron mangiferina y lupeol de cáscara de mango usando como solvente etanol-agua (8:2 v/v), donde compararon el método tradicional de maceración y

el método de Soxhlet con los métodos asistido por microondas, ultrasonido y altas presiones hidrostáticas concluyeron que el método asistido por ultrasonido fue el más apropiado para la extracción de estos compuestos.

La extracción asistida con enzimas se basa en el rompimiento de las paredes y tejidos celulares vegetales con la finalidad de exponer los compuestos a extraer al solvente utilizado, permitiendo una difusión más fácil. Es común el uso de enzimas pectinolíticas, celulolíticas y hemicelulolíticas en este tipo de extracciones. Sin embargo, los resultados que se obtienen con este tratamiento varían dependiendo de la zona donde se ubican los compuestos de interés, así como de su naturaleza (Zuorro et al., 2011). Este método se ha usado para la extracción de licopeno, aceites vegetales, polifenoles, carotenoides, compuestos no volátiles precursores del aroma de uvas, polisacáridos, pigmentos, entre otros compuestos de interés (Zuorro et al., 2011; Puri et al., 2012). Investigaciones recientes han mostrado que la extracción con enzimas presenta mejores rendimientos, bajos costos energéticos y menor uso de solventes comparada con métodos no enzimáticos (Puri et al., 2012).

Por otro lado, los métodos no convencionales tienen la ventaja de poder ser combinados, por ejemplo, extracción enzimática y ultrasonido o microondas. Konwarh y colaboradores (2012) reportaron un efecto sinérgico en el aumento del rendimiento de extracción de licopeno de desechos de jitomate al combinar los tratamientos de ultrasonido y enzimas; además los tiempos de reacción y concentración de enzima pudieron reducirse sin afectar el rendimiento.

Así, si bien es cierto que cada método debe ser adaptado para el producto y compuestos bioactivos a extraer, los resultados apuntan a una mayor eficiencia de las tecnologías no convencionales en comparación con las convencionales.

1.8 Determinación de la actividad antioxidante

La capacidad antioxidante de una mezcla no siempre se debe a la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, también depende del microambiente en que se encuentran los compuestos. Así, los compuestos pueden interactuar entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Kuokoski et al., 2005). Debido a esto es necesario que la metodología empleada para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto o mezcla tenga en cuenta los distintos factores

que pueden afectar la determinación, así como la naturaleza de los compuestos con posible función antioxidante y de las fases que son empleadas para su extracción.

Con la finalidad de medir la capacidad antioxidante de compuestos o mezclas de compuestos, como son los extractos de materiales vegetales, se han desarrollado distintas metodologías, que se pueden dividir en dos grupos, los ensayos *in vitro* que se realizan a nivel químico y donde no se involucran organismos vivos y los ensayos *in vivo*, que se realizan en organismos vivos (desde células hasta plantas y mamíferos superiores).

La necesidad de desarrollar metodologías *in vitro* surge de la gran dificultad para evaluar los complejos mecanismos que interactúan en los organismos vivos. Sin embargo, los mecanismos *in vitro* tienen mejor aproximación cuando se realizan varios ensayos diferentes sobre la misma muestra, ya que cada uno proporciona distinta información sobre las propiedades del compuesto o mezcla analizados. Es importante mencionar que aún así, los ensayos *in vitro* sólo dan una aproximación a lo que ocurre dentro de los seres vivos, debido a la gran cantidad de sistemas reguladores que existen en ellos, además de los sistemas y factores que afectan la absorción y el metabolismo de los compuestos en los organismos. Por lo que compuestos que presentan alta capacidad antioxidante en estos ensayos podrían ser biológicamente inactivos (López-Alarcón y Denicola, 2013; Bender y Graziano, 2015).

Así, los métodos *in vitro* son sencillos de realizar, se conocen bien los mecanismos por los cuales actúan, además de tener resultados rápidos; sin embargo, no reflejan lo que ocurre en los organismos vivos. Por el otro lado, los ensayos *in vivo* dan información real sobre la actividad de un compuesto o extracto en un organismo vivo, sin embargo, suelen ser largos, los métodos de medición son complicados, hay mucha variación dentro de los sistemas modelo y los resultados pueden ser complicados de interpretar.

1.8.1 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Muchos de estos ensayos determinan la capacidad antioxidante frente a sustancias cromógenas; el cambio en la longitud de onda de máxima absorbancia ocurre de forma proporcional con la concentración del agente antioxidante (Kuokoski et al., 2005).

1.8.1.1 Neutralización de radicales libres estables. DPPH y ABTS

Los ensayos de ABTS y DPPH se basan en la neutralización de un radical catión estable que presenta un máximo de absorbancia en su estado radical y otro una vez han sido neutralizados (López-Alarcón y Denicola, 2013).

El método de DPPH fue descrito por primera vez en 1958 por Blois, a partir de entonces ha sufrido diversas modificaciones. El DPPH es un radical libre estable capaz de reaccionar con compuestos donadores de átomos de hidrógeno (Fig 20). En su forma activa presenta una coloración púrpura, que tras la reacción con un compuesto antioxidante sufre decoloración. La actividad antioxidante del compuesto es medida por el decremento en la absorbancia de la solución a 515 nm. El radical debe disolverse en un solvente orgánico, comúnmente metanol o etanol. Es necesario permitir la reacción durante 15-30 minutos; la decoloración del radical es proporcional a la concentración del antioxidante (Krishnaiah et al., 2011).

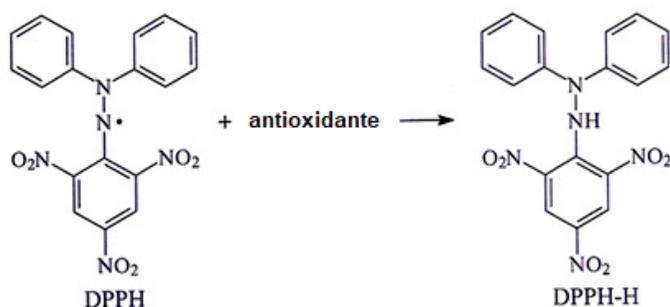


Figura 20. Reacción de neutralización del radical DPPH.

El método de ABTS fue desarrollado por Rice-Evans y Miller en 1994 y fue modificado en 1999 por Re y col. Esta modificación da como resultado un cromóforo azul/verde debido a la reacción de ABTS con persulfato de potasio, a diferencia del DPPH que se vende en su forma activa, el radical ABTS debe generarse (Krishnaiah et al, 2011). La reducción de este radical puede darse en presencia de agentes donadores de hidrogeno o donadores de electrones, según la naturaleza del antioxidante y el pH del medio (Shahidi y Zhong, 2015). La medición se realiza a través de espectrofotómetro a 734 nm, el decremento en la absorbancia es proporcional a la concentración del antioxidante (Fig 21). El efecto de la concentración del antioxidante y la duración de la neutralización del catión son tomadas en cuenta para la determinación. El Trolox, un análogo soluble en agua de la vitamina E es usado como control, debido a esto también es conocido como el método TEAC (actividad antioxidante equivalente de Trolox) (Shahidi y Zhong, 2015). Este método

puede ser usado para determinar la capacidad antioxidante de fracciones hidrofílicas y lipofílicas (Krishnaiah et al., 2011).

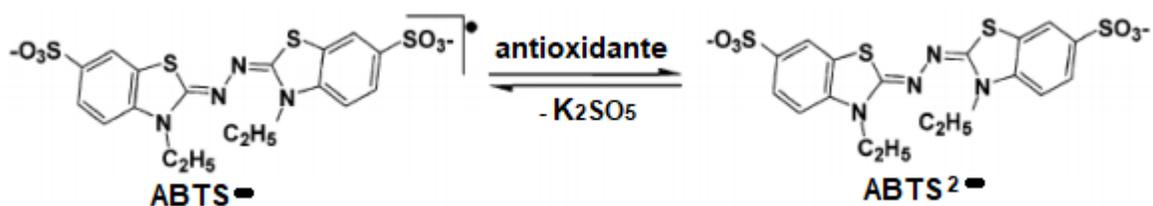


Figura 21. Reacción de neutralización del radical ABTS.

El método de capacidad actividad de reducción de cobre (CUPRAC) fue reportado por Apak y colaboradores (2007). Es un método espectrofotométrico en el cual se mide la formación de un complejo de cobre al pasar de cobre oxidado a cobre reducido (Cu^{II} a Cu^{I}), cuya absorbancia se mide en los 450 nm (Fig 22). La actividad medida en esta prueba se refiere a la capacidad reductora de los compuestos probados, la cual está relacionada con su capacidad de donar electrones y de esta manera actuar como neutralizadores de RL.

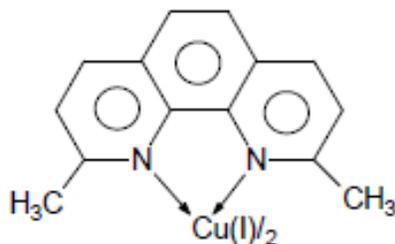


Figura 22. Complejo neocuproína-cobre utilizado en el método CUPRAC.

A pesar de ser métodos simples, rápidos, que no requieren equipo sofisticado para su realización y altamente reproducibles, estos métodos se han clasificado como métodos poco relevantes a nivel biológico debido a la diferencia de condiciones en el medio y los mecanismos regulatorios encontrados *in vivo*, sin embargo, la información que proporcionan debe ser considerada como parte importante de la caracterización de los materiales estudiados (Embuscado, 2015; Shahidi y Zhong, 2015).

Además de los métodos mencionados, los métodos (por sus siglas en inglés) FRAP (poder antioxidante reductor de hierro), ORAC (capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno) y TRAP (parámetro total antioxidante de atrapamiento de radicales) son

ampliamente utilizados en la evaluación de capacidad antioxidante de compuestos (Embuscado et al., 2015).

1.8.2 Determinación de la capacidad antioxidante *in vivo*

En comparación con los métodos *in vitro*, las metodologías para evaluar la capacidad antioxidante *in vivo* requieren mayor cantidad de recursos para su realización debido a que se utilizan complejos sistemas de pruebas, muchos individuos de estudio y una gran cantidad de muestras a analizar mediante métodos que no siempre son sencillos, rápidos o económicos. Sin embargo, son la única forma real de involucrar factores que a nivel *in vitro* no son analizables, como la biodisponibilidad de los compuestos, su asimilación, el metabolismo al que están expuestos o los procesos membranales, que son cruciales para la efectividad de cualquier compuesto a nivel *in vivo*.

En estas metodologías existen dos subdivisiones, los métodos que se realizan en animales y humanos, como ensayos clínicos y los que utilizan células como modelo de estudio, que son más rápidos y con menos factores externos al experimento (López-Alarcón y Denicola, 2013). La mayoría de las metodologías en animales tienen el inconveniente de terminar en el sacrificio del ejemplar para evaluar las condiciones en que se encuentran los tejidos u órganos completos (Alam et al., 2013). A pesar de estos inconvenientes, los estudios en animales son piezas claves en la construcción del conocimiento de los mecanismos involucrados en la actividad de los compuestos, además de que nos acercan más a las posibles aplicaciones en humanos.

1.8.2.1 *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental

Existen ciertos criterios que un organismo debe cumplir para ser un buen modelo para el estudio de enfermedades degenerativas y envejecimiento. Entre ellos se pueden enunciar: mostrar síntomas de envejecimiento; tener una duración de vida corta; ser relativamente sencillo en morfología e histología, con la finalidad de facilitar el estudio de los procesos fundamentales del envejecimiento y poder demostrar diferencias a nivel celular; que pueda crecer bajo condiciones controladas, preferentemente de forma sencilla; que puedan obtenerse cantidades suficientes para realizar pruebas bioquímicas y detectar cambios relacionados con la edad (Gershon, 1970). Todas estas características y algunas otras ventajas se encuentran en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

C. elegans es un nematodo de vida libre, es decir, que se puede encontrar en los suelos como su hábitat natural, de aproximadamente 0.25 mm en la etapa larvaria y 1 mm de longitud en su etapa adulta. Se pueden encontrar dos formas sexuales, hermafrodita o macho siendo mucho más frecuente la hermafrodita. Puede ser cultivado de forma barata en agar teniendo bacteria *E. coli* como fuente de alimento. Presenta un ciclo de vida corto y una alta tasa de reproducción (Chege y McColl, 2014). Fue propuesto desde mediados del siglo XX para el estudio de aspectos relacionados con biología molecular por Sydney Brenner (Corsi et al., 2015).

Debido al pequeño tamaño de los individuos, pueden crearse por millares en cajas Petri, aunque es necesario para su estudio la observación bajo microscopio (Fig 23). Cuando se tienen equipos suficientemente poderosos, y aprovechando la ventaja de ser un organismo transparente, pueden hacerse observaciones a nivel celular, utilizando marcadores fluorescentes para marcar proteínas o compartimentos celulares (Corsi et al., 2015)

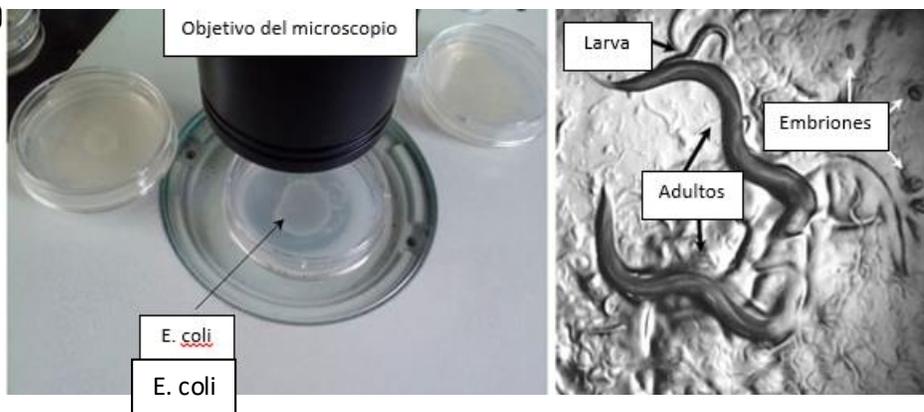


Figura 23. Vista al microscopio del nematodo *C. elegans*. Tomado de Corsi et al., 2015

Su ciclo de vida toma (Fig 24) aproximadamente tres días a 25°C y hasta 4 semanas a 20°C que es la condición más comúnmente empleada para su estudio. La temperatura a la que se cultivan estos organismos influye directamente en sus ciclos reproductivos, siendo uno de los parámetros que se utilizan cuando se requiere un crecimiento lento, tanto de las larvas como de la reproducción. Sin embargo, cuando se colocan en temperaturas mayores a 25°C se detiene la reproducción debido a que se vuelven estériles. La embriogénesis dura alrededor de 10-15 h a 20°C. Los gusanos recién salidos del huevecillo se conocen como de etapa L1 que dura cerca de 12-16 h. Las otras dos etapas (L2 y L3) duran cerca de 8-12 h cada una; el gusano termina cada etapa de su vida con un periodo de inactividad llamado letargo. Después de 8-12 h en la etapa L4, los

adultos comienzan a producir progenie. Cuando la cantidad de comida disponible es baja las larvas pueden entrar en un estado conocido como “dauer” el cual es una variante del estado L3. En este estado, los gusanos se vuelven más resistentes contra el estrés y condiciones adversas (es la forma más común en la naturaleza). Cuando las condiciones son favorables el gusano continúa su desarrollo hasta la fase L4. Una vez en esta fase puede vivir cerca de 3 semanas antes de morir por senescencia (Corsi et al., 2015).

Debido a que los individuos se desarrollan con un número invariable de células somáticas, han sido posibles estudios de los cambios que ocurren en cada célula durante su desarrollo. Adicionalmente, por ser un organismo pluricelular, tiene la ventaja de permitir el estudio de las complejas interacciones celulares de los organismos superiores.

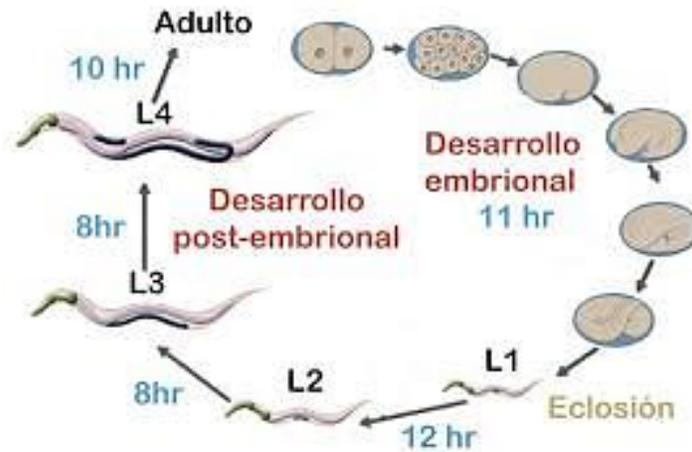


Figura 24. Ciclo de vida del nematodo *C. elegans*.

El genoma de *C. elegans* ha sido secuenciado completamente; se ha descubierto que cerca del 80% de sus genes tienen un gen homólogo en humanos, además que al menos 42% de los genes involucrados en el desarrollo de enfermedades en humanos tienen un homólogo en *C. elegans*. Aunado a esto, este organismo puede ser (y ha sido) modificado genéticamente para expresar genes relacionados con enfermedades desarrolladas en humanos como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer, además cuentan con un sistema neuronal que posee la mayoría de los sistemas neurotransmisores de mamíferos (Chege y McColl, 2014)

El gran conocimiento que se tiene sobre el genoma de este nematodo permite, además de evaluar el efecto que tienen un gran número de compuestos sobre su vida, desarrollo y

metabolismo, analizar el mecanismo de acción de dichos compuestos, a nivel de expresión y represión de genes, así como interacción de los compuestos con los componentes de las células (Lucanic et al., 2013).

A pesar de las claras diferencias evolutivas entre *C. elegans* y los mamíferos, existe una gran similitud entre su biología celular y molecular, por lo cual se han podido desarrollar trabajos usando como modelo *C. elegans* con miras a realizar pruebas posteriores en mamíferos. Uno de los mecanismos de señalización más conservados es el relacionado con las respuestas contra el estrés oxidante, por lo cual *C. elegans* es uno de los organismos preferidos para realizar evaluaciones sobre daño oxidante así como su prevención con el uso de compuestos funcionales (Kampkötter et al., 2007; Martorell et al., 2011; Monroy et al., 2013, Lucanic et al., 2013).

2. Justificación

La salud humana siempre ha estado estrechamente relacionada con dos factores, su alimentación y las condiciones de su entorno (el medio ambiente). De manera similar, estos dos factores se relacionan entre sí pues es el entorno quien “provee” de alimento a los seres vivos. La manera en que obtenemos los alimentos del entorno puede afectar de manera importante el equilibrio en que éste se desarrolla, pudiendo llegar a desestabilizarlo a tal punto que no sea capaz de continuar sus ciclos normales. Por otro lado, los alimentos que tomamos del entorno en muchas ocasiones contienen sustancias útiles para el ser humano, las cuales pueden tener aplicaciones más allá de la necesidad básica de alimentación (ej. pigmentos, fitofármacos, gomas, etc.), lo que propicia mayor necesidad de conseguir estos materiales y con ellos una posible descompensación para el ambiente. Y lo que es más, si los métodos mediante los cuales se obtienen estos recursos no son desarrollados considerando promover el equilibrio con entorno y el resto de seres vivos, el daño generado en el ambiente podría no ser reversible en un futuro. Debido a que las sociedades humanas basan su desarrollo en el consumo de recursos naturales, la solución a los problemas que se ocasionan por ello no es dejar de aprovecharlos, sino hacerlo de una manera sustentable.

Entre los distintos tipos de compuestos que resultan de interés para los humanos están los llamados compuestos bioactivos, los cuales tienen la capacidad de regular funciones en los organismos y son muy apreciados por su potencial aplicación en sectores como el de la salud. Existen diversas metodologías bien establecidas para extraer compuestos

bioactivos de productos vegetales. Sin embargo, presentan desventajas como baja eficiencia y alto impacto en el ambiente. Además, para las extracciones de compuestos liposolubles, la mayoría de los solventes usados son altamente contaminantes y/o tóxicos, quedando restringido su uso para alimentos o medicamentos. La aplicación de nuevas tecnologías con menores requerimientos energéticos, mayores rendimientos y que sean más amigables con el ambiente y los operarios, sin dejar de ser viables económicamente, es un área de investigación prioritaria para la industria química. Dos tecnologías de reciente aplicación para la extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales, la sonicación y la extracción asistida por enzimas, se perfilan como buenos candidatos para su incorporación a escala industrial en un futuro cercano. Además, el uso de solventes verdes como alternativa a los solventes convencionales es un tema primordial ya que en diversas industrias químicas los solventes llegan a representar más del 50% de los residuos generados.

El achiote (*Bixa orellana*) y el jitomate (*Solanum lycopersicum*) son fuentes de compuestos funcionales. En México, el cultivo del achiote es principalmente de traspatio; en la Península de Yucatán se han colectado 40 accesiones de achiote con características morfológicas distintas, muy pocas de ellas están bien caracterizadas. En el caso de los jitomates, es hasta años recientes que se ha dado importancia a atributos ocultos de calidad como el sabor y el contenido de compuestos funcionales. En estos, la inclusión de frutos de genotipos nativos puede aportar características atractivas a los frutos híbridos, además del consumo directo que se hace de ellos, que es generalmente regional. El estudio formal de las propiedades de estos recursos puede ayudar a potenciar su aprovechamiento y darles mayor valor agregado en el mercado. Además, el potencial que tienen para influir en la prevención de enfermedades degenerativas, mejorar la salud de la población y reducir los costos en materia de salud pública merece la pena ser investigado. En línea con esto, el estudio en organismos modelo permite dilucidar los mecanismos involucrados en los efectos de los compuestos en estudio aportando información que facilite la predicción sobre su posible efecto en humanos. Para este fin el nematodo *Caenorhabditis elegans* es uno de los modelos mejor aceptados y más utilizados en los últimos años.

3. Hipótesis

La extracción de compuestos bioactivos utilizando tecnologías no convencionales permitirá tener rendimientos iguales o superiores a los obtenidos con las metodologías convencionales, disminuyendo el impacto negativo en el ambiente y en la salud de los operarios, mejorando así el aprovechamiento de los recursos.

Los extractos de achiote y jitomate tendrán un efecto biológico benéfico sobre el nematodo *C. elegans*, el cual será debido a los compuestos presentes en ellos; dicho efecto tendrá relación con la capacidad de los extractos para reforzar las defensas anti-estrés e influirá en la salud y longevidad del gusano.

El uso de cepas mutantes de *C. elegans* permitirá profundizar en el conocimiento del efecto de los compuestos bioactivos presentes en los extractos de achiote y jitomate y en los mecanismos involucrados en tales efectos, aportando así información sobre su posible uso como tratamiento preventivo contra enfermedades degenerativas.

4. Objetivos

4.1 General

Determinar el contenido y composición de compuestos funcionales, así como la actividad funcional *in vitro* e *in vivo* (mediante el uso del modelo de *C. elegans*) de extractos obtenidos por métodos de extracción convencionales y no convencionales de accesiones de achiote (*Bixa orellana*) y de genotipos nativos de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.).

4.2 Particulares

- Obtener extractos de achiote (*Bixa orellana*) y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) por métodos convencionales (maceración con solventes) y no convencionales (sonicación, uso de solventes verdes y extracción asistida por enzimas).
- Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos obtenidos.
- Obtener los rendimientos e identificar los compuestos con actividad biológica (carotenoides, tocoferoles, tocotrienoles) presentes en los extractos.
- Determinar la actividad funcional *in vivo* de los extractos con mayor contenido de antioxidantes.
- Explorar las vías de señalización involucradas en la actividad funcional de los extractos de achiote y jitomate mediante el uso de cepas mutantes de *C. elegans*.

5. Materiales y Métodos

En las siguientes líneas se describen las metodologías utilizadas en el estudio. Los diagramas 1 y 2 (al final de la descripción de materiales y métodos) resumen el trabajo realizado.

5.1 Achiote y jitomate

Las accesiones de achiote estudiadas en este trabajo son provenientes de los estados de Campeche (E, 19°34'20.50"/89°36'15.94" y NE, 20°10'13.06"/90°0'37.7"), Quintana Roo (2N, 19°35'27.33"/88°35'39.03") y Yucatán (NAT, 20°59'25.59"/88°18'14.1" y YUC, 20°50'59.4"/88°5'33.8"), y fueron donadas por el Dr. Luis Pinzón del Instituto Tecnológico de Conkal. Las accesiones se codificaron con la nomenclatura E, 2N, NE, YUC y NAT y forman parte del banco de accesiones recolectadas en la península de Yucatán y resguardadas en la Universidad Autónoma Chapingo como parte de los trabajos realizados por la Red Temática de Achiote (REMEFI). Se utilizó también la accesión 42 con la finalidad de estandarizar las metodologías y como punto de comparación de los datos encontrados debido a que la caracterización de esta accesión ya ha sido publicada (Raddatz-Mota et al., 2016).

En el caso de jitomate se estudiaron dos genotipos nativos de jitomate, el 209, tipo cereza, y el 210, tipo ojo de venado, colectados en el estado de Puebla por el Dr. Ricardo Lobato del Colegio de Postgraduados Estado de México y propagados en el campus Montecillos de la misma institución. La madurez de los frutos al momento de su cosecha fue comparable a la madurez comercial para las variedades comerciales. También se emplearon para ensayos preliminares frutos de variedad comercial saladette, madurez de consumo, de extracción en los que se probó el efecto de la aplicación de enzimas y las condiciones de la reacción enzimática.

5.2 Obtención de extractos

5.2.1 Extractos de achiote

5.2.1.1 Extracción convencional de norbixina

Se empleó la metodología publicada por la FAO/WHO (2006) y la NOM-119-SSA1-1994. Se tomaron 0.5 g de semillas intactas se extrajeron con 5 mL de NaOH 0.1 N, se agitó en vortex por 5 min y se añadieron 5 mL más de NaOH 0.1 N. Se agitó nuevamente por 5

min y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min, se recuperó el sobrenadante y las semillas fueron desechadas.

5.2.1.2 Extracción de norbixina con equipo de sonicación en baño

La extracción con sonicación en baño se realizó reemplazando la agitación en vortex por sonicación en baño (Branson modelo 3510, 42kHz, 100 W) por 10 min. El volumen de NaOH (10 mL) fue colocado en una sola adición. El extracto se dejó reposar durante 10 min y se colectó el sobrenadante el cual fue analizado.

5.2.1.2 Obtención de extractos hidrofílicos e hidrofóbicos de achiote por métodos convencionales.

Método de referencia. Se utilizó la metodología reportada por Mène-Saffranè y colaboradores (2010) con ligeras modificaciones. Brevemente, 0.5 g de semilla molida en homogenizador de alta velocidad se mezclaron con 30 mL de etanol 96% v/v (EtOH); posteriormente, se agregaron 33 mL de diclorometano (DCM). Esta mezcla se agitó en vórtex durante 5 min, a continuación, se agregaron 70 mL de agua, se agitó 5 min más y se centrifugó a 2000 x g por 10 min a 4°C. Se colectó la fase acuosa (extracto hidrofílico) y el material vegetal se reextrajo dos veces más con nueva adición de agua:DCM (4:3.3 v/v). Las nuevas fases acuosas se descartaron y las fases orgánicas se mezclaron y aforaron a 100 mL con DCM (extracto hidrofóbico). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Extractos obtenidos por este método no presentaron diferencias significativas al comparar con una extracción usando las mismas proporciones de materiales, cambiando la agitación en vortex por agitación convencional (equipo de agitación orbital) durante 2.5 h.

Extracción con reflujo. Un gramo de semilla molida de la accesión 42 fue sometido a extracción con reflujo utilizando un equipo Soxhlet. El material vegetal se extrajo utilizando 250 mL de DCM a 55°C por 1.5 h, tiempo en que se alcanzó la máxima extracción posible.

Optimización de la extracción convencional con un diseño Taguchi. Se realizó un diseño para mejorar la eficiencia de la extracción de bixina de semillas de achiote estudiando los parámetros involucrados en la extracción con agitador orbital. Esta prueba se realizó después de las pruebas de sonicación en baño con solventes verdes por lo que los solventes probados aquí corresponden a los seleccionados en esas pruebas.

Para ello, se implementó un experimento tipo Taguchi donde se probaron los parámetros: accesión usada, solvente, tiempo de agitación, velocidad de agitación, aplicación de pretratamiento y relación volumen:masa, ya que estos factores son importantes en las metodologías de extracción por maceración con agitación. En el Cuadro 3 se presentan los niveles de los factores estudiados. En el Cuadro 4 se presenta la distribución de los experimentos.

En el caso de aplicar pretratamiento, éste se aplicó durante 48 h previo a la molienda y consistió en mantener las semillas sumergidas en agua destilada o agua acidificada, el ácido empleado fue ácido acético 5% v/v.

Las semillas utilizadas (0.5 g) fueron molidas para todos los experimentos con un homogenizador de cuchillas Omni International GLH-01 durante 2 min a velocidad 2. Se agregaron 40 mL de agua, la mezcla se agitó en vórtex por 5 min y fue centrifugada a 2000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y al residuo de semillas se le agregó la cantidad de solvente indicada en el diseño. Después se dejó en agitación orbital durante el tiempo indicado. Las muestras fueron centrifugadas, colectadas y almacenadas a -70°C hasta su análisis.

Se aplicó el análisis estadístico específico para el diseño Taguchi, basado en comparación de las medias de los datos.

5.2.1.3 Obtención de extractos por métodos no convencionales

Sonicación en baño. Para la extracción en baño de sonicación se probaron parámetros de tiempo de sonicación y relación masa:volumen. Se tomaron 200 mg de semilla molida y se agregaron a un vial. Se adicionó EtOH 96% v/v, seguido de DCM (relación 1:60:200 p/v/v) respetando la relación utilizada en el procedimiento de extracción de referencia. Posteriormente, se realizaron extracciones con menores volúmenes de extracción (1:45:150; 1:33:100; 1:15:50 p/v/v). Las mezclas se sometieron a sonicación en baño (Branson modelo 3510, 100 W, 42 kHz, Emerson Industrial Automation, USA) durante tres tiempos diferentes (10, 20 y 30 min). Transcurrido el tiempo de sonicación se agregó agua a la mezcla en proporción 7:10 v/v (agua:mezcla EtOH:DCM) y se agitó en vórtex durante 1 min. Se centrifugó a 2000 g por 10 min a 4°C y se colectaron las fases, acuosa (extracto hidrofílico) y orgánica (extracto hidrofóbico), por separado, las cuales fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis.

Extracción con solventes verdes. Las semillas de achiote molidas se extrajeron con el uso de solventes verdes: acetona (ACE), acetato de amilo (AAM), alcohol ter-butílico (ATB), alcohol etílico (EtOH), acetato de etilo (AET), acetato de isopropilo (AIP), cimeno (CIM) y lactato de etilo (LET), los cuales fueron elegidos mediante el uso de la guía GlaxoSmithKline, de la ACS aprobados por la FDA para usarse en alimentos. Para todos los solventes se utilizó la metodología de sonicación en baño ya descrita con tiempo de sonicación de 20 min y 1.5 mL de volumen de solvente orgánico. En el caso de la acetona y el lactato de etilo, que son miscibles en agua, la extracción se realizó con un procedimiento diferente, que se detalla a continuación. Se pesaron 10 mg de semilla molida se extrajeron con 300 μ L de EtOH y 700 μ L de agua. La mezcla se agitó durante 5 min en vortex y se centrifugó a 2000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se separó y la pastilla se extrajo con 1.5 μ L del solvente orgánico probado en baño de sonicación durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 1800 g por 5 min a 4°C y el sobrenadante se colectó como la fase lipofílica. Ambas fases se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Extracción con sonicación por sonda. La extracción con sonotrodo se realizó utilizando AIP y el LET por haberse obtenido buenos resultados en la fase anterior (con baño de sonicación). Se incluyó al EtOH por ser el solvente orgánico más amigable para la extracción de compuestos de naturaleza hidrófoba. Se probaron tiempos de sonicación (5, 10 y 15 min), relación masa:volumen (1:20, 1:50 y 1:100 p/v) y número de extracciones (1, 2 o 3 manteniendo el volumen final entre 5-6 mL). Se homogenizaron 0.5 g de semilla con 15 mL de EtOH y posteriormente se agregaron 35 mL de agua. El tubo se agitó en vortex durante 5 min y se centrifugó a 2000 g x 10 min a 10°C. El sobrenadante acuoso se retiró y se agregó el solvente orgánico (en volumen variable). La mezcla semilla-solvente orgánico fue sonicada con un sonicador de sonda (Vibra-Cell, 130 W, 20 kHz, Sonics and Materials, Inc., USA, amplitud 70%) durante los tiempos probados. Inmediatamente después de la sonicación, el tubo fue colocado en agua fría para disminuir la temperatura. Los extractos fueron centrifugados durante 5 min a 2000 g por 10 min a 10°C y el sobrenadante fue colectado y almacenado a -70°C hasta su análisis.

Extracción con sonicación por sonda con pulsos, con y sin enfriamiento. Para la sonicación continua en frío se siguió la misma metodología que la sonicación en sonotrodo sin frío, fijando la relación masa:volumen en 1:50, el tiempo de tratamiento en 5 min y una sola etapa de sonicación, durante la cual el recipiente que contenía el material a sonicar estuvo sumergido en un baño con hielo para evitar su calentamiento. En la

sonicación por pulsos lo que varió fue la aplicación de tiempos de 30 s de sonicación por 30 s de descanso, hasta completar 5 min totales. Los pulsos en frío se aplicaron de la misma manera, colocando el recipiente de la muestra en un baño con hielo durante el tratamiento.

5.2.2 Extractos de jitomate

5.2.2.1 Experimento factorial, reacción enzimática. Enzimas y medio de la reacción enzimática.

Se realizó un experimento factorial en el que se probaron las enzimas estudiadas y los medios de reacción enzimática. Los medios con pH (4-6) regulado fueron amortiguadores compuestos de ácido acético y acetato con concentración de 0.2 M, el medio no regulado fue agua destilada. El tiempo de reacción fue fijado en 3 h en todos los casos y la temperatura fue 40°C. La concentración de enzima añadida fue del 5% del peso de la matriz vegetal. Las características de las enzimas se muestran en el Cuadro 10, todas las enzimas son del fabricante Novozyme. En el Cuadro 11 se presentan los factores y niveles estudiados.

Un gramo de pulpa de jitomate saladette comercial congelado y pulverizado, se mezcló con 3 mL del medio de reacción enzimática. A la mezcla se añadió 5% v/p de enzima y se mantuvo en agitación constante durante 3 h a 40°C. Al finalizar este tiempo, la matriz vegetal se separó del medio de reacción mediante filtrado. El residuo de jitomate fue extraído utilizando 4 mL de EtOH, 10 mL de diclorometano y 6 mL de agua mediante agitación en vortex por 15 min. Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 4500 x g durante 10 min. Se colectó la fase orgánica y se almacenó a -70°C hasta su análisis.

5.2.2.2 Experimentos factoriales fraccionados

Los experimentos fraccionados fueron utilizados con la finalidad de reducir la cantidad de experimentos necesarios para conocer las condiciones que maximizaran las variables respuesta, pero con información suficiente para conocer la influencia de los factores estudiados.

Condiciones para la reacción enzimática. Un gramo de pulpa de jitomate saladette comercial se pulverizó con nitrógeno líquido en un mortero y se mezcló con 3 mL de agua destilada o buffer de acetato 0.2 M pH 5. Se añadió la cantidad de enzima a probar y se dejó incubando por el tiempo y la temperatura correspondiente en agitación orbital

constante a 300 rpm. Una vez pasado el tiempo de reacción enzimática, para la extracción se procedió igual que en la metodología anterior. En el Cuadro 13 se presentan los factores analizados y sus niveles y el Cuadro 14 presenta la distribución de los experimentos.

Una vez optimizados los procedimientos para la extracción asistida por enzimas (enzima, medio de reacción, tiempo y temperatura), se procedió a realizar las pruebas con los genotipos nativos de jitomate.

Extracción combinando métodos no convencionales. En este experimento se estudiaron los genotipos nativos de jitomate. En el Cuadro 16 se presentan los factores de estudio y sus niveles. El Cuadro 17 presenta la distribución de los experimentos. 0.5 g de pulpa de jitomate congelado se trituraron en mortero y fueron mezclados con 5 mL de EtOH al 20% v/v, se agitó en vortex durante 5 min y se centrifugó a 4500 x g durante 10 min. El sobrenadante se separó y al residuo vegetal se le agregaron 2 mL de buffer de acetatos 0.2 M pH 5. En los tratamientos que así lo indican, se agregó 5 % v/p de enzima y se dejó incubar 1 h a 50°C con agitación. Posteriormente, las muestras se centrifugaron y se recuperó la pastilla por filtración con gasa. En los casos donde aplica la sonicación, la pastilla se mezcló con 5 mL de solvente y se sonicó durante 10 min con un equipo de sonda aplicando enfriamiento al medio. Posteriormente, se centrifugo a 4500 g por 10 min y la fase orgánica se colectó para su análisis. En los tratamientos donde la sonicación no aplica, después del tratamiento enzimático (si se trata de extracción asistida por enzimas) y la posterior recuperación del material vegetal, se agregaron 5 mL de solvente al residuo vegetal y se agitó en vortex durante 10 min. La fase orgánica fue colectada y almacenada a -70°C hasta su análisis.

5.3 Caracterización de los extractos de achiote y jitomate

5.3.1. Determinación del contenido de polifenoles totales

Los polifenoles totales se determinaron siguiendo el método de Folin–Ciocalteu. Se tomaron 200 µL de muestra y se mezclaron con 1000 µL de una solución de reactivo de Folin 10% v/v en agua, se dejó reaccionar durante 1 min y se agregaron 800 µL de carbonato de sodio 7.5% p/v. Después de 1 h de reacción a temperatura ambiente la absorbancia de la solución se midió en espectrofotómetro a 760 nm. Se realizó una curva patrón con ácido gálico para la cuantificación; los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico.

5.3.2 Determinación de carotenoides totales por espectrofotometría

5.3.2.1 Determinación de carotenoides en extractos de achiote

Determinación de Norbixina. La determinación de norbixina en los extractos se realizó siguiendo el método de la FAO (FAO/WHO, 2006). El extracto se diluyó con NaOH 0.1 N hasta obtener una absorbancia entre 0.3-1.0 a 482 nm (DU650 Spectrophotometer, BECKMAN, USA) usando NaOH 0.1 N como blanco. La concentración se determinó utilizando el coeficiente de absorción $A^{1\%}=287.0$ L/cm^g reportado para norbixina.

Determinación de Bixina. Se determinó el contenido de bixina en los extractos siguiendo el método reportado por Cardarelli y colaboradores (2008). Una alícuota de cada extracto se diluyó en DCM para obtener una absorbancia cercana a 0.5 medida a 470 nm. El cálculo de la concentración de bixina se realizó mediante la ley de Lambert-Beer empleando el coeficiente de absorción $A^{1\%}=282.6$ L/cm^g reportado para bixina en DCM.

5.3.2.3 Determinación de carotenoides en extractos de jitomate

Los carotenoides de los extractos de jitomate se monitorearon mediante la lectura en espectrofotómetro de una dilución adecuada para obtener una absorbancia cercana a 0.5 a 450 nm. Las diluciones fueron realizadas con DCM, mismo que se empleó como blanco. El residuo de solvente usado para la extracción no afectó el barrido comprendido entre 350 y 750 nm de las soluciones. La medición se realizó a 450 nm utilizando un coeficiente de absorción $A^{1\%}=235.0$ cmL/g reportado para licopeno que es el carotenoide más abundante en jitomate. Los resultados se expresan en μg eq. de licopeno/gramo de peso fresco.

5.3.3 Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS

Se siguió el método reportado por Re y colaboradores (1999). Se preparó una solución de radical ABTS con absorbancia de 0.7 a 734 nm (100 mL de agua, 16.5 mg de persulfato de potasio y 96.2 mg de ABTS; 700 μL de esta solución se mezclaron con 15 mL de EtOH 96% v/v). Se mezclaron 100 μL de muestra diluida con 1000 μL de la solución diluida de ABTS; se incubó por 10 min y se leyó la absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro. La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó mediante curva patrón de Trolox, los resultados se expresaron en μmol equivalentes de Trolox/gramo de peso fresco.

5.3.4 Cuantificación de carotenoides por HPLC

5.3.4.1 Cuantificación de bixina en extractos de achiote

Se siguió la técnica reportada por Fraser y colaboradores (2000) con las siguientes modificaciones. Las muestras se inyectaron en un equipo Agilent Technologies 1260 con bomba cuaternaria y automuestreador. Se usó una columna Waters Xterra MS C18 (5 μ m, 4.6 x 250 mm) con ACN:metanol:DCM (60:20:20 v/v/v) como fase móvil en corrida isocrática y temperatura ambiente. El flujo fue de 0.8 mL/min y el detector (DAD) se trabajó a 460 nm. La cuantificación se realizó usando curva patrón de bixina.

5.3.4.2 Cuantificación de carotenoides (licopeno, β -caroteno y luteína) en extractos de jitomate

Se siguió la técnica anterior con las siguientes modificaciones. La fase móvil fue ACN:metanol:DCM (43:43:14 v/v/v) en corrida isocrática. El flujo fue de 1 mL/min y el detector (DAD) se trabajó a 455 nm. La cuantificación se realizó mediante curvas patrón de licopeno, β -caroteno y luteína.

5.3.5 Cuantificación de tococromanos mediante HPLC

Se realizó siguiendo la metodología reportada por Méne-Safrané y colaboradores (2010) con ligeras modificaciones. Se utilizó un equipo KNAUER con detector de fluorescencia Shimadzu RF-20, la fase estacionaria consistió en una columna LiChrospher 100 diol (5 μ m, 4.6x250 mm) y la fase móvil fue hexano:metil-ter-butílico (90:10 v/v) con flujo de 0.8mL/min. Se utilizó una longitud de onda de 296 nm de excitación y 340 nm de emisión. La cuantificación se realizó usando curvas estándar de α -, β -, γ - y δ -tocoferol, así como δ -tocotrienol.

5.4 Evaluación de la actividad funcional *in vivo* de los extractos de achiote y jitomate en el modelo *C. elegans*

Los extractos probados sobre el modelo *in vivo* son el extracto de la accesión E de achiote, obtenido mediante sonicación con sonda y enfriamiento usando AIP como solvente de extracción. Los extractos probados de jitomate corresponden al extracto obtenido del genotipo 209 obtenido con la aplicación de enzimas hidrolíticas, sonicación en baño y utilizando AIP como solvente.

5.4.1 Cepas y mantenimiento de los nematodos

Las cepa nativa N2 (Bristol) y las mutantes DA465 [eat-2 (ad465) II], GA186 [sod-3 (tm760) X], TJ1052 [age-1 (hx546) II], PS3551 [hsf-1 (sy441) I], EU1 skn-1 (zu67) IV / nT1 [unc -? (n754) let-?] (IV; V), CF1038 [daf-16 (mu86) I], CB1370 [daf-2 (e1370) III] se obtuvieron del Centro de Genética de *Caenorhabditis* (CGC). Los nematodos se propagaron a 20°C en cajas de Petri de 35 mm que contenían medio de crecimiento de nematodos (NGM) y se alimentaron con bacteria *E. coli* OP50 previamente inactivadas por luz UV (4 ciclos de 9999 x10² µJ/cm²). Todos los ensayos se realizaron en NGM sólido.

5.4.2 Efecto de los extractos en la curva de sobrevivencia

La curva de sobrevivencia se realizó de acuerdo a lo reportado por Alavez y colaboradores (2011). En cajas de Petri de 35 mm con NGM y *E. coli* inactivada por radiación UV. Se agregaron 100 µL de extracto seco de achiote o de jitomate disueltos en EtOH 96% v/v en concentraciones de 60, 100 o 170 µg/mL o 100, 200, 300, 450 o 600 µg/mL, respectivamente. Se utilizó EtOH 96% v/v como control. Adicionalmente se probaron bixina y δ-tocotrienol como compuestos puros, así como la mezcla de estos dos, igualmente disueltos en EtOH, en las concentraciones correspondientes a extractos de 100 µg/mL. Después de añadir el extracto sobre el medio NGM solidificado, se permitió la evaporación del solvente durante al menos 4 h. Se utilizaron cuarenta y cinco nematodos en etapa L4 para cada experimento. Los animales se transfirieron diariamente a cajas nuevas durante los primeros 5 días y en días alternos durante el resto del experimento. Los nematodos fueron calificados como vivos o muertos diariamente hasta la muerte de todos los individuos. Los experimentos se realizaron a 20°C. Las curvas de sobrevivencia se representaron gráficamente y los análisis estadísticos (pruebas de log-rank) se realizaron con el software Prism 6 (Graphpad Software Inc., CA, EE. UU).

5.4.3 Efecto de los extractos sobre la tolerancia a estrés

Antes de la inducción de estrés (oxidante, térmico o radiación UV) los nematodos se trataron durante 48 h en cajas de Petri que contenían EtOH 96% v/v (control), extracto de achiote (60, 100 o 170 µg/mL), bixina (30 µg/mL), δ-tocotrienol (10 µg/mL) o extracto de jitomate (100, 200, 300, 450, 600 µg/mL). La bixina y el δ-tocotrienol se obtuvieron de Sigma-Aldrich. En estos ensayos se utilizaron 40 adultos jóvenes de un día por experimento.

5.4.3.1 Ensayo de termotolerancia

Después de las 48 h de tratamiento con el extracto probado, la temperatura se elevó a 35°C y se evaluó la supervivencia de los animales después de 8 h y posteriormente cada 2 h hasta que todos los individuos murieron.

5.4.3.2 Ensayo de tolerancia al estrés oxidante

Después de las 48 h de tratamiento previo, los gusanos se expusieron a H₂O₂ 1.5 mM y luego de 4 h de incubación a 20 ° C se realizó una determinación contando los animales que sobrevivieron.

5.4.3.3 Ensayo de tolerancia a radiación UV

La radiación UV se aplicó durante 1.7 min (100 µJ/cm²) utilizando una cámara de radiación UVC (Crosslinker UVC-500, Hoefer, Massachusetts, EE. UU.) sin cambios importantes de temperatura. Después del estrés, los nematodos se incubaron a 20°C durante 24 h y transcurrido este tiempo, se realizó una determinación contando los animales que sobrevivieron.

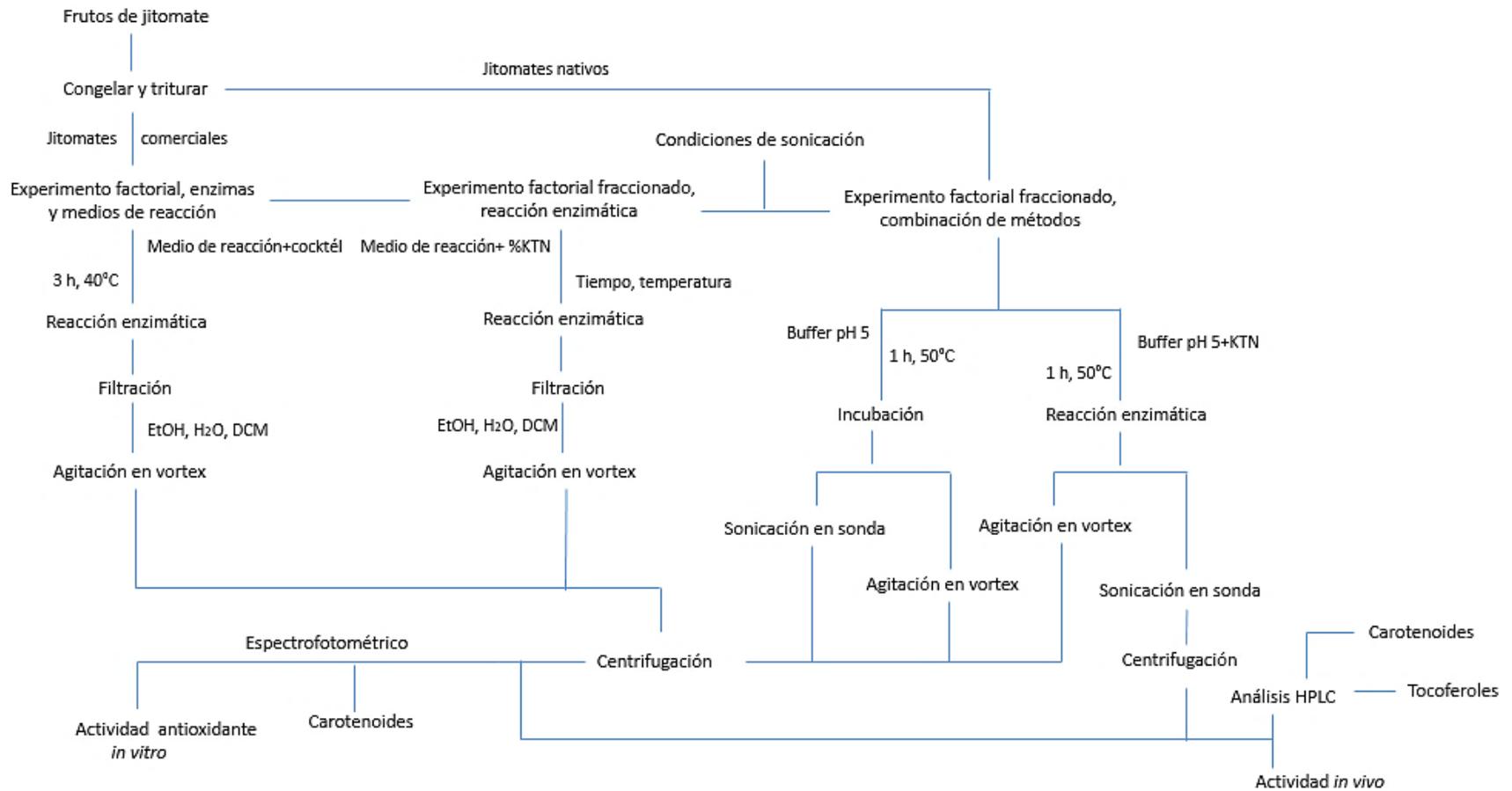
5.4.4 Efecto de los extractos sobre la fertilidad

La fertilidad se analizó en los nematodos control y en los sometidos a concentraciones de 60 µg/mL y 170 µg/mL del extracto de achiote, así como a 200, 450 y 600 µg/mL del extracto de jitomate, todos en la cepa N2, siguiendo la metodología reportada por Chen y colaboradores (2014). Se colocaron dos nematodos en cajas Petri que contenían el tratamiento a probar. Los nematodos se transfirieron cada día a cajas nuevas durante los primeros 5-6 días de la edad adulta y se contó la progenie producida cuando las larvas alcanzaron la etapa L3.

5.5 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron a través de ANOVA de uno o de varios factores, pruebas de correlación y pruebas log-rank para curva de supervivencia con el software GraphPad Prisma 6, así como prueba t de Student, y regresión lineal o regresión múltiple con el software Statgraphics Centurion. La significancia de todas las pruebas fue fijada en $\alpha=0.05$.

Diagrama 2.- Métodos y pruebas empleados para el estudio de los frutos de jitomate y sus propiedades.



6. Resultados y discusión de resultados

Los resultados para cada tipo de material estudiado (achiote y jitomate) son presentados y discutidos de manera independiente, debido a las grandes diferencias existentes tanto en las metodologías como en el enfoque desde el que se abordó cada uno de estos productos. Al final se presenta una discusión y conclusión integrada.

6.1 Extractos de achiote

6.1.1 Obtención de extractos de seis accesiones de achiote mediante métodos convencionales

6.1.1.1 Contenido de bixina y norbixina determinados por espectrofotometría

Los resultados de extracción de bixina con el método de referencia se presentan en la Figura 25a. De las distintas accesiones analizadas, los extractos de la accesión 42 presentaron el menor contenido de bixina (9.85 mg/gps), sin encontrarse diferencias significativas entre el resto de las accesiones (13.93-14.61 mg/gps), exceptuando la accesión NAT cuyos valores estuvieron ligeramente por debajo del resto (12.56 mg/gps). En la literatura hay reportes muy variados sobre el contenido de bixina en extractos de achiote, que van desde 0.27 mg/gps hasta 73 mg/gps (Cardarelli et al., 2008; Chisté et al., 2011; Dequigiovani et al., 2017). Estos valores se ven fuertemente afectados por variables como el origen de la semilla utilizada, la variedad, los métodos de extracción y cuantificación, los solventes usados, entre otros (Rahmalia et al., 2015). Un intervalo promedio de valores reportados está entre 10 y 35 mg/gps.

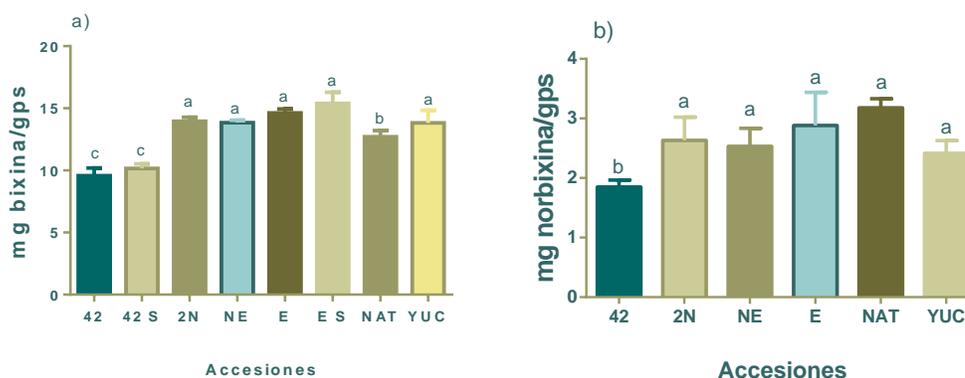


Figura 25. a) Contenido de bixina en los extractos de las distintas accesiones de achiote estudiadas obtenidos por el método de referencia o con reflujó en equipo Soxhlet (42 S y E S); b) Contenido de norbixina en los extractos de las distintas accesiones de achiote estudiadas

obtenidos por agitación. Letras distintas indican diferencia significativa de acuerdo a la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$. gps: gramo de peso seco.

Cuando la extracción se realizó utilizando un equipo Soxhlet, los valores de bixina no se modificaron con respecto a la extracción mediante el método de referencia (accesión 42, 9.85 vs 10.17 mg/gps; accesión E, 14.61 vs 15.68; Figura 25a); estos resultados indican que ambos métodos lograron extraer la totalidad de bixina extraíble presente en las semillas. La extracción con Soxhlet sólo se realizó en las accesiones 42 y E, aunque se presume que el resto de las accesiones tendrían el mismo comportamiento. Aun así, debido al tiempo, solventes y energía requeridos para estos métodos, se consideran poco eficientes.

Se determinó el contenido de norbixina en los extractos de las seis accesiones analizadas. Los resultados se observan en la Figura 25b. La norbixina es el segundo carotenoide de mayor abundancia e importancia en las semillas de achiote y se usa para colorear diversos productos de naturaleza acuosa. Como se observa en la Figura 25b, los contenidos de norbixina variaron entre 1.84 y 3.17 mg/gps, siendo nuevamente la accesión 42 la de menor contenido y sin diferencias significativas entre el resto de las accesiones. Estas determinaciones se realizaron como parte de la caracterización de las accesiones. Raddatz-Mota y colaboradores (2016) reportaron valores de norbixina en los extractos entre 0.1 y 0.15% (equivalente a 1-1.5 mg/gps) para algunas accesiones provenientes de la península de Yucatán.

6.1.1.2 Determinación del contenido de polifenoles totales

El contenido de compuestos polifenólicos es uno de los parámetros más relacionados con los efectos benéficos sobre la salud que se mencionan respecto al consumo de productos de origen vegetal (Fraga et al., 2010; Li et al., 2014; Abuajah et al., 2015; Oroian y Escriche, 2015). En la Figura 26 se presenta el contenido de compuestos polifenólicos totales presentes en las semillas de achiote estudiadas.

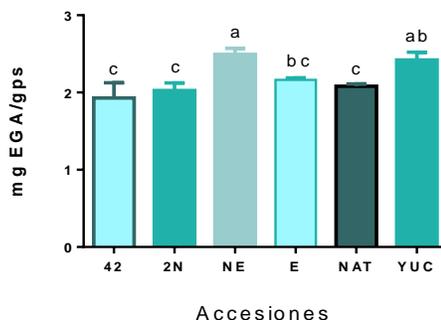


Figura 26. Cuantificación de los compuestos polifenólicos totales en las distintas accesiones estudiadas. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

Se observa que dos de las accesiones estudiadas, NE y YUC, sobresalen en contenido de compuestos polifenólicos totales con los mayores contenidos (2.49 y 2.42 mg/gps), mientras que el resto de las accesiones, incluyendo la accesión 42, presentan contenidos similares (1.93-2.16 mg/gps). El valor aquí reportado para la accesión 42 coincide con el reportado por Raddatz-Mota y colaboradores (2016) para un extracto hidrofílico obtenido de esta misma accesión mediante agitación de alta intensidad en un homogenizador (1.93 vs 2.09). Estas determinaciones se realizaron como parte de la caracterización de las accesiones estudiadas.

6.1.1.3 Evaluación de la compatibilidad de tres metodologías de medición de actividad antioxidante *in vitro* con los extractos de achiote

A continuación se presentan los resultados de la actividad antioxidante de las fracciones hidrofílica e hidrofóbica de los extractos de semillas de achiote obtenidos por el método de referencia. Inicialmente se planteó evaluar esta propiedad en los extractos por tres metodologías *in vitro*, los métodos de radicales DPPH y ABTS así como el método de reducción de cobre, CUPRAC. Los métodos de DPPH y ABTS son considerados como de transferencia de electrones y/o protones para neutralizar un radical, mientras que en el método CUPRAC sólo interviene la transferencia de electrones debido al poder reductor de los compuestos (Özyürek et al., 2011; Apak et al., 2016).

Los carotenoides presentan espectros de absorción con valores importantes de absorbancia desde 425 nm y hasta 520 nm (Fig 27), dependiendo de algunos factores como el tipo de carotenoide o el medio en el que está disuelto (Rahmalia et al., 2014). Debido a esta propiedad, la presencia de carotenoides en las muestras interfirió con los

métodos de DPPH y CUPRAC, cuyas mediciones se realizan a 515 y 470 nm respectivamente. En el método de ABTS, debido a que las mediciones se realizan a 734 nm no se presentó ninguna interferencia. En la Figura 27 se observa el espectro de absorción representativo de los extractos obtenidos mediante el método de maceración, con picos máximos en 475, 505 y 445. Los espectros de los extractos obtenidos por sonicación presentaron la misma forma.

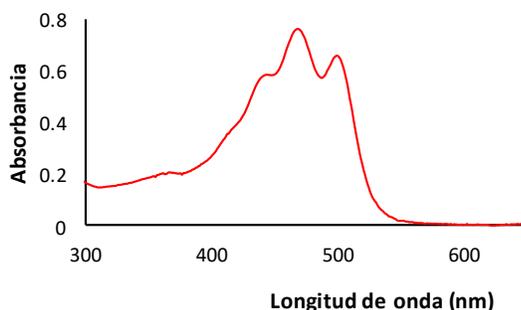


Figura 27. Espectro de absorción representativo de los extractos de achiote obtenidos con el método de referencia.

La Figura 28a muestra la determinación de la actividad antioxidante en la fracción hidrofílica. En esta fracción la actividad antioxidante está dada por compuestos de naturaleza polar, como los polifenoles o pequeñas cantidades de vitamina C (Vilar et al., 2014; Raddatz-Mota et al., 2016). Se observa que los valores obtenidos para las distintas accesiones son similares y siguen los mismos patrones al comparar los distintos métodos. Este comportamiento ha sido reportado para métodos de determinación de actividad antioxidante que tienen mecanismos de acción similares, como lo son los utilizados en este trabajo (Özyürek et al., 2011; Jing et al., 2012). Los mayores valores se tuvieron en el método de ABTS.

La Figura 28b muestra los resultados de la fracción hidrofóbica, donde se concentran los carotenoides. Se observa que los valores determinados para cada método son muy distintos (sobre todo si se consideran las diferencias proporcionalmente), siendo sub estimados para el método de DPPH y sobre estimados para el método de CUPRAC. La presencia de carotenoides en la mezcla de reacción del método de DPPH interfiere con la determinación y hace que los valores de absorbancia sean mayores a lo que aporta el radical, sub estimando la actividad antioxidante de las muestras. Por su parte, en el método CUPRAC los valores de absorbancia se incrementan a mayor actividad antioxidante. Similar al caso anterior, la presencia de carotenoides que absorben a la

longitud de onda de la determinación (470 nm) hace que la absorbancia medida sea mayor a la obtenida del complejo de cobre, por lo que la actividad antioxidante es sobre estimada.

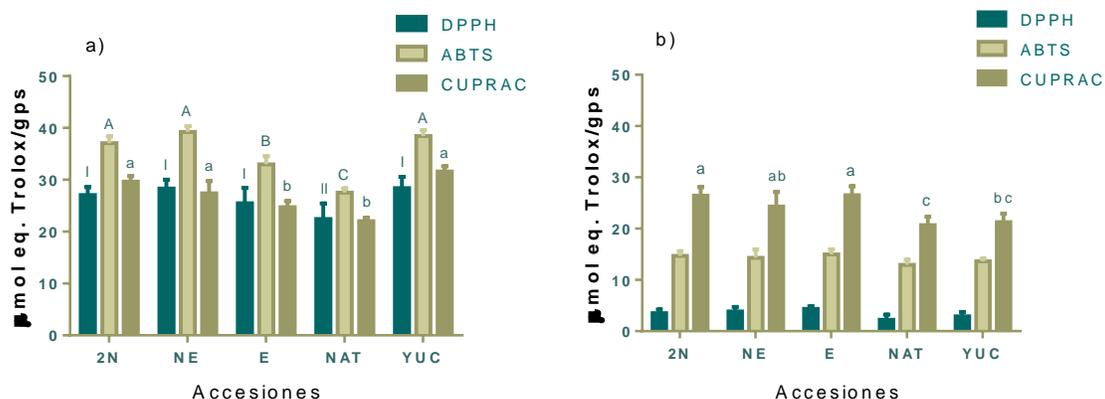


Figura 28. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos de achiote a) extracto hidrofílico y b) extracto hidrofóbico medidos por tres métodos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

Este efecto fue reportado previamente por Müller y colaboradores (2011) quienes observaron que, al medir la capacidad antioxidante de distintos carotenoides, entre los que se encontraban la bixina y el licopeno, el método de DPPH presentaba diversos inconvenientes como nula reacción, incremento en la absorbancia en lugar de disminución, así como comportamientos en los que la concentración de compuesto no seguía una relación lineal con la cantidad de radical neutralizado. Por el contrario, y acorde con lo observado en este trabajo, Müller y colaboradores reportaron que el método de ABTS no presenta ninguno de estos inconvenientes y es adecuado para la medición de muestras que contienen carotenoides.

Debido a las razones expuestas se considera que los métodos DPPH y CUPRAC no son compatibles para medir los extractos hidrofóbicos estudiados en este trabajo, debido a la interferencia de los carotenoides y en adelante se utilizó únicamente el método del radical ABTS para medir la actividad antioxidante. Todos los resultados, análisis y argumentos presentados para los extractos de achiote aplicaron de manera similar para los extractos obtenidos de jitomates, debido a la presencia de los carotenoides licopeno y β -caroteno, por lo que en las pruebas realizadas con este fruto también fueron utilizando únicamente el método de ABTS.

Es importante mencionar que, aunque los métodos *in vitro* de medición de actividad antioxidante brindan información importante, estas metodologías han sido cuestionadas por considerarse que no reflejan el comportamiento de las ERO y otros radicales libres encontrados *in vivo*, además de no involucrarse parámetros fisiológicos reales (Shahidi y Zhong, 2015), por lo que idealmente deben ser consideradas como pruebas de caracterización preliminares, pero no concluyentes.

6.1.1.4 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* en extractos de distintas accesiones achote obtenidos por métodos convencionales

Habiendo seleccionado el método de ABTS sobre los métodos de DPPH y CUPRAC, a continuación se presentan los resultados de la actividad antioxidante con éste método para extractos de las seis accesiones analizadas obtenidos por tecnologías convencionales. Se observa que para los extractos hidrofílicos, el obtenido a partir de la accesión NE presentó la mayor actividad antioxidante (40.57 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$) mientras que la menor actividad fue del extracto de la accesión 42 (26.32 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$) (Fig 29). Debido al procedimiento empleado para la extracción en equipo Soxhlet, ésta únicamente afectó las características del extracto hidrofóbico, por lo que no se muestra la actividad antioxidante de extractos hidrofílicos obtenidos mediante esta metodología.

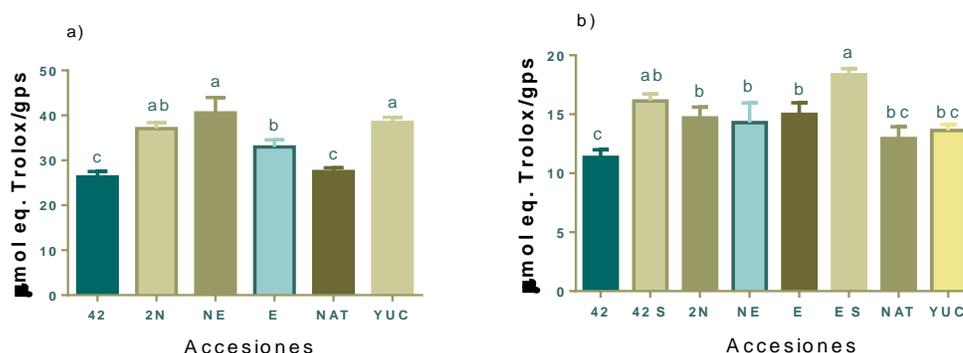


Figura 29. Actividad antioxidante determinada mediante el método del radical ABTS en extractos a) hidrofílicos y b) hidrofóbicos de achote. 42 S y E S son extractos obtenidos utilizando un equipo Soxhlet. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

Para los extractos hidrofóbicos obtenidos por las tecnologías convencionales se presentan resultados tanto para la extracción de referencia como para la realizada en equipo Soxhlet. Para los extractos obtenidos por el método de referencia, nuevamente la accesión 42 presentó los menores valores de actividad antioxidante (11.73 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$).

Trolox/gps) mientras que la accesión E tuvo el mayor valor con 14.99 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$. Este último no tuvo diferencias significativas con los valores obtenidos para los extractos de las accesiones 2N, NE, NAT y YUC. En los extractos obtenidos mediante equipo Soxhlet, tanto para la accesión 42 como para la accesión E, la actividad antioxidante se incrementó significativamente comparada con los extractos de referencia ($\alpha=0.05$). En este caso, el extracto de la accesión 42 obtuvo valores de 16.12 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$ mientras la accesión E llegó hasta 18.35 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$. Estos resultados indican que, si bien el contenido de bixina no se modifica por la extracción en Soxhlet en comparación con la extracción de referencia, otros compuestos que aportan actividad antioxidante, como los pertenecientes a la familia de la vitamina E, sí se ven incrementados. Hasta este punto, esta es una hipótesis que se apoya en el significativo incremento de la actividad antioxidante. Es importante mencionar que la extracción en equipo Soxhlet se realizó a 55°C, la cual es una temperatura relativamente baja, y esto permitió evitar la degradación de los compuestos de interés. Se ha reportado que la degradación de una gran variedad de compuestos en presencia de calor comienza a partir de los 65°C (Aspé y Fernández, 2011; Taham et al., 2015).

La siguiente etapa del trabajo, consistente en obtener extractos aplicando sonicación en baño buscando incrementar la eficiencia de extracción, se realizó utilizando únicamente la accesión 42, la cual presentó los valores más bajos para muchos de los parámetros analizados. Esto fue con la finalidad de saber si los bajos rendimientos eran debidos a baja eficacia de los métodos de extracción probados.

6.1.2 Extractos obtenidos por sonicación en baño

La sonicación es un método que se ha aplicado exitosamente para la extracción de compuestos de interés de matrices vegetales, tiene las ventajas de ser sencillo, no requerir calor y poder ser aplicado en combinación con una gran variedad de solventes.

6.1.2.1 Condiciones de sonicación en baño usando DCM

En esta etapa del trabajo se mostrarán paralelamente resultados de contenido de bixina y actividad antioxidante para extractos obtenidos de la accesión 42 dado que el objetivo fue monitorear la efectividad de las condiciones de extracción y no analizar a la accesión en sí.

El cuadro 2 muestra el contenido de bixina y la actividad antioxidante en los extractos obtenidos probando distintos tiempos de sonicación así como relaciones semilla g: solvente mL. Los tiempos de sonicación más favorables (mejor contenido de bixina y actividad antioxidante) fueron de 20 y 30 min, sin diferencias significativas entre ellos; debido a que utilizar el menor tiempo permite ahorrar recursos, 20 minutos fue el tiempo de extracción más conveniente. El contenido de bixina obtenido por sonicación en baño (20 min) fue similar a los métodos de referencia y Soxhlet (9.1 mg/gps); sin embargo, la extracción con sonicación requirió menos tiempo total de extracción (aproximadamente la mitad del tiempo). Además, la actividad antioxidante del extracto obtenido con 20 min de sonicación fue mayor que con el método de referencia y similar a la actividad obtenida por Soxhlet (16.1 μ mol eq. Trolox/gps), lo que indica una mejor extracción de compuestos antioxidantes distintos a la bixina. Acorde con este resultado, Ruiz-Montañez y colaboradores (2014) reportaron una mayor eficacia de extracción de mangiferina y lupeol por sonicación en baño en comparación con maceración, microondas o Soxhlet. Se seleccionó una relación 1:150 (g: mL) porque ésta produce resultados similares a los obtenidos con mayores cantidades de solvente (1:200) pero mejores que los obtenidos con menores cantidades de DCM (1:50 y 1:100).

Cuadro 2. Condiciones de sonicación en baño para obtener extractos de achiote usa DCM como solvente.

| Factor | Valor | Bixin mg/gps | AA (μ mol Trolox/gps) |
|-----------------|-------|-----------------|----------------------------|
| Tiempo (min) | 10 | 4.3 \pm 0.8 c | 13.0 \pm 0.6 c |
| | 20 | 9.1 \pm 0.4 a | 16.1 \pm 0.6 a |
| | 30 | 8.3 \pm 0.6 a | 15.3 \pm 0.4 a,b |
| Relación (g:mL) | 1:50 | 6.1 \pm 0.5 b | 12.2 \pm 0.4 c |
| | 1:100 | 6.9 \pm 0.8 b | 13.8 \pm 0.6 b,c |
| | 1:150 | 9.4 \pm 0.5 a | 16.4 \pm 0.5 a |
| | 1:200 | 8.3 \pm 0.5 a | 15.3 \pm 0.7 a,b |

Media \pm DE. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). AA: actividad antioxidante. gps: gramo de peso seco. El factor tiempo se estudió con relación 1:200; el factor relación se estudió con el tiempo de 20 min.

Dado que los factores evaluados no presentaron interacción entre ellos (ANOVA de dos factores, $\alpha = 0.05$), fue posible elegir independientemente las mejores condiciones de extracción para cada factor y combinarlos para obtener mejores parámetros para la extracción. Por lo tanto, se seleccionaron 20 min de sonicación y una relación m:v 1:150 como las mejores condiciones para la sonicación en baño.

6.1.2.2 Aplicación de las mejores condiciones de sonicación en baño a las distintas accesiones de achote estudiadas.

Cuando se aplicó el tratamiento de sonicación (20 min; 1:150 g:mL) para obtener extractos de las accesiones 2N, NE, E NAT y YUC el contenido de bixina en los extractos fue similar al presentado en los extractos realizados con el método de referencia y en el caso de la accesión E a los obtenidos con el equipo Soxhlet (Fig 30). Estos resultados concuerdan con lo que se observó para la accesión 42; el método de agitación ya lograba extraer la mayor cantidad de bixina extraíble de las semillas, y este comportamiento se mantuvo independientemente de la accesión en la cual fue aplicado.

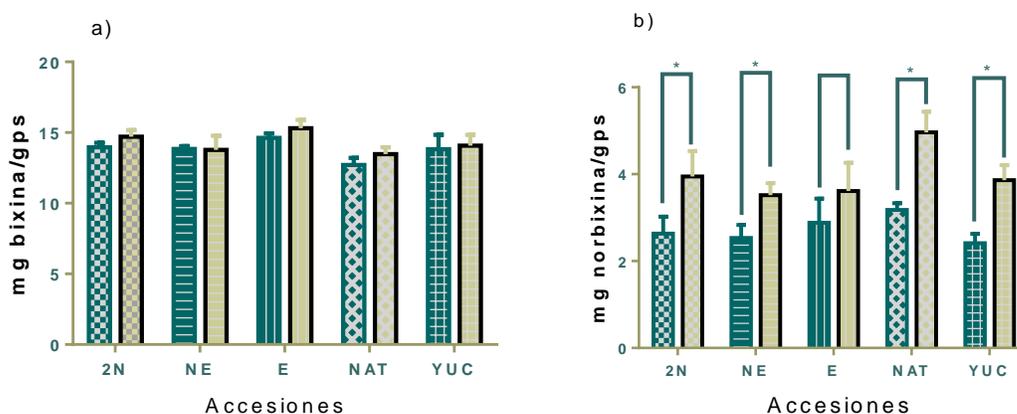


Figura 30. a) Contenido de bixina y b) contenido de norbixina en extractos obtenidos por agitación (barras verdes) y por sonicación (barras grises) de las distintas accesiones de achote. Los asteriscos indican diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

Por su parte, los contenidos de norbixina sí se incrementaron de manera significativa mediante la sonicación alcanzando valores entre 3.51 hasta 4.96 mg/gps, que representa un incremento entre 25 y 55%. Esta diferencia puede estar relacionada con la estructura química de estos apocarotenoides. La presencia de dos grupos carboxilo hace a la molécula de norbixina propensa a sufrir la conversión de los grupos ácidos a grupos de naturaleza iónica, permitiendo su solvatación por moléculas de agua. La bixina se solubiliza en menor proporción en soluciones acuosas, incluyendo las soluciones básicas. Sin embargo, al calentar soluciones de bixina en medios alcalinos, se da la conversión total de bixina a norbixina (Smith, 2006; Albuquerque y Meireles, 2011). Es posible que este fenómeno se presente durante la sonicación ya que esta es una herramienta que se emplea para acelerar reacciones químicas en síntesis orgánica (Sánchez-Ávila et al., 2007; Tiwari, 2015). Si bien es cierto que para esta finalidad se emplean equipos más

potentes que el utilizado en este trabajo, la conversión de bixina a norbixina en las muestras analizadas solo se dio parcialmente y no totalmente. Esto se comprobó mediante cromatografía de capa fina. Al calentar muestras de bixina disuelta en solución acuosa de KOH toda la bixina se transformó y se observaba una sola banda correspondiente a norbixina, mientras que en las muestras sonicadas se conservó una banda de bixina, pero también se mostró una banda correspondiente a norbixina (datos no mostrados). Estos resultados son relevantes para la obtención de norbixina pues utilizando equipos de sonicación de mayor potencia se podría realizar la extracción y conversión de bixina a norbixina en una sola operación, sin necesidad de realizar la extracción y la conversión en operaciones distintas, como se realiza comúnmente (Smith 2006; Scotter 2009; EFSA 2016).

Los compuestos polifenólicos han mostrado tener una gran variedad de funciones biológicas y actualmente su estudio tienen una gran relevancia (Fraga et al., 2010; Li et al., 2014; Abuajah et al., 2015). Aportan una parte importante de la actividad antioxidante presente en extractos acuosos de diversas fuentes vegetales (Carocho y Ferreira, 2013; Oroian y Escriche, 2015). El contenido de estos compuestos en los extractos también se incrementó con la sonicación, en comparación con método de extracción de referencia (desde 2.088-2.493 hasta 2.610-2.938). Estos resultados indican que la extracción se mejora cuando se realiza mediante la aplicación de sonicación en baño (Fig 31).

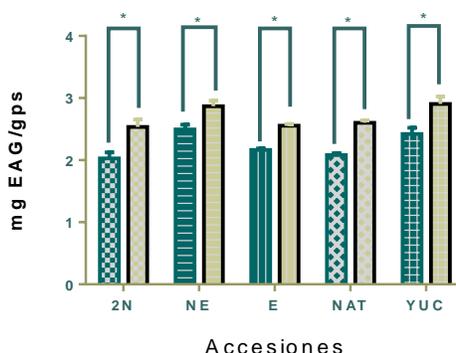


Figura 31. Contenido de compuestos polifenólicos totales presentes en semillas de achiote de distintas accesiones extraídas mediante agitación (barras verdes) y mediante sonicación (barras grises). Los asteriscos indican diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco

Se observa que la actividad antioxidante de las fracciones hidrofílicas, para todas las accesiones estudiadas, y de manera congruente a lo observado para el contenido de compuestos polifenólicos, se incrementó con la aplicación de sonicación (Fig 32). La

actividad antioxidante de las fracciones hidrofóbicas, se incrementan de manera significativa en cuatro de las cinco accesiones presentadas con respecto a los extractos obtenidos con el método de referencia (Fig 32). Debido a que el contenido de bixina se mantuvo en valores estadísticamente iguales en los extractos obtenidos mediante sonicación con respecto al método de referencia, los resultados apuntan a que la actividad antioxidante en los extractos hidrofóbicos está dada por más de un compuesto y no sólo por la bixina.

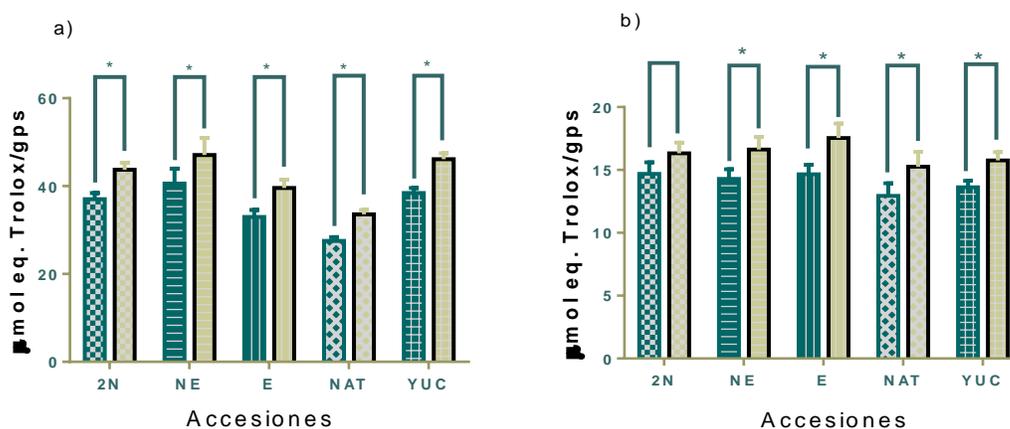


Figura 32. Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS de extractos obtenidos mediante agitación (barras oscuras) y mediante sonicación en baño (barras claras). a) Fracciones hidrofílicas y b) fracciones hidrofóbicas. Los asteriscos señalan diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

A pesar de que las semillas de achiote son apreciadas principalmente debido a sus componentes hidrofóbicos (carotenoides y vitamina E), las pruebas aquí realizadas reflejan una mayor actividad antioxidante de las fracciones hidrofílicas. Este comportamiento se ha observado en otros reportes para el achiote (Raddatz-Mota et al., 2016) o para otros frutos con importante contenido de carotenoides y vitamina E, como el jitomate (Toor y Savage 2005; Ilahy et al., 2011). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las metodologías *in vitro* para la medición de la actividad antioxidante presentan diversos inconvenientes y falta de relevancia biológica, por lo que deben ser tomadas como parte de la caracterización y no como concluyentes en el estudio de muestras biológicas.

6.1.2.3 Extractos de achiote obtenidos mediante sonicación en baño usando solventes verdes

En la actualidad, diversos grupos de investigación buscan alternativas más seguras que permitan cumplir con los límites de solventes residuales permisibles en alimentos, medicamentos y cosméticos (Byrne et al., 2016; EURC No. 231/2012). Después del análisis de algunos productos basados en achiote en el mercado, Ito y colaboradores (2012) reportaron que varios de ellos mostraron niveles de solventes residuales mayores a los permitidos por las agencias reguladoras. En este trabajo, probamos algunos solventes verdes aprobados por la FDA (Código de Regulaciones Federales de la FDA, 2017) para su uso en alimentos y medicamentos con límites prohibitivos más laxos que los solventes orgánicos usados comúnmente para obtener extractos de achiote.

Usando las condiciones de sonicación seleccionadas en el apartado de “condiciones de sonicación en baño”, se analizaron extracciones con solventes verdes. Los extractos obtenidos con ACE, AAM, AET, AIP, CIM y LET produjeron rendimientos de bixina similares entre sí y similares al obtenido con DCM (8.22-9.47 mg/gps) pero mayores a los obtenidos con ATB y EtOH (6.83 y 7.05 mg/gps, respectivamente) (Fig 33). Los extractos obtenidos con AAM, AIP, CIM y LET presentaron la mayor actividad antioxidante (15.44-16.75 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$) que fue similar a la actividad obtenida con DCM (16.1 $\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$). Estos resultados son relevantes porque el DCM es el segundo solvente más adecuado para extraer bixina y otros compuestos lipofílicos de semillas de achiote, sólo después del cloroformo (Giridhar et al., 2014)

Con base en la baja actividad antioxidante obtenida del extracto de ACE en este trabajo, no se recomienda su uso cuando se requieren extractos de achiote ricos en antioxidantes, a pesar de que se ha reportado su uso para la extracción de bixina (Rahmalia et al., 2015).

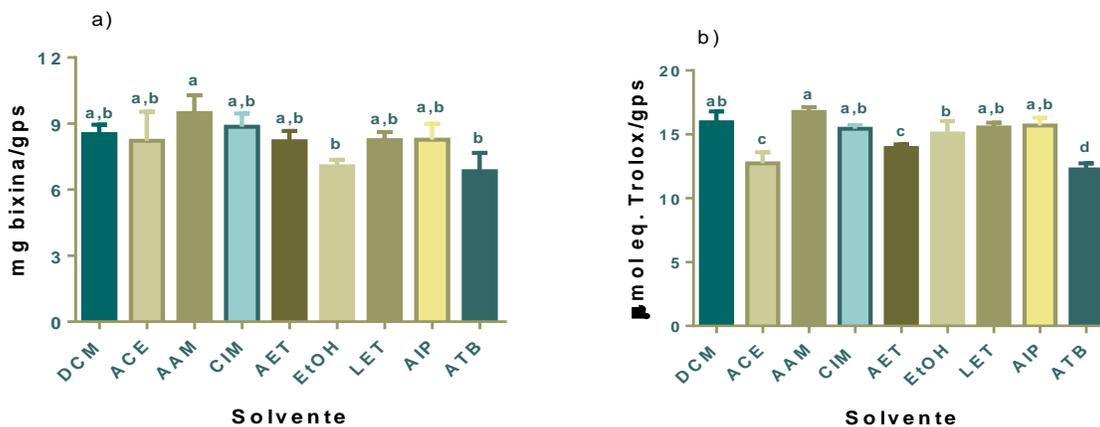


Figura 33. Contenido de bixina y Actividad antioxidante de los extractos de achiote obtenidos por sonicación en baño usando DCM y solventes verdes. Promedios y DE. DCM: diclorometano; ACE: acetona; AAM: acetato de amilo; CIM: p-cimeno; AET: acetato de etilo; EtOH: etanol; LET: lactato de etilo; AIP: acetato de isopropilo; ATB: alcohol ter-butílico. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

Aunque los solventes AAM, CIM, AIP y LET tuvieron valores similares de contenido de bixina y actividad antioxidante, el AIP y el LET se seleccionaron como los solventes más apropiados, ya que son fáciles de manejar, asequibles y es fácil obtener un extracto seco de ellos, además de su buen rendimiento (los resultados para estos no fueron estadísticamente distintos a los obtenidos con AAM, CIM ni con DCM). El AIP tiene un punto de ebullición bajo, lo que implica menos energía para la evaporación; el LET tiene la ventaja de ser miscible en sustancias polares y no polares.

6.1.3 Obtención de extractos de achiote con el método convencional de referencia aplicando un diseño Taguchi

Al corroborar en distintas accesiones que la sonicación incrementó la actividad antioxidante de los extractos de achiote en comparación a los extractos realizados con el método de referencia, se buscó comprobar que este efecto fue debido al uso de sonicación y no por la falta de optimización de los parámetros de extracción con la metodología convencional. Para ello, se realizó una optimización del método de extracción convencional (extracción durante 2.5 h en agitador orbital, como ya se mencionó, esta metodología dio resultados estadísticamente iguales a los resultados del método de referencia) usando un diseño tipo Taguchi. En el Cuadro 3 se presentan los factores y niveles analizados.

Cuadro 3. Factores y niveles analizados en el diseño Taguchi.

| Factor | Niveles |
|----------------------------|--|
| Solvente | IPA; EtOH; LET |
| Tiempo de agitación (min) | 20; 60; 150 |
| Relación g:mL | 1:50; 1:100; 1:200 |
| Pretratamiento | Sin pret; H ₂ O; H ⁺ |
| Velocidad de agitación rpm | 100; 200; 300 |
| Accesión usada | E y YUC |

Todos los factores analizados tuvieron tres niveles, a excepción del factor accesión, el cual se considera un factor de ruido, es decir, un factor externo al proceso de extracción, pero que puede influir el resultado de manera significativa (Gutiérrez-Pulido y de la Vara-Salazar, 2008). El AIP y el LET se seleccionaron con base en los resultados de las pruebas de sonicación en baño. El EtOH se incorporó debido a que es considerado como el mejor solvente orgánico a ser usado en procesos de extracción. Se incluye el factor pretratamiento debido a que este tipo de tratamientos suele producir un efecto de hinchazón en los tejidos vegetales por a un efecto osmótico, lo que produce ruptura de estructuras celulares y facilita los procesos de extracción.

En el Cuadro 4 se presentan las combinaciones para el diseño experimental. Estas combinaciones fueron generadas por el programa Statgraphics Centurion.

Cuadro 4. Arreglo de las corridas experimentales del diseño Taguchi.

| Accesión E | | | | | | Accesión YUC | | | | | |
|------------|------|------|-------|----|-----|--------------|------|------|-------|----|-----|
| T | S | min | g:mL | Pt | V | T | S | min | g:mL | Pt | V |
| 1 | LET | 20' | 1:50 | - | 100 | 10 | LET | 20' | 1:200 | H+ | 200 |
| 2 | LET | 60' | 1:100 | A | 200 | 11 | LET | 60' | 1:50 | - | 300 |
| 3 | LET | 120' | 1:200 | H+ | 300 | 12 | LET | 120' | 1:100 | A | 100 |
| 4 | AIP | 20' | 1:50 | A | 200 | 13 | AIP | 20' | 1:100 | H+ | 100 |
| 5 | AIP | 60' | 1:100 | H+ | 300 | 14 | AIP | 60' | 1:200 | - | 200 |
| 6 | AIP | 120' | 1:200 | - | 100 | 15 | AIP | 120' | 1:50 | A | 300 |
| 7 | EtOH | 20' | 1:100 | - | 300 | 16 | EtOH | 20' | 1:200 | A | 300 |
| 8 | EtOH | 60' | 1:200 | A | 100 | 17 | EtOH | 60' | 1:50 | H+ | 100 |
| 9 | EtOH | 120' | 1:50 | H+ | 200 | 18 | EtOH | 120' | 1:100 | - | 200 |

T: tratamiento; S: solvente; min: tiempo de agitación en minutos; g:mL relación semilla:solvente (1 g:x mL); Pt: pretratamiento; V: velocidad de agitación en rpm. AIP: acetato de isopropilo; LET: lactato de etilo; EtOH: etanol. -: sin pretratamiento; A: pretratamiento con agua; H⁺: pretratamiento ácido.

Los diseños experimentales como este tienen como fin mejorar los procesos en que se aplican, en este caso el proceso de extracción, evitando en medida de lo posible el influjo de factores externos al proceso (Gutiérrez-Pulido y de la Vara-Salazar, 2008) mientras busca maximizar las respuestas y mejorar la eficiencia. Aplicando esta metodología, se logró visualizar los parámetros del proceso de extracción que influyeron para obtener los mejores rendimientos de bixina y actividad antioxidante de los extractos reduciendo de manera significativa la cantidad de corridas experimentales necesarias. Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 34.

Debido a la cantidad de factores analizados en el experimento y las interacciones que entre ellos se dan, analizar lo que ocurre en cada uno de los tratamientos resulta difícil y poco relevante. Desde este punto de vista, lo más importante es saber que ocurre con los factores en sí, cuáles son significantes para los resultados y cuáles son los niveles para cada factor que optimizan el proceso de la extracción.

En la Figura 35 se presenta gráficamente la significancia de cada factor estudiado en este experimento sobre el contenido de bixina en los extractos. Este grafico muestra claramente que el factor de mayor impacto es la relación m/v (semilla:solvente). Debido al efecto tan grande que tiene este factor sobre los resultados, el resto de los factores resultan ser no significativos para el análisis estadístico, siendo ordenados de la siguiente manera de acuerdo a su nivel de influencia en los resultados: velocidad de agitación>accesión>tiempo de agitación>solvente>pretratamiento.

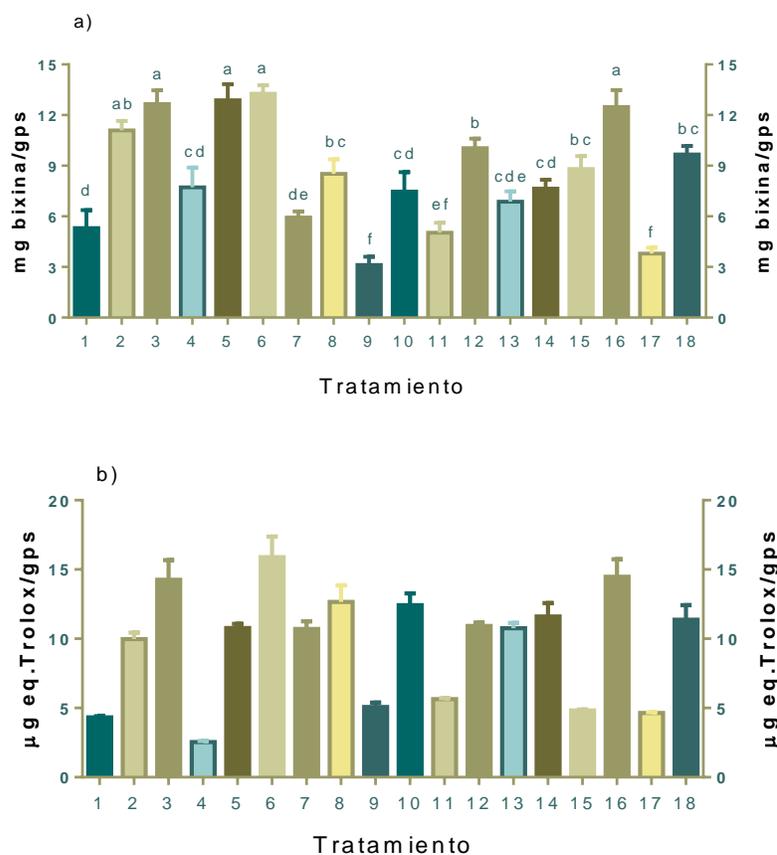


Figura 34. Valores de a) bixina y b) actividad antioxidante en extractos de semillas de achotes obtenidos mediante agitación aplicando el diseño Taguchi. Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

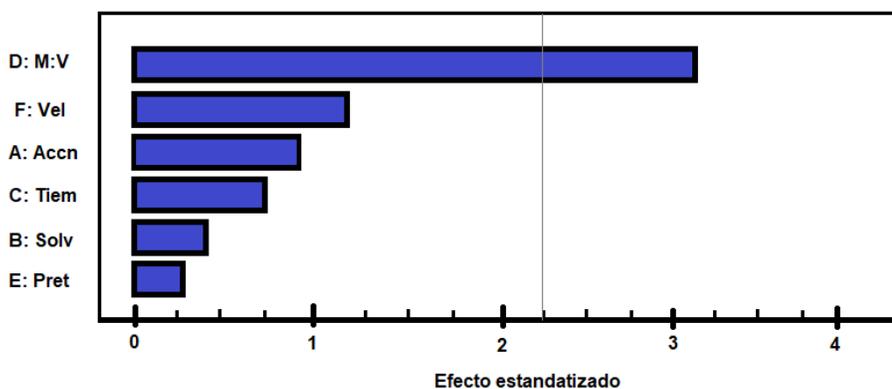


Figura 35. Diagrama de Pareto para el contenido de bixina en los extractos obtenidos con el diseño Taguchi. La línea gris muestra el punto de significancia de los factores ($\alpha=0.05$). M:V: relación masa:volumen; Vel: velocidad de agitación; Accn: accesión de semilla usada; Tiem: tiempo de agitación; Solv: solvente usado; Pret: pretratamiento aplicado.

En la Figura 36 se muestra el comportamiento de los datos en cada uno de los factores analizados. El análisis de estos comportamientos permite conocer cuáles son los niveles que maximizan la respuesta (Cuadro 5), que en este caso es el contenido de bixina.

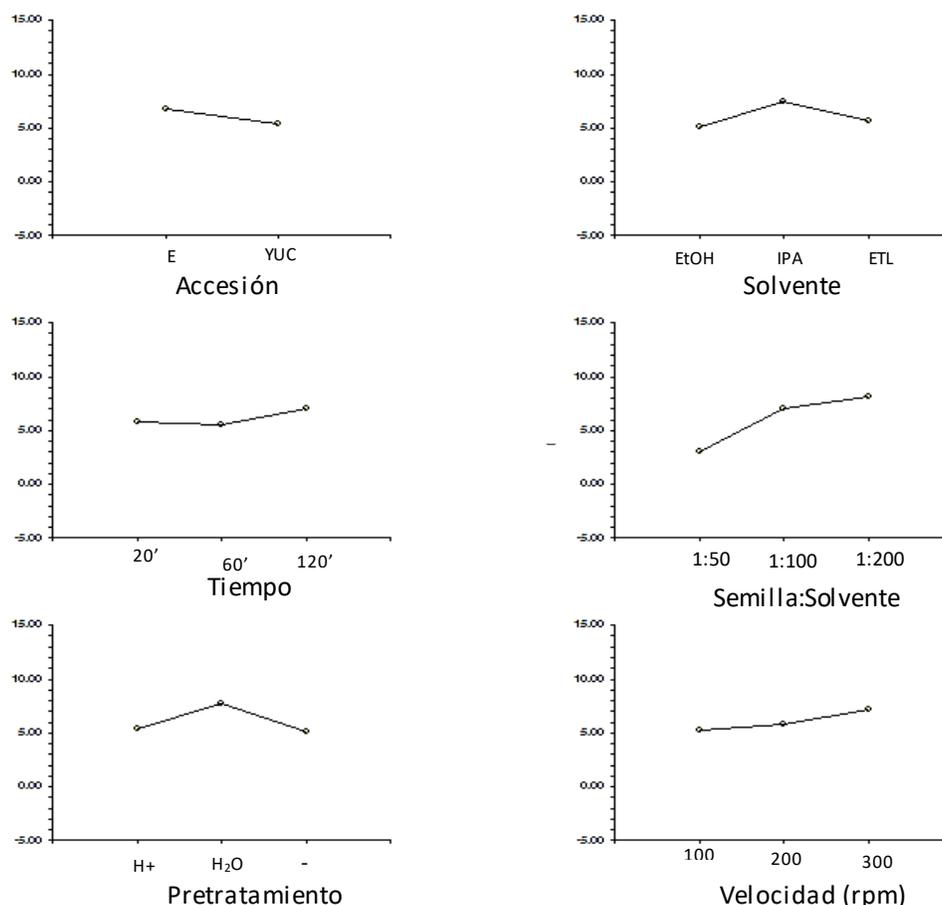


Figura 36. Efecto de los factores y niveles analizados en el diseño Taguchi sobre el contenido de bixina en los extractos de achiote de las accesiones E y YUC.

Cuadro 5. Niveles óptimos para la obtención de bixina.

| Factor | Óptimo | Valor del nivel |
|----------------|--------|-----------------|
| Relación g:mL | 3 | 1:200 |
| Velocidad rpm | 3 | 300 |
| Accesión | 1 | E |
| Tiempo min | 3 | 150 |
| Solvente | 1 | AIP |
| Pretratamiento | 2 | Agua |

1:200 representa g de semilla:mL de solvente. AIP: acetato de isopropilo.

Del lado de la actividad antioxidante, se presentó un comportamiento similar de los factores estudiados (Fig 37). La relación m/v (semilla:solvente) fue por mucho el factor más influyente siendo además el único en alcanzar la significancia estadística ($\alpha=0.05$). El resto de los factores, aunque no de manera significativa, influyeron en el siguiente orden los valores de actividad antioxidante: Tiempo de agitación>Accesión>Pretratamiento >Velocidad de agitación>Solvente.

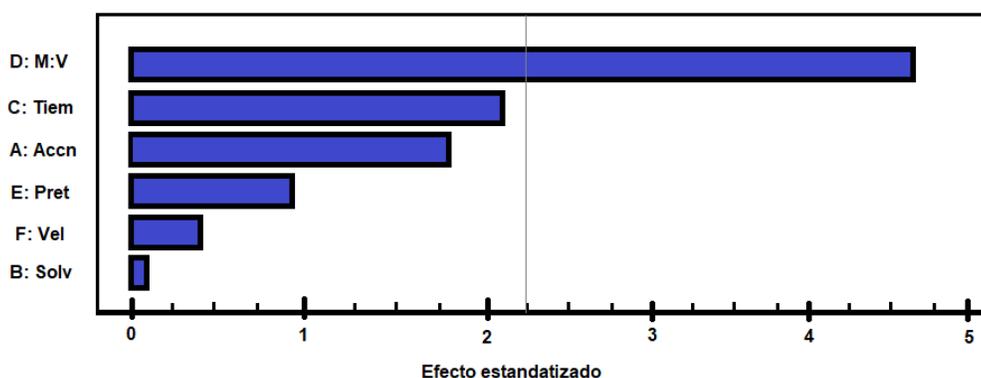


Figura 37. Diagrama de Pareto para la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con el diseño Taguchi. La línea gris muestra el punto de significancia de los factores ($\alpha=0.05$). M:V: relación masa:volumen; Vel: velocidad de agitación; Accn: accesión de semilla usada; Tiem: tiempo de agitación; Solv: solvente usado; Pret: pretratamiento aplicado

Es interesante notar que, a pesar de que en general los solventes empleados para realizar extracciones son uno de los factores que más afecta el rendimiento de extracción (Rahmalia et al., 2015), en este experimento se observó que el solvente fue uno de los factores que menos influyó en el proceso, sin embargo, esto pudo deberse a que los solventes utilizados ya estaban pre seleccionados por tener buenos rendimientos (que además fueron similares entre sí). Por otro lado, el factor pretratamiento pudo ver disminuida su influencia en los resultados debido a que las semillas fueron molidas para realizar los extractos, por lo que probablemente el efecto de hinchazón de las semillas (que sí era observable) perdió el impacto que habría tenido en caso de realizarse las extracciones con semillas enteras.

En la Figura 38 se observan los efectos de los niveles de cada factor sobre la actividad antioxidante. De manera homóloga a lo presentado para el contenido de bixina, el método presenta los valores óptimos para cada método (Cuadro 6).

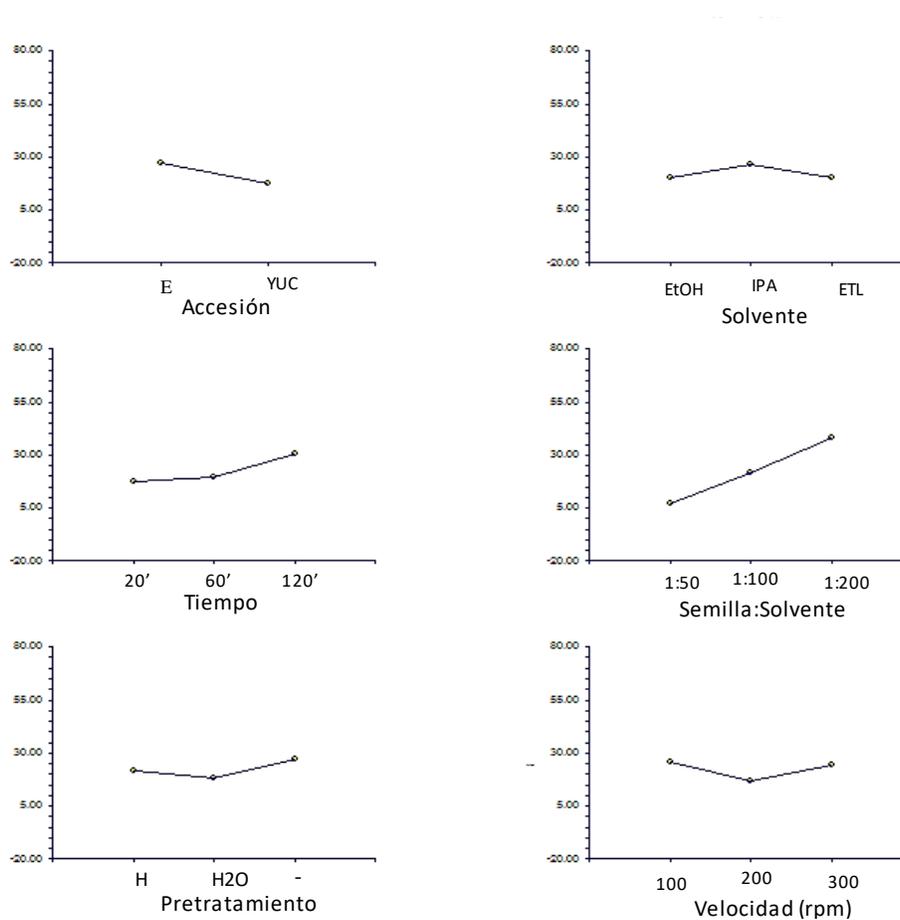


Figura 38. Efecto de los factores y niveles analizados en el diseño Taguchi sobre la actividad antioxidante en los extractos de achiote de las accesiones E y YUC.

Cuadro 6. Niveles óptimos para la actividad antioxidante.

| Factor | Óptimo | Valor del nivel |
|----------------|--------|-----------------|
| Relación g:mL | 3 | 1:200 |
| Velocidad rpm | 1 | 100 |
| Accesión | 1 | E |
| Tiempo | 3 | 150 min |
| Solvente | 1 | IPA |
| Pretratamiento | 1 | SP |

1:200 es en g de semilla:mL de solvente. AIP: acetato de isopropilo. SP: sin pretratamiento.

Los valores más altos de bixina obtenidos en este experimento (para cada una de las accesiones) son similares a los obtenidos en las pruebas anteriores (13.27 mg/gps en accesión E y 12.38 mg/gps para accesión YUC). Este resultado era esperado, pues los mayores contenidos de bixina obtenidos en los extractos han sido siempre similares,

indicando que en todos los casos se está extrayendo la mayor cantidad posible de este carotenoide. Con relación a la actividad antioxidante de los extractos, los valores obtenidos fueron similares a los generados utilizando el método de referencia, pero menores a los obtenidos usando un equipo Soxhlet o con el método de sonicación en baño (15.89 $\mu\text{mol eq Trolox/gps}$ para la accesión E y 14.48 $\mu\text{mol eq Trolox/gps}$ para la accesión YUC). Es importante mencionar que el hecho de que la relación semilla:solvente haya sido el único factor significativo y que el nivel de mayor relación (1:200) haya sido el óptimo tanto para el contenido de bixina como para la actividad antioxidante sugiere que el rendimiento de extracción es altamente dependiente de la cantidad de solvente usado. Otro factor importante es el tiempo de extracción, pues a pesar de no tener significancia estadística, ambas respuestas incrementan al aumentar el tiempo de extracción. Debido a que con la sonicación en baño ya se había logrado disminuir la cantidad de solvente y que el tiempo de extracción es mucho menor con esta tecnología (20 min vs 120 min), la evidencia indica que la sonicación incrementa la eficiencia de la extracción, cosa que no fue posible en el método de agitación.

Cabe aclarar que en el método con equipo Soxhlet, la extracción se monitoreó todo el tiempo y se consideró completa cuando el solvente en contacto con la semilla se mantenía incoloro, lo que reflejaba una extracción completa de bixina, por lo que reducir el tiempo no sería factible. El caso de la relación semilla:solvente posiblemente podría haberse mejorado, pero es probable que se tuviera que incrementar el tiempo de la extracción (al menos 30 min, que es lo que tardaba en producirse el efecto sifón), lo cual incrementaría de manera importante el consumo de energía, que ya era el más alto de todos los métodos.

6.1.4 Obtención de extractos mediante sonicación con sonda

La sonicación en sonda se aplicó debido a que se ha reportado que produce una mayor eficiencia en comparación con la sonicación en baño, debido a la concentración de energía en un área enfocada (www.hielscher.com/es/probe-type-sonication-vs-ultrasonic-bath-an-efficiency-comparison). Por ejemplo, Sivakumar y colaboradores (2011) mejoraron el rendimiento de pigmentos extraídos de varias fuentes en un 12–100% mediante el uso de una sonicación de sonda en comparación con la maceración con agitación. En este sentido, se probó esta tecnología utilizando relaciones de semilla:solvente inferiores a la de 1:150, que se seleccionó en el tratamiento de sonicación en baño. Este factor fue el parámetro menos favorable en todos los métodos

probados hasta este punto. Adicionalmente, debido a la mayor concentración de la energía, el factor tiempo también fue probado, con la finalidad de disminuirlo. Estas pruebas se realizaron en la accesión 42.

El tiempo de sonicación se redujo de 20 min necesarios con sonicación en baño a 5 min en el equipo de sonicación en sonda. La relación requerida para lograr buenos rendimientos de bixina y alta actividad antioxidante en los extractos disminuyó de 1:150 en sonicación en baño a 1:50 usando la sonicación de sonda (Cuadro 7). Los extractos obtenidos en una proporción de 1:100 tuvieron valores de actividad antioxidante estadísticamente iguales a los obtenidos en 1:50. Si el objetivo fuera sólo la extracción de bixina y no de otros compuestos funcionales, la relación semilla:solvente se podría reducir hasta 1:20 (g:mL) con rendimientos apenas 15% menores, pero ahorrando el 60% del volumen de solvente gastado (comparaciones vs relación 1:50).

Cuadro 7. Condiciones para la sonicación con sonda para obtener extractos de semillas de achiote usando AIP.

| Tiempo | Relación g:mL | Contenido de bixina (mg/gps) | Actividad antioxidante ($\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$) |
|--------|---------------|------------------------------|---|
| 5 min | 1:20 | 7.27 \pm 0.31 b,c | 11.07 \pm 0.10 c |
| | 1:50 | 7.89 \pm 0.25 b | 16.73 \pm 0.37 a,b |
| | 1:100 | 7.91 \pm 0.43 a | 17.95 \pm 0.86 a |
| 10 min | 1:20 | 7.13 \pm 0.16 b,c | 10.32 \pm 0.42 c |
| | 1:50 | 7.45 \pm 0.21 b | 17.08 \pm 0.36 a,b |
| | 1:100 | 7.56 \pm 0.33 a | 17.36 \pm 0.56 a |
| 15 min | 1:20 | 6.77 \pm 0.31 c | 9.75 \pm 0.62 c |
| | 1:50 | 7.11 \pm 0.27 b,c | 16.15 \pm 0.67 b |
| | 1:100 | 6.44 \pm 0.45 c | 16.98 \pm 0.55 a,b |

Promedio \pm DE. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gps: gramo de peso seco.

Con las condiciones más efectivas probadas para la sonicación en sonda usando AIP se exploraron el EtOH y el LET. Aunque se han reportado bajos rendimientos de extracción de bixina con EtOH utilizando otros métodos de extracción (Chisté et al., 2011; Rodrigues et al., 2014), se decidió utilizarlo debido a que es el solvente orgánico más recomendable para realizar extracciones y que posiblemente la tecnología de sonicación por sonda pudiera incrementar su eficacia. Esto último se comprobó al comparar los resultados de

extracción con sonicación en baño y con sonda; los rendimientos de bixina con EtOH se incrementaron de manera significativa (6.9 ± 0.2 contra 7.5 ± 0.3 mg/gps), posiblemente porque el aumento de la temperatura hasta 65°C , junto con una mayor intensidad de los procesos de cavitación, facilitó la capacidad de extracción y la solubilidad de la bixina en el EtOH.

Por su parte, empleando LET se alcanzó una temperatura más alta durante el tratamiento de sonicación con sonda en comparación con la alcanzada con AIP o EtOH (85°C contra 65°C) lo que provocó que se tuvieran bajos rendimientos de extracción debido a que la bixina y otros antioxidantes presentes en el achiote, como la vitamina E, son compuestos termolábiles. Por lo anterior, se probó la aplicación de sonicación en pulso en lugar de sonicación continua y el enfriamiento de las muestras durante la sonicación en un baño de hielo.

El uso de sonicación pulsada sin enfriamiento mostró mal rendimiento de bixina y actividad antioxidante para los tres solventes, posiblemente debido a que el tiempo de sonicación efectivo se redujo en un 50%, aunque la temperatura final no disminuyó. El rendimiento máximo de bixina y la mayor actividad antioxidante se lograron en las extracciones donde se aplicó la sonicación continua por sonda con enfriamiento usando AIP. Para los solventes LET y EtOH, los mayores rendimientos se obtuvieron utilizando sonicación de sonda pulsada con enfriamiento (Cuadro 8).

Cuadro 8. Contenido de bixina y actividad antioxidante en extractos de achiote obtenidos por sonicación de sonda con y sin enfriamiento.

| Variable | | Sonicación con sonda | | | |
|---|----------|---------------------------|---------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Párametro | Solvente | Continua sin enfriamiento | Continua con enfriamiento | Pulsos | Por pulsos con enfriamiento |
| Contenido de bixina (mg/gps) | EtOH | 7.5 ± 0.3 b,c | 6.4 ± 0.7 c | 5.0 ± 0.3 d,e | 7.1 ± 0.3 b |
| | LET | 7.9 ± 0.3 a | 6.7 ± 0.6 c | 4.8 ± 0.1 e | 8.6 ± 0.4 a |
| | AIP | 8.5 ± 0.5 a | 8.4 ± 0.6 a | 5.5 ± 0.2 d | 8.1 ± 0.3 a |
| Actividad antioxidante ($\mu\text{mol eq. Trolox/gps}$) | EtOH | 16.8 ± 0.5 B,C | 17.4 ± 1.0 B | 16.0 ± 0.8 C | 17.7 ± 0.5 B |
| | LET | 16.0 ± 0.4 C | 18.2 ± 0.4 B | 16.7 ± 1.2 B,C | 19.20 ± 0.4 A |
| | AIP | 17.7 ± 0.7 B | 19.1 ± 0.7 A | 16.2 ± 0.4 C | 18.6 ± 0.8 A,B |

Promedio \pm DE. Letras distintas (minúsculas para bixina y mayúsculas para actividad antioxidante)

indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). EtOH: etanol; LET: lactato de etilo; AIP: acetato de isopropilo. gps: gramo de peso seco.

Si bien los tratamientos de ultrasonido y los solventes verdes no aumentaron el contenido de bixina en los extractos en comparación con el método de referencia, el tiempo de extracción y la cantidad de solvente requerida se redujeron en un 75% y 67%, respectivamente, manteniendo un bajo gasto de energía. Además, la actividad antioxidante en los extractos de sonicación con sonda fue significativamente mayor. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zhang y colaboradores (2009), quienes encontraron que el uso de sonicación con sonda redujo el tiempo, la temperatura de operación y el consumo de solventes con rendimientos similares de epimedina C en comparación con el método de extracción en equipo Soxhlet.

Las condiciones de sonicación con sonda que presentaron los mejores resultados se aplicaron también a la accesión E, por las razones expuestas con relación a la extracción con equipo Soxhlet. Similar a lo ocurrido para la accesión 42, la sonicación continua con sonda aplicando enfriamiento incrementó la actividad antioxidante hasta 21.95 ± 0.55 μmol eq. Trolox/gps, lo que representa un incremento de 30% con respecto a la extracción de referencia y alcanzando diferencia estadística contra el extracto obtenido con equipo Soxhlet (21.95 ± 0.55 vs 18.35 ± 0.93)

6.1.5 Determinación de bixina y δ -tocotrienol en extractos de la accesión 42 obtenidos mediante espectrofotometría y HPLC

La espectrofotometría es una técnica simple, de bajo costo y rápida, lo que la hace el método preferido para monitorear la eficiencia de los procesos de extracción cuando se realizan modificaciones en ellos. Sin embargo, los análisis de HPLC son más precisos y confiables para la identificación y cuantificación de compuestos. Aunque en las mediciones realizadas en los extractos por HPLC se obtuvieron contenidos mayores de bixina que en las realizadas por espectrofotometría, se mantuvo una relación entre los valores medidos por ambos métodos en los diferentes extractos, por lo que se reafirma la validez de las conclusiones obtenidas mediante las mediciones realizadas por espectrofotometría. El contenido de bixina medido por HPLC de la accesión 42 (Cuadro 9) fue similar al reportado previamente (12.77 ± 0.66 contra 14 ± 0.47 mg/gps) para extractos de esta accesión de achiote obtenidos mediante extracción con equipo Soxhlet (Raddatz-Mota et al., 2016).

Cuadro 9. Contenido de bixina y de δ -tocotrienol determinados por HPLC y actividad antioxidante de extractos de achiote de la accesión 42 obtenidos mediante métodos convencionales y por sonicación con sonda.

| Tratamiento | Contenido de bixina (mg/gps) | Contenido de δ -tocotrienol (mg/gps) | Actividad antioxidante (μ mol eq de Trolox/gps) |
|-------------|------------------------------|---|--|
| R | 12.56 \pm 0.42 a | 2.74 \pm 0.61 b | 10.74 \pm 1.04 c |
| S | 12.77 \pm 0.66 a | 3.58 \pm 0.72 a | 17.22 \pm 1.56 b |
| EtOHC | 11.49 \pm 0.93 b | 3.55 \pm 0.24 a | 16.88 \pm 0.54 b |
| LETPE | 12.36 \pm 0.41 a | 3.65 \pm 0.56 a | 18.90 \pm 0.32 a |
| AIPP | 10.98 \pm 0.79 b | 2.99 \pm 0.32 b | 16.19 \pm 0.40 b |
| AIPCE | 11.99 \pm 0.56 a,b | 3.75 \pm 0.50 a | 19.24 \pm 0.41 a |

Promedios \pm DE. Para cada columna, diferentes letras indican diferencia significativa entre los tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). R: extracto del método de referencia; S: extracto de Soxhlet; EtOHC: extracto usando etanol y sonicación continua por sonda; LETPE: extracto utilizando lactato de etilo y sonicación por pulsos con enfriamiento; AIPP: extracto utilizando acetato de isopropilo y sonicación pulsada sin enfriamiento; AIPCE: extracto utilizando acetato de isopropilo y sonicación continua con enfriamiento. gps: gramo de peso seco.

En los extractos analizados, el único tococromanol cuantificable fue el δ -tocotrienol (Cuadro 9). Estos resultados coincidieron con varios informes, donde se reporta que el δ -tocotrienol es el principal tococromanol en semillas de achiote, con concentraciones comprendidas entre 1.5-10.5 mg/gps (Aggarwal et al., 2010; Dequigiovani et al., 2017; Raddatz-Mota et al., 2016).

Dado que tanto los carotenoides como los tocotrienoles son antioxidantes, su contribución individual a la actividad antioxidante en los extractos se evaluó mediante análisis de regresión múltiple, donde la actividad antioxidante se consideró como la respuesta, mientras que el contenido de bixina y de δ -tocotrienol fueron los factores en estudio. El análisis reveló que, en conjunto, representaban el 67% de la actividad antioxidante, lo que indica que esos compuestos confieren la mayor parte de la actividad antioxidante en los extractos de achiote. Sin embargo, el δ -tocotrienol, pero no la bixina, tuvo un valor de P menor que 0.05 (δ -tocotrienol $P=0.0001$; bixina $P=0.1505$), lo cual indica una mejor correlación entre el contenido de δ -tocotrienol en el extracto y la actividad antioxidante. Esto sugiere que el δ -tocotrienol es el compuesto que confiere la mayor parte de la actividad antioxidante de los extractos de achiote obtenidos. En un análisis de regresión

lineal simple de actividad antioxidante frente a δ -tocotrienol, este último tuvo un coeficiente de correlación de Pearson de 0.78.

Para la accesión E, el extracto obtenido bajo las mejores condiciones de sonicación mostró un contenido de bixina de 18.84 ± 0.44 mg/gps y un contenido de δ -tocotrienol de 5.08 mg/gps. Este extracto fue el que se utilizó en las pruebas para determinar el efecto del extracto de achiote en la supervivencia y resistencia a estrés en *C. elegans*.

6.1.6 Medición del efecto de los extractos de achiote sobre *C. elegans*

C. elegans es el modelo animal más utilizado para medir las propiedades biológicas *in vivo* de extractos o compuestos, pues su simplicidad y su corto periodo de vida facilita ejecutar las pruebas y la interpretación de los resultados. Sin embargo, se debe tener cuidado con la interpretación y la extrapolación directa de los resultados a mamíferos; los resultados deben usarse como bases para realizar estudios adicionales en otros modelos animales o en humanos.

6.1.6.1 Efecto de los extractos de achiote en la supervivencia de la cepa nativa

El efecto del extracto de achiote en la supervivencia del nematodo se muestra en la Figura 39. La concentración de $60 \mu\text{g/mL}$ no presentó efecto en el periodo de vida, la concentración de $100 \mu\text{g/mL}$ aumentó la vida media y máxima en 23 y 13%, respectivamente, en comparación con el grupo control mientras que la concentración de $170 \mu\text{g/mL}$ incrementó la vida media en un 35% y la vida máxima en un 27% (Fig 39b).

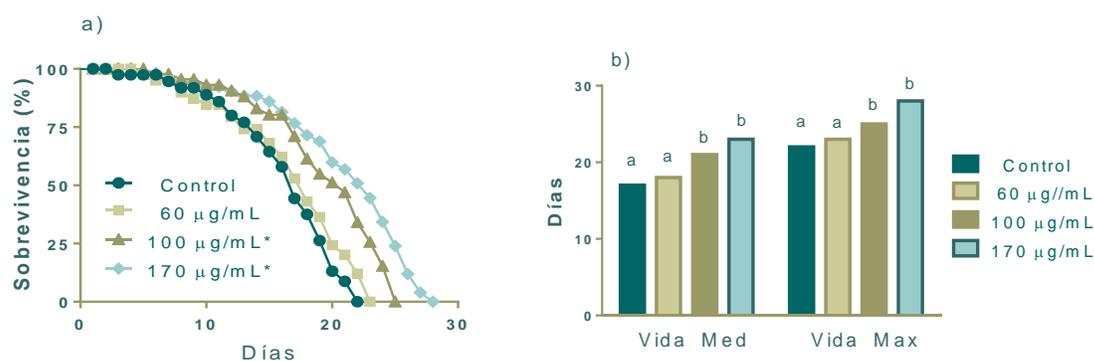


Figura 39. Efecto de tres concentraciones de extracto de achiote en la supervivencia de *C. elegans* cepa N2. a) Curvas de Kaplan-Meier de individuos sincronizados expuestos a 0 (control), 60, 100 y 170 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de achiote a 20°C . * indica diferencia significativa vs control. b) Efecto del extracto de achiote (0-170 $\mu\text{g/mL}$) en la vida media y máxima de las poblaciones de N2. Diferentes letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

Dado que los extractos de achiote son ricos en carotenoides y la vitamina E, el aumento en la vida media observado en este estudio puede deberse a la capacidad de estos compuestos para incrementar los mecanismos de sobrevivencia, como se ha reportado para otros compuestos bioactivos (Fontana et al., 2010; Lucanic et al., 2013). En este sentido, Surco-Laos y colaboradores (2012) evaluaron la influencia de la catequina y algunos de sus derivados en el periodo de vida del gusano y reportaron que algunos de los compuestos probados tienen la capacidad de aumentar la vida media y máxima en los nematodos. Vayndorf y colaboradores (2013) estudiaron el efecto de los extractos de manzana en *C. elegans*, descubriendo que estos extractos podían incrementar el periodo de vida saludable, así como la vida media y la vida máxima. En estos dos estudios, los autores también reportaron aumento en la resistencia contra diferentes tipos de estrés en *C. elegans*. Además, estos autores también reportaron que los extractos de manzana aumentaron la resistencia a la infección por *Pseudomonas aureoginosa*, lo que sugiere la participación del sistema inmune en el incremento de vida observado.

6.1.6.2 Efecto de los extractos de achiote sobre la resistencia a distintos tipos de estrés en la cepa nativa

Para determinar si el extracto de achiote induce resistencia a estrés, se probaron sus efectos contra estrés oxidante, térmico y por radiación UVC. Los resultados se presentan en la Figura 40.

El tratamiento con extractos de achiote produjo resistencia a todos los tipos de estrés explorados. Los extractos de achiote incrementaron la resistencia al estrés térmico 30 y 33% con las concentraciones de 100 µg/mL y 170 µg/mL, respectivamente (Fig 40a). Además, la resistencia al estrés térmico fue el único parámetro que incrementa de manera significativa por la concentración más baja utilizada en este estudio, que fue de 60 µg/mL (14% de incremento).

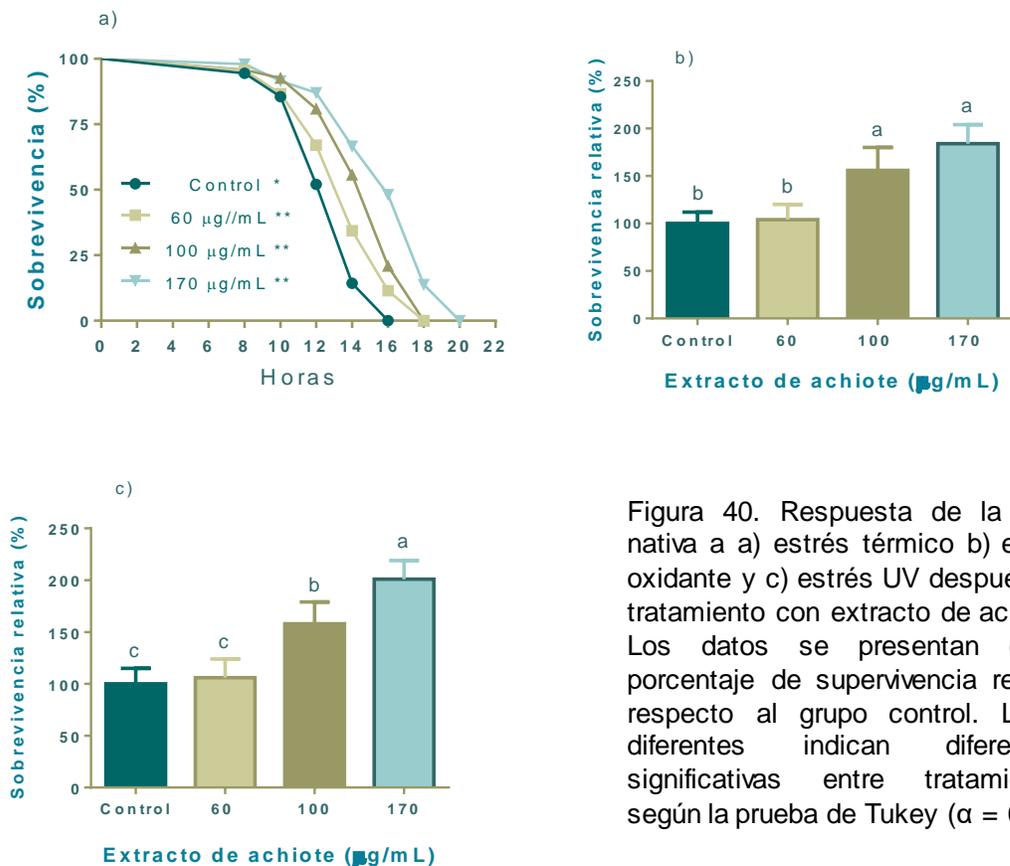


Figura 40. Respuesta de la cepa nativa a a) estrés térmico b) estrés oxidante y c) estrés UV después del tratamiento con extracto de achote. Los datos se presentan como porcentaje de supervivencia relativa respecto al grupo control. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

La supervivencia al estrés oxidante (Fig 40b) aumentó en un 56% y 84% en comparación con el tratamiento control al aplicar 100 µg/mL y 170 µg/mL de extracto de achote, respectivamente. Para el estrés UV (Fig 40c), los porcentajes de supervivencia aumentaron en 58% y 101% del valor de control cuando se aplicaron 100 µg/mL y 170 µg/mL de extracto de achote, respectivamente.

Estos resultados sugieren que, al menos en parte, el efecto observado en la supervivencia de la cepa de N2 estuvo mediado por la capacidad de los extractos para aumentar la resistencia a diferentes tipos de estrés. Respecto a este resultado, muchos autores han relacionado la resistencia a estrés con sistemas altamente eficientes para prevenir y/o reparar alteraciones en proteínas y otras biomoléculas causados por agentes dañinos, como las ERO. La resistencia a estrés también se ha relacionado con actividad antienvjecimiento (Wu et al., 2012; Chen et al., 2013; Vayndorf et al., 2013; Cavinato et al., 2017).

6.1.6.3 Efecto de los extractos de achiote sobre la fertilidad

Para determinar si el aumento en el periodo de vida y en la resistencia a estrés provocada por los extractos de achiote se debió a una desviación de la energía de las funciones secundarias, como la reproducción, a las funciones primarias, como mecanismos de supervivencia, se llevaron a cabo ensayos de fertilidad. La desviación de energía podría ser un indicador de alteraciones importantes en el metabolismo (Gruber et al., 2007; Kim et al., 2014; Zhuang et al., 2014) y es, para compuestos que no tienen esa finalidad, un efecto indeseable.

La Figura 41 muestra los efectos de 60 y 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto de achiote en la tasa de reproducción, así como en el tamaño de la progenie de los nematodos. Dado que la concentración más alta y la concentración más baja probadas en este trabajo no tuvieron un efecto significativo en este ensayo, es razonable pensar que concentraciones intermedias, como 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tendrían el mismo comportamiento.

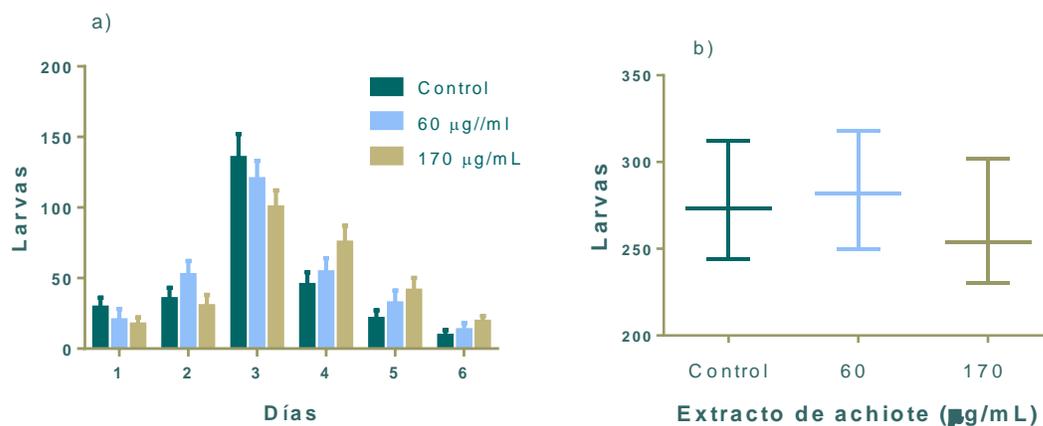


Figura 41. Efecto del extracto de achiote a concentraciones de 60 y 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en: a) tasa de reproducción y b) tamaño total de la progenie en la cepa N2 de *C. elegans*.

Ni la cantidad total de larvas ni la cantidad de larvas puestas por día presentaron diferencias significativas en comparación con el control. Estos resultados apuntan a que los efectos protectores del extracto de achiote no están mediados por restricción calórica (Kirkwood, 2005; Pietsch et al., 2011), y no interfieren con el sistema reproductivo de *C. elegans* y en general sugieren la inocuidad de este extracto.

6.1.6.4 Efecto de la bixina y del δ -tocotrienol sobre la resistencia a estrés de la cepa nativa de *C. elegans*

Debido a que los extractos de achiote tienen a la bixina y al δ -tocotrienol como los principales compuestos bioactivos (30% y 10%, respectivamente), ambos fueron probados para determinar si estos compuestos, individualmente o en combinación, podían reproducir los efectos sobre la resistencia a estrés producidos por los extractos de achiote. Las concentraciones de bixina (30 $\mu\text{g/mL}$) y δ -tocotrienol (10 $\mu\text{g/mL}$) aplicadas corresponden a las encontradas en el extracto a 100 $\mu\text{g/mL}$. Esto fue con la finalidad de explorar si los componentes principales del extracto de achiote podrían ser los responsables, individualmente o en mezcla, de los efectos beneficiosos producidos por el extracto completo de achiote. La Figura 42 muestra los resultados de estos ensayos.

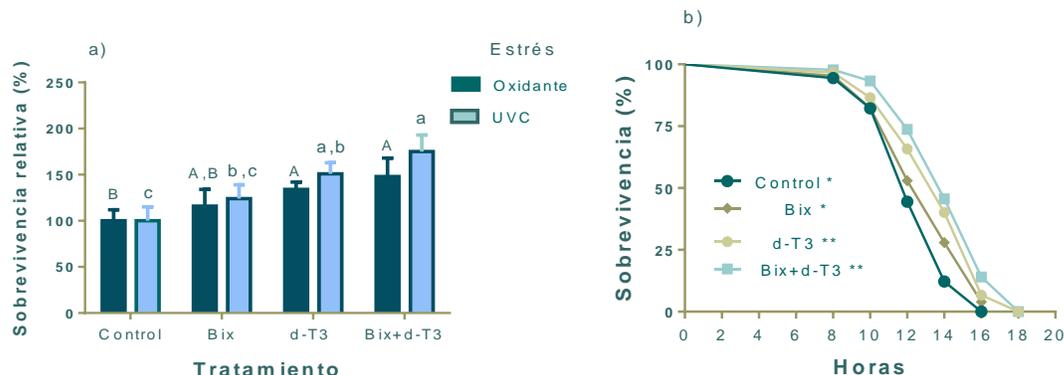


Figura 42. Respuesta de la cepa N2 a a) estrés oxidante y UVC b) estrés térmico después de aplicar los tratamientos de bixina (Bix, 30 $\mu\text{g/mL}$), δ -tocotrienol (d-T3, 10 $\mu\text{g/mL}$) o de su mezcla (Bix+d-T3). Los datos se presentan como porcentaje de supervivencia relativa con el grupo control como 100% de supervivencia. Diferentes letras indican diferencias estadísticas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

La bixina no tuvo efecto sobre la resistencia contra el estrés oxidante (16%, $\alpha=0.05$); sin embargo, el δ -tocotrienol sí aumentó significativamente la supervivencia (34% más que el control). Del mismo modo, la supervivencia al estrés térmico y a radiación UV fue incrementada por el δ -tocotrienol (16% y 51% sobre el control, respectivamente; log-rank, $\alpha=0.05$) pero no por la bixina. Estos resultados sugieren que individualmente el δ -tocotrienol es el principal compuesto responsable de la actividad del extracto de achiote. Cuando los compuestos se aplicaron en combinación, la supervivencia a todos los tipos de estrés probados fue mayor que la obtenida al aplicar los compuestos individuales, y similar a la obtenida con 100 $\mu\text{g/mL}$ de extracto de achiote. Estos resultados sugieren un

efecto acumulativo de δ -tocotrienol y bixina indicando que los mecanismos por los que actúan son distintos.

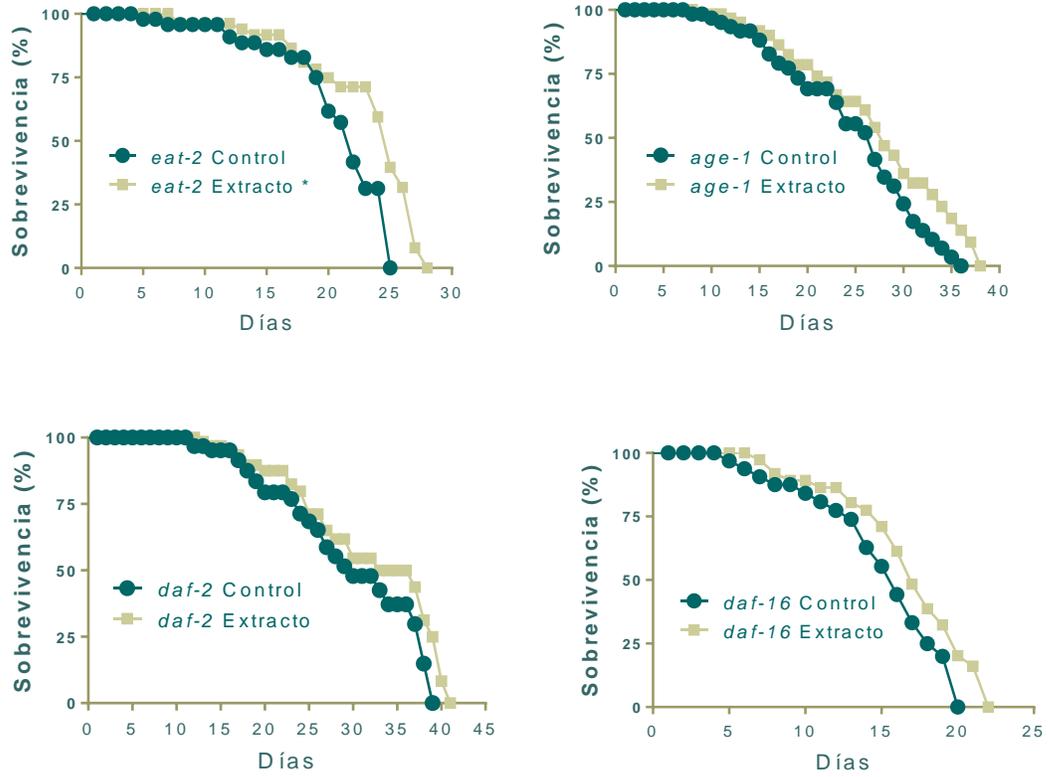
Los efectos protectores de mezclas de tococromanoles donde los tocotrienoles representan la fracción mayoritaria han sido estudiados previamente por Adachi e Ishii (2000) y por Aan y colaboradores (2013). Estos autores reportaron un aumento en la vida media, así como en la resistencia al estrés generado por la radiación UV y por H₂O₂. El aumento de la resistencia se tradujo en reducción de la oxidación de biomoléculas como proteínas y lípidos. Hasta donde sabemos, no hay estudios similares para el efecto de la bixina o de extractos de achiote. Aunque la bixina no tuvo efectos significativos contra el estrés ni en la longevidad de los nematodos a las concentraciones probadas en este estudio, no se descarta que diferentes concentraciones de bixina pudieran producir un resultado benéfico.

6.1.6.5 Efecto de los extractos de achiote en la sobrevivencia y resistencia a estrés en C. elegans a través de epistasis

Con el fin de explorar los mecanismos a través de los cuales el extracto de achiote protegió a los nematodos, se realizaron ensayos en varias cepas mutantes de *C. elegans* para determinar el efecto en el periodo de vida, la resistencia a estrés oxidante y a estrés térmico al aplicar tratamientos de 100 μ g/mL de extracto de achiote. La Figura 43 muestra las curvas de sobrevivencia de los nematodos mutantes (*eat-2*, *age-1*, *daf-2* y *daf-16*) tratados con extractos de achiote.

El extracto de achiote aumentó la vida media y máxima de la mutante *eat-2*, pero no el de las mutantes *age-1*, *daf-2* y *daf-16* (Fig 43b). La capacidad de los extractos de achiote para aumentar la vida de *eat-2* sugiere que este efecto es independiente de la restricción calórica, lo que es consistente con los resultados del ensayo de fertilidad ya que ambas situaciones, limitada actividad reproductiva y restricción calórica, se presentan como respuestas a bajos niveles de nutrientes (Kim et al., 2015). Por su parte, debido a que las diferencias entre tratamientos en las mutantes relacionados con la vía de señalización de insulina y péptidos semejantes a insulina no son significativas (aunque en todos los casos hay una tendencia a aumentar la vida media y máxima), tentativamente, esta vía puede ser reguladora de la actividad de los extractos de achiote.

a)



b)

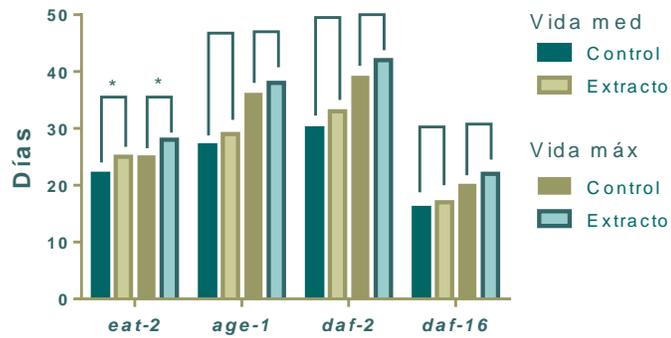


Figura 43. Efecto del extracto de achiote en el periodo de vida de cepas mutantes de *C. elegans*. a) Curvas de sobrevivencia y b) efecto sobre la media y la vida máxima de las mutantes *eat-2*, *age-1*,

daf-2 y *daf-16* del control y el tratamiento de 100 µg/mL de extracto de achiote. * indica diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la prueba de log-rank ($\alpha = 0.05$), $n = 5$.

La Figura 44 muestra los resultados de la prueba de estrés oxidante y estrés térmico en mutantes de *C. elegans*. Se observó que el extracto de achiote incrementó la resistencia al estrés oxidante (Fig 44a) independientemente de los factores de transcripción DAF-16, SKN-1 y HSF-1; esto indica una alta actividad antioxidante de los compuestos en el extracto; sin embargo, esta actividad antioxidante no fue suficiente para aumentar el periodo de vida (Fig 43 b). Esto concuerda con reportes donde se menciona que proteger contra estrés oxidante no siempre correlaciona con el aumento de la sobrevivencia y que el incremento de estrés oxidante no siempre correlaciona con la disminución de la sobrevivencia (Doonan et al., 2008; Gutteridge & Halliwell, 2010; Cabreiro et al., 2011; Ristow & Schmeisser, 2011; Yazaki et al., 2011; Liochev, 2013; Jones, 2015). La actividad antioxidante observada también fue independiente de la restricción calórica, probado con la mutante *eat-2*. No se observaron efectos significativos en la resistencia al estrés de las mutantes *age-1* y *daf-2*.

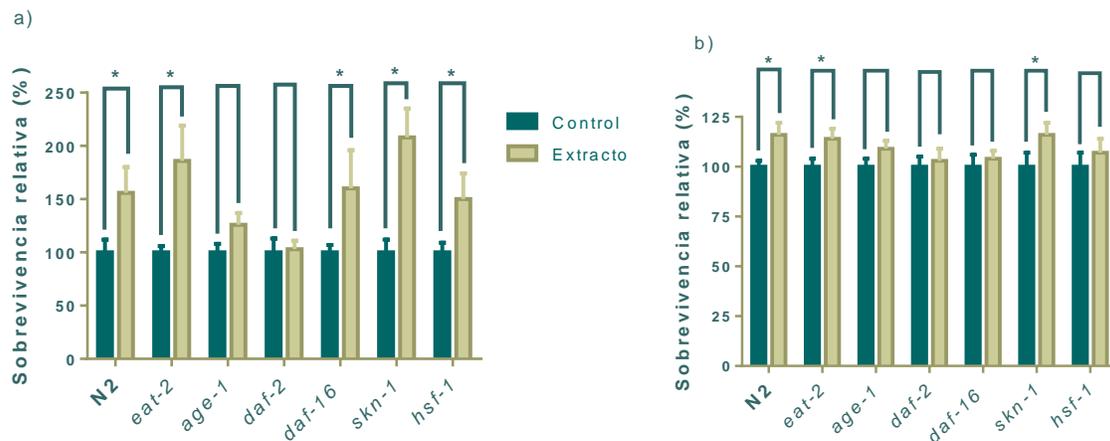


Figura 44. Efecto de 100 µg/mL de extracto de achiote sobre la resistencia a a) estrés oxidante y b) térmico en mutantes de *C. elegans*. Los datos se presentan como porcentaje de sobrevivencia relativa a los grupos control. Para el estrés térmico, los valores presentados corresponden a 16 h de estrés para *eat-2* y *age-1*; 20 h para *daf-2*, y 14 h para *daf-16*, *skn-1* y *hsf-1*. * indica diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), $n=5$.

El extracto de achiote también fue capaz de aumentar la supervivencia al estrés térmico en las mutantes *eat-2* y *skn-1*, pero no en mutantes *age-1*, *daf-2*, *daf-16* y *hsf-1*, lo que indica dependencia del efecto a IIS, DAF-16 y HSF-1 (Fig 44b). En conjunto, los resultados en mutantes indican que, aunque los mecanismos responsables de conferir

resistencia a cada tipo de estrés están relacionados y comparten algunos intermediarios de señalización (Zumberland et al., 2016; Rathor et al., 2017), pueden actuar por vías independientes (Saul et al., 2008), principalmente en cepas mutantes donde las respuestas pueden ser objeto de mecanismos adaptativos, compensatorios o de epistasis (Briga y Verhulst, 2015).

6.2 Extractos de jitomate

6.2.1 Experimento factorial. Enzimas y medio de reacción enzimática

En el Cuadro 10 se muestran las características de las enzimas ensayadas. Se trata de tres cocteles enzimáticos diseñados para la degradación de moléculas presentes en la pared celular de las células de los frutos. Si bien, la actividad lítica reportada de los cocteles es similar, la composición específica de cada coctel, así como la fuente de las que fueron obtenidas las enzimas no son iguales, por lo que particularidades como las condiciones óptimas para su actividad y la afinidad por los sustratos trabajados afectaron su desempeño en las pruebas realizadas. En el Cuadro 11 se muestran los dos factores estudiados, así como sus niveles.

Cuadro 10.- Enzimas probadas para la extracción de compuestos funcionales de jitomate.

| Coctel | Código | Actividad | Fuente |
|-------------------|--------|---|------------------------------|
| NS-22002/CNN02196 | CNN | Glucanasa, Xilanasa, Celulasa y Hemicelulasa | <i>Humicola inolens</i> |
| NS-50012/KTN02163 | KTN | Celulasa, Glucanasa, Hemicelulasa, Pectinasa y Xilanasa | <i>Aspergillus aculeatus</i> |
| Viscozyme L | VIS | Hemicelulasa, Glucanasa, Celulasa y Xilanasa | <i>Aspergillus sp.</i> |

Datos obtenidos de Novozymes.

Cuadro 11.- Factores y niveles evaluados del diseño factorial.

| Diseño factorial | |
|------------------|--------|
| pH | Enzima |
| 4 | KTN |
| 5 | CNN |
| 6 | VIS |
| A | N |

A: agua destilada; N: sin enzima.

Las enzimas, al ser proteínas, pueden modificar su actividad o la afinidad por su sustrato dependiendo de la composición del medio y el pH en que se encuentran. Por esto, se evaluó si el efecto del tratamiento con los cocteles enzimáticos era significativo contra un control sin enzimas, al mismo tiempo que se estudió cuál de los cocteles presentaba mayores beneficios y en qué medio se obtenían los mejores resultados para la obtención de extractos de jitomate con las mejores propiedades antioxidantes. Los resultados mostrados en la Figura 45 reflejan el efecto de la utilización de cocteles enzimáticos y los distintos medios de reacción probados para la obtención de extractos de jitomate.

Las Figuras 45 y 46 presentan el efecto de los dos factores estudiados. Ambos factores y su interacción tienen influencia tanto en el contenido de carotenoides como en la actividad antioxidante de los extractos obtenidos (Cuadro 12), teniendo mejor desempeño el coctel KTN, con una gran diferencia contra el control sin enzima ($P=0.0001$). Es interesante señalar que el coctel KTN es el único de los tres probados para el que se reporta actividad pectinasa, posiblemente esta enzima tuvo relevancia en los resultados obtenidos.

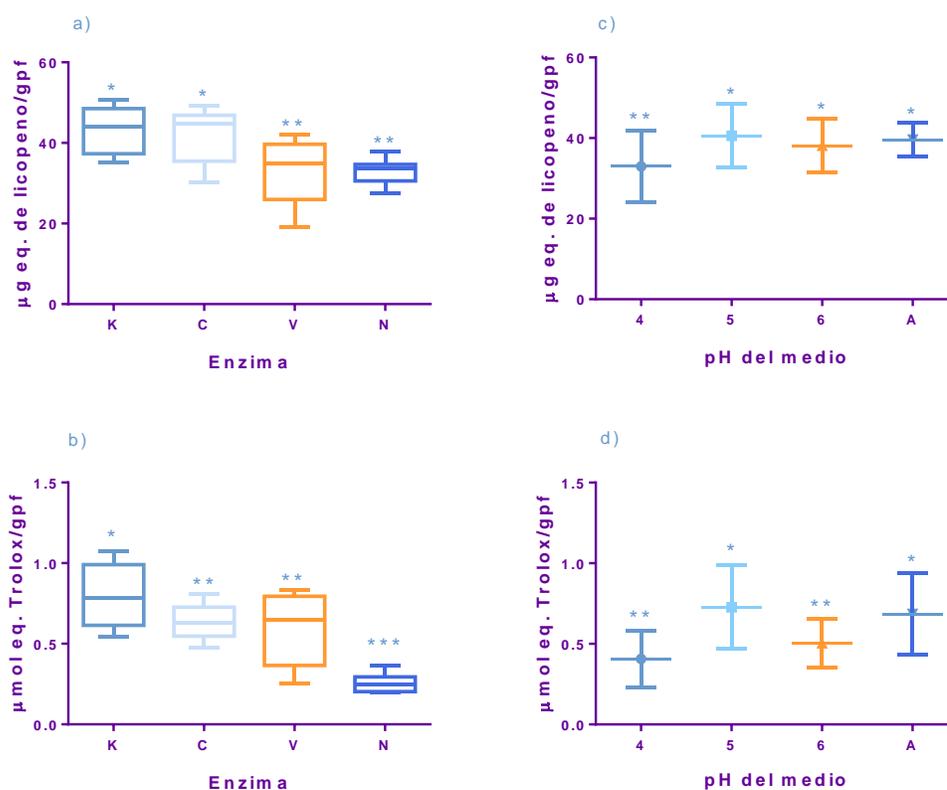


Figura 45. Contenido de carotenoides (A y C) y Actividad antioxidante (B y D) en extractos de jitomate saladette comercial obtenidos empleando distintos cocteles enzimáticos y diferentes

medios de reacción. Se grafican los valores promedio obtenidos para cada condición. Los asteriscos agrupan de acuerdo con la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$. gpf: gramo de peso fresco.

Cuadro 12.- Análisis de Varianza para carotenoides y actividad antioxidante.

| Fuente | Valor-P (C) | Valor-P (AA) |
|----------------------|-------------|--------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | |
| A:pH | 0.0001* | 0.0001* |
| B:Enzima | 0.0001* | 0.0001* |
| INTERACCIONES | | |
| AB | 0.0001* | 0.0001* |

C: carotenoides; AA: actividad antioxidante; *Significancia estadística, $\alpha=0.01$

En la Figura 45 se observa que en las reacciones realizadas en pH5 y en agua destilada, los valores promedio de carotenoides y de actividad antioxidante no mostraron diferencias significativas entre ellos y fueron superiores a los obtenidos en pH 4 y pH 6. Este resultado es interesante pues el hecho de no necesitar controlar el pH de la reacción enzimática es una ventaja debido al ahorro de recursos.

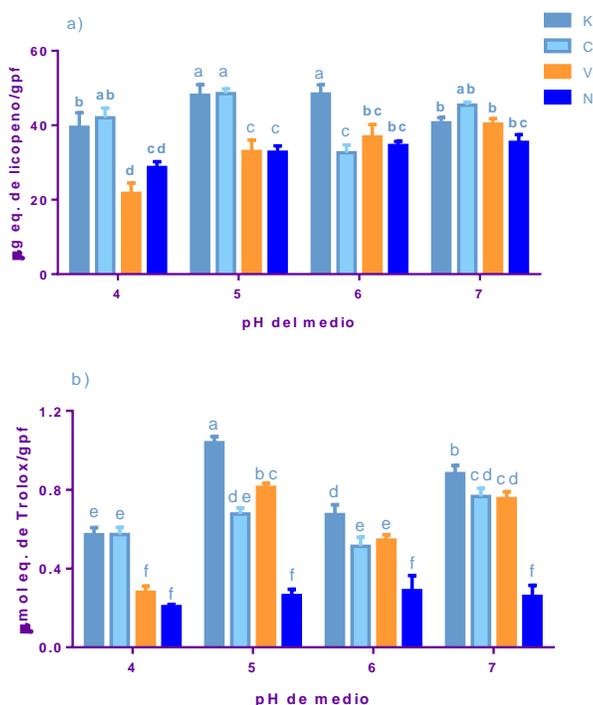


Figura 46. a) Contenido de carotenoides y b) Actividad antioxidante en extractos de jitomate aplicando cocteles enzimáticos y distintos medios de reacción. Comparación de tratamientos.

Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). gpf: gramo de peso fresco.

El hecho de que ambos factores, así como su interacción, hayan resultado significativos señala la necesidad de estudiarlos más detalladamente para la optimización de procesos donde se involucre el uso de enzimas. Con base en estos resultados se seleccionó el coctel enzimático KTN para realizar las extracciones, y dos de los medios de reacción probados, pH 5 y agua destilada, para probarlos en el siguiente experimento.

6.2.2 Experimento factorial fraccionado. Condiciones de reacción enzimática

El Cuadro 13 muestra los factores y los niveles de dichos factores que se probaron durante el primer experimento fraccionado. Los experimentos factoriales fraccionados presentan la ventaja de permitir la incorporación de factores cualitativos. De los factores estudiados en este experimento, el medio de reacción corresponde a un factor del tipo cualitativo, el resto son factores de tipo cuantitativo.

Cuadro 13.- Factores y niveles estudiados para la reacción enzimática.

| | | | |
|----------------------------|---------------------------|--------------------|---------|
| Reacción enzimática | Medio de reacción | 1=H ₂ O | -1=pH5 |
| | Tiempo | 1=12h | -1=1h |
| | Concentración %w/p | 1=5% | -1=1% |
| | Temperatura | 1=40°C | -1=50°C |

El Cuadro 14 muestra el arreglo del diseño experimental. Este arreglo fue generado mediante el programa Statgraphics Centurion XVI.

Cuadro 14. Arreglo del diseño factorial fraccionado, reacción enzimática.

| Tratamiento | Medio de reacción | Tiempo | Concentración | *Temperatura |
|--------------------|--------------------------|---------------|----------------------|---------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| 4 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 6 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | -1 | -1 | -1 | -1 |

*Complemento -ABC

Además del pH del medio, que ya se había probado en el experimento factorial inicial, la temperatura, la cantidad de enzima utilizada y el tiempo de contacto entre las enzimas y el material tratado son factores que pueden afectar la eficacia de las reacciones enzimáticas, por lo que estos factores se optimizaron en este experimento, donde cada uno de estos factores tuvo dos niveles, resultando en un experimento del tipo 2^{4-1} . Los resultados se presentan en la Figura 47.

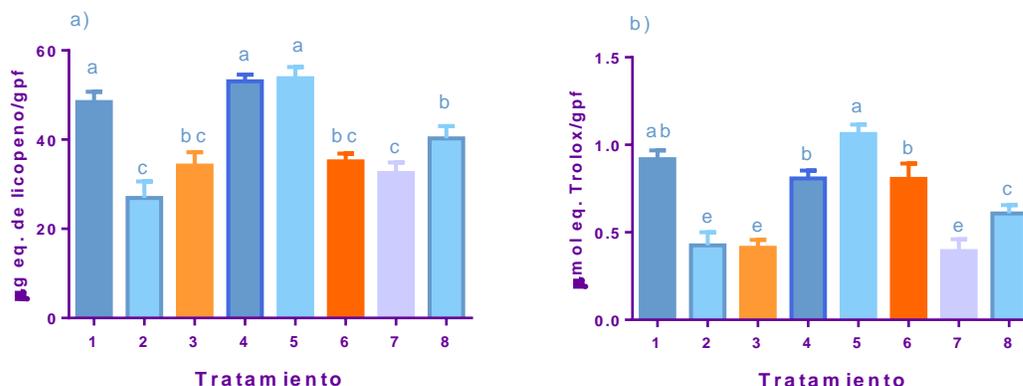
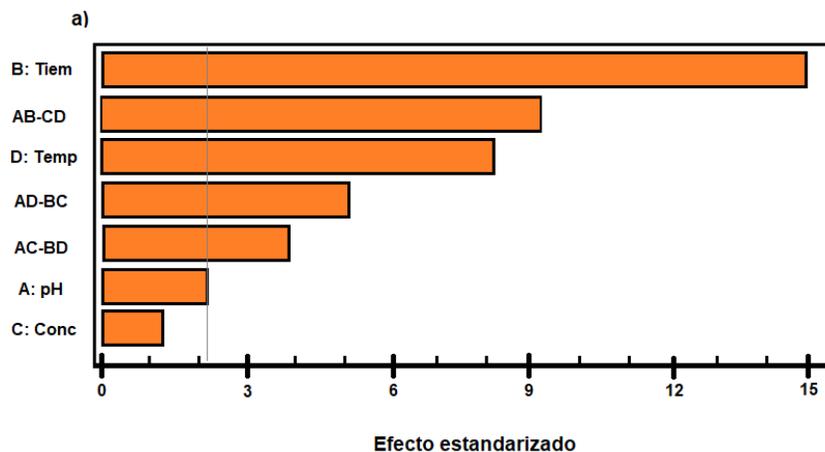


Figura 47. a) Contenido de carotenoides y b) Actividad antioxidante de extractos obtenidos en distintas condiciones de reacción enzimática. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey $\alpha=0.05$.

La metodología del diseño factorial fraccionado permite definir, además de la significancia de los factores, cuáles son los niveles óptimos para cada factor, maximizando las variables respuesta. En la Figura 48 se presenta el nivel de significancia de cada factor (línea negra). Los factores cuya barra rebasa esta línea son significativos; mientras más grande sea la barra, mayor es la influencia del factor en el resultado. Las leyendas combinadas del tipo AB indican interacción entre los factores.



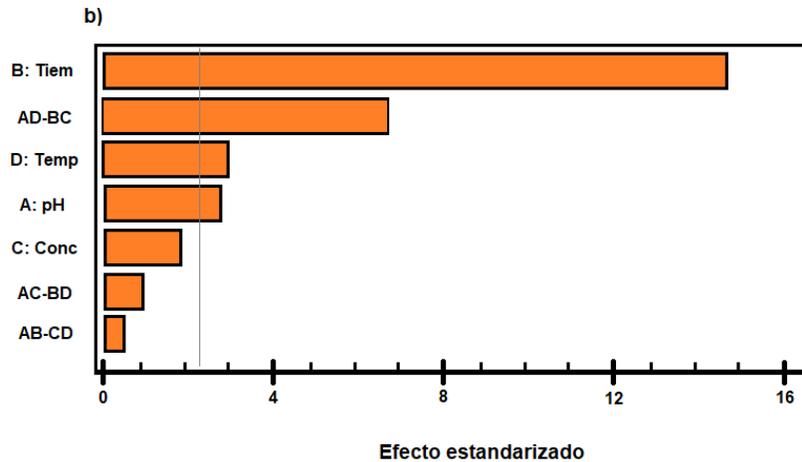


Figura 48. Diagrama de Pareto del experimento de reacción enzimática; se indica la significancia de los factores para a) el contenido de carotenoides y para b) la actividad antioxidante.

Tanto para el contenido de carotenoides como para la actividad antioxidante, el tiempo de reacción es el factor más influyente, seguido por la temperatura, el pH del medio de reacción y finalmente la concentración de enzima añadida. Este último factor deja de ser significativo. El Cuadro 15 refleja los niveles que maximizan los valores de los dos parámetros estudiados (contenido de carotenoides y actividad antioxidante). Los dos tienen como niveles óptimos tiempo: 3 h, temperatura: 50°C, medio de reacción: pH 5 y concentración: 1% v/p.

Cuadro 15.- Niveles óptimos para los factores del experimento de condiciones de reacción enzimática.

| Factor | Contenido de carotenoides | | | Actividad antioxidante | | |
|----------------|----------------------------------|-------------|---------------|-------------------------------|-------------|---------------|
| | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Óptimo</i> | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Óptimo</i> |
| pH | -1.0 | 1.0 | -1.0 | -1.0 | 1.0 | -1.0 |
| Tiempo | -1.0 | 1.0 | -1.0 | -1.0 | 1.0 | -1.0 |
| Conce.% | -1.0 | 1.0 | 1.0 | -1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Temp. | -1.0 | 1.0 | -1.0 | -1.0 | 1.0 | -1.0 |

Es relevante mencionar que, aun cuando el factor concentración de enzima no es significativo, el método seleccionó un nivel óptimo; el nivel 1 de concentración que corresponde a la menor concentración probada de enzimas.

6.2.3 Experimento factorial fraccionado. Combinación de métodos no convencionales

A partir de los experimentos anteriores se pudieron establecer las condiciones a aplicar en el último experimento, en el cual las tecnologías de tratamiento enzimático y sonicación en sonda fueron combinadas con los solventes verdes. Las condiciones de sonicación fueron también ensayadas previamente, siendo el tiempo de sonicación el único factor estudiado (datos no mostrados).

En la Cuadro 16 se pueden observar los factores estudiados en este experimento, así como sus niveles. En este caso, los cuatro factores son del tipo cualitativo. El Cuadro 17 muestra el arreglo de los tratamientos.

Cuadro 16.- Factores estudiados en la combinación de métodos de extracción no convencionales.

| Combinación de métodos | Factor | Niveles | |
|------------------------|------------|--------------------|--------------------------|
| | Genotipo | 1=210 | -1=209 |
| | Sonicación | 1=Sí | -1=No |
| | Enzimas | 1=Sí | -1=No |
| | Solvente | 1=Lactato de etilo | -1=Acetato de isopropilo |

Cuadro 17.- Arreglo del diseño factorial fraccionado, combinación de métodos de extracción.

| Tratamiento | Genotipo | Sonicación | Enzima | *Solvente |
|-------------|----------|------------|--------|-----------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 1 |
| 3 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 4 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 5 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| 7 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 8 | -1 | -1 | 1 | 1 |

*Complemento ABC

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 49. Se observa que el contenido de carotenoides de la actividad antioxidante fue mayor en el tratamiento número 3, el cual corresponde al genotipo 209 ($168.17 \pm 36.13 \mu\text{g eq. lycopeno/gpf}$ y

0.83±0.11 $\mu\text{mol eq. Trolox/gpf}$). Por otro lado, los valores más bajos de contenido de carotenoides extraídos se encontraron en el tratamiento 1, que corresponde al genotipo 210, con un valor de 51.13±0.11 $\mu\text{g eq. licopeno/gpf}$ y de actividad antioxidante para el genotipo 209 con el tratamiento 4, con un valor de 0.16±0.08 $\mu\text{g eq. Trolox/gpf}$. Estos resultados reflejan la importancia de las condiciones de extracción, pues estas pueden modificar de manera importante las propiedades de los extractos obtenidos.

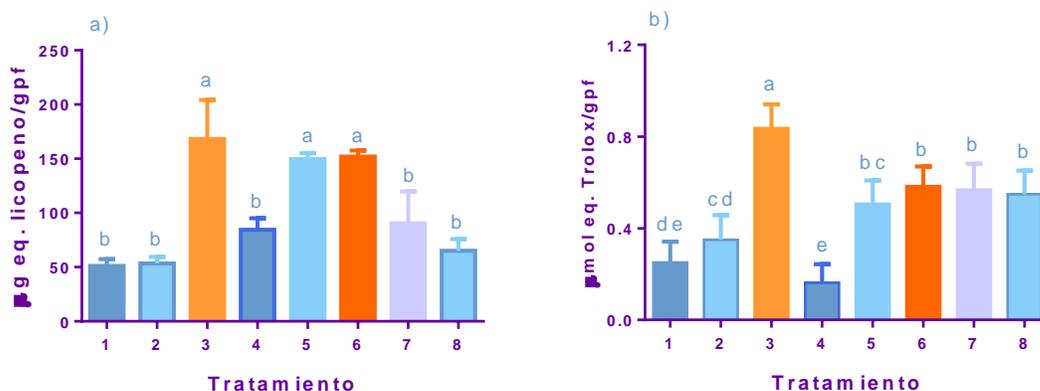


Figura 49. a) Contenido de carotenoides y b) Actividad antioxidante en extractos de jitomates nativos obtenidos con la aplicación de enzimas digestivas y sonicación, según un diseño factorial fraccionado del tipo 2^{4-1} . Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos.

Contrario a lo ocurrido en el experimento anterior, los factores estudiados influyen de manera diferencial a cada uno de los parámetros medidos. Mientras que para el contenido de carotenoides el factor que más afecta el resultado es el solvente empleado, para la actividad antioxidante es la aplicación de enzimas digestivas. De manera interesante, en el caso del contenido de carotenoides, ni la aplicación de enzimas ni el genotipo estudiado resultan ser factores significativos, mientras que para la actividad antioxidante el solvente usado es el factor con menor significancia (Fig 49).

Este comportamiento resalta la importancia de los trabajos como este, donde se estudia el efecto de las condiciones de extracción sobre diversas variables respuesta de interés y cómo en ciertos casos será necesario ponderar la importancia de los parámetros de medidos con el fin de seleccionar las condiciones del proceso más adecuadas según las finalidades buscadas.

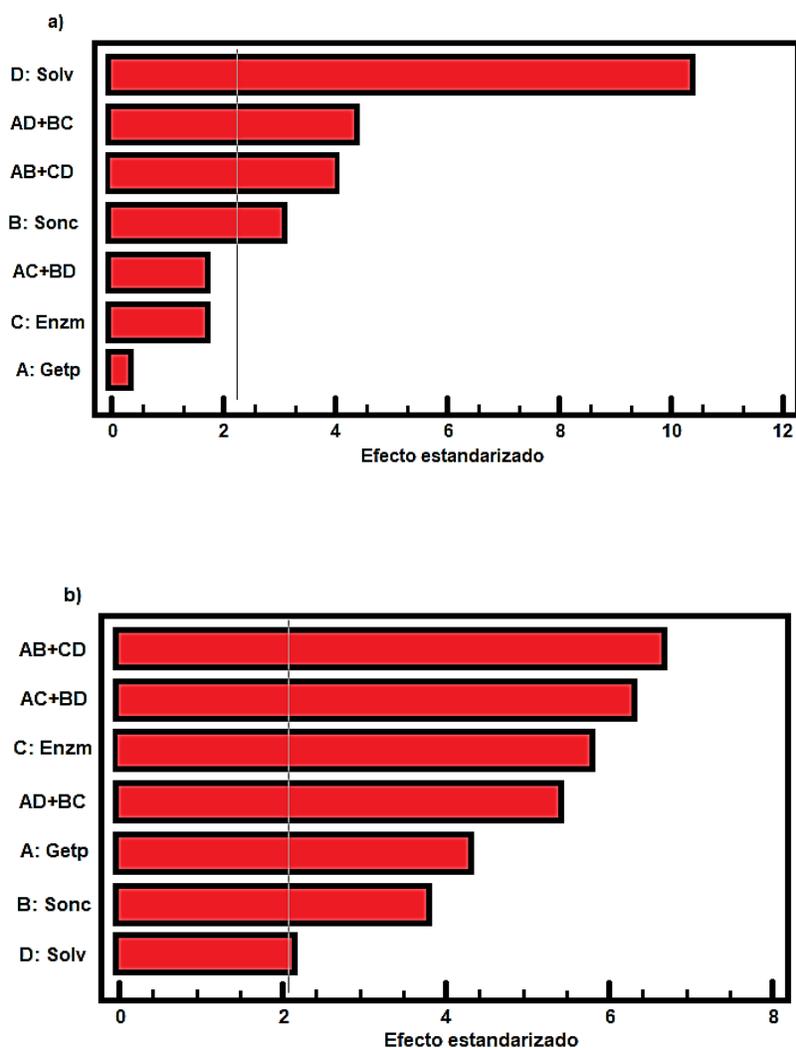


Figura 50. Diagramas de Pareto para a) el contenido de carotenoides y para b) la actividad antioxidante de extractos obtenidos mediante la aplicación de enzimas digestivas y sonicación. La línea gris marca el punto de significancia del factor ($\alpha=0.05$).

A pesar de que los factores tuvieron distinto orden de relevancia según su efecto en el contenido de carotenoides y en la actividad antioxidante, el método indicó los mismos niveles óptimos para maximizar ambas respuestas (Cuadro 18).

Cuadro 18.- Niveles óptimos para los cuatro factores estudiados en el experimento de combinación de métodos no convencionales.

| Factor | Contenido de carotenoides | | | Actividad antioxidante | | |
|-----------------|----------------------------------|-------------|---------------|-------------------------------|-------------|---------------|
| | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Optimo</i> | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Optimo</i> |
| Genotipo | -1.0 | 1.0 | -1.0 | -1.0 | 1.0 | -1.0 |
| Sonicado | -1.0 | 1.0 | 1.0 | -1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Enzima | -1.0 | 1.0 | 1.0 | -1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Solvente | -1.0 | 1.0 | -1.0 | -1.0 | 1.0 | -1.0 |

Los niveles óptimos para la extracción de compuestos funcionales de genotipos nativos de jitomate son genotipo: 209; sonicación: sí; enzimas: sí, y solvente: acetato de isopropilo. Es de mencionar que debido a que ambos solventes son considerados solventes verdes, son características particulares las que podrían tener relevancia a la hora de preferir uno u otro y no su inocuidad o seguridad. Por ejemplo, el acetato de isopropilo presenta la ventaja de tener un punto de ebullición bajo, lo que limita la temperatura alcanzada durante el proceso de sonicación, además de requerirse menos temperatura para su evaporación.

Si bien es cierto que no es posible determinar qué tan grande es la diferencia entre los niveles de los factores probados, sí es posible determinar cuáles niveles dan los mejores resultados. Si fuera de interés conocer más específicamente el efecto de un factor sobre los resultados, sería necesario estudiar este factor en otro tipo de diseño experimental, como el diseño factorial, o en diseños como el de superficie de respuesta. No obstante, los diagramas de Pareto pueden ayudar a decidir sobre la aplicación, en la práctica, de uno u otro nivel, tomando en cuenta la significancia del factor; es decir, si se justifica aplicar el nivel que resulte como óptimo, aún con los posibles inconvenientes que esto pudiera traer consigo (costos, tiempo, recursos empleados, equipos necesarios, entre otros) o si la baja o nula significancia del factor permite escoger libremente el factor a aplicar, guiándose por razones económicas, prácticas o ideológicas.

6.2.4 Determinación del contenido de carotenoides y tocoferoles por HPLC

Los extractos obtenidos con la combinación de tecnologías fueron caracterizados más finamente mediante HPLC. Estos resultados se presentan en los Cuadros 19 y 20.

Como ha sido reportado para jitomates de variedades rojas, el licopeno es el carotenoide más abundante, seguido de β -caroteno (Ilhay et al., 2011; Kotíkova et al., 2011). La luteína se encontró solo en cantidades traza, por lo que no es presentada. Se observan diferencias importantes en el contenido de carotenoides entre tratamientos (256.41 ± 22.32 μg de licopeno y 26.51 ± 3.93 μg de β -caroteno), siendo el tratamiento 3 en el que se obtiene mayor contenido de carotenoides totales. También en concordancia con los resultados espectrofotométricos, los menores contenidos, se presentaron en los tratamientos 1 y 2.

| Muestra | $\mu\text{g/gpf}$ Licopeno | $\mu\text{g/gpf}$ β -Caroteno | $\mu\text{g/gpf}$ Total |
|---------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 80.24 \pm 5.74 e | 1.63 \pm 0.24 c | 81.87 \pm 5.98 e |
| 2 | 88.31 \pm 3.67 e | 0.2 \pm 0.1 d | 88.51 \pm 3.77 e |
| 3 | 256.41 \pm 22.32 a | 26.51 \pm 3.93 a | 282.92 \pm 26.25 a |
| 4 | 163.54 \pm 7.51 c | 13.38 \pm 3.87 b | 176.92 \pm 11.38 c |
| 5 | 210.64 \pm 11.38 b | 18.32 \pm 5.78 ab | 228.64 \pm 17.16 b |
| 6 | 164.08 \pm 8.23 c | 1.78 \pm 0.13 c | 165.86 \pm 8.36 c |
| 7 | 207.71 \pm 14.76 b | 3.39 \pm 1.77 c | 211.10 \pm 16.53 b |
| 8 | 118.56 \pm 10.64 d | 1.96 \pm 0.62 c | 120.92 \pm 11.26 d |

Cuadro 19.- Contenido de carotenoides en los extractos de jitomates nativos.

Valores promedio y desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos según la prueba de Tukey $\alpha=0.05$

Cuadro 20. Contenido de tocoferoles en los extractos de jitomates nativos.

| Muestra | α -tocoferol $\mu\text{g/gpf}$ | β -tocoferol $\mu\text{g/gpf}$ | γ -tocoferol $\mu\text{g/gpf}$ | δ -tocoferol $\mu\text{g/gpf}$ | Total $\mu\text{g/gpf}$ |
|---------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| 1 | 3.24 \pm 0.64 ab | 1.03 \pm 0.12 c | 0.27 \pm 0.02 | 0.18 \pm 0.03 | 4.73 \pm 0.81 ab |
| 2 | 3.88 \pm 0.93 ab | 0.99 \pm 0.14 c | 0.45 \pm 0.05 | 0.41 \pm 0.08 | 5.74 \pm 1.2 ab |
| 3 | 4.24 \pm 0.45 a | 1.56 \pm 0.09 a | 0.43 \pm 0.09 | 0.29 \pm 0.04 | 6.52 \pm 0.67 a |
| 4 | 2.23 \pm 0.33 b | 1.10 \pm 0.10 bc | 0.37 \pm 0.06 | 0.04 \pm 0.01 | 3.74 \pm 0.5 b |
| 5 | 3.15 \pm 0.70 ab | 1.36 \pm 0.21 ab | 0.77 \pm 0.27 | 0.42 \pm 0.06 | 5.70 \pm 1.24 ab |
| 6 | 2.69 \pm 0.54 ab | 1.17 \pm 0.18 bc | 0.97 \pm 0.21 | 0.34 \pm 0.05 | 5.38 \pm 0.98 ab |
| 7 | 4.15 \pm 0.61 a | 1.13 \pm 0.19 bc | 0.44 \pm 0.04 | 0.27 \pm 0.03 | 5.98 \pm 0.90 ab |
| 8 | 3.20 \pm 0.38 ab | 1.24 \pm 0.19 bc | 0.42 \pm 0.13 | 0.33 \pm 0.08 | 5.19 \pm 0.78 ab |

Valores promedio y desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey $\alpha=0.05$.

En los extractos obtenidos mediante la aplicación de tecnologías no convencionales se detectaron las cuatro isoformas conocidas de los tocoferoles. La abundancia de los

mismos de manera general fue $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, este comportamiento ha sido reportado anteriormente (Pinela et al., 2012), sin embargo en los tratamientos 2 y 8 el contenido de γ y δ tocoferol es similar. Coincidente a lo ocurrido con los carotenoides, fue en el tratamiento 3 en el que se encontraron los mayores contenidos de tocoferoles (α -tocoferol 4.24 $\mu\text{g/gpf}$ y tocoferoles totales 5.74 $\mu\text{g/gpf}$). El menor contenido de tocoferoles se encontró en el tratamiento 4 (2.23 $\mu\text{g/gpf}$ de α -tocoferol y 3.74 $\mu\text{g/gpf}$ de tocoferoles totales), y en este tratamiento también se obtuvo el valor de actividad antioxidante más bajo.

El hecho de que el extracto con el mayor contenido de carotenoides y tocoferoles haya tenido la mayor actividad antioxidante (tratamiento 3), pero que el de menor contenido de carotenoides no haya sido el de menor contenido de tocotrienoles o el de menor actividad antioxidante (tratamientos 1 y 4, respectivamente), hizo necesario aplicar un análisis de correlaciones entre los compuestos analizados de los extractos y la actividad antioxidante (Cuadro 21). El análisis mostró que no existe una correlación entre el contenido de carotenoides y el contenido de tocoferoles totales o de α -tocoferol. Por otra parte, tanto el contenido de carotenoides como el de tocoferoles correlacionó positivamente con la actividad antioxidante, teniendo mejor correlación el contenido de tocoferoles (P de 0.66 vs 0.83). De manera interesante, entre estas correlaciones se encontró que el contenido de licopeno está correlacionado con la actividad antioxidante pero no el contenido de α -tocoferol, siendo estos dos compuestos los principales representantes de cada grupo presentes en los frutos de jitomate. Un resultado similar fue reportado por Zanfini y colaboradores (2010) quienes encontraron que la actividad antioxidante de extractos lipofílicos de jitomates presentó alta correlación con el contenido de licopeno, pero una correlación media con el contenido de α -tocoferol. Estos resultados hacen difícil una conclusión respecto al aporte individual de cada compuesto o de cada grupo de compuestos a la actividad antioxidante, apuntando a un efecto en conjunto, no puede ser explicado de manera satisfactoria solo por el compuesto mayoritario de cada grupo de compuestos.

Cuadro 21. Correlaciones entre los distintos compuestos de interés y la actividad antioxidante.

| | Carotenoides | Tocoferoles | α -tocoferol | Lycopeno | Actividad antioxidante |
|---------------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|------------------------|
| Carotenoides | | 0.478/0.116 | 0.260/0.267 | 0.996/0.001* | 0.664/0.036* |
| Tocoferoles | 0.478/0.116 | | 0.880/0.002* | 0.494/0.107 | 0.828/0.005* |
| α -tocoferol | 0.260/0.267 | 0.880/0.002* | | 0.273/0.257 | 0.582/0.065 |
| Lycopeno | 0.996/0.001* | 0.494/0.107 | 0.273/0.257 | | 0.683/0.031* |

Coefficientes de correlación/ Valores de P. Nivel de significancia $\alpha=0.05$

6.2.5 Efecto del extracto de jitomate en la resistencia a estrés y en la sobrevivencia del nematodo *C. elegans*

6.2.5.1 Efecto de los extractos de jitomate sobre la resistencia a estrés de la cepa nativa de *C. elegans*

Las pruebas de estrés oxidante y estrés térmico se realizaron probando concentraciones de 100, 200, 300 450 y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto (Fig 50).

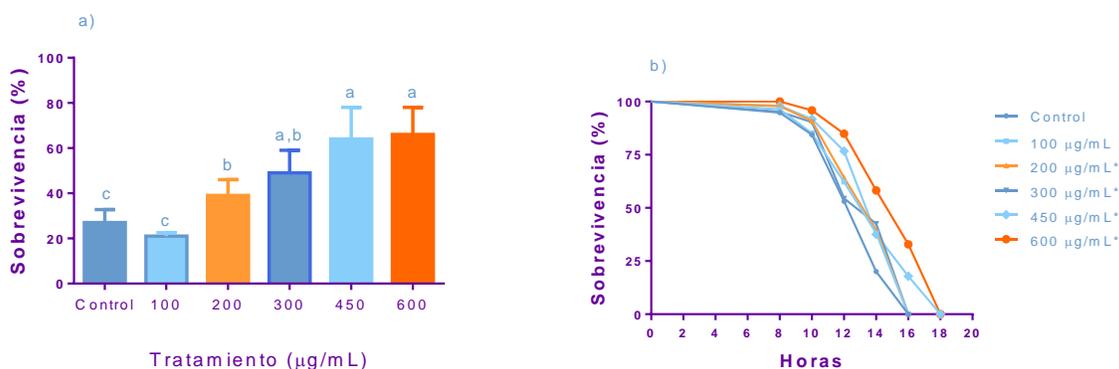


Figura 51. Efecto del extracto de jitomate a distintas concentraciones en el a) estrés oxidante y b) estrés térmico. Letras distintas indican diferencia significativa según la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$). Los asteriscos indican diferencia significativa contra el control según la prueba de log-rank ($\alpha=0.05$).

Se observa que a partir de los 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el extracto de jitomate es capaz de incrementar la tolerancia a estrés oxidante (Fig 50a) y a estrés térmico de los gusanos significativamente en comparación con el control (40 y 15%, respectivamente); en

concentraciones mayores se observa una tendencia de aumento en la tolerancia a estrés, alcanzándose los mayores incrementos al aplicar 600 µg/mL (Fig 50b).

Sin embargo, la prueba de fertilidad mostró que con la concentración de 600 µg/mL se presentaban importantes modificaciones en el metabolismo y los sistemas relacionados con la reproducción de los gusanos, reflejándose en una disminución significativa en la cantidad de larvas totales (20% menos larvas, Fig 51). Estos efectos pueden ser debidos a mimetismo con restricción calórica o por un grado ligero de toxicidad.

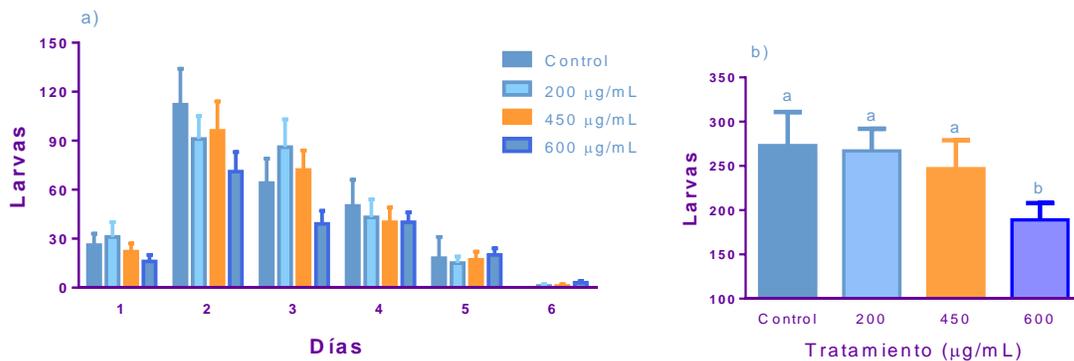


Figura 52. Efecto del extracto de jitomate sobre a) la tasa de reproducción y b) la cantidad total de larvas producidas por los nematodos.

6.2.5.2 Efecto de los extractos de jitomate en la sobrevivencia de la cepa nativa de *C. elegans*

Para la curva de sobrevivencia se eliminó la concentración de 600 µg/mL debido a los efectos negativos observados en la prueba de fertilidad. Se observa que la vida media de los gusanos pasa de 17 días en el control a 18, 20 y 22 días con las concentraciones de 200, 300 y 450 µg/mL, lo que supone un incremento de 6, 17 y 29% respectivamente. Por otra parte, la vida máxima se incrementó 20% con la concentración de 200 µg/mL y hasta 30% con las concentraciones de 300 y 450 µg/mL (Fig 52). Así se observa que el extracto de jitomate en concentraciones de 200, 300 y 450 µg/mL es capaz de incrementar la longevidad de los nematodos. Este aumento en la longevidad se vio acompañado por un incremento en la movilidad a edades avanzadas, así como por un fenotipo con apariencia más joven que se mantuvo durante más tiempo.

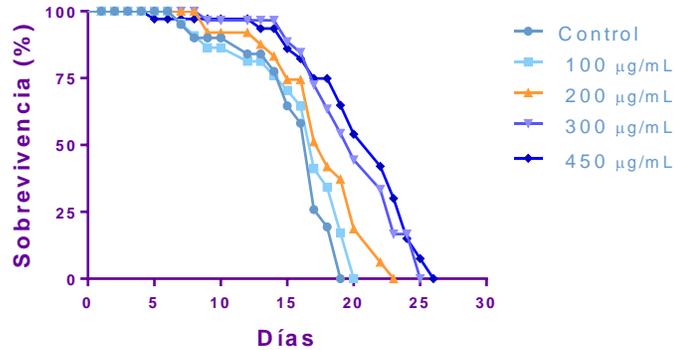


Figura 53. Efecto del extracto de jitomate sobre la curva de sobrevivencia de la cepa nativa.

6.2.5.3 Efecto de los extractos de jitomate sobre la resistencia a estrés en experimentos de epistasis

La mutante *mev-1* tiene la particularidad de generar mayor cantidad de radicales libres en mitocondria, por lo que se considera un modelo de estrés oxidante endógeno. Se observa que el extracto de jitomate incrementa la sobrevivencia de la mutante *mev-1*, lo que sugiere que parte de su actividad está mediada por el incremento de las defensas contra radicales libres y por la regulación del estado redox celular; esta capacidad de respuesta se ve potenciada por el extracto aún en condiciones hiperoxidantes (Fig 54). Las mutantes *daf-16* y *skn-1* no mostraron incremento en la resistencia al estrés oxidante cuando se aplicó el extracto de jitomate, contrario a las mutantes *age-1* y *daf-2*. Estos resultados indican que la protección contra estrés oxidante es independiente de la vía de señalización IIS; pero es dependiente de la presencia de los factores de transcripción de respuesta a estrés. Así, el extracto presenta actividad antioxidante directa e indirecta. Posiblemente la activación de estos factores de transcripción por el extracto de jitomate sea mediante una vía distinta a la vía de la insulina, que es la vía canónicamente represora del factor *daf-16*.

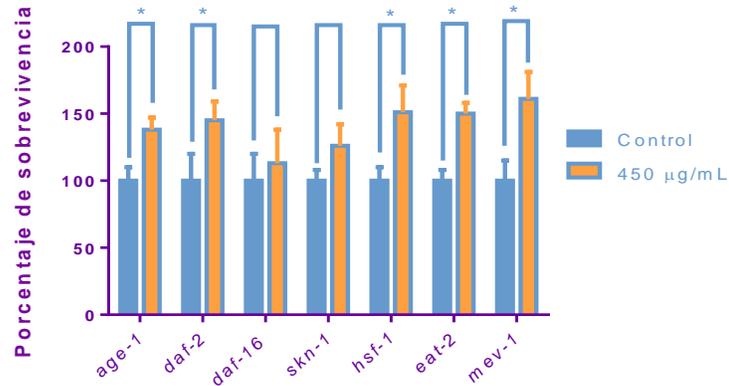


Figura 54. Resistencia a estrés oxidante inducido por H₂O₂ de las mutantes de *C. elegans* con tratamiento control y tratamiento de 450 µg/mL de extracto de jitomate.

Por su parte, también la curva de resistencia a estrés térmico de las mutantes *eat-2*, y *mev-1* presentó diferencias significativas en comparación con el control (Fig 55). Similar a lo ocurrido para estrés oxidante, la mutante de *daf-16* no presenta el efecto protector. Además, para este tipo de estrés, la resistencia de la mutante *hsf-1* tampoco se ve afectada por el extracto de jitomate. Debido a que la relevancia de *hsf-1* en respuesta a estrés térmico es mayor que en respuesta a estrés oxidante, pues sus principales genes blanco están relacionados con la expresión de proteínas de choque térmico y chaperonas, las diferencias entre la prueba de estrés oxidante y estrés térmico con relación a *hsf-1* son justificadas. Por otro lado, *daf-16* ha mostrado tener alto impacto en la resistencia a ambos tipos de estrés pues promueve la expresión de proteínas de choque térmico y de proteínas antioxidantes de fase 1. Estos resultados apoyan la idea de que el comportamiento de la respuesta a estos dos tipos de estrés no siempre sigue el mismo comportamiento.

El análisis de log-rank indica que las diferencias son significativas en relación a la distribución de la curva para las mutantes *age-1* y *daf-2*, sin embargo, ni la vida media ni la vida máxima se modificó para ninguna de las mutantes estudiadas (Fig 55).

En conjunto, los resultados de resistencia a estrés oxidante y a estrés térmico sugieren que la respuesta al tratamiento con extracto de jitomate no está mediada solamente por un efector, sino que depende de varios efectores y vías de señalización. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos en el análisis de correlación entre el contenido de carotenoides, tocoferoles y la actividad antioxidante donde se observó que más de un compuesto correlacionó con la actividad antioxidante (aunque este comportamiento no

debería ser congruente necesariamente ya que lo que ocurre *in vitro* no es extrapolable en a las pruebas *in vivo*). Si varios compuestos, y no sólo uno o no principalmente uno, son responsables del efecto de incremento en la resistencia a estrés observado en la cepa nativa, es probable que también varios mecanismos estén involucrados en la respuesta y no sólo uno. Esto indica que, para el caso del extracto de jitomate, un efecto hormético explica mejor por qué el extracto mejora la resistencia a estrés, a pesar de que no ahonda de manera detallada en los mecanismos responsables.

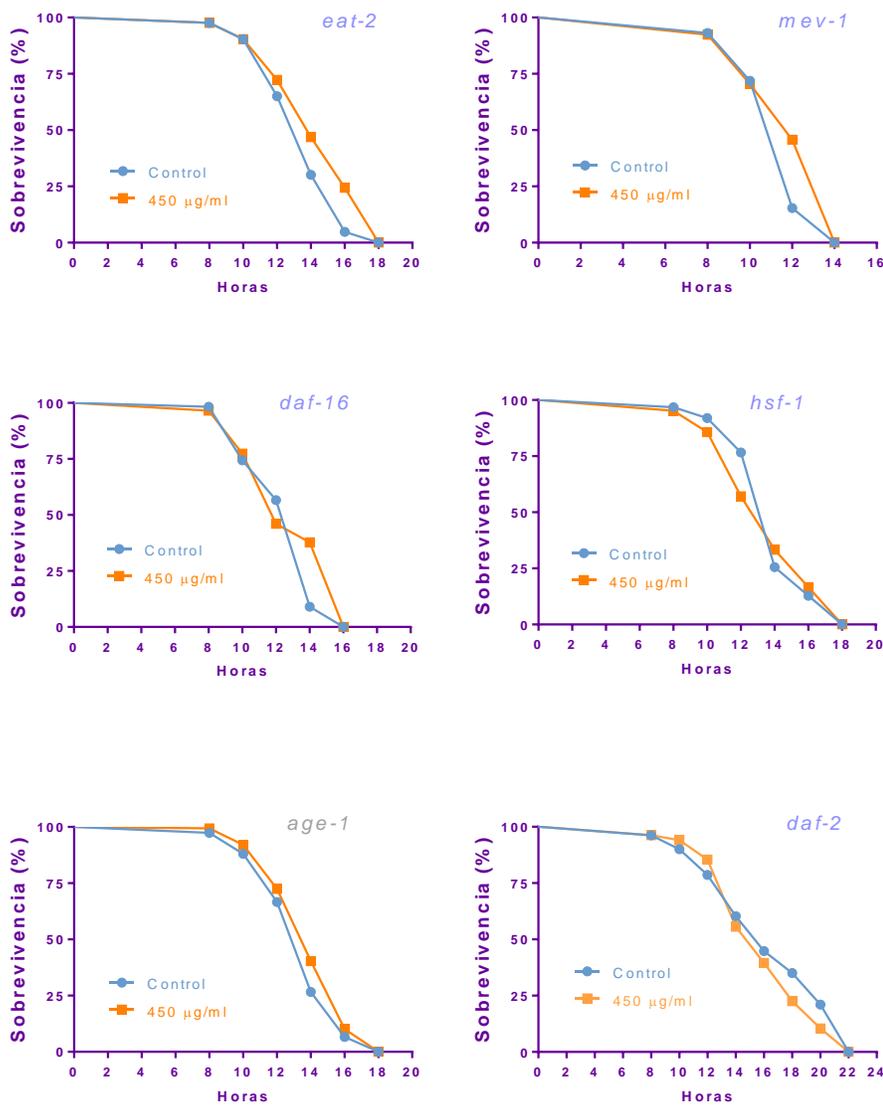


Figura 55. Resistencia a estrés térmico de las mutantes de *C. elegans* con el tratamiento control y con extracto de jitomate en concentración de 450 µg/mL.

6.2.5.4 Interacción epistática de los extractos de jitomate en la sobrevivencia de *C. elegans*

Las curvas de vida media y los valores promedio de vida media y vida máxima de las mutantes utilizadas se muestran en la Figura 56. El extracto de jitomate fue capaz de incrementar significativamente la vida media de la mutante *mev-1* (12%). Sin embargo, ni la vida máxima en esta mutante ni la vida media o máxima para el resto de las mutantes se vio modificada significativamente, lo que sugiere que el efecto observado en la prueba de estrés oxidante en las mutantes *age-1*, *daf-2* y *hsf-1* no es suficiente para incrementar su periodo de vida en condiciones fisiológicas normales. Además, debido a que en la cepa nativa sí se modifica el periodo de vida, se refuerza la idea de que el efecto mostrado es el resultado del conjunto de varias respuestas, efectos y mecanismos combinados.

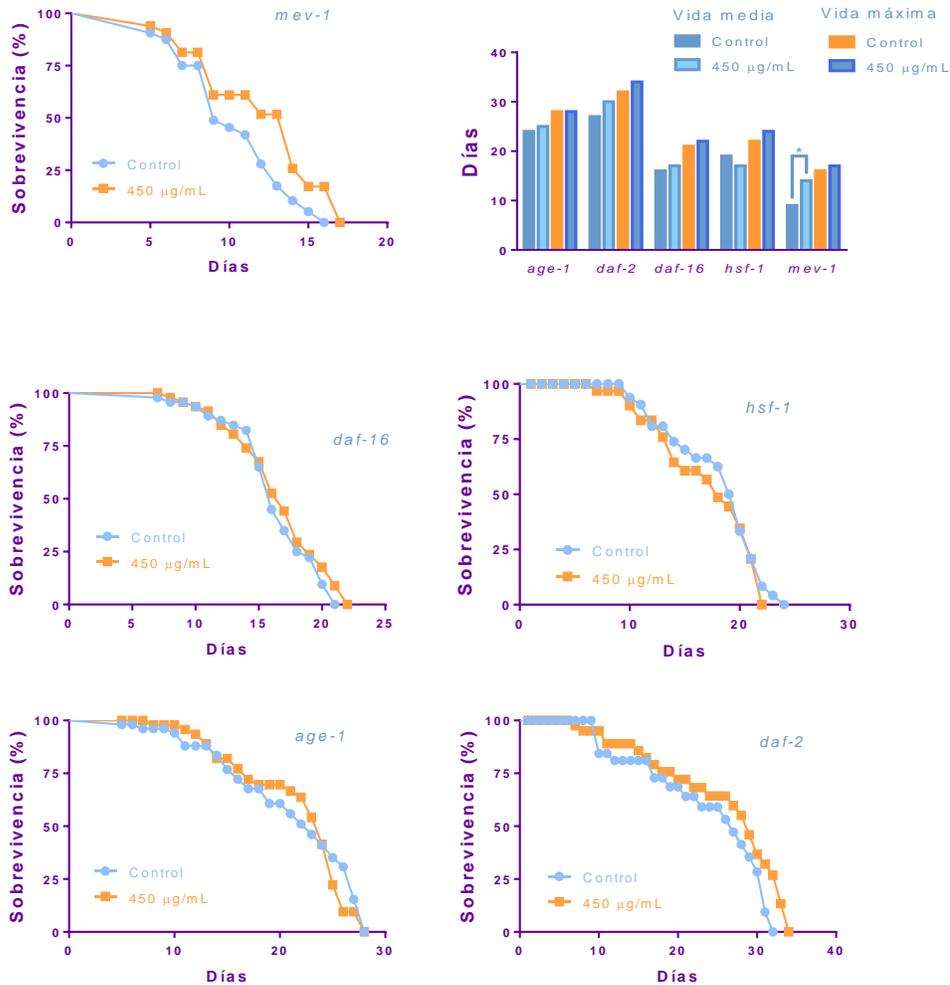


Figura 56. Curvas de sobrevivencia, vida media y vida máxima para las mutantes, tratamiento

control y 450 µg/mL de extracto de jitomate. * indica diferencia significativa contra el control ($\alpha=0.05$).

7. Conclusiones

Las tecnologías no convencionales de extracción son herramientas poderosas que pueden ser aplicadas de manera exitosa, estudiando las condiciones idóneas de aplicación, para mejorar los procesos de extracción de compuestos de interés a partir de las matrices vegetales que los producen. Si bien puede ser cierto que no todas las tecnologías serán compatibles con todas las matrices, si pueden explorarse distintas herramientas para encontrar la más adecuada, según las finalidades buscadas.

El uso de solventes orgánicos convencionales para la extracción de compuestos de carácter hidrófobo es una práctica que se intenta reducir en medida de lo posible, debido a que estos solventes suelen tener efectos negativos. Con esta finalidad pueden ser usados solventes alternativos, llamados solventes verdes, que permiten obtener resultados satisfactorios cuando su aplicación es precedida por un estudio de las condiciones adecuadas para su aplicación.

La utilización de los diversos diseños experimentales permitió conocer mejor las propiedades de los extractos en las distintas etapas, facilitando la elección de las condiciones de extracción en relación a las variables respuesta que se buscaron maximizar, el contenido de carotenoides y la actividad antioxidante, con una cantidad relativamente baja de corridas experimentales.

Los materiales vegetales nativos aquí estudiados, tanto achiote como jitomate, tienen potencial para ser aprovechados como fuente de pigmentos, de compuestos funcionales o, en el caso del jitomate, para ser utilizados en programas de mejoramiento, debido a sus buenas cualidades y a sus propiedades funcionales. La ventaja de la utilización de materiales nativos es que están adaptados a los lugares donde crecen, lo que representa una ventaja en el sentido de constancia de producción y de las características con que se desarrollan.

Se comprobó que los extractos de achiote y jitomate obtenidos con el uso de tecnologías no convencionales de extracción tienen la capacidad de incrementar la resistencia a estrés oxidante y térmico en el nematodo *C. elegans*. De manera similar, el periodo de vida se incrementó en los nematodos tratados. Ambos efectos podrían estar relacionados

hasta cierto punto, sin embargo, en las cepas mutantes se observaron comportamientos contradictorios con esta idea, por ejemplo, protección positiva contra estrés oxidante pero efecto nulo sobre el periodo de vida.

Sorpresivamente, a pesar de que los compuestos mayoritarios en los extractos de achiote y de jitomate pertenecen a las mismas familias (carotenoides y vitamina E), los mecanismos que median estos efectos parecen ser distintos, pues los extractos de achiote mostraron tener efectos dependientes de la vía de insulina, pero independientes de la actividad de los factores de transcripción DAF-16, SKN-1 y HSF-1. Por su parte, los extractos de jitomate produjeron efectos independientes de la vía de insulina, pero dependientes de los factores de transcripción. En última instancia, ambas opciones indicaría una respuesta celular desencadenada por la presencia de los compuestos contenidos en los extractos, sin descartar que dichos compuestos promuevan una respuesta hormética, es decir que podrían estar siendo percibidos por las células como agentes dañinos y estimulando diversas respuestas de sobrevivencia en los organismos, desencadenando procesos de adaptación.

Aunque ambos tipos de extracto mostraron mantener sus efectos en la mutante de restricción calórica, los extractos de jitomate presentaron signos de producir este efecto al aplicarse en concentración de 600 µg/mL. Los extractos de achiote, que llegaron a probarse hasta en 200 µg/mL no presentaron tal efecto, sin embargo al no encontrarse diferencias significativas con la concentración de 170 µg/mL decidió utilizarse última concentración en los estudios realizados.

El uso de estrategias de investigación, como emplear organismos mutantes, son útiles para estudiar fenómenos en los que una vía de señalización, factor de transcripción o proteína activa son determinantes para observar cierto efecto. En procesos donde los efectos observados son debido a respuestas múltiples es difícil asegurar cuál componente, vía o compuesto tiene mayor relevancia (por efectos epistáticos). Sin embargo, lo que se puede hacer es descartar posibilidades, que de una manera distinta, también nos acerca al conocimiento de los fenómenos involucrados. Adicionalmente, estos resultados sugieren que los compuestos presentes en los extractos de achiote y de jitomate pueden ser fuente de compuestos con potencial de producir efectos benéficos en mamíferos y contribuir a alcanzar un envejecimiento saludable.

8. Referencias

- Aan, G., Zainudin, M., Karim, N., Wan, W. 2013. Effect of tocotrienol-rich fraction on the lifespan and oxidative biomarkers in *Caenorhabditis elegans* under oxidative stress. *Clinical Science* 68, 599-604. doi:10.6061/clinics/2013(05)04
- Abuajah, C., Ogbonna, A., Osuji, C. 2015. Functional components and medicinal properties of food: a review. *Journal of Food Science and Technology* 52, 2522-2529. doi:10.1007/s13197-014-1396-5
- ACS (American Chemical Society). 2007. Introduction: Green Chemistry. *Chemical Reviews* 107.
- Adachi, H., Ishii, N. 2000. Effects of Tocotrienols on Life Span and Protein Carbonylation in *Caenorhabditis elegans*. *Journals of Gerontology. Serie A, Biological Science and Medical Science* 55, B280-B285. doi:10.1093/gerona/55.6.b280
- Agarwal, S., Rao, A.V. 2000. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal* 163, 739-744.
- Aggarwal, B., Sundaram, C., Prasad, S., Kannappan, R. 2010. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical Pharmacology* 80, 1613-1631. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.043
- Ahsan, H., Ahad, A., Siddiqui, W. 2015. A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. *Journal of Chemical Biology* 8, 45-59. doi:10.1007/s12154-014-0127-8
- Alam, M.N., Bristi, N.J, Rafiqzama, M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, 143-152. doi:10.1016/j.jsps.2012.05.002
- Alavez, S., Lithgow, G.J. 2011. A new look at old compounds. *Aging* 3, 338-339. doi:10.18632/aging.100317
- Albuquerque, C.L.C., Meireles, M.A.A. 2011. Trends in Annatto Agroindustry: Bixin Processing Technologies and Market. *Recent Patents on Engineering* 5, 94-102. doi:10.2174/187221211796320738

Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E. 2016. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 997-1027. doi:10.1021/acs.jafc.5b04739

Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Trougakos, I.P., Skaltsounis, A.L. 2013. *Natural Products Reports* 30, 1412-1437. doi:10.1039/c3np70031c

Ashwell, M. 2002. *Concepts of Functional Foods*. ILSI Europe Concise monograph series.

Aspé, E., Fernández, K. 2011. The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* bark. *Industrial Crops and Products*, 34, 838-844. doi:10.1016/j.indcrop.2011.02.002

Baldwin, E., Scott, J., Shewmaker, C., Schuch, W. 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience* 35, 1013-1021.

Barrozo, M.A.S., Santos, K.G., Cunha, F.G. 2013. Mechanical extraction of natural dye extract from *Bixa orellana* seeds in spouted bed. *Industrial Crops and Products* 45, 279-282. doi:10.1016/j.indcrop.2012.12.052

Bender, C., Graziano, S. 2015. Evaluation of the antioxidant activity of foods in human cells. *Nutrafoods* 14, 79-85. doi:10.1007/s13749-015-0016-y

Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5, 9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Bouvier, F., Dogbo, O., Camara, B. 2003. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300, 2089-2091. doi:10.1126/science.1085162

Briga, M., Verhulst, S. 2015. What can long-lived mutants tell us about mechanisms causing aging and lifespan variation in natural environments? *Experimental Gerontology* 71, 21-26. doi:10.1016/j.exger.2015.09.002

Byrne, F.P., Jin, S., Paggiola, G., Petchey, T.H.M., Clark, J.H., Farmer, T.J., Hut, A.J., McElroy, C.R., Sherwood, J. 2016. Tools and techniques for solvent selection: green

solvent selection guides. Sustainable Chemical Processes 4. doi:10.1186/s40508-016-0051-z

Cabreiro, F., Ackerman, D., Doonan, R., Araiz, C., Back, P., Papp, D., Braeckman, B. P., Gems, D. 2011. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. Free Radical Biology and Medicine 51, 1575-1582. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.020

Capello, C., Fischer, U., Hungerbühler, K. 2007. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. Green Chemistry 9, 927-934. doi:10.1039/b617536h

Cardarelli, C., de Toledo, M., Mercadante, A. 2008. Characterization of different annatto extracts based on antioxidant and color properties. LWT Food Science and Technology 41, 1689-1693. doi: 10.1016/j.lwt.2007.10.013

Cárdenas-Rodríguez, N., Pedráza-Chaverri, J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. Educación Química 17, 164-173. doi.org/10.22201/fq.18708404e.2006.2.66056

Carocho, M., Ferreira, I.C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology 51, 15-25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021

Carvajal-Carvajal, C. 2015. LDL oxidada y aterosclerosis. Medicina Legal de Costa Rica 32.

Cavinato, M., Waltenberger, B., Baraldo, G., Grade, C., Stuppner, H., Jansen-Dürr, P., 2017. Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. Biogerontology 18, 499-516. doi:10.1007/s10522-017-9715-7

Casas, A. Caballero, J. 1995. Domesticación de plantas y origen de la agricultura en Mesoamérica. Ciencias 40, 36-45.

Cause, M., Buret, M., Robini, K., Verschave, P., 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. Journal of Food Science 68, 2342–2350. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb05770.x

Chege, P., McColl, G. 2014. *Caenorhabditis elegans*: a model to investigate oxidative stress and metal dyshomeostasis in Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 6, 89. doi:10.3389/fnagi.2014.00089

Chen, W., Müller, D., Richling, E., Wink, M. 2013. Anthocyanin-rich purple wheat prolongs the life span of *Caenorhabditis elegans* probably by activating the DAF-16/FOXO transcription factor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 3047-3053. doi:10.1021/jf3054643

Chen, Y., Onken, B., Chen, H., Xiao, S., Liu, X., Driscoll, M., Cao, Y., Huang, Q. 2014. Mechanisms of longevity extension of *Caenorhabditis elegans* induced by pentagalloyl glucose isolated from eucalyptus leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 3422-3431. doi:10.1021/jf500210p

Chisté, R., Benassi, M., Mercadante, A. 2011. Effect of solvent type on the extractability of bioactive compounds, antioxidant capacity and colour properties of natural annatto extracts. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 1863-1870. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02693.x

Cieślak, E., Gręda, A., Adamus, W. 2006. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry* 94, 135-142. doi:10.1016/j.foodchem.2004.11.015

Clancy, D., Birdsall, J. 2013. Flies, worms and the free radical theory of ageing. *Aging Research Reviews* 12, 404-412. doi:10.1016/j.arr.2012.03.011

Constable, D. 2013. Solvent considerations in Green Chemistry. American Chemistry Society, Green Chemistry Institute.

Corsi, A., Wightman, B., Chalfie, M. 2015. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. WormBook. The online review of *C. elegans*. doi:10.1534/genetics.115.176099

Crespo, D. 2006. Biogerantología. Textos universitarios, Ciencias Biomédicas. Universidad de Cantabria. España. Capítulo 7 Daño oxidativo y envejecimiento.

de Araújo-Vilar, D., Suenia de Araujo-Vilar, M., Moura, T.F.A., Nervo-Raffin, F., Rosa de Oliveira, M., Flamarion de Oliveira-Franco, C., Athayde-Filho, P., de Fátima Formiga Melo Diniz M., Barbosa-Filho, J. 2014. Traditional uses, Chemical Constituents, and Biological

Activities of *Bixa orellana* L. A Review. Scientific World Journal 2014, 857292, 11 pp.
doi:10.1155/2014/857292

Del Rio, D., Costa, L., Lean, M., Crozier, A. 2010. Polyphenols and health: What compounds are involved? Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 20, 1-6.
doi:10.1016/j.numecd.2009.05.015

Dequigiovani, G., Ferreyra-Ramos, S., Alves-Pereira, A., Gomes-Fabri, E., Nogueira-Carvahlo, P., Gomes da Silva, M., Nogueira-Abdo, M., Mello-Martins, A., Clement, C., Veasey, E. 2017. Genetic diversity and structure in a major Brazilian annatto (*Bixa orellana*) germplasm bank revealed by microsatellites and phytochemical compounds. Genetic Resources and Crop Evolution 64, 1775-1788. doi:10.1007/s10722-017-0535-z

de Teresa-Galván, C., Guisado-Darrilao, R., García, M.C., Ochoa, J., Ocaña-Wilhelmi, J. 2008. Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. Revista Andaluza de Medicina del Deporte 1, 61-72.

Devlin, T. 2004. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínica. Editorial Reverté S.A. Cuarta edición. España.

Díaz-Huang, M., González-Fraguela, E., Blanco-Lezcano, L. 2015. El sistema antioxidante del glutatión en la etiopatología de la difusión nigro-estriatal. Revista Cubana Investigaciones Biomédicas 34.

Doonan, R., McElwee, J.J., Matthijssens, F., Walker, G.A., Houthoofd, K., Back, P., Matscheski, A., Vanfleteren, J.R., Gems, D. 2008. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases stress but have little or no effect on life span *Caenorhabditis elegans*. Genes and Development 22, 3236-3241. doi:10.1101/gad.504808

Epel, E.S., Lithgow, G.J. 2014. Stress biology and aging mechanisms: toward understanding the deep connection between adaptation to stress and longevity. Journal of Gerontology A: Biological Science and Medical Science 69, S10-S16.
doi:10.1093/gerona/glu055

EURC (European Union Regulatory Commission), Nº 231/2012; Food Additives.

European Food Safety Association (EFSA). 2016. The safety of annatto extract (E 160b) as a food additive. EFSA Journal 14, 4544. doi:10.2903/j.efsa.2016.4544

Falowo, A.B., Fayemi, P.O., Muchenje, V. 2014. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International* 64, 171-181. doi:10.1016/j.foodres.2014.06.022

FAOSTAT 2013 <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>

Figuroa-Cares, I.E., Curz-Álvarez, O., Martínez-Damián, M.T., Rodríguez-Pérez, J.E., Colinas-León, M.T. Valle-Guadarrama, S. 2018. Calidad nutricional y capacidad antioxidante en variedades y genotipos nativos de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* 35, 63-84.

Finkel, T., Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408, 239-247. doi:10.1038/35041687

Fonnegra, G., Jimenez, R. 2007. *Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia*. Universidad de Antioquia, segunda edición. Medellín, Colombia.

Fontana, L.; Partridge, L.; Longo, V. 2010. Extending healthy life span-From yeast to humans. *Science* 328, 321-326.

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J., Davies, J., Dolan, L. 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* 422, 442-446. doi:10.1038/nature01485

Foyer, C.H., Noctor, G. 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155, 2–18. doi:10.1104/pp.110.167569

Fraga, C., Galleano, M., Verstraeten, S., Otezia, P. 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine* 31, 435-445. doi:10.1016/j.mam.2010.09.006

Fraser, P., Pinto, E., Holloway, D., Bramley, P. 2000. Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *The Plant Journal* 24, 551-558. doi:10.1111/j.1365-313X.2000.00896.x

Frega, N., Mozzon, M., Bocci, F. 1998. Identification and estimation of tocotrienols in annatto lipid fraction by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of American Oil Chemistry Society* 72, 1723-1727. doi:10.1007/s11746-998-0323-1

- Gershon, D. Studies on aging in nematodes. The nematode as a model organism for aging research. *Experimental Gerontology* 5, 7-12. doi:10.1016/0531-5565(70)90023-9
- Ginter, E. Simko, V. Panakova, V. 2014. Antioxidants in health and disease. *Bratislavske Lekarske Listy* 115, 603-606. doi:10.4149/bl_2014_116
- Giorgi, A., De Marinis, P., Granelli, G., Chiesa, L.M., Panseri, S. 2013. Secondary metabolite profile, antioxidant capacity, and mosquito repelente activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon region. *Journal of Chemistry* 2013, 409826, 10 páginas. doi:10.1155/2013/409826
- Giovannucci, E., Rimm, E.B., Lui, Y., Stampfer, M.J., Willet, W.C. 2002. A prospective study of tomato product lycopene, and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 94: 391-398. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0563
- Giridhar, P., Venugopalan, A., Parimalan, R. 2014. A review on Annatto Dye Extraction, Analysis and Processing- A Food Technology Perspective. *Journal of Scientific Research and Reports* 3, 327-348. doi:10.9734/JSRR/2014/5870
- Gómez, M.D., Vera-Sirera, F., Pérez-Amador, M.A. 2014. Molecular programme of senescence in dry and fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany* 65, 4515-4526. doi:10.1093/jxb/eru093
- González, M., Betancourt, M., Ortiz, R. 2000. Daño oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica* 25, 3-9.
- Gruber, J., Tang, S.Y., Halliwell, B. 2007. Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. *Annales of the New York Academy of Science* 1100, 530-542. doi:10.1196/annals.1395.059
- Guil-Guerrero, J.L. Reboloso-Fuentes, M.M 2009. Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 123-129. doi:10.1016/j.jfca.2008.10.012
- Gutteridge, J.M.C. Halliwell, B. 2010. Antioxidants: Molecules, medicines and myths. *Biochemical Biophysical Research and Communications* 393, 561-564. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.071

Gutiérrez-Pulido, H., de la Vara-Salazar, R. 2008. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill, segunda edición. México.

Halliwell, B. 2011. Free radicals and antioxidants-*quo vadis?* Trends in Pharmacological Sciences 32, 125-130. doi:10.1016/j.tips.2010.12.002

Helmja, K., Vaher, M., Püssa, T., Raudsepp, P., Kaljurad, M. 2008. Evaluation of antioxidative capability of the tomato (*Solanum lycopersicum*) skin constituents by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. Electrophoresis 29, 3980-3998. doi:10.1002/elps.200800012

Hekimi, S., Lapointe, J., Wen, Y. 2011. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. Trends in Cell Biology 21, 569-576. doi:10.1016/j.tcb.2011.06.008

Hobson G., Grierson D. 1993. Tomato. In Seymour. Biochemistry of fruit ripening. Chapman and Hall Publishing. London. 405-442

Ilahy, R., Hdider, C., Lenucci, M. S., Tlili, I., Dalessandro, G. 2011. Phytochemical composition and antioxidant activity of high-lycopene tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivars grown in Southern Italy. Scientia Horticulturae 127, 255-261. doi:10.1016/j.scienta.2010.10.001

Ito, Y., Ishizuki, K., Sekiguchi, W., Tada, A., Akiyama, T., Sato, K., Yamazaki, T., Akiyama, H. 2012. Analysis of Residual Solvents in Annatto Extracts using Static Headspace Gas Chromatography Method. American Journal of Analytical Chemistry 3:638-645. doi:10.4236/ajac.2012.39083

Jing, L., Zhang, Y., Yan, L., Guo, Y., Niu, L. 2012. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Bulb Extracts of Six *Lilium* Species Native to China. Molecules 17, 9361-9378. doi:10.3390/molecules17089361

Johnson, T.E., Cypser, J., de Castro, E., de Castro, S., Henderson, S., Murakami, S., Rikke, B., Tedesco, P., Link, C. 2000. Gerontogenes mediate health and longevity in nematodes through increasing resistance to environmental toxins and stressors. Experimental Gerontology 35, 687-694. doi:10.1016/s0531-5565(00)00138-8

Jones, D.P. 2015. Redox theory of aging. Redox Biology 5, 71-79. doi:10.1016/j.redox.2015.03.004

Joseph, S., Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B. 2014. Berries: Anti-inflammatory Effects in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 3886-3903. doi:10.1021/jf4044056

Kampkötter, A., Gombitang, C., Zurawski, R., Timpel, C., Chovolou, Y., Wätjen, W., Kahl, R. 2007. Investigations of protective effects of flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology* 234, 113-123. doi:10.1016/j.tox.2007.02.006

Kim, C.K., Park, J.K., Lee, J.S., Park, S.K. 2014. Increased resistance to stress and an anti-aging effect due to *Acanthopanax sessiliflours* roots in *Caenorhabditis elegans*. *Food Science and Biotechnology* 23, 1653-1659. doi:10.1007/s10068-014-0225-y

Kim, J., Kang, Y.G., Lee, J., Cho, D., Cho, Y., Shin, J.M., Park, J.S., Lee, J.H., Kim, W.G., Sea, D.B., Lee, T.R., Miyamoto, Y., No, K.T. 2015. The natural phytochemical dehydroabietic acid is an anti-aging reagent that mediates the direct activation of SIRT1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 412, 216-225. doi:10.1016/j.mce.2015.05.006

Kirkwood, T.B.L. 2005. Understanding the odd Science of aging. *Cell* 120, 437-447. doi:10.1016/j.cell.2005.01.027

Klee, H.J., Tieman, D. 2013. Genetic challenges of flavor improvement in tomato. *Trends in Genetics* 29, 257-262. doi:10.1016/j.tig.2012.12.003

Konigsberg, M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Manual Moderno. 1ª edición, México. Capítulos: 1, Química de los radicales libres; 2, El dióxígeno y sus especies reactivas; 3, Cadena respiratoria mitocondrial; 11, Superóxido dismutasa; 20, Polifenoles.

Konwarh, R., Pramanik, S., Kalita, D., Mahanta, C., Karak, N. 2012. Ultrasonication, a "green chemistry" tool to biocatalysis: A laboratory-scale study of lycopene extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 19, 292-299. doi:10.1016/j.ultsonch.2011.07.010

Kotíková, Z., Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K. 2011. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interaction between antioxidants. *LWT Food Science and Technology* 44, 1703-1710. doi:10.1016/j.lwt.2011.03.015

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. 2011. A review of antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing* 89, 217-233. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008

Kuokoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mncini-Filho, A., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* 25, 726-732. doi:10.1590/S0101-20612005000400016

Lázaro, J.J., Jiménez, A., Camejo, D., Iglesias-Baena, I., Marti, M.C., Payo, L.A., Medina-Barranco, S., Sevilla, F. 2013. Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science* 4, 1-20. doi:10.3389/fpls.2013.00460

Li, A., Li, A., Zhang, Y., Xu, X., Chen, Y., Li, H. 2014. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* 6, 6020-6047. doi:10.3390/nu6126020

Liochev, S.I. 2013. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical and Biology Medicine* 60, 1-4. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011

Lobato-Ortiz, R., Rodríguez-Guzmán, E., Carrillo-Rodríguez, J.C., Chávez-Servia, J.L., Sánchez-Peña, P., Aguilar-Meléndez, A. 2012. Exploración, colecta y conservación de recursos genéticos de jitomate: avances en la Red de Jitomate. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINAREFI), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 54 p.

Long, J. 2001. Una semblanza de las Solanaceae. *Etnobiología* 1, 18-24.

López-Alarcón, C., Denicola, A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* 763, 1-10. doi:10.1016/j.aca.2012.11.051

López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J.M.P, Madeo, F. Kroemer, G. 2016. Metabolic control of longevity. *Cell* 166, 802-821. doi:10.1016/j.cell.2016.07.031

Louro, R.P., Santiago, L.J.M. 2016. Development of carotenoids storage cell in *Bixa orellana* L. seed arils. *Protoplasma* 253, 77-86. doi:10.1007/s00709-015-0789-2

Lucanic, M., Lithgow, G., Alavez, S. 2013. Pharmacological Lifespan Extension of Invertebrates. *Ageing Research Reviews* 12, 445-458. doi:10.1016/j.arr.2012.06.006

Martorell, P., Vincent, J., de Llanos, R., Montón, F., Llopis, S., González, N., Genovés, S., Cienfuegos, E., Monzó, H., Ramón, D. 2011. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 2077-2085. doi: 10.1021/jf104217g

McColl, G., Rogers, A., Alavez, S., Hubbard, A., Melov, S., Link, C., Bush, A., Kapahi, P., Lithgow, G. 2010. Insulin-like Signaling Determines Survival during Stress via Post Transcriptional Mechanisms in *C. elegans*. *Cell Metabolism* 12, 260-272. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.004.

Meléndez-Martínez, A.J., Fraser, P.D., Bramley P.M. 2010. Accumulation of health promoting phytochemicals in wild relatives of tomato and their contribution to in vitro antioxidant activity. *Phytochemistry* 71, 1104–1114. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.021

Mène-Sa_rané, L., Jones, D., DellaPenna, D. (2010). Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 17815-17820. doi: 10.1073/pnas.1006971107

Micăle, F., Albu, F., Iorgulescu, E., Medvedovici, A., Tache, F. 2015. Ethyl Lactate as a Green Alternative to Acetonitrile in RPLC: A Realistic Appraisal. *Journal of Chromatographic Science* 53, 1701-1707. doi: 10.1093/chromsci/bmv077

Monroy, A., Lithgow, G., Alavez, S. 2013. Curcumin and neurodegenerative diseases. *Biofactors* 39, 122-132. doi: 10.1002/biof.1063

Moreno-Arriola, E. Cárdenas, N. Coballase, E. Pedraza, J. Carmona, L. Ortega, D. 2014. *Caenorhabditis elegans*: A useful model for study metabolic disorders in wich oxidative stress is a contributing factor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, ID 705253, 9 páginas. doi: 10.1155/2014/705253

Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. 2011. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC),

DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry* 129, 139-148. doi:10.1016/j.foodchem.2011.04.045

Oroian, M., Escriche, I. 2015. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* 74, 10-36. doi:10.1016/j.foodres.2015.04.018

Özyürek, M., Güçlü, K., Tütmen, E., Sözgen, K., Erçağ, E., Çelik, E., Baki, S., Karaman, Ş., Apak, R. 2011. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods* 3, 2439-2453. doi:10.1039/C1AY05320E

Pan, X., Niu, G., Liu, H. 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing* 42, 129-133. doi:10.1016/S0255-2701(02)00037-5

Partridge, L. 2014. Intervening in ageing to prevent the diseases of ageing. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 25, 555-557. doi: 10.1016/j.tem.2014.08.003.

Peng, C. wang, X. Chen, J. Jio, R. Wang, L. Man Li, Y. Zuo, Y. Lui, Y. Ying, K. Huang, Y. Chen, Z. 2014. Biology of Ageing and Role of Dietary Antioxidants. *BioMed Research International* 2014, 831-841. doi:10.1155/2014/831841

Pérez-Guerra, Y. 2007. Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 39, 3-11.

Piombino, P., Sinesio, F., Moneta, E., Cammareri, M., Genovese, A., Lisanti, M.T., Mogno, M.R., Peparaio, M., Termolino, P., Moio, L. Grandillo, S. 2013. Investigating physicochemical volatile and sensory parameters playing a positive or negative role on tomato liking. *Food Research International* 50, 409-419. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.033

Pietsch, K., Saul, N., Chakrabarti, S., Stürzenbaum, S.R., Menzel, R., Steinberg, C.E.W. 2011. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology* 12, 329-347. doi:10.1007/s10522-011-9334-7

Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. 2012. Nutritional composition and antioxidant activity for four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer varieties in

Northeastern Portugal homegardens. 2012. Food and Chemical Toxicology, 50, 829-834. doi:10.1016/j.fct.2011.11.045

Pisoschi, A., Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry 97, 55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.

Pokorny, J. Yanishlieva, N. Gordon, M. 2001. Antioxidants in Food-Practical Applications. CRC press/Woodhead Publishing Limited. Inglaterra. Capítulo Introducing natural antioxidants.

Preedy, V. 2014. Aging: Oxidative stress and dietary antioxidants. Academic Press. Primera Impresión. Estados Unidos de Norteamérica. Sección 1: Oxidative stress and aging. Capítulo 1.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. 2012. Enzyme assisted extraction of bioactives from plants. Trends in Biotechnology 30, 37-44. doi:10.1016/j.tibtech.2011.06.014

Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L.J., Carrari, F., Insania, M., Asis, R., Mendoza-Espinoza, J.A., Díaz de León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, F. 2016. Chemical characterization and quantification of the pigment extraction yield of seven Mexican accessions of *Bixa orellana*. Revista Mexicana de Ingeniería Química 3, 727-740.

Rahmalia, W., Fabre, J.F., Mouloungui, Z. 2015. Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. Procedia Chemistry 14, 455-464. doi:10.1016/j.proche.2015.03.061

Rahmalia, W., Fabre, J.F., Usman, T., Mouloungui, Z. 2014. Aprotic solvents effect on the UV-visible absorption spectra of bixin. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 131, 455–460. doi:10.1016/j.saa.2014.03.119

Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajn, T., Palaniswami, R., Gnanadhas E.N., Lakshminarasiah, U., Gopsa, J., Nishigaki, I. 2014. Antioxidants and human diseases. Clinica Chimica Acta 436, 332-347. doi:10.1016/j.cca.2014.06.004

Ramamoorthy, S., Doss, F.P., Kundu, K., Satyanarayana, V.S.V., Kumar, V. 2010. Molecular characterization of bixin-An important industrial product. Industrial Crops and Products 32, 48-53. doi:10.1016/j.indcrop.2010.03.001

Rambla, J.L., Tikunov, Y.M., Monforte, A.J. Bovy, A.G., Granell, A. 2014. The expanded tomato fruit volatile landscape. *Journal of Experimental Botany* 65, 4613-4623. doi:10.1093/jxb/eru128

Rathor, L., Pant, A., Awasthi, H., Mani, D., Pandey, R. 2017. An antidiabetic polyherbal phytomedicine confers stress resistance and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *BioGerontology* 18, 131-147. doi:10.1007/s10522-016-9668-2

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26, 1231-1237. doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3

Ristow, M., Schmeisser, S. 2011. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 51, 327-336. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.010

Rodrigues, L., Alcazár-Alay, S., Petenate, A., Meireles, M. 2014. Bixin extraction from defatted annatto seeds. *Competes Rendus Chimie* 17, 268-283. doi:10.1016/j.crci.2013.10.010

Rodríguez, M. y Sastre, A. 1999. Tratado de Nutrición. Ediciones Díaz de Santos. España. Capítulo 20 Fisiología de la nutrición. Estrés oxidativo y nutrientes antioxidantes.

Ruiz-Montañez, G., Ragazzo, J., Calderón, M., Velázquez, G., Ramírez, J., Navarro, A. 2014. Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry* 159, 267-272. doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.009

SAGARPA, 2014
<http://sagarpa.gob.mx/delegaciones/Jalisco/boletines/Paginas/B0322012.aspx>

Sandoval-Acuña, C., Ferreira, J., Speisky, H. 2014. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent action. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 559, 75-90. doi: 10.1016/j.abb.2014.05.017

Sadowska-Bartosz, I., Bartosz, G. 2014. Effect of antioxidants supplementation on aging and longevity. *BioMed Research International* 2014, 404680.

Sánchez-Ávila, N., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. 2007. Ultrasound-assisted extraction and silylation prior to gas chromatography-mass spectrometry for the

characterization of the triterpenic fraction in olive leaves. *Journal of Chromatography A* 1165, 158-165. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.039

Sanz, C., Olias, J.M., Perez, A.G., 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables. In: Barberan Tomas, F.A., Robins, R.J. (Eds.), *Phytochemistry of Fruits and Vegetables. Proceedings of Phytochemical Society of Europe*, vol. 41. Clarendon Press, Oxford, pp. 125–155.

Saul, N. Pietsch, K. Menzel, R. Steinberg, C.E. 2008. Mechanisms of Ageing and Development 129, 611-613. doi:10.1016/j.mad.2008.07.001

Scotter, M. 2009. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Additives and Contaminants* 26, 1123-1145. doi:10.1080/02652030902942873

Sen, C., Khanna, S., Roy, S. 2006. Tocotrienols: Vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences* 78, 2088-2098. doi:10.1016/j.lfs.2005.12.001

Sesso, H.D., Liu, S., Gaziano, J.M, Buring, J.E. 2003. Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women. *The Journal of Nutrition* 133, 2336-2341. doi:10.1093/jn/133.7.2336

Shahidi, F., Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods* 18, 757-781. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047

Shaidu-ul-Islam, S., Rather, L., Mohammad, F. 2015. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications- A review. *Journal of Advanced Research* 7: 499-514. doi:10.1016/j.jare.2015.11.002

Si, H., Liu, D., 2014. Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 581-591. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.02.001

Silva, S.N.S., Amaral, C.L.F., Reboucas, T.N.H. 2010. Adoption of conservation practices on farm and selection of varieties by producers of annatto in the city of Vitoria da Conquista-BA. *Revista Brasileira de Agroecologica* 5, 106–113.

Sivakumar, V., Vijaeeswarri, J., Lakshim-Anna, J. 2011. Effective natural dye extraction from different plant materials using ultrasound. *Industrial Crops and Products* 33, 116-122. doi:10.1016/j.indcrop.2010.09.007

- Smith, J. 2006. Annatto Extracts. Chemical and Technical Assessment. JECFA. 1-21.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2000. Protein oxidation, Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology. New York Academy of Sciences, New York, pp.
- Strati, I.F., Oreopoulou, V. 2014. Recovery of catorenoids from tomato processing by-products-a review. Food Research International 65, 311-321. doi:10.1016/j.foodres.2014.09.032
- Surco-Laos, F.; Dueñas, M.; González-Manzano, S.; Cabello, J.; Santos-Buelga, C.; González-Paramás, A. 2012. Influence of chatechins and thir methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and termal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. Food Research International 46, 514-521.
- Swanson, S. Hilroy, S. 2010. ROS in plant development. Physiologia Plantarum 138, 384-392. doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01313.x
- Taham, T., Cabral, F.A., Barrozo, M.A.S. 2015. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. The Journal of Supercritical Fluids 100, 175-183. doi:10.1016/j.supflu.2015.02.006
- Tiwari, B.K. 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. Trends in Analytical Chemistry 71, 100-109. doi:10.1016/j.trac.2015.04.013
- Toor, R. K., Savage, G. P. 2005. Antioxidant activity in different fractions of tomatoes. Food Research International 38, 487-494. doi:10.1016/j.foodres.2004.10.016
- Traber, M.G., Stevens, J.F. 2011. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. Free Radical Biology & Medicine 51, 1000-1013. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017
- Vayndorf, E., Lee, S., Liu, R. H. 2013. Whole apple extracts increase lifespan, healthspan and resistance to stress in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Functional Foods 5, 1235-1243. doi:10.1016/j.jff.2013.04.006
- Vilar, D.A., Vilar, M.S., de Lima e Moura, T.F., Raffin, F.N, de Oliveira, M.R., Franco, C. F., de Athayde-Filho P.F., Diniz, M. de F., Barbosa Filho J.M., 2014. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. Scientific World Journal 2014, 857292. doi:10.1155/2014/857292

- Villa-Hernández, J.M., Mendoza-Cardoso, G., Mendoza-Espinoza, J.A., Vela-Hinojosa, C., Díaz de León-Sánchez, F., Rivera-Cabrera, F., Alia-Tejacal, I.; Pérez-Flores, L.J. 2017. Antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo* of various ecotypes of Mexican plum (*Spondias purpurea* L.). *Journal of Food Science* 82, 2576-2582. doi:10.1111/1750-3841.13862
- Villar, R., Calleja, J.M., Morales, C., Caceres, A. 1997. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. *Phytotherapy Research* 11, 441–445. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(199709)11
- Watson, R.R., Preedy, V.R. 2009. *Bioactive foods in promoting health: Fruits and vegetables*, Academic Press. Primera edición. EUA.
- Wu, H., Zhao, Y., Guo, Y., Xu, L., Zhao, B. 2012. Significant longevity-extending effects of a tetrapeptide from maize on *Caenorhabditis elegans* under stress. *Food Chemistry* 130, 254-260. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.027
- Yazaki, K., Yoshikoshi, C., Oshiro, S., Yanase, S. 2011. Supplemental cellular protection by a carotenoid extends lifespan via Ins/IGF-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2011, 596240. doi:10.1155/2011/596240
- Yilmaz E. 2001. The chemistry of fresh tomato flavor. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 25, 149-155.
- Yolmeh, M. Habibi, M. Farhoosh, R. 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response Surface methodology (RSM). *Food Chemistry* 155, 319-324. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.059
- Zanfini, A., Corbini, G., La Rosa, C., Dreassi, E. 2010. Antioxidant activity of lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures. *LWT Food Science and Technology* 43, 67-72. doi:10.1016/j.lwt.2009.06.011
- Zanor, M.I., Rambla, J.L., Chaib, J., Steppa, A., Medina, A., Granell, A., Fernie, A.R., Causse, M. 2009. Metabolic characterization of loci affecting sensory attributes in tomato allows an assessment of the influence of the levels of primary metabolites and volatile organic contents. *Journal of Experimental Botany* 60, 2139-2154. doi:10.1093/jxb/erp086

Zhang, H., Yang, X., Zhao, L., Wang, Y. 2009. Ultrasonic-assisted extraction of epimedin C fresh leaves of *Epimedium* and extraction mechanism. *Innovative Food Science and Emerging Technology* 10, 54-60. doi:10.1016/j.ifset.2008.09.007

Zhuang, Z., Lv, T., Li, M., Zhang, Y., Xue, T., Yang, L., Liu, H., Zhang, W. 2014. The Lifespan-Extending Effects of *Nymphaea hybrid* Root Extract in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Plant Foods for Human Nutrition* 69, 304-309.

Zumberland, D.C., Amaral, G.P., Arantes, L.P., Machado, M.L., Mizdal, C.R., Campos, M.M.A., Soares, F.A.A. 2019. *Rosmarinus officinalis* L. increases *Caenorhabditis elegans* stress resistance and longevity in a DAF-16, HSF-1 and SKN-1-dependent manner. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 49. e5235. doi:10.1590/1414-431X20165235

Zuorro, A., Fidaleo, M., Lavecchia, R. 2011. *Enzyme and Microbial Technology* 49, 567-573. doi: 10.1016/j.enzmictec.2011.04.020

<https://www.hielscher.com/es/probe-type-sonication-vs-ultrasonic-bath-an-efficiency-comparison.htm#97175> consultado en marzo del 2017.

**Effect of sonication on the content of bixin, norbixin, total phenols and antioxidant activity of extracts of five achiote accessions****Efecto de la sonicación en el contenido de bixina, norbixina, fenoles totales y actividad antioxidante de extractos de cinco accesiones de achiote**D.R. Gómez-Linton¹, A. Navarro-Ocaña², S. Alavez³, L. Pinzón-López⁴, G. M. Trejo-Aguilar¹ and L.J. Pérez-Flores^{1*}¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Leyes de Reforma 1ra Secc, 09340, CDMX.²Universidad Nacional Autónoma de México. Investigación Científica 74, C.U., 04510 CDMX.³Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma. Av. Miguel Hidalgo 46, Col. La Estación, 52006 Lerma de Villada, Méx.⁴Instituto Tecnológico de Conkal. Calle 10 S/N, 97345 Mérida, Yuc.

Received: October 9, 2019; Accepted: December 14, 2019

Abstract

Pigments obtained from achiote seeds are highly demanded worldwide, being the bixin the second most important natural pigment. Due to this, the study of methods and conditions that allow to improve traditional processes for their extraction from achiote seeds is of particular interest. In some works, the functional activity of the obtained extracts is also evaluated. In this work we study the effect of a sonication treatment on the extraction of functional compounds of achiote seeds, as well as the antioxidant activity of such extracts, in comparison to a traditional agitation extraction. Sonication has shown some advantages such as being simple to apply, reducing extraction times and increasing extraction yields. The comparisons were made in hydrophilic and hydrophobic extracts obtained from 5 accessions of achiote from Yucatan Peninsula, Mexico. When applying sonication, time of extraction was reduced (33%), the content of polyphenols in the hydrophilic phases was increased (18-25%) as well as the norbixin content in the alkaline extracts (70-85%). A similar behavior was observed in the antioxidant activity of the hydrophilic (18-22%) and hydrophobic (10-20%) phases; however, the sonication had no effect on the content of bixin, the latter being the main product of commercial interest. These results suggest that some of the studied accessions had the potential to be used commercially and that sonication extraction can be a valuable alternative for obtaining extracts with higher contents of functional compounds or enhanced norbixin contents from achiote seeds.

Keywords: *Bixa orellana*; sonication; bixin; norbixin; antioxidant activity.

Resumen

Los pigmentos obtenidos de las semillas de achiote tienen una gran demanda mundial, siendo la bixina el segundo pigmento natural de mayor importancia. Debido a esto es de interés el estudio de métodos y condiciones que permitan mejorar los procesos tradicionales para su extracción a partir de semillas de achiote. En ocasiones, la actividad funcional de los extractos obtenidos también es evaluada. En este trabajo se estudia el efecto de un tratamiento de sonicación en la extracción de compuestos funcionales de semillas de achiote, así como la actividad antioxidante de dichos extractos, en comparación con un tratamiento de extracción tradicional por agitación. La sonicación ha mostrado tener ventajas como ser sencilla de aplicar, disminuir los tiempos de extracción e incrementar los rendimientos de extracción. Las comparaciones se realizan en extractos hidrofílicos e hidrofóbicos obtenidos de 5 accesiones de achiote provenientes de la península de Yucatán, México. Al aplicar el tratamiento de sonicación, el tiempo de extracción se redujo (33%), se incrementó el contenido de polifenoles (18-25%) y de norbixina (70-85%) en los extractos, así como la actividad antioxidante de los extractos hidrofílicos (18-22%) y de los extractos hidrofóbicos (10-20%); sin embargo, la sonicación no tuvo efecto en el contenido de bixina, el principal producto de interés comercial. Estos resultados apuntan a que algunas de las accesiones aquí estudiadas tienen el potencial de ser aprovechables comercialmente y que la extracción mediante sonicación puede ser una alternativa valiosa para la obtención de extractos con mayor contenido de compuestos funcionales o extractos con altos contenidos de norbixina a partir de semillas de achiote.

Palabras clave: *Bixa orellana*; sonicación; bixina; norbixina; actividad antioxidante.

* Corresponding author. E-mail: ljpf@xanum.uam.mx

<https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim916>

issn-e: 2395-8472



Some naturally occurring compounds that increase longevity and stress resistance in model organisms of aging

Darío R. Gómez-Linton · Silvestre Alavez · Adriana Alarcón-Aguilar · Norma E. López-Diazguerrero · Mina Konigsberg · Laura J. Pérez-Flores

Received: 2 April 2019 / Accepted: 3 June 2019 / Published online: 11 June 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Abstract Humans and other organisms show age-related signs of deterioration, which makes aging an interesting process to study. In the present work, we review the anti-aging evidence of several of the most promising natural compounds. Quercetin, rapamycin, resveratrol, spermidine, curcumin or sulforaphane administration increase longevity and stress resistance in model organisms such as yeasts, nematodes, flies and mice. Even more, rapamycin, resveratrol, and curcumin are currently in preclinical tests on the Interventions Testing Program of the National Institute on Aging due to their encouraging results in model organisms. The potential mechanisms underlying the beneficial effects of these compounds are briefly described.

Keywords Natural compounds · Longevity · Stress resistance · Aging models · Signaling pathways

Introduction

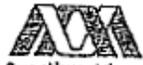
Aging can be described as a time-dependent damage accumulation, functional capacity decline and difficulty to environmental adaptation, associated with an increase of morbidity and mortality (Argyropoulou et al. 2013; Mitnitski et al. 2017). Due to the changes in the population pyramid, developed and several developing countries all around the world are now facing important challenges to deal with the increased aging population (Partridge 2014; Martin 2017).

The study of the biology of aging is of particular interest because is a major risk factor for degenerative diseases (e.g., cancer, diabetes, sarcopenia, cardiovascular and neurodegenerative diseases) and in the development of morbidity (Melov 2016; Sen et al. 2016). Nowadays, interdisciplinary efforts to understand the biology and the molecular mechanisms underlying aging as a determinant to reduce the incidence of age-related diseases and increase health-span are known as “Geroscience” (Melov 2016; Yabluchanskiy et al. 2018). Possibly, strategies that succeed in significantly delaying aging in humans would indirectly decrease the incidence of all age-related diseases (Alavez and Lithgow 2012; Vaiserman and Lushchak 2017; Yabluchanskiy et al. 2018).

D. R. Gómez-Linton
Ph.D. Biotechnology Program, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, CP 09340 Mexico City, Mexico

S. Alavez
Department of Health Science, Universidad Autónoma Metropolitana, Lerma, CP 52005 Mexico State, Mexico

A. Alarcón-Aguilar · N. E. López-Diazguerrero · M. Konigsberg · L. J. Pérez-Flores (✉)
Department of Health Science, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, CP 09340 Mexico City, Mexico
e-mail: ljpf@xanum.uam.mx



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00224

Matrícula: 2163805873

Extracción de antioxidantes de genotipos nativos de achote (Bixa Orellana L.) y jitomate (Solanum lycopersicum L.) mediante métodos no convencionales y determinación de su actividad funcional *in vitro* e *in vivo*.



DARIO RAFAEL GOMEZ LINTON
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERPIANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 26 del mes de marzo del año 2020 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DR. JOSE RAMON VERDE CALVO
DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: DARIO RAFAEL GOMEZ LINTON

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobado

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SILVIA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. SILVESTRE DE JESUS ALAVEZ ESPIDIO

VOCAL

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DR. JOSÉ RAMÓN VERDE CALVO

SECRETARIO

DR. ARTURO NAVARRO OCAÑA

El presente documento cuenta con la firma –autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta – Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella