



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**Estado oxidativo y producción de volátiles del jitomate en
función de los estados de maduración.**

TÉSIS

Que para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental

PRESENTA

I.B.Q. Omar Roberto López Vidal

COMITÉ TUTORAL

Director. Dr. Fernando Díaz de León Sánchez

Asesora. Dra. Laura Josefina Pérez Flores

Asesor. Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

México D.F. a 21 de julio del 2011

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular en Plantas del departamento de Ciencias de la Salud; División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Fernando Díaz de León Sánchez y la asesoría de la Dra. Laura J. Pérez Flores y el Dr. Héctor B. Escalona Buendía.

COMITÉ TUTORAL

Director

Dr. Fernando Díaz de León Sánchez
Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I
Fdls5@yahoo.com.mx

Asesor

Dra. Laura J. Pérez Flores
Departamento de Ciencias de la Salud. UAM-I
ljpf@xanum.uam.mx

Asesor

Dr. Héctor B. Escalona Buendía
Departamento de Biotecnología. UAM-I
hbeb@xanum.uam.mx

Los miembros del jurado de exámen, designados por el posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis “**Estado oxidativo y producción de volátiles del jitomate en función de los estados de maduración**”. Por Omar Roberto López Vidal quien realizó la disertación pública el 21 de Julio del 2011, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Presidente

Dra. Laura J. Pérez Flores

Secretario

Dra. Clara Pelayo Zaldívar

Vocal

Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Vocal

Dr. Francisco Cruz Sosa

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por haberme otorgado una beca, la que me permitió realizar esta investigación, para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental. Becario 224665.

A la Universidad Autónoma Metropolitana por permitirme realizar mis estudios de maestría correspondientes en Biología Experimental.

Al Dr. Fernando Díaz de León Sánchez por brindarme todo el apoyo y la confianza para que pudiera desarrollar esta maestría.

A la Dra. Laura J. Pérez Flores por permitirme incorporarme a esta línea de investigación en la universidad y así ingresar al equipo de trabajo del laboratorio S-253 donde desarrollé este trabajo.

A la Dra. Mónica Ponce Valadez por sus enseñanzas y críticas que contribuyeron a mi formación como profesional y persona.

A los profesores Fernando Rivera, Juan Manuel y Xochitl que siempre me apoyaron en diversas situaciones como colegas y compañeros.

A todos los compañeros integrantes del equipo del laboratorio de Fisiología Bioquímica y Biología Molecular en Plantas del departamento de Ciencias de la

Salud por su apoyo moral. Denis, Irasema, Mauricio, Max y todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

A los doctores Héctor Escalona Buendía, Francisco Cruz Sosa, Clara Pelayo Zaldívar y Mónica Ponce Valadez por sus valiosas aportaciones, disponibilidad y paciencia para revisar y corregir este trabajo.

DEDICATORIAS

Dedico profundamente y con amor este trabajo a mi familia, Papá, Mamá y hermanos (Lilia y Nahim) por ser una ayuda incondicional para mí en todos los aspectos que una persona puede recibir y además por apoyarme y estar conmigo en todos mis planes y objetivos.

Dedico también con mucho afecto este trabajo a mis amigos Elena, Mony, Aura, Héctor Lara, Piojo, Maxim, Waldo, Pako, Coco, Frida, Dany, Pig, Jose Luis, Clau y algunos otros que me apoyaron moralmente y con buenos deseos y palabras en muchos aspectos independientes de lo académico y de algún modo contribuyeron a la causa.

ÍNDICE

1 ABREVIATURAS	1
2 RESÚMEN	3
3 ANTECEDENTES	4
3.1 Importancia del las frutos y hortalizas.....	4
3.2 Importancia del jitomate.....	5
3.3 Generalidades del jitomate.....	6
3.4 Descripción bioquímica de las especies reactivas de oxígeno ERO.....	8
3.4.1 Anión superóxido	8
3.4.2 Peróxido de hidrógeno	9
3.4.3 Radical hidroxilo	10
3.4.4 Oxígeno síngulete	11
3.5 Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas.....	11
3.6 Sistemas antioxidantes.....	12
3.7 Sistemas antioxidantes enzimáticos.....	13
3.7.1 Ascorbato peróxidasa	14
3.7.2 Glutación reductasa	15
3.8 Sistemas Antioxidantes No-Enzimáticos.....	16
3.8.1 Glutación.....	17
3.8.2 Ácido Ascórbico.....	18
3.8.3 Ácido Cítrico.....	20
3.9 Efecto de las ERO en las Biomoléculas.....	20
3.9.1 Daño a lípidos.....	21
3.9.2 Daño a proteínas.....	21
3.10 Capacidad antioxidante.....	23
3.11 Maduración de frutos.....	24
3.12 Estado oxidativo y maduración.....	26
3.13 Aroma y sabor.....	28
3.13 .1 Apocarotenoides.....	29

4 JUSTIFICACIÓN	30
5 OBJETIVOS	
5.1 General.....	33
5.2 Particulares	33
6 HIPÓTESIS	34
7 METODOLOGÍA	
7.1 Material biológico y tratamientos.....	35
7.2 Diseño experimental.....	35
7.3 Separación y cuantificación de los compuestos volátiles del aroma de jitomate mediante cromatografía de gases (GC).....	36
7.4 Determinación de la Capacidad antioxidante.....	37
7.5 Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes.....	38
7.5.1 Determinación de la actividad de la enzima glutatión reductasa.....	39
7.5.2 Determinación de la actividad de la enzima ascorbato peroxidasa....	40
7.6 Determinación de los niveles de compuestos antioxidantes presentes	
7.6.1 Glutatión.....	40
7.6.2 Ácido ascórbico.....	41
7.6.3 Ácido cítrico.	42
7.7 Determinación de los niveles de lipoperoxidación y proteínas oxidadas	
7.7.1 Daño a lípidos.....	43
7.7.2 Daño a proteínas.....	43
8 RESULTADOS	
8.1 Niveles de compuestos volátiles derivados de carotenos.....	45
8.2 Capacidad antioxidante total.....	47
8.3 Actividad de la enzima glutatión reductasa.....	48
8.4 Actividad de la enzima ascorbato peroxidasa.....	49
8.5 Cociente glutatión reducido/oxidado.....	50

8.6 Niveles de ácido ascórbico.....	51
8.7 Niveles de ácido cítrico.....	52
8.8 Niveles de lipoperxidación.....	52
8.9 Niveles de proteínas oxidadas.....	53
9 DISCUSIÓN.....	54
10 CONCLUSIONES.....	60
11 PERSPECTIVAS.....	61
12 BIBLIOGRAFIA.....	63

1 ABREVIATURAS

AA ácido ascórbico

AC ácido cítrico

APX ascorbato peróxidasa

BPDS batofenantrolin disulfónico

CAEA capacidad antioxidante en equivalente de ácido ascórbico

CAT catalasa

CCD dióxigenasas de corte de carotenos

cDNA ácido desoxirribonucleico complementario

DHA dehidroascorbato

DHAR dehidroascorbato reductasa

DNA ácido desoxirribonucleico

DTNB ácido 5-5- ditiobis-2-nitrobenzoico

DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DVB/CAR/PDMS Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

ERO especies reactivas de oxígeno

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FDNB 1-fluor-2-4-dinitrobenzoceno

GC cromatografía de gases

GLDH L-galactono-1-4-lactona deshidrogenasa

GSH glutatión reducido

GSSG glutatión oxidado

GR glutatión reductasa

GPX glutatión peróxidasa

h hora

HPLC cromatografía líquida de alta resolución

LeCCD licopersicum esculentum dióxigenasas de corte de carotenos

MDA malondialdehído

MDH monodehidroascorbato

MDHR monodehidroascorbato reductasa

min minutos

NADPH nicotin adenin dinucleotido fosfatado

OMS organización mundial de la salud

PCA ácido perclórico

PVP polivinilpirrolidona

RNA_m ácido ribonucleico mensajero

SOD superóxido dismutasa

TEAC Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

TRAP Parámetro total atrapador de electrones

s segundos

SH sulfhidrilos

SPME por sus siglas en inglés (*Solid Phase Micro Extraction*)

O₂⁻ anión superóxido

¹O₂ oxígeno síngulate

H₂O₂ peróxido de hidrogeno

OH[•] radical hidroxilo

2 RESÚMEN

En este trabajo se estudiaron algunos sistemas de remoción de las ERO de tipo enzimáticos y no enzimáticos, así como el daño causado por estas especies reactivas de oxígeno durante la maduración del jitomate. Se encontró que las enzimas pertenecientes al ciclo ascorbato-glutación como la ascorbato peróxidasa y la glutación reductasa presentaron actividades altas al inicio del proceso de maduración (jitomate verde), para después disminuir significativamente en los estados de madurez más avanzados, mientras que las moléculas antioxidantes como el glutación reducido y el ascorbato se acumularon durante el proceso de maduración. En relación a la capacidad antioxidante total se encontró un incremento significativo del estado de madurez verde al rompiente para luego mantenerse constante. Estos resultados muestran que durante la maduración de este fruto operan diferentes mecanismos antioxidantes. Asimismo, la cuantificación del daño causado por especies reactivas de oxígeno a lípidos y proteínas mostró que en el estado de madurez rojo hay un mayor nivel de daño en ambas biomoléculas, indicando que en este estado los sistemas antioxidantes prevalecientes son insuficientes para evitar el daño oxidativo causado probablemente por un aumento en los niveles de ERO. Por otra parte, las emisiones de los volátiles del aroma de jitomate provenientes del metabolismo de carotenos no se acumularon durante la maduración, debido a que sus precursores podrían estar siendo utilizados para la biosíntesis de licopeno que da al fruto su color rojo característico.

3 ANTECEDENTES

3.1 Importancia de los frutos y hortalizas en la nutrición

Los frutos y las hortalizas tienen un papel significativo en la nutrición humana (Goddart y Matthews, 1979), comparten algunas propiedades tanto estructurales como nutricionales y las diferencias entre ellas se encuentran principalmente en su composición bioquímica. En el caso de los frutos inicialmente crecen a través de la división celular y el incremento de volumen, el embrión madura y en la semilla se acumulan productos de almacenamiento (Paliyath y col., 2004). Los frutos y hortalizas en general, son órganos atractivos, con colores llamativos, con un olor y sabor agradables cuya función es la dispersión de la semilla (Paliyath y col., 2004).

Los frutos aportan una gran proporción de vitaminas, minerales, antioxidantes, y fibra, son las principales fuentes de micronutrientes (vitaminas y minerales) y antioxidantes, por lo que forman parte integral de la dieta del ser humano. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el 2003 que hasta un 50% de la población mundial sufre de deficiencias en micronutrientes como consecuencia de la falta de acceso a frutos y hortalizas (Klee, 2010).

El incremento en la atención al valor nutricional de frutos y hortalizas se debe a la baja capacidad de los animales para protegerse de los procesos oxidativos con sus sistemas antioxidantes endógenos (Giuntini y col., 2005). Los compuestos antioxidantes, al ser fácilmente oxidables son capaces de prevenir el daño celular causado por especies reactivas de oxígeno (ERO) formadas durante las reacciones normales del metabolismo aeróbico del organismo o como respuesta a diferentes tipos de estrés exógenos (Bartley y Scolnik, 1995).

Un gran número de frutos y hortalizas tales como las verduras verdes, el jitomate, las uvas, etc. se han considerado como una buena fuente de antioxidantes. Diversos estudios médicos apuntan hacia una correlación positiva entre el consumo de frutos y hortalizas y la prevención de enfermedades degenerativas (cardíacas y cáncer) y las asociadas al envejecimiento como la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer (Giuntini y col., 2005; Giovannucci, 1999).

3.2 Importancia del jitomate

El jitomate (*Solanum lycopersicum* conocido anteriormente como *Lycopersicum esculentum* Mill.) es una hortaliza muy popular en todo el mundo, con una producción que se incrementa año con año. Datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) muestran que en el año 2008, México tuvo una producción de 2, 936 773 toneladas de jitomate ubicándose en el sitio número 10 entre los países con mayor producción (FAOSTAT, 2008).

La popularidad del jitomate se debe a su color atractivo, versatilidad de uso, valor nutricional y a su aroma y sabor agradables. Es un fruto que se puede consumir crudo o como ingrediente de una gran variedad de alimentos y bebidas (enlatados, salsas, jugos, Ketchup, sopas, etc.). El fruto puede ser procesado solo o incorporado a varios alimentos para posteriormente ser enlatado, congelado, o deshidratado (Rick, 1978; Hobson y Grierson, 1993).

Como se mencionó, el jitomate, es una buena fuente de vitaminas y minerales además de contener una cantidad significativa de antioxidantes, tales como vitamina C, fenoles, tocoferoles y carotenoides (Beecher, 1997; Giovanucci,

1999). Está bien establecido que debido a su capacidad antioxidante, estos compuestos previenen enfermedades cardiovasculares y cáncer (La Vecchia, 1997). El licopeno es el principal carotenoide presente en el jitomate, constituyendo más del 80% del total de carotenoides en el estado de madurez rojo, siendo este compuesto el responsable de su color rojo característico (Nguyen y Schwartz, 1999). En el jitomate comercial, el licopeno se encuentra en una concentración de 3.1-7.7 mg/100 g de fruto maduro. En los últimos años, se han incrementado los reportes donde se menciona al licopeno como un compuesto importante para la salud humana, otorgándole un papel relevante en la prevención de ciertos tipos de cáncer, especialmente el de próstata (Giovannucci, 1999; Nguyen y Schwartz, 1999; Bramley, 2002).

El jitomate contiene además una cantidad moderada de α y β carotenos y luteína. Se ha propuesto que el β -caroteno que es conocido como un precursor de la vitamina A y la luteína que reducen el riesgo de cáncer de pulmón. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios importantes en plantas, muchos de los cuales exhiben actividades antioxidantes, anticancerígenas, y antiinflamatorias (Di Mascio y col., 1991).

3.3 Generalidades del jitomate

El jitomate es originario de la región andina que hoy comparten Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú. De ahí se distribuyó por varias regiones de América hasta llegar a México, donde se ha sugerido que fue domesticado y alcanzó gran popularidad. Sin embargo, no hay pruebas definitivas que apoyen que fue domesticado en nuestro país (Peralta y col., 2006).

El jitomate carece de nombre nativo en la región andina, en tanto que en México se le conoce en lengua náhuatl como *tomatl*, término que es sin duda el origen del nombre moderno.

Las primeras crónicas sobre América son escasas en sus referencias a la producción y consumo de jitomate. El cronista peruano Guamán Poma menciona el consumo esporádico del fruto del jitomate silvestre en el imperio Inca.

El jitomate alcanzó un avanzado estado de domesticación antes de ser conocido en Europa. Fueron los españoles después de la conquista quienes regresaron con la semilla a España, desde donde se distribuyó rápidamente por los países mediterráneos (España, Portugal e Italia) y posteriormente por toda Europa (Rick, 1978; Yilmaz, 2001). En Francia fue conocido como la “manzana del amor” y en Alemania como la “manzana del paraíso”. Éstos y otros nombres equivalentes persistieron hasta mediados del siglo XIX. La primera mención del jitomate en Europa fue en el año 1554, por el herborista Pietro Andrea Mattioli, quien afirmaba que el jitomate se comía en Italia con sal y pimienta (Peralta y col., 2006).

Como el jitomate está emparentado con plantas venenosas como la belladona y la mandrágora, en un principio ni la planta ni su fruto tuvieron gran aceptación en Inglaterra y Estados Unidos, y sólo se utilizaba al jitomate como planta ornamental o como medicina (Rick, 1978).

El jitomate pertenece a la familia Solanaceae, la cual incluye más de 3000 especies. La clasificación filogenética de las Solanaceae fue revisada recientemente y el género *Lycopersicum* se reintegró al género *Solanum*. En la actualidad el jitomate cultivado (*S. lycopersicum*) y otras 12 especies silvestres

emparentadas pertenecen al género *Solanum* sección *Lycopersicum* (Peralta y col., 2006).

3.4 Breve descripción bioquímica de las especies reactivas de oxígeno

A partir de la introducción del oxígeno molecular en nuestra atmósfera por los organismos fotosintéticos, hace aproximadamente 2.5 billones de años, las especies reactivas de oxígeno (ERO) han sido los productos indeseables del metabolismo aerobio (Wickens, 2001). Las plantas, así como otros organismos aerobios, requieren oxígeno para una producción eficiente de energía. Sin embargo, en la cadena respiratoria, se pueden formar las ERO tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el radical hidroxilo OH^{\cdot} ó el oxígeno singulete 1O_2 (Vranova y col., 2002).

3.4.1 Anión superóxido

Al igual que en las células animales, en las plantas, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es generalmente la primera ERO producida a partir de la reducción del oxígeno con un electrón y tiene una vida media de aproximadamente 2-4 microsegundos.

El ($O_2^{\cdot-}$) reduce quinonas y complejos de metales de transición afectando así la actividad de enzimas dependientes de estos complejos (Vranova y col., 2002). Así mismo, es tóxico para la célula porque a partir de él se generan el radical hidroxilo y el oxígeno síngulete.

El O_2^- se produce principalmente en la cadena respiratoria debido a que una parte de los electrones que pasan por ella es captada por el O_2 . Otra fuente importante de O_2^- es la actividad de la enzima NADPH oxidasa que tiene la función específica de sintetizarlo, también puede ser producido por la actividad de las enzimas xantina deshidrogenasas y lipoperoxidasas.

La eliminación de O_2^- se lleva a cabo a través de las enzimas superóxido dismutasas (SOD) las cuales son muy eficientes y existen en cada compartimento celular (Torres, 2008).

3.4.2 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno o agua oxigenada se forma cuando cada uno de los electrones libres del O_2 se aparea con un electrón de giro contrario. Esta molécula es un líquido similar al agua aunque más denso y viscoso. El H_2O_2 es una molécula relativamente estable y su concentración en las plantas va del rango micromolar a milimolar dependiendo del compartimento celular (Rinalducci y col., 2008). El H_2O_2 puede atravesar con facilidad membranas biológicas y difundirse a través de los compartimentos celulares.

El H_2O_2 no es un radical libre, sin embargo, es precursor de radicales ya que puede formar el radical hidroxilo, el cual es muy reactivo y puede causar daño a diferentes biomoléculas. Además de su papel dañino, recientemente se han identificado nuevas funciones para el H_2O_2 en la señalización de procesos biológicos como el crecimiento, la expansión y la muerte celular programada, entre otros (Torres, 2008).

La reacción de las enzimas SOD durante la detoxificación del radical superóxido produce la mayor parte de H_2O_2 en las células. Esta ERO puede producirse además, por la actividad de algunas oxidasas como las de xantina, de aminoácidos, de hexosas y de fenoles entre otras. El H_2O_2 normalmente es degradado por la acción de enzimas como las peróxidasas y las catalasas (Torres, 2008).

3.4.3 Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es conocido como la especie de oxígeno más reactiva y es producido generalmente a través de hidroperóxidos por la reacción de Fenton usando agentes reductores metálicos capaces de tener diferentes valencias, también se produce a partir del H_2O_2 (Rinalducci y cols., 2008).

El OH^\bullet difunde muy poco porque interacciona rápidamente con casi cualquier compuesto celular. Los ácidos grasos polinsaturados son más susceptibles a la oxidación con el OH^\bullet que los saturados y los monoinsaturados. La mayoría de los daños irreversibles en las proteínas son causados por OH^\bullet porque reacciona con cualquier aminoácido cercano al sitio donde se origina. El OH^\bullet puede oxidar bases nitrogenadas hasta producir rupturas en el DNA. Como casi todos los compuestos reaccionan rápidamente con el OH^\bullet , no hay una manera específica de contender con esta especie reactiva. Sin embargo, es posible que la acumulación de metabolitos como el ascorbato y el glutatión protejan a las biomoléculas del daño oxidativo causado por esta ERO (Torres, 2008).

3.4.4 Oxígeno síngulete

El oxígeno síngulete ($^1\text{O}_2$) se produce ampliamente cuando el O_2 acepta la energía de excitación procedente de pigmentos como las clorofilas o los carotenos por lo que su producción en las plantas es considerable.

El $^1\text{O}_2$ reacciona con la mayoría de compuestos celulares. El que se produce afuera de las células interacciona con la membrana plasmática; el producido dentro de la célula reacciona con los lípidos de las membranas internas, con los carbohidratos y las proteínas, muy cerca del sitio donde se forma. El $^1\text{O}_2$ también interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos produciendo aductos que puede generar mutaciones en las células al duplicarse el DNA (Torres, 2008).

Normalmente los carotenoides (agentes fotoprotectores) apagan el estado excitado de la clorofila previniendo así, la formación del $^1\text{O}_2$ (Di Mascio y col., 1991). Esta molécula es eliminada más eficientemente por el licopeno que por el β -caroteno. Por ello se ha considerado al licopeno como el caroteno biológicamente más eficiente para la supresión del oxigeno síngulete (Di Mascio y col., 1989).

3.5 Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas

En condiciones fisiológicas normales, las ERO, mencionadas anteriormente, son continuamente producidas en distintos compartimentos celulares de las plantas como resultado de reacciones de diferentes rutas metabólicas.

En las plantas existen tres principales mecanismos para la producción de las ERO (Rinalducci y col., 2008):

- i. Cadenas de transporte de electrones (cloroplasto y mitocondria)
- ii. Algunas peroxidasas y oxidasas (NADPH oxidasa, xantina oxidasa, lipoxigenasas, glicolato oxidasa etc.)
- iii. Moléculas que intervienen en la fotosíntesis como la clorofila y carotenos (cloroplastos)

Se ha estudiado, la participación de algunas ERO como el H_2O_2 en la regulación de procesos metabólicos que ocurren durante la maduración de frutos (Hamilton y col., 1974). En experimentos de fluorescencia modificada en extractos de jitomate se ha observado que durante la maduración la producción de H_2O_2 presenta un pico en el estado de madurez rojo el cual coincide con el daño observado en lípidos (Jiménez y col., 2002).

3.6 Sistemas Antioxidantes

Como ya se ha mencionado las ERO son altamente reactivas, tóxicas y capaces de oxidar diversas biomoléculas como los lípidos de membrana, las proteínas, o incluso los ácidos nucleicos alterando el metabolismo y pueden incluso llevar a la destrucción oxidativa de la célula.

El término “antioxidante” se refiere a alguna molécula capaz de estabilizar o desactivar radicales libres antes de que estos ataquen algunas biomoléculas en la célula. Por este motivo, los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas antioxidantes altamente complejos (enzimáticos y no enzimáticos) los cuales trabajan sinérgicamente para proteger los sistemas celulares del daño de estos radicales. En los animales, los antioxidantes pueden ser endógenos o pueden

ser obtenidos exógenamente a través de la dieta o como suplemento. Los antioxidantes endógenos desempeñan un papel crucial en el mantenimiento óptimo de las funciones celulares que conservan la salud y el bienestar del organismo. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo, los sistemas antioxidantes pueden no ser suficientes por lo que pueden ser requeridos los antioxidantes que se obtienen en la dieta para mantener las funciones celulares óptimas (Rahman, 2007).

Todas las plantas tienen antioxidantes naturales, que pueden ser enzimáticos y no enzimáticos y cuyos niveles y localización celular varían dependiendo de su estado metabólico así como de los factores ambientales a los que se encuentran expuestas (Shao y col., 2008) .

3.7 Sistemas antioxidantes enzimáticos en las plantas

En condiciones normales los sistemas antioxidantes vegetales proveen una adecuada protección en contra de las ERO, uno de estos sistemas antioxidantes son los llamados enzimáticos que como su nombre lo indica son enzimas involucradas en la remoción de especies reactivas. Para controlar los niveles de las ERO los tejidos de plantas contienen una variedad de enzimas que eliminan estas especies tales como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) así como un conjunto de peroxidasas (PRXs), glutatión peroxidasas (GPXs) y transferasas, así como cuatro enzimas pertenecientes al ciclo ascorbato-glutatión las cuales contribuyen tanto en la remoción de ERO como en la regeneración de cofactores involucrados en la detoxificación (Blokhina y col., 2003; Matamoros y col., 2010). En el ciclo ascorbato-glutatión también conocido como el ciclo Halliway- Asada (Fig.1) la enzima ascorbato

peroxidasa (APX) cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O utilizando el ascorbato (AA) y produciendo monodehidroascorbato (MDHA) y dehidroascorbato (DHA) (Fig. 1). El ascorbato es regenerado por la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) y la dehidroascorbato reductasa (DHAR) usando NADPH y glutatión reducido (GSH) respectivamente. La forma oxidada del glutatión (GSSG) es regenerada por la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) usando NADPH como cofactor (Foyer y col., 1994; Jiménez y col., 2002; Matamoros y col., 2010).

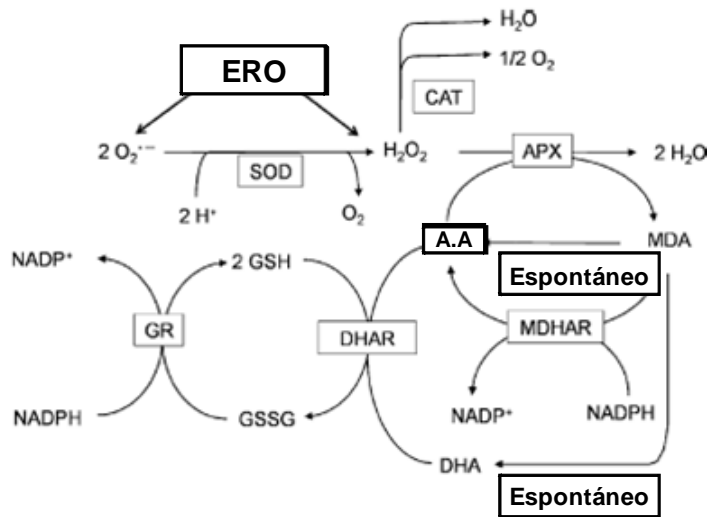


Figura 1. Ciclo Ascorbato-Glutatión en plantas (Zuchi y col., 2009).

3.7.1 Ascorbato Peroxidasa

Como se mencionó en los cloroplastos la enzima APX (1.11.1.11) utiliza al ascorbato como donador específico de electrones para reducir el peróxido de hidrógeno a agua con la generación concomitante de monodehidroascorbato

(MDA) el cual es espontáneamente reducido a dehidroascorbato (DHA) (Shigeoka y col., 2002). Así, la actividad de la APX dentro del ciclo ascorbato-glutación previene el aumento de los niveles de H_2O_2 en organismos fotosintéticos (Asada, 1996).

La APX ha sido identificada en muchas plantas superiores y comprende una familia de isoenzimas. Estas isoenzimas son distribuidas en al menos cuatro distintos compartimentos celulares: La APX localizada en el estroma del cloroplasto (sAPX) y la tilacoidal (tAPX), la APX unida a la membrana de micro cuerpos incluyendo peroxisomas y glioxisomas (mAPX) y la citosólica APX, (cAPX) (Shigeoka y col., 2002).

3.7.2 Glutación Reductasa

La enzima GR (1.6.4.2.), es una flavoproteína heterodímera que usa NADPH para reducir al glutación oxidado (GSSG) a dos moléculas de GSH (Noctor y col., 2002, manteniendo constante la relación celular de GSH/GSSG. La glutación reductasa es una enzima ampliamente distribuida en procariontes y eucariontes y ha sido implicada en un amplio rango de procesos metabólicos importantes para la vida de la célula. La enzima fue reportada por primera vez en plantas hace más de 50 años y ha sido localizada en diferentes especies de plantas y en distintos tejidos de las mismas (Edwards y col., 1990). La enzima forma parte del ciclo ascorbato-glutación en frutos y hortalizas y juega un papel importante en la detoxificación de las ERO en diferentes tipos de estrés. Así mismo, se ha evidenciado la importancia de esta enzima en procesos fisiológicos normales de las plantas como en la maduración de los frutos.

(Jiménez y col., 2002; Loannidi y col., 2009). Se han aislado dos DNA complementarios (cDNA) de la GR en plantas, uno de ellos codifica para la isoforma citosólica, mientras que el otro codifica para proteínas, con una región N-terminal característica, y que pueden localizarse tanto en cloroplastos como en mitocondrias (Noctor y col., 2002; Contour-Ansel y col., 2006).

3.8 Sistemas Antioxidantes no Enzimáticos

Una serie de moléculas de bajo peso molecular tales como el ascorbato (A.A), el glutatión (GSH), los tocoferoles, los carotenoides y los compuestos polifenólicos pueden proteger a los tejidos de las plantas de los efectos dañinos de las ERO (Blokhina y col., 2003; Matamoros y col., 2010).

En las plantas, los tocoferoles son las moléculas más eficientes para eliminar los radicales hidroperóxilos en las membranas celulares (Di Mascio y col., 1991).

En los frutos de jitomate, la cantidad de moléculas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas puede ser afectada por diversos factores tales como la época de cosecha, la ubicación geográfica y factores ambientales durante el cultivo, las condiciones de almacenamiento, así como el estado de maduración en el cual se encuentra el fruto (Abushita y col., 1997). Sin embargo, el papel de los antioxidantes en el desarrollo, la maduración y el almacenamiento post-cosecha de frutos y hortalizas no está bien entendido (Matamoros y col., 2010).

3.8.1 Glutación

El GSH es una fuente importante de tioles no-proteicos en la mayoría de las células. La reactividad química de este grupo hace que esta molécula sirva en un amplio rango de funciones bioquímicas como antioxidante y en la detoxificación de compuestos en todos los organismos (Noctor y col., 2002).

El glutación es un tripéptido (α -glutamyl-cisteinilglicina) cuya presencia ha sido detectada virtualmente en todos los compartimentos celulares de las plantas, en el citosol, los cloroplastos, el retículo endoplásmico, las vacuolas y las mitocondrias. La capacidad antioxidante del GSH es debida, como ya fue mencionado, a su grupo sulfuro (tiol), el cual puede fácilmente perder un electrón. Esta reactividad, junto con una relativa estabilidad y una alta solubilidad en agua, hacen del glutación un protector bioquímico ideal para la planta en condiciones de ciertos tipos de estrés incluyendo el estrés oxidativo, el estrés de salinidad, etc. El cambio en la relación de su forma reducida a su forma oxidada durante la degradación de peróxido de hidrógeno es importante, por lo que se ha sugerido que la relación GSH/GSSG es un indicador del balance del estado redox de la célula (Fig.2). El glutación reducido está involucrado directamente en la reducción de la mayoría de las ERO generadas debido al estrés. Además, otra función central del GSH en la defensa oxidativa es debido a su capacidad para regenerar otra poderosa molécula antioxidante, el ácido ascórbico (A.A) por medio del antes mencionado ciclo ascorbato-glutación (Foyer y col., 1994; Blokhina y col., 2003; Rhaman., 2007; Shao y col., 2008).

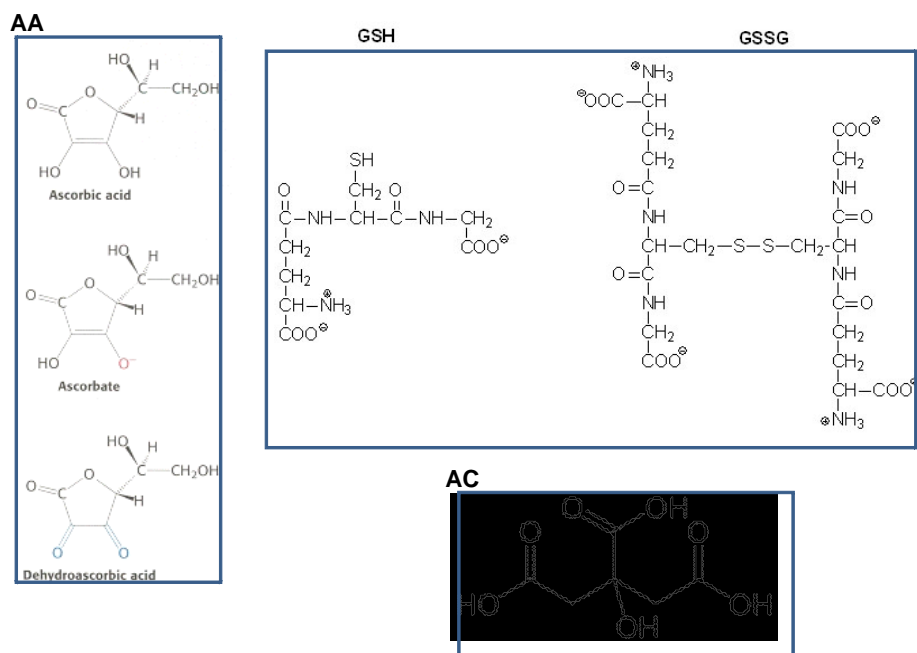


Figura 2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos. Formas de A.A: ácido ascórbico, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado y AC: ácido cítrico.

3.8.2 Ácido Ascórbico

El ácido ascórbico, L ascorbato o vitamina C es el antioxidante soluble más abundante encontrado en las plantas (2-25 mM). Debido a su abundancia y a que algunas especies de animales (incluyendo primates) han perdido la capacidad para sintetizarlo, el A.A es un nutriente esencial para los humanos (Fig. 2).

La incapacidad de estos animales para sintetizar el A.A se debe a que tienen mutada la enzima L-galactono-1-4-lactona deshidrogenasa (GLDH) que cataliza la última etapa de la vía de su síntesis (Linster y Clarke., 2008).

La molécula de ácido ascórbico es principalmente conocida por sus propiedades antioxidantes pero también actúa como cofactor para varias enzimas así como en la regulación de la división y expansión celular. En las plantas el A.A, ha sido implicado también en procesos como la muerte celular programada, la respuesta a las hormonas y a los patógenos, la floración y la senescencia así como en la protección de cierto tipo de estreses ambientales (Linster y Clarke., 2008; Loannidi y col., 2009; Di Matteo y col., 2010).

Se conoce poco acerca de las funciones que el A.A tiene en las plantas y la regulación de su biosíntesis. Sin embargo, es bien conocido que el contenido de A.A en las plantas cambia con la luz, la hora del día, la edad de la planta, el tejido y el compartimento celular. Teóricamente, todos estos cambios deben ser explicados por el funcionamiento de una red metabólica de biosíntesis, catabolismo y reciclaje. En plantas, se han descrito al menos tres distintas rutas para la síntesis de ácido ascórbico (Hancock y Viola., 2005; Cruz-Rus y col., 2010). La ruta mejor caracterizada es la biosíntesis de A.A a partir de la D-glucosa, la cual es diferente a la encontrada en los animales que pueden sintetizar este compuesto. Esta ruta involucra diez etapas enzimáticas a partir de la D-glucosa hasta L-ascorbato con la formación de intermediarios como la GDP manosa y la L-galactosa. La mayoría de las enzimas y los genes correspondientes de las otras dos vías de plantas no han sido identificados aún (Linster y Clarke., 2008).

3.8.3 Acido Cítrico

La acidez de los frutos resulta de los ácidos orgánicos que se almacenan en la vacuola y su composición puede variar dependiendo del tipo de fruta. En general las frutos jóvenes contienen más ácidos orgánicos los cuales pueden disminuir mientras el fruto alcanza la madurez fisiológica y madurez de consumo debido a su conversión a azúcares.

Algunas familias de frutos se caracterizan por su contenido de ciertos ácidos orgánicos. Por ejemplo, los miembros de la familia Oxalidaceae (*Averrhoa carambola*) tienen frutos que contienen ácido oxálico, mientras que los frutos de género *Citrus* acumulan una gran cantidad de ácido cítrico (Fig. 2).

Los jitomates acumulan una gran cantidad de ácido cítrico y en menor proporción ácido málico que contribuyen a la generación de su sabor característico y que además pueden tener cierta aplicación como conservadores y antioxidantes (Abushita y col., 1997).

Durante el fenómeno de maduración, como ya se mencionó previamente estos ácidos orgánicos pueden entrar al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y degradarse o metabolizarse a azúcares (Paliyath y col., 2004).

3.9 Daño a las biomoléculas

El “estrés oxidativo” es el daño oxidativo producido por las ERO. En los procesos de estrés oxidativo las ERO oxidan todo tipo de componentes celulares, como carbohidratos, lípidos insaturados, proteínas y ácidos nucleicos

causándoles daño que puede ocurrir de diferentes maneras y en varios sitios de estas moléculas (Rinalducci y col., 2008).

3.9.1 Daño a Lípidos

La reacción de las ERO con los lípidos de las membranas biológicas ocasionan la producción de diversos compuestos tóxicos, altera su fluidez y permeabilidad, así mismo, causa la pérdida de actividad de las enzimas, de los receptores y de los canales iónicos asociados a ellas, situación que compromete la estructura y función celular.

Los ácidos grasos saturados o monoinsaturados de las membranas celulares, son poco susceptibles al ataque de las ERO, mientras que los polinsaturados como el ácido linoléico, el ácido linolénico y el ácido araquidónico son rápidamente atacados debido a la presencia de sus enlaces dobles conjugados. En la peroxidación que inician las ERO en las membranas celulares, los radicales libres de los lípidos resultantes propagan el proceso de peroxidación permitiendo la acumulación de hidroperóxidos que finalmente se descomponen en una gran variedad de productos terminales en donde los principales son el malondialdehído (MDA), el hexanal y el 4-hidroxi-nonanal (Piña y Piña, 2008).

3.9.2 Daño a Proteínas

Las proteínas son las moléculas más propensas al daño por las ERO, más que los lípidos y el ADN, siendo los componentes celulares mas oxidados (68 %)

(Rinalducci y col., 2008). El estrés oxidativo puede dañar las proteínas de manera similar a como ocurre con otras macromoléculas. Estudios con radiaciones ionizantes mostraron que el OH^\cdot es el causante de la oxidación de las proteínas, sin embargo, el curso del proceso de oxidación esta determinado por la disponibilidad de $^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$. Investigaciones posteriores ponen en evidencia que el daño a proteínas inducido por las ERO se afecta por un sin número de factores como la velocidad de la reacción, concentración de las ERO, entre otras. Los sitios específicos en los que puede ser oxidada una proteína son: el esqueleto del carbono α por la oxidación del hidrógeno donador del electrón; las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos, como los residuos alifáticos, los residuos aromáticos y los residuos de azufre de la metionina y cisteína (Piña y Piña, 2008).

La oxidación de las proteínas produce derivados carbonilos. La carbonilación, es la modificación oxidativa de proteínas más común en plantas. Las cadenas de prolina, arginina, lisina y treonina pueden ser convertidas mediante la oxidación en grupos aldehídos o cetonas (carbonilos) causando la inactivación, el entrecruzamiento y la ruptura de las proteínas en la célula. No existe evidencia alguna de que la carbonilación sea reversible (Rinalducci y col., 2008).

Los grupos carbonilos han sido reportados como marcadores de daño oxidativo producido por las ERO y podrían ser un indicador de procesos de maduración y senescencia en frutos como jitomate (Jiménez y col., 2002).

3.10 Capacidad Antioxidante

El jitomate posee una gran cantidad de sustancias con propiedades antioxidantes tales como los carotenoides, el ácido ascórbico, los compuestos fenólicos y los tocoferoles (Lenucci y col., 2006). Todos estos compuestos contribuyen a la capacidad o actividad antioxidante de este fruto para prevenir las enfermedades degenerativas y asociadas al envejecimiento mencionadas previamente. Debido a la diversidad química de los compuestos antioxidantes presentes en frutos y vegetales, incluido el jitomate, se han desarrollado diferentes métodos para determinar su capacidad antioxidante la cual ha sido descrita también con términos como “actividad antioxidante”, “eficiencia antioxidante”, “poder antioxidante”, “capacidad antioxidante total” entre otros y se refieren a la capacidad de secuestrar radicales libres. Sin embargo, la “actividad” que posee cada químico no tiene sentido sin el contexto específico de las condiciones de la reacción de la determinación, como la presión, temperatura, reactivos, etc. porque la “capacidad antioxidante” medida por algún ensayo individual refleja únicamente la reactividad química en las condiciones específicas aplicadas en dicho ensayo, de modo que es inadecuado y erróneo generalizar los datos como indicadores de una “capacidad antioxidante total” (Huang y col ., 2005).

Por este motivo, se han desarrollado diversos métodos para cuantificar la “capacidad antioxidante” de alimentos, frutos, jugos y vegetales tales como: “Capacidad antioxidante equivalente a Trolox” (TEAC), Capacidad de absorbancia de radicales libres” (ORAC), “Parámetro total atrapador de electrones” (TRAP) y “Método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)”.

Estos métodos difieren tanto en su base química como en el modo de ser evaluados. El método de DPPH es fácil de realizar para la detección de la capacidad antioxidante de jugo de frutos y vegetales. El radical orgánico nitrogenado DPPH tiene un máximo de absorción a 515 nm y reacciona con diferentes antioxidantes como los compuestos fenólicos y algunos carotenos, de modo que cuando se reduce, su color disminuye, lo cual puede ser monitoreado espectrofotométricamente (Huang y col., 2005)

3.11 Maduración de los frutos

Anatómicamente, los frutos son ovarios que pueden contener parte de la flor. Los frutos toman muchas formas que han evolucionado para proteger y dispersar la semilla (White, 2002).

El desarrollo de un fruto es posterior a la fertilización y ocurre simultáneamente con la maduración de la semilla. Los frutos crecen primero por división celular y posteriormente por incremento de volumen. El embrión madura y la semilla acumula productos de almacenamiento, adquiere la tolerancia a la desecación, y pierde agua. El fruto entonces madura.

La maduración de los frutos como los de jitomate es un proceso complejo genéticamente programado, que desde el punto de vista de su consumo puede dividirse en maduración fisiológica que ocurre entre el momento de la fertilización hasta que el fruto alcanza su madurez total (frutos que alcanzan su tamaño máximo, y las semillas adquieren la capacidad para germinar y que tienen una coloración verde), posteriormente se presenta la maduración de consumo en la que ocurren cambios en color, textura, aroma y sabor del fruto

que son atractivos para los consumidores y que al final culmina con la senescencia de los frutos (White, 2002).

Los frutos en función de sus mecanismos de maduración pueden ser divididos en dos grupos; climatéricos, como el jitomate, en los cuales durante la maduración se presenta un estallido en la concentración de etileno que va acompañado por un pico en la respiración, mientras que en los frutos no-climatéricos no existe tal comportamiento (Alexander y Grierson, 2002).

La maduración de los frutos puede ser definida en general como la suma de los cambios en el metabolismo del fruto que lo hacen atractivo para el consumo de los organismos que participan en la liberación y esparcimiento de la semilla (White, 2002).

Sin embargo, los frutos no son únicamente esos componentes olorosos y coloridos de la dieta de los animales y de los humanos, sino también son una fuente importante de minerales, vitaminas, fibras y antioxidantes. Por esta razón, una comprensión más completa de las vías de biosíntesis para la producción de estos nutrientes es de amplia aplicación, así como de importancia fundamental (Carrari y Ferni, 2006). Un ejemplo de esto, es el uso de jitomate (*Solanum Lycopersicum*) para el estudio, de los cambios que ocurren en el metabolismo del fruto durante su desarrollo y maduración, en el cual se presentan cambios tales como la diferenciación de cloroplastos a cromoplastos y la acumulación masiva de carotenoides como licopeno entre otros eventos metabólicos (Carrari y Ferni, 2006).

3.12 Estado oxidativo y maduración del jitomate

La teoría del envejecimiento por radicales libres propone que el envejecimiento progresivo es el resultado de un ataque azaroso y acumulativo de formas parcialmente reducidas de oxígeno (Brennan y Frenkel., 1977).

La maduración de consumo de los frutos ha sido descrita como un fenómeno oxidativo (Blackman y Parija, 1928; Brennan y Frenkel, 1977) el cual requiere un recambio controlado de las ERO, tales como H_2O_2 y O_2^- (Hamilton, 1974).

Es decir, debe haber un balance entre la producción de las ERO y su remoción por los sistemas antioxidantes por lo que es probable entonces, que estos sistemas tengan un papel crucial en el proceso de maduración (Jimenez y col., 2002).

Se ha estudiado, la participación del H_2O_2 en la regulación de procesos metabólicos que ocurren durante la maduración de frutos (Hamilton, 1974). En experimentos de fluorescencia modificada en extractos de jitomate se ha observado que durante la maduración, la producción de H_2O_2 presenta un pico en el estado de madurez rojo el cual coincide con el daño observado en los lípidos (Jiménez y col., 2002).

Al inicio de la maduración de los frutos la detoxificación de las ERO parece estar dado predominantemente por los sistemas antioxidantes enzimáticos como se mostró en el jitomate 'Alicia Craig' donde se detectaron actividades altas de algunas enzimas antioxidantes en frutos en estado verde junto con una acumulación significativa de los RNAm de estas enzimas (Jiménez y col., 2002).

Por otro lado, metabolitos antioxidantes importantes en el estado redox celular como A.A y GSH tienden a incrementar durante la maduración de consumo de los frutos de modo que este proceso, la maduración, ha sido reportado como una senescencia regulada que requiere un intercambio controlado de radicales y un cambio de un estado reducido a oxidado (Brennan y Frenkel, 1977).

Compuestos que estimulan la producción de ERO como el glicolato y la xantina fueron aplicados a peras Bartlett para probar su efecto sobre el inicio de la maduración. Se encontró que estos compuestos provocaron un aumento significativo en el ablandamiento, la producción de etileno, así como en los niveles de peróxido de hidrógeno, mostrando así que estas especies reactivas tienen una función en la promoción de la maduración de frutos (Brennan y Frenkel., 1977).

Por otro lado, en estos mismos frutos la aplicación de los compuestos sulfhidrilos (SH) como cisteína y ditiotreitól resultó en la inhibición de la maduración. Por el contrario, los reactivos que oxidan los compuestos (SH) incluyendo el aloxán y la N-etilmaleimida promovieron los eventos como el ablandamiento, la producción de etileno y de H_2O_2 durante el proceso de maduración. Estos resultados muestran que los tratamientos que afectan a los gradientes SH en el fruto, pueden alterar también la maduración siendo consistentes con la opinión de que este proceso requiere un cambio en el estado oxidativo en el tejido del fruto como un fenómeno de senescencia durante la madurez de consumo (Frenkel, 1976).

3.13 Aroma y sabor

El aroma de los frutos y hortalizas está determinado por la combinación en proporciones adecuadas y únicas de sus compuestos volátiles. Estos compuestos son derivados de diferentes moléculas como lípidos, aminoácidos, carotenoides, ligninas y terpenos (Lewinnsohn y col., 2005). El sabor, por su parte, es la suma de un gran conjunto de metabolitos que son percibidos por el gusto y por el olfato (Klee, 2010). Por este motivo, un prerrequisito necesario para mejorar los alimentos frescos no procesados es la determinación de las sustancias químicas que contribuyen al sabor (Tieman y col., 2009).

En el caso particular del jitomate fresco, el sabor es la suma de la interacción entre azúcares, ácidos orgánicos y aproximadamente 400 compuestos volátiles. El buen sabor del jitomate requiere de niveles mínimos de de azúcares como glucosa y fructosa, así como de ácidos tales como el cítrico que son percibidos por receptores en la lengua en combinación con los compuestos volátiles que son detectados por el sistema olfatorio de la nariz. Sin embargo, la contribución de los volátiles percibidos por el sistema olfatorio al sabor no está del todo entendida (Tieman y col., 2009).

La sensibilidad humana a los compuestos volátiles varía enormemente y el impacto de un volátil sobre el sabor es determinado tanto por su concentración como por su umbral de olor (Baldwin y col., 2000). Basado en estos factores, han sido identificados un conjunto de aproximadamente 30 volátiles que contribuyen de manera significativa en el aroma del jitomate y a los que se les denomina volátiles de impacto (Tieman y col., 2009). Una combinación en proporciones apropiadas de estos compuestos y otros más produce el aroma típico del jitomate maduro fresco (Baldwin y col., 2000; Yilmaz, 2001).

3.13.1 Apocarotenoides

Algunas moléculas denominadas apocarotenoides (norisoprenos) son derivadas de la ruptura de carotenoides (tetraterpenos) por lo que comparten una ruta biosintética común (Fig. 3). Los carotenoides son producidos por la condensación de isopentil-difosfato a través de una vía localizada en plastídios e iniciada por la condensación de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato. El isopentil difosfato es convertido entonces en farnesil difosfato y difosfato de geranil geranilo, éste último es considerado el precursor universal en la biosíntesis de carotenos los cuales son moléculas antioxidantes y constituyentes clave de algunos aromas de flores, frutos y plantas picantes (Bramley, 2002; Lewinsohn y col., 2005).

Los apocarotenoides volátiles se encuentran entre los más importantes contribuyentes del sabor de jitomate y muchos alimentos económicamente importantes. Los apocarotenoides cíclicos como (White, 2002) la β -ionona y la β -damascenona se describen como aromas floral/frutal. Los humanos somos muy sensibles a estos volátiles, a pesar de que su concentración es muy baja. Los apocarotenoides lineales como el 6-metil-5-hepten-2-ona y geranilacetona han sido también descritos como aromas frutal/floral aunque sus umbrales de olor son significativamente superiores a los de los apocarotenoides cíclicos. Tanto los apocarotenoides cíclicos como los lineales de jitomate pueden ser generados directamente de sus precursores (carotenos) por la acción de un par de enzimas dioxigenasas LeCCD1A y LeCCD1B que cortan los carotenoides (Klee, 2010).

Aunque algunos volátiles del aroma de jitomate se producen en cantidades detectables durante todo el desarrollo del fruto, la mayoría de los mismos se asocian a determinadas etapas de maduración.

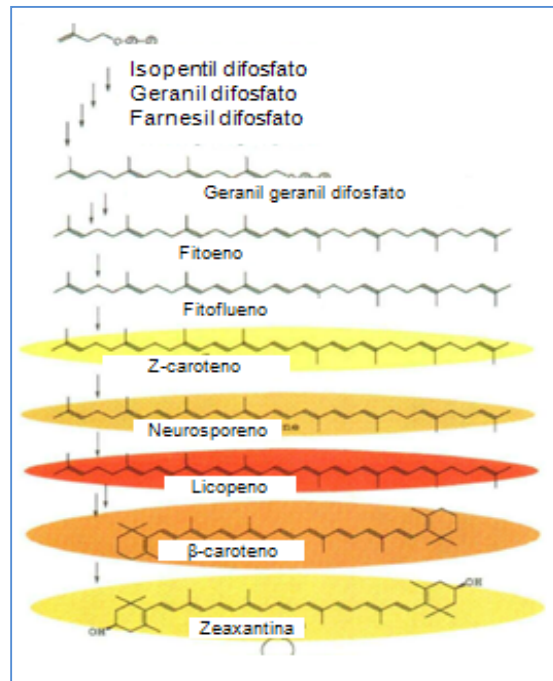


Figura .3. Ruta de biosíntesis de carotenoides (Bartley y Scolnik., 1995)

4 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha incrementado la conciencia del daño que las ERO causan en la salud humana. En la célula, los radicales libres interactúan rápidamente con las biomoléculas iniciando reacciones en cadena que pueden dar por resultado el daño celular. Por lo regular, el cuerpo humano puede encargarse de estos compuestos a través de sus sistemas antioxidantes

enzimáticos y no enzimáticos, pero si sus cantidades se vuelven excesivas puede ocurrir el daño. En los últimos años se ha atribuido a los radicales libres como los probables causantes de diversas enfermedades crónicas y degenerativas que se desarrollan con la edad como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y algunas disfunciones en el sistema inmunológico.

Los compuestos que presentan actividad antioxidante han ganado la atención de investigadores y nutriólogos por su papel potencial en la prevención de tales enfermedades. Por tal motivo, la determinación de la actividad antioxidante se ha convertido en un parámetro importante de evaluación para determinar la calidad nutricional de un alimento.

Los frutos y hortalizas tienen un papel primordial en la nutrición humana. Entre éstos, el jitomate es muy importante por su consumo abundante y frecuente, así como por su alta calidad nutritiva. Los jitomates representan una fuente importante de distintos nutrientes antioxidantes como los carotenoides, en particular el licopeno y la vitamina C, además de tener un alto contenido de folato y minerales como el potasio. El aporte calórico limitado del jitomate, así como su elevado contenido de antioxidantes hacen de este fruto un alimento ideal de acuerdo a las consideraciones nutricionales modernas.

Existen cientos de variedades e híbridos de jitomate que responden a distintas necesidades del mercado como por ejemplo para consumo en fresco o procesado. Así encontramos cultivares que muestran grandes diferencias en las características físicas de los frutos, tales como tamaño, forma y color. Asimismo, los frutos se cosechan en distintos estados de maduración de acuerdo a su uso y las preferencias de los consumidores (Leonardi y col.,

2000). Se ha reportado que la composición de nutrientes y los componentes de los sistemas antioxidantes cambian en función de la variedad de jitomate, del estado de madurez analizado y de la época de cosecha (Raffo y col., 2002; Slimestad y Verheul, 2005).

La biosíntesis de carotenoides y su regulación durante la maduración de frutos es un proceso complejo que ocurre en forma paralela a la diferenciación de cloroplastos en cromoplastos (Bramley, 2002). Recientemente, se ha reconocido la importancia del licopeno por su efecto en la disminución de ERO y sus efectos benéficos en la salud. El mecanismo primario que controla la acumulación de licopeno en frutos de jitomate es la regulación diferencial de la expresión génica. Durante el desarrollo de los frutos de jitomate los niveles de los ARNm de las enzimas que sintetizan licopeno se incrementan y los que participan en su conversión a beta o delta-caroteno disminuyen y llegan incluso a desaparecer (Ronen y col., 1999).

Los carotenoides además de su función antioxidante son precursores de algunos volátiles de importancia en el aroma del jitomate, entre dichos volátiles se encuentran: la geranilacetona, la 6-metil-5-hepten-2-ona, el 6-metiheptenol, la pseudoionona, la β -ionona, el β -ciclocitral y la β -damascenona (Baldwin y col., 2000). Se ha observado que los niveles de carotenoides en jitomate y melón afectan la composición de volátiles de estos productos (Lewinsohn y col., 2005).

Como se mencionó anteriormente, los cambios en la actividad antioxidante durante el desarrollo del jitomate dependen de la variedad, la región de producción y la época de cosecha, por lo que resulta importante estudiar las variedades cultivadas en México para conocer sus efectos en la salud. En años

recientes en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la variedad 7705 de jitomate saladette en relación a sus características sensoriales y composición de volátiles durante el almacenamiento refrigerado.

En este trabajo se pretende determinar el estado oxidativo, sistemas antioxidantes y su interrelación con la producción de volátiles del aroma durante la maduración del jitomate saladette variedad 7705 (*Solanum lycopersicum*) ya que existen pocos estudios que enfoquen procesos oxidativos durante la maduración de jitomate.

5 OBJETIVOS

5.1 General.

Determinar el estado oxidativo, los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) y su interrelación con la producción de volátiles del aroma del jitomate (*Solanum lycopersicum*) saladette variedad 7705 en diferentes etapas de maduración (verde, rompiente, naranja y rojo).

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar los niveles de volátiles del aroma derivados de carotenoides durante la maduración.
2. Determinar la capacidad antioxidante total en equivalentes de ácido ascórbico durante la maduración.
3. Determinar la actividad de enzimas antioxidantes (glutación reductasa y ascorbato peroxidasa) durante la maduración.

4. Determinar los niveles de compuestos antioxidantes presentes (ácido cítrico, glutatión, carotenoides) durante la maduración.
5. Determinar los niveles de lipoperoxidación y proteínas oxidadas durante la maduración.

6 HIPÓTESIS

Si los carotenoides participan como antioxidantes y precursores del aroma de jitomate, los cambios en los niveles y calidad de volátiles del aroma durante la maduración estarán asociados a cambios en el estado oxidativo durante la maduración del jitomate.

7 METODOLOGÍA

7.1 Material biológico y tratamiento

Durante el presente trabajo se usó jitomate saladette variedad '7705' cultivado en el estado de Hidalgo. Los frutos de esta variedad fueron cultivados en invernaderos comerciales y se cosecharon el mismo día del inicio del experimento seleccionándolos visualmente en los estados de madurez requeridos para la investigación (verde, rompiente, naranja y rojo) (Fig. 4).

Los frutos se transportaron a la UAM-Iztapalapa donde fueron nuevamente seleccionados de manera visual, buscando uniformidad de forma, tamaño, estado de madurez y ausencia de defectos físicos.

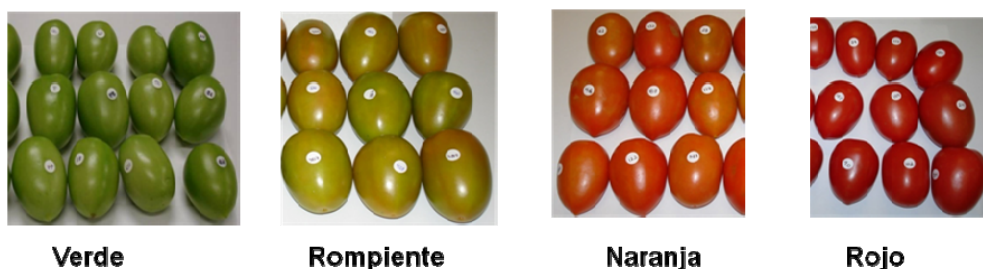


Figura 4. Jitomate saladette '7705' en diferentes estados de maduración.

7.2 Diseño experimental

Se seleccionaron 60 frutos de jitomate de cada estado de madurez y se tomaron muestras independientes (tres réplicas de 5 frutos) para cada uno de los estados de madurez. Se extrajo el jugo y pericarpio con N_2 líquido y las muestras fueron almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta realizar cada una de las determinaciones indicadas en los objetivos.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se usó el programa Statgraphics Plus para Windows 4.0. Donde los datos de cada determinación fueron comparados entre estados de maduración mediante pruebas ANOVA de una vía mas pruebas de comparación múltiple considerando diferencias significativas con valores p menores a 0.05.

7.3 Separación y cuantificación de los compuestos volátiles del aroma de jitomate mediante cromatografía de gases (GC)

Para cuantificar los volátiles derivados de carotenos se colocaron en un frasco vial 3 mL de la muestra de jugo de jitomate a analizar, la cual fue previamente estabilizada con una solución 1 mM de EDTA. Posteriormente, se añadieron 2g de NaCl y 40 μ L de una solución conteniendo nonanol como estándar interno, el frasco fue cerrado con un septo y sellado herméticamente. El vial se agitó durante un minuto utilizando el vortex y se colocó en una parrilla multiblock para mantenerlo a una temperatura constante de 35 °C.

El muestreo de los volátiles de interés contenidos en el frasco se realizó utilizando una técnica denominada microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés *Solid Phase Micro Extraction*), la cual permite un muestreo rápido. Para ello se insertó a través del septo del frasco vial una fibra SPME de Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) y se expuso durante 10 min en el espacio de cabeza del vial para que se adsorbieran y concentrarán en los aromas presentes. Finalmente, la fibra fue desorbida térmicamente durante 5 min a 250 °C en el inyector del cromatógrafo de gases. El análisis por cromatografía de gases de los compuestos volátiles del aroma del jitomate se realizó en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5800

serie II, Palo Alto, USA) utilizando una columna D-B-WAXTER, con una longitud de 60m, 0.32mm de diámetro interno y 1 μ m de fase estacionaria (J & W Scientific. Folsom, USA), mediante un detector de ionización de flama. Se utilizó el siguiente programa de temperatura: Inicio a 60 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 90 min y luego subiendo a 230 °C a razón de 2 °C/min para mantener esta temperatura durante 15 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250 y 280 °C respectivamente.

La identificación de los compuestos del aroma se hizo por la comparación con estándares químicos puros marca sigma aldrich.

7.4 Determinación de la capacidad antioxidante total

La determinación de la capacidad antioxidante se basó en la evaluación de la capacidad del jugo de jitomate para secuestrar radicales libres por el método descrito por Brand-William y colaboradores en 1995. Se preparó una solución de DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidracil) 0.6 mM en metanol. Se utilizaron diferentes diluciones del jugo (1:1 ó 1:10) en metanol al 80% (v/v). La mezcla de reacción contenía 50 μ L de una solución de ácido ascórbico 2.5 mM o 50 μ l de jugo de jitomate y 950 μ L de la solución de DPPH 0.6 mM y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La capacidad antioxidante se determinó como el decremento de la absorbancia a 515 nm. Los resultados fueron expresados como la capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico mM (CAEA).

7.5 Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes

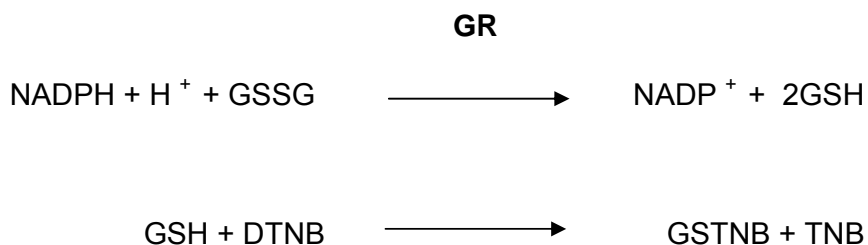
7.5.1 Glutación Reductasa

Obtención del extracto

Se pesaron 3 g de pericarpio de jitomate y fueron colocados en un mortero preenfriado. El tejido fue homogenizado con 15 mL de buffer de extracción (fosfato de potasio 0.1 M pH 7.5, conteniendo EDTA 0.5 M), posteriormente fue filtrado a través de una gasa. El filtrado se centrifugó a 20,000 × g por 10 min a 4 °C. Se desechó la pastilla y el sobrenadante fue usado como fuente enzimática para la determinación de la actividad de la enzima glutatión reductasa.

Determinación de la actividad

La determinación de la actividad de la enzima GR se basó en la reducción del GSSG con NADPH, catalizada por esta enzima. El GSH que se produce, reacciona a su vez con el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) formándose ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), de acuerdo a las siguientes reacciones. El TNB es el cromóforo responsable del color que se midió en el espectrofotómetro a 412 nm (Smith y col., 1988).



En una celda de 2 mL, se adicionaron:

- 1 mL de fosfato de potasio 200 mM pH 7.5, conteniendo EDTA 1 mM
- 0.5 mL de fosfato de potasio 0.01 mM, conteniendo DNTB 3 mM

- 0.1 mL de NADPH 2 mM
- 0.3 mL de extracto enzimático, el cual se mantuvo en hielo durante la preparación de la muestra.

La reacción se inició con la adición de 0.1 mL de GSSG 20 mM. La mezcla se agitó e incubó a 24 °C. Posteriormente, se midió la absorbancia a 412 nm cada 30 s durante 2 min. Considerando 0.01 U de GR como la cantidad de enzima necesaria para lograr una ΔA de 0.4 a 412 nm (Smith y col., 1988).

7.5.2 Ascorbato peroxidasa

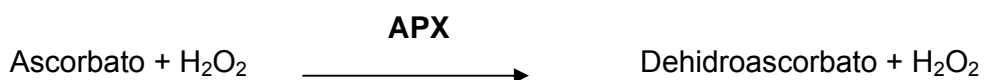
Obtención del extracto

Se pesó 1g de muestra de tejido de pericarpio de jitomate saladette variedad '7705' y se colocó en un mortero preenfriado. El tejido fue homogeneizado a 4 °C con 10 mL de buffer de extracción de fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, conteniendo EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 1 mM y PVP 1 % (p/v), el cual fue previamente desgasificado burbujeándole nitrógeno durante 5 min para eliminar el oxígeno. El homogenado se centrifugó a 15,300 x g a 4 °C durante 15 min. La pastilla se desechó y el sobrenadante se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones. El sobrenadante de la segunda centrifugación se usó para determinar la actividad de la enzima.

Determinación de la actividad

La determinación de la actividad de la enzima APX se basó en la medición espectrofotométrica de la disminución de absorbancia a 290 nm debido a la

oxidación de ascorbato a DHA por H₂O₂. La absorbancia del ascorbato se midió acuerdo a la siguiente reacción.



En una celda de cuarzo se colocó un 1 mL de buffer de actividad (fosfato de potasio 50 mM pH 7.0, conteniendo ácido ascórbico 0.5 mM) desgasificado de la misma manera que el buffer de extracción + 500 µL de extracto enzimático + 40 µL de H₂O₂ 5 mM y se agitó. Se midió la absorbancia cada 5 s a 290 nm por 1 min. Para determinar la actividad enzimática se consideró que una disminución de 0.01 en la absorbancia correspondía a 3.6 µmol de ascorbato de potasio oxidado. Una unidad de APX se define como la cantidad de enzima que oxida 1 µmol de ascorbato por minuto a temperatura ambiente (Nakano y Asada, 1981).

7.6.1 Niveles de Glutación GSH/GSSG

Los niveles de glutación fueron determinados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando la metodología de Mustacich (1999) con las siguientes modificaciones.

Se molieron, en un mortero preenfriado, 7 g de pericarpio de jitomate utilizando nitrógeno líquido, posteriormente al polvo se le adicionaron 2.5 mL de una solución para precipitar proteínas (mezcla de ácido perclórico (PCA) y de ácido batofenantrolin disulfónico (BPDS) al 10% v/v). La mezcla se centrifugó a 8,500 x g durante 5 min a 4 °C, el sobrenadante se usó para el proceso de derivatización.

Para la derivatización, se colocaron en un tubo eppendorf 250 μ L del extracto de PCA/BPDS y 1 mL de FDNB (1-fluor-2-4-dinitrobenzeno) al 1 % (v/v) se agitó vigorosamente y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una segunda incubación toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó la mezcla a 13,000 x g por 1 min a temperatura ambiente.

El sobrenadante se utilizó para el análisis del glutatión por HPLC en fase reversa utilizando una columna de Silica 3-aminopropiltriétoxi silicano y como fase móvil un gradiente de concentraciones de las mezclas de las soluciones A conteniendo Metanol 80 % (v/v) y la B que contenía 0.5 M de acetato de sodio/64% de metanol (v/v) pH 4.5. El gradiente se inició de 0 a 8 min con una mezcla de 80%A/20%B, posteriormente de 8 a 33 min se usó una mezcla de 1% A/ 99% B y finalmente con el objetivo de reequilibrar la columna de 33 a 48 min se usó nuevamente una mezcla 80%A/20%B. Se utilizó un detector UV a una longitud de onda de 365 nm. Los tiempos de retención fueron de 17.95 y 20.15 min para el GSH y el GSSG respectivamente.

7.6.2 Niveles de ácido ascórbico

Se utilizó jugo de jitomate de cada estado de madurez, el cual se diluyó 1:2 con agua, de esta dilución se tomaron 100 μ L para la determinación de ácido ascórbico.

Los niveles de ácido ascórbico fueron cuantificados espectrofotométricamente por el ensayo colorimétrico comercial (Boehringer Mannheim cat 101409677035). En este ensayo, el L-ácido ascórbico y otras sustancias representadas como X-H₂, reducen las sales de tetrazolio [(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio] MTT en presencia de un acarreador de electrones PMS

(5-metilfeinizidium metasulfato) a un pH de 3.5 para generar formazan como se muestra en la reacción.



Para la determinación específica de L-ácido ascórbico en la muestra blanco el ácido ascórbico es removido específicamente por la enzima ascorbato oxidasa AAO en presencia del oxígeno del aire, como se muestra en la reacción, por lo que la reducción estará dada por XH_2 .



La diferencia de absorbancias entre la muestra ($\text{AA} + \text{XH}_2$) y la muestra blanco (XH_2) es equivalente a la cantidad de AA en la muestra. El MTT-formazan es el parámetro de medida y es determinado con la absorbancia en la región del espectro visible a 578 nm como se muestra en la reacción y los resultados son expresados como μg de AA/L de jugo.

7.6.3 Niveles de ácido cítrico

Los niveles de ácido cítrico fueron determinados espectrofotométricamente con un ensayo enzimático comercial (Boehringer Mannheim cat 10139076035). En este ensayo el ácido cítrico contenido en 200 μL de jugo de jitomate se convierte a oxaloacetato y acetato en la reacción catalizada por la enzima citrato liasa. En presencia de las enzimas malato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa, el oxaloacetato y su producto de descarboxilación piruvato, se

reducen a malato y lactato por NADH, produciendo la coenzima oxidada NAD^+ . La cantidad de la coenzima oxidada a 430nm en la reacción se relacionó estequiométricamente con el ácido cítrico presente en la muestra.

7.7 Determinación de los niveles de lipoperoxidación y proteínas oxidadas

7.7.1 Lipoperoxidación

Se pesaron 0.5 g de jitomate y se homogenizaron con 5 mL de amortiguador de Tris 20 mM, pH 7.4, a 4°C; el homogenado se centrifugó a 19,000 x g por 15 min a 4°C. Se utilizó el sobrenadante para la determinación de los niveles de lipoperoxidación por medio de un ensayo comercial (Bioxytech LPO-586, Oxis) que se basa en la cuantificación de malondialdehído (MDA) producto de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas. El ensayo de LPO-586 está basado en la reacción del MDA con un agente cromógeno, el N-metil-2-fenilindol (R1), catalizada por HCl. Una molécula de MDA reacciona con dos moléculas de R1, para dar un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 586 nm y los resultados son expresados en μM de MDA.

7.7.2 Determinación de proteínas oxidadas

Para la determinación de proteínas oxidadas se molieron 3 g de pericarpio de jitomate en un mortero preenfriado con 7 mL de una solución amortiguadora (Tris-HCl 50 mM, pH 7) la cual fue centrifugada a 10,000 x g durante 15 min a y el sobrenadante fue concentrado en tubos AMICON ULTRA por 40 min a 4 ° C. El concentrado fue usado para la determinación por medio de un ensayo

comercial (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit S7150) que se basa en la detección de grupos carbonilo introducidos en las proteínas por reacciones oxidativas provocadas por las ERO.

8 RESULTADOS

8.1 Niveles de compuestos volátiles

Los compuestos volátiles 6-metil-5-hepten-2-ona y β -ionona derivados del metabolismo de carotenos mostraron mayores niveles en el jitomate '7705' en el estado de maduración verde y disminuyeron significativamente cuando los frutos llegaron al estado rompiente para después no mostrar cambios significativos durante el resto del proceso de maduración (Fig. 5). Los niveles de los apocarotenoides β -damascenona y geranilacetona no se modificaron significativamente durante la maduración de los frutos de esta variedad de jitomate como se muestra en la figura 5. De modo que el fenómeno de maduración afectó los niveles de algunos de los volátiles apocarotenoides ($p=0,0124$) derivados de carotenos.

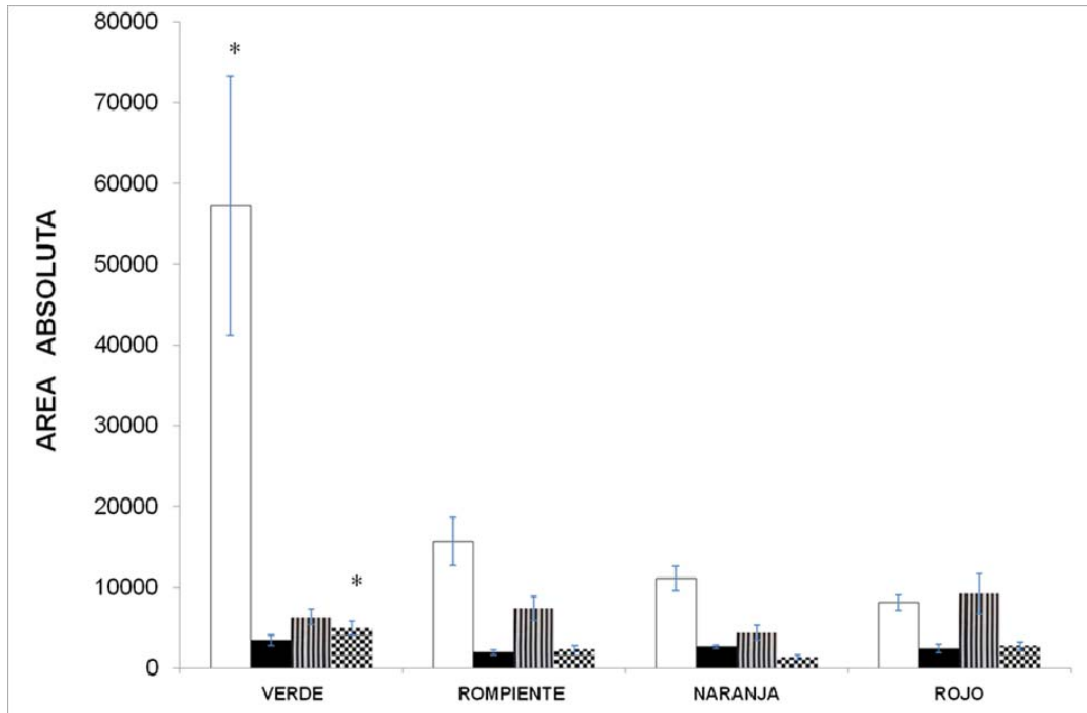


Figura 5. Niveles de los aromas derivados de carotenos durante la maduración de jitomate saladette '7705'. 6-metil-5-hepten-2-ona β -damascenona Geranilacetona β -lonona. Las barras indican la desviación estándar de n=3 datos mientras los asteriscos indican diferencias significativas entre estados de madurez.

8.2 Capacidad antioxidante total

Un parámetro importante que determina el valor nutricional de un fruto es su capacidad antioxidante, es decir su capacidad para secuestrar y/o prevenir la formación de radicales libres. En este trabajo se cuantificó la capacidad antioxidante total, expresada en equivalentes de AA, durante la maduración del jitomate. Los resultados encontrados mostraron que la capacidad antioxidante total del jitomate, aumentó significativamente ($p=0,001$) del estado de maduración verde al rompiente para posteriormente mantener estos niveles en los estados de madurez naranja y rojo como se muestra en la figura 6.

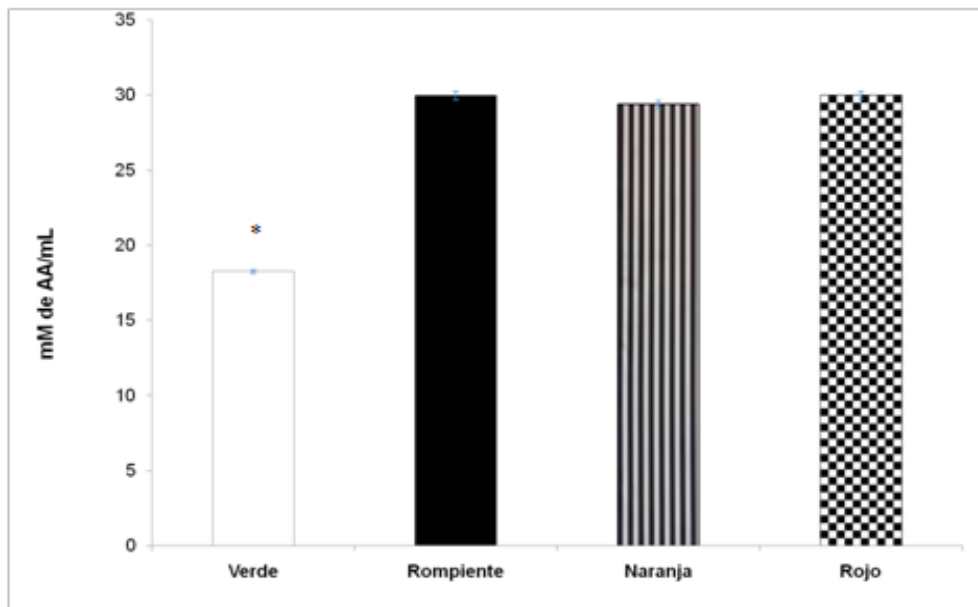


Figura. 6.- Capacidad antioxidante total en equivalente a mM de A.A durante la maduración de jitomate '7705'. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre estados de madurez. Las barras verticales muestran la desviación estándar de una n=3 determinaciones.

8.3 Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR)

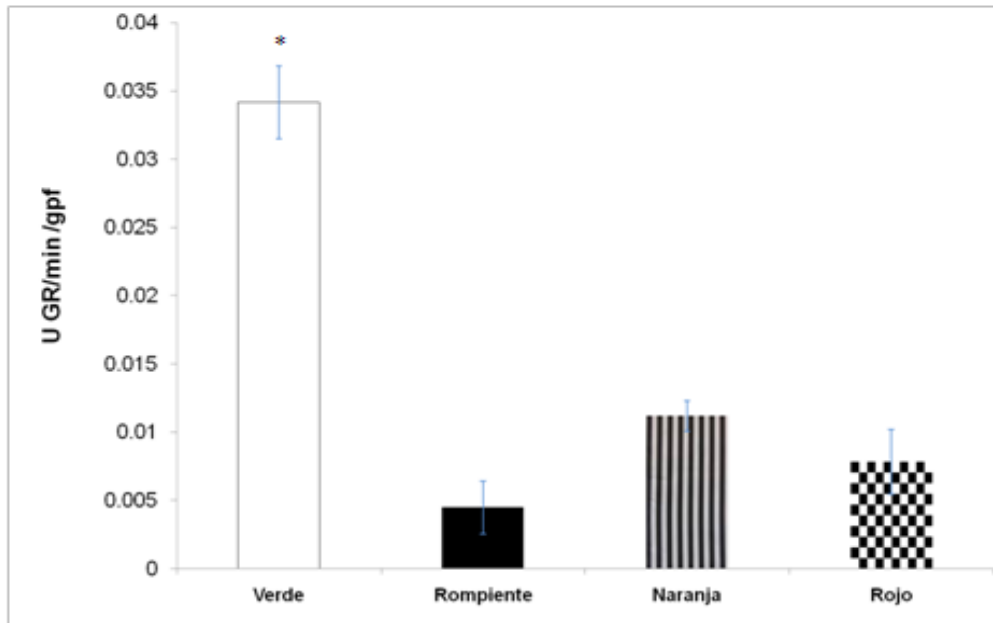


Figura. 7.- Actividad de la enzima glutatión reductasa durante la maduración de jitomate '7705'. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre estados de madurez. Las barras verticales muestran la desviación estándar de una n=3 determinaciones.

La actividad de la enzima glutatión reductasa involucrada en el control de las ERO, mostró una disminución significativa del estado de madurez verde al rompiente, para posteriormente permanecer sin cambio en los siguientes estados de madurez como se muestra a en la figura 7 mostrando que el fenómeno de maduración afectó los niveles de GR ($P < 0,001$) en jitomate saladette '7705'.

8.4 Actividad de la enzima ascorbato peróxidasa (APX)

La actividad de la enzima ascorbato peróxidasa perteneciente al ciclo ascorbato glutatión, mostró una disminución significativa del estado de maduración verde al rompiente, posteriormente la actividad de esta enzima no mostró cambio significativo durante los restantes estados de maduración, como se muestra en la figura 8. El proceso de maduración afectó la actividad de esta enzima con un nivel de significancia ($p < 0,001$) en esta variedad de jitomate.

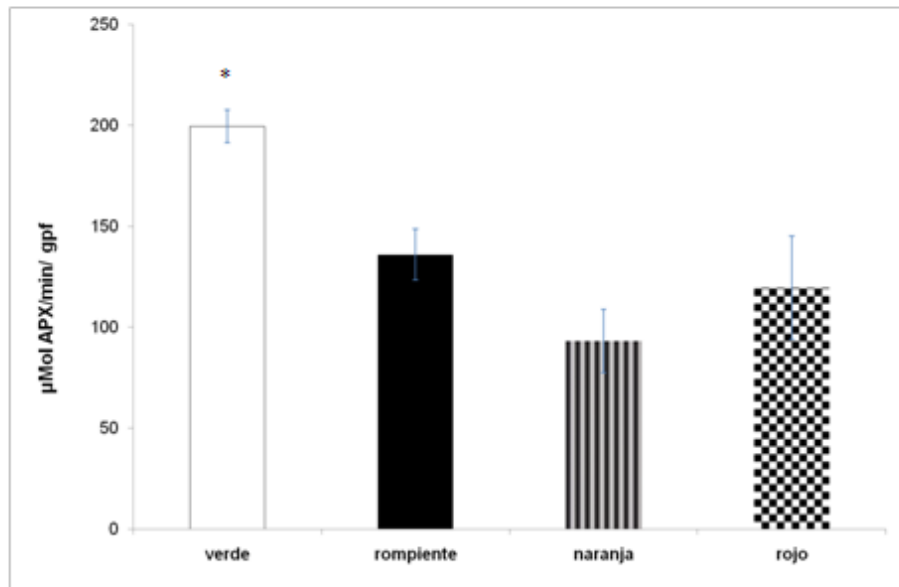


Fig. 8.- Actividad de la enzima ascorbato peróxidasa durante la maduración de jitomate '7705'. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre estados de madurez. Las barras verticales indican la desviación estándar de $n=3$ determinaciones.

8.5 Relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG)

Los niveles de glutatión en su forma reducida fueron altos en el jitomate '7705' en el estado de madurez verde y fueron disminuyendo significativamente en forma general durante el avance de la maduración, sin embargo se observó un

aumento significativo en el estado naranja de maduración (tabla 1). Por su parte, los niveles de glutatión oxidado fueron también altos en el estado verde de maduración y disminuyeron significativamente conforme avanzaba este proceso. El cociente GSH/GSSG fue bajo al inicio de la maduración de consumo y fue aumentando conforme los frutos iban madurando, al mostrar un pico en el estado naranja del GSH como se muestra en la tabla 1. Los niveles de glutatión total disminuyeron significativamente en el jitomate en estado de madurez rojo comparado con el estado verde.

Tabla 1. Niveles de GSH, GSSG, total y cociente durante la maduración de jitomate '7705'. Las desviaciones mostradas fueron tomadas de 3 muestras independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas entre estados.

Estado	nMol GSH/gpf ± Desv.Est.	nMol GSSG/gpf ± Desv.Est.	Total	GSH/GSSG
Verde	195.25 ± 67.2	*11.0 ± 6.3	206.25	17.71
Rompiente	*63.28 ± 11.9	1.44 ± 0.37	64.72	43.50
Naranja	148.41 ± 53.6	1.14 ± 0.17	149.55	130.04
Rojo	*75.60 ± 24.1	0.89 ± 0.33	76.49	85.40

8.6 Niveles de Acido Ascórbico A.A

Los niveles de este metabolito importante tanto para plantas como para animales, mostró durante la maduración de jitomate saladette '7705' un incremento significativo del estado de madurez verde al rompiente, estos niveles se mantuvieron constantes en jitomate naranja para finalmente aumentar significativamente en el estado de madurez rojo como se muestra en la figura 9. El fenómeno de maduración afectó los niveles de esta molécula con una significancia ($p=0.0003$).

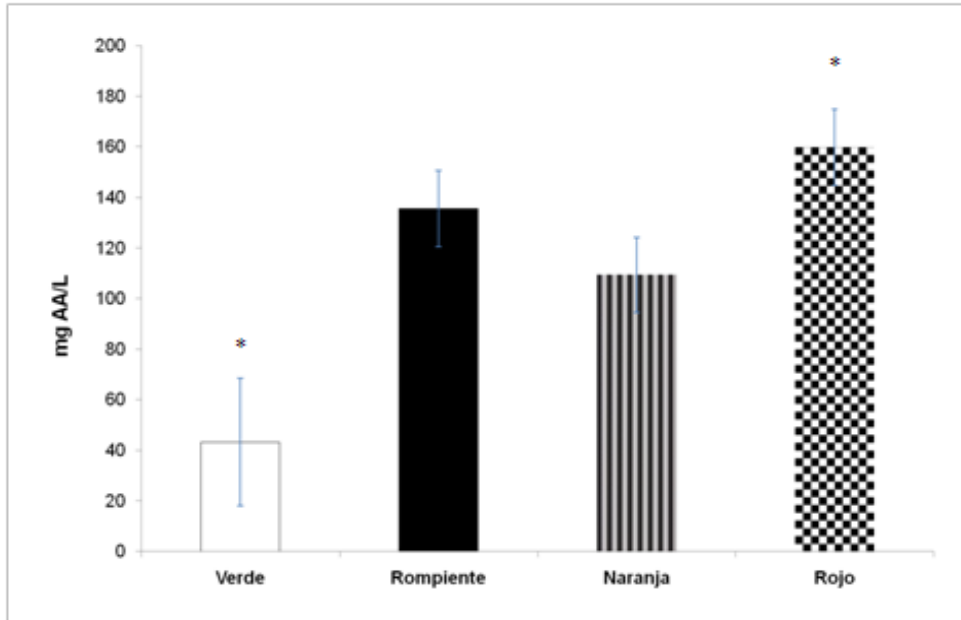


Figura 9.- Niveles de ácido ascórbico durante la maduración de jitomate '7705'. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre estados de madurez. Las barras verticales muestran la desviación estándar de 3 muestras independientes.

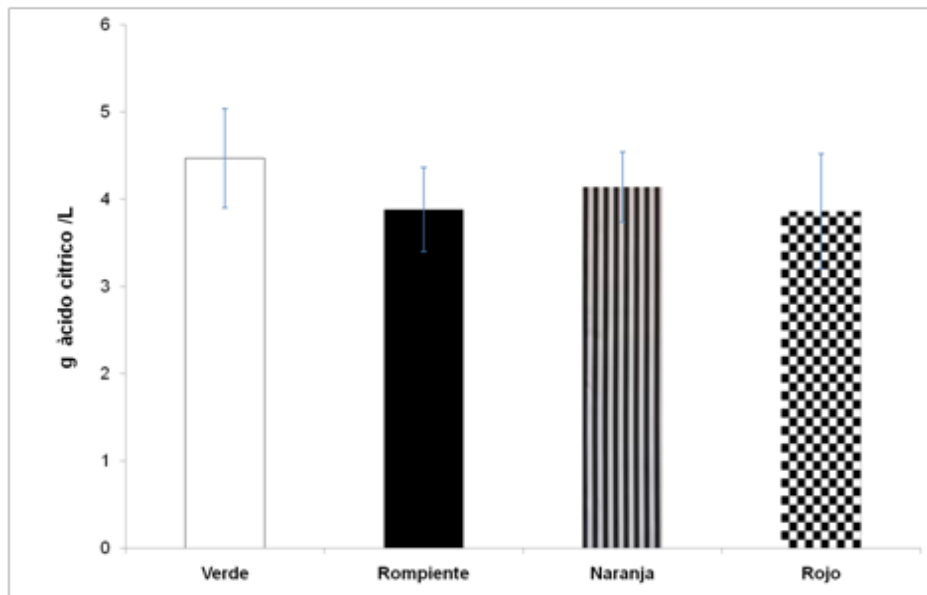


Figura 10.- Niveles de ácido cítrico durante la maduración de jitomate saladette '7705'. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre estados de madurez. Las líneas verticales indican la desviación estándar de una n=3 datos independientes.

8.7 Acido Cítrico

No hubo cambios significativos en los niveles de ácido cítrico presentes durante el proceso de maduración del jitomate saladette '7705' (Fig.10).

8.8 Daño a Lípidos

Durante el proceso de maduración del jitomate '7705', los niveles de los productos derivados de la peroxidación de lípidos por ERO como MDA se incrementaron significativamente del estado de madurez verde a rompiente para posteriormente en el estado naranja mostrar un declive también significativo. En el estado de maduración rojo, los niveles de lipoperoxidación se incrementaron al doble con respecto al verde con un nivel de significancia de ($p < 0,001$) como se muestra en la figura 11.

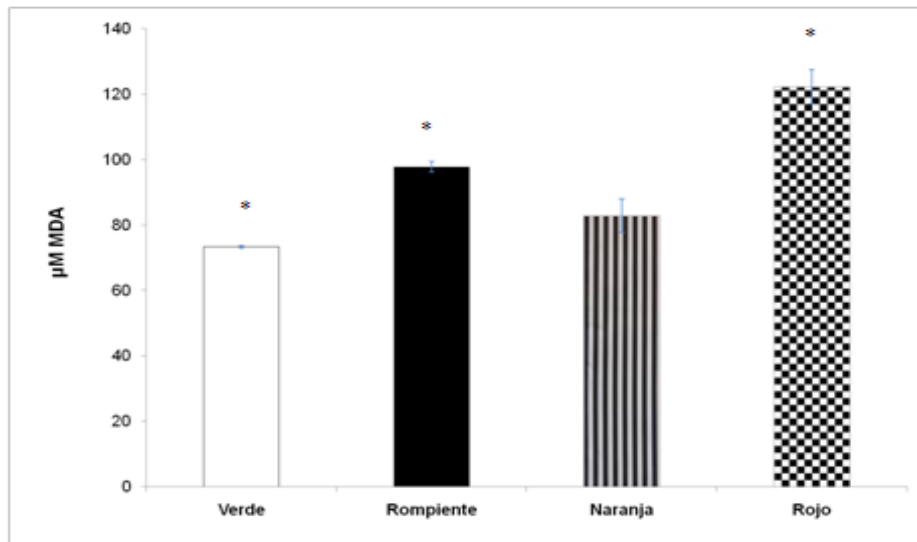


Figura11.- Niveles de lipoperoxidación durante la maduración de jitomate '7705'. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre estados de maduración. Las líneas verticales indican la desviación estándar de una n=3 datos independientes.

8.9 Proteínas oxidadas

Las proteínas son moléculas propensas a sufrir daño producido por las ERO. Durante la maduración del jitomate '7705' se encontró una mayor cantidad de proteínas oxidadas en frutos en estado de madurez rojo comparado con los frutos en los otros estados de madurez. La determinación semicuantitativa del grado de oxidación de estas macromoléculas se hizo mediante la evaluación en un oxyblot de la intensidad de manchas oscuras que son representativas del número de los grupos carbonilos presentes en las proteínas provenientes de las reacciones oxidativas que ocurren en estas moléculas. La figura 12 muestra el control de carga de 10 µg de proteína.

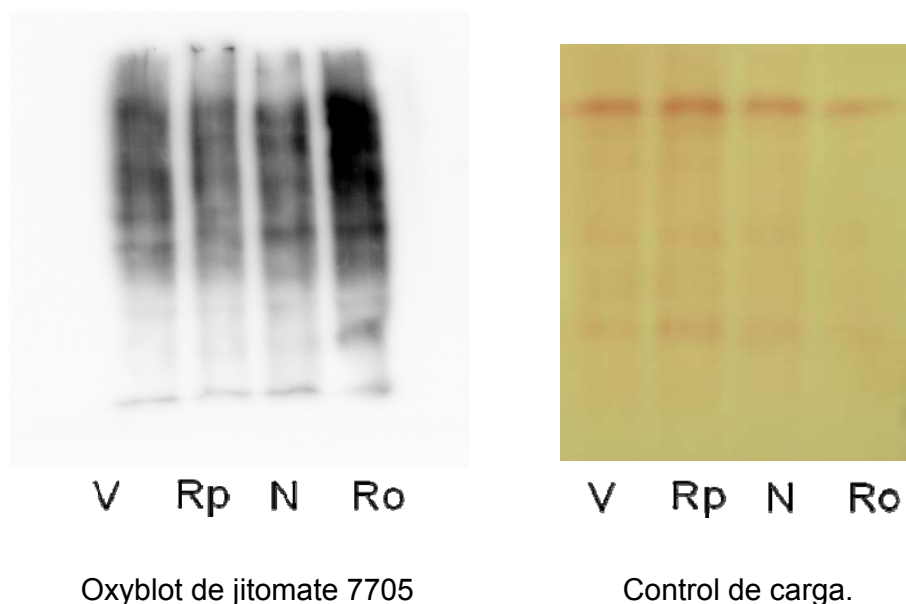


Figura 12.- Daño oxidativo en proteínas de jitomate '7705' durante la maduración. V (verde) ,Rp (rompiente), N (naranja) y Ro (rojo). El ensayo se hizo por triplicado con resultados similares.

9 DISCUSIÓN

Se han estudiado los cambios en el contenido de carotenos durante la maduración de jitomate, reportándose una gran acumulación de los mismos principalmente de licopeno en los plástidos durante la diferenciación de cloroplastos a cromoplastos. Durante este proceso los carotenos se sintetizan en estos organelos a partir del isopentil difosfato con la participación de enzimas codificadas en el ADN nuclear (Bartley, 1995; Bramley, 2002; Christopher y col., 2009).

En este estudio, se encontró que los apocarotenoides 6-metil-5-hepten-2-ona y β -ionona, tuvieron una disminución significativa en sus niveles durante la maduración del jitomate '7705', mientras que la β -damascenona y la geranilacetona, no mostraron cambios significativos en sus niveles. Encontrándose finalmente, que en los frutos en estado de madurez naranja o rojo los niveles de estos cuatro apocarotenoides fueron bajos, en comparación con otros compuestos volátiles como el hexanal, el cual es uno de los volátiles con más alta concentración en el aroma del jitomate '7705'.

Estos resultados son consistentes con los reportados en la literatura en jitomate fresco en los que se encontró que las concentraciones de 6-metil-5-hepten-2-ona, β -ionona, β -damascenona y geranilacetona, son bajas, en comparación con otros volátiles presentes en el aroma de estos frutos (Yilmaz, 2001; Baldwin y col., 2000). Sin embargo, a pesar de sus niveles bajos estos cuatro apocarotenoides son considerados como compuestos de impacto por su gran influencia en el aroma del jitomate fresco (Yilmaz, 2001; Baldwin y col., 2000). Esto es debido a que los humanos somos muy sensibles a estas moléculas teniendo umbrales de olor extremadamente bajos. Esto explica porque a pesar

de su escasa abundancia son muy importantes en el aroma de jitomate (Yilmaz, 2001; Baldwin y col., 2000; Klee, 2010).

El hecho de que los apocarotenoides volátiles estudiados en el presente estudio no se acumularan durante las etapas avanzadas de maduración de consumo del jitomate '7705' podría deberse a una disminución en la actividad de las enzimas dioxigenasas que los producen o a una baja concentración de los carotenos que son los sustrato de estas enzimas en la generación de dichos volátiles. Simkin y colaboradores (2004) reportaron que las enzimas LeCCD que generan estos volátiles están presentes durante todas las etapas de maduración de frutos de jitomate variedad 'M82'. Por otra parte, se ha reportado que en la variedad de jitomate 'M82' estos volátiles no se acumularon durante la maduración de los frutos y que su acumulación coincide con una mayor disponibilidad de sustratos para las enzimas que los producen, de modo que los niveles de estos volátiles están muy relacionados con el contenido de carotenos (Tieman y col., 2006).

En el presente estudio se encontró que la capacidad antioxidante total del jitomate '7705' fue baja en frutos en etapa de maduración verde, y posteriormente se incrementó en las siguientes etapas de maduración, sugiriendo que las moléculas como los compuestos fenólicos, los tocoferoles ó carotenos que se acumulan durante las etapas finales de maduración soportan en mayor grado la detoxificación de las ERO.

Un sistema de detoxificación de las ERO en plantas es el ciclo ascorbato-glutación que además actúa como una ruta de regeneración de dos moléculas con funciones antioxidantes importantes como el A.A y GSH. Durante la maduración del jitomate '7705' la actividad de dos de las enzimas

pertenecientes a este ciclo, la GR y la APX mostraron una actividad alta en el estado de maduración verde y luego disminuyeron significativamente su actividad en el estado rompiente de maduración, manteniéndose posteriormente sin cambios significativos en su actividad. Estos resultados coinciden con los reportados por Jiménez y colaboradores (2002) en la variedad de jitomate 'Alicia Craig' donde estas enzimas mostraron actividades altas en estados tempranos de maduración.

La mayor actividad de la enzima GR en el estado verde de maduración del jitomate '7705' encontrada en este trabajo, coincide con los altos niveles de GSH total detectados en esta misma etapa (tabla 1). En etapas posteriores de maduración, cuando la actividad de la enzima disminuyó los niveles de GSH total también disminuyeron (tabla 1).

En el presente estudio, los niveles de GSH se incrementaron significativamente en el estado de maduración naranja para posteriormente disminuir en el estado de maduración rojo, este pico en el naranja no coincide con la actividad de la enzima GR cuantificada en jitomate saladette '7705', este incremento podría deberse a que el GSH se puede sintetizar *de novo* en los cloroplastos o en el citosol (Noctor y col., 2002; Jefferies y col., 2003).

Una pérdida gradual en la capacidad para neutralizar a los radicales libres debido a la reducida captación de éstos por los sistemas antioxidantes enzimáticos puede ser fundamental para muchos cambios asociados a la maduración de frutos (Brennan y Frenkel., 1977; Rogiers y col., 1998) como se puede mostrar en jitomate '7705' al disminuir significativamente la actividad de ambas enzimas del ciclo ascorbato-glutati6n APX y GR (Fig. 7,8) del estado

verde al rompiente sin mostrar incremento posterior. Sin embargo, el aumento gradual de los niveles de A.A y el incremento de GSH de rompiente a naranja podrían indicar que en etapas posteriores al verde del proceso de maduración la capacidad para neutralizar ERO en este fruto, puede estar dada por estos mecanismos antioxidantes no enzimáticos.

Así mismo, los resultados mostraron cambios en la relación GSH/GSSG durante la maduración de jitomate '7705'. Esta relación refleja el estado reducido celular tuvo un aumento durante las primeras etapas de la maduración con los niveles más altos en jitomate naranja (tabla 1). Como las células generan constantemente las ERO durante el metabolismo aeróbico, el estado oxidativo es fundamental en el mantenimiento de la viabilidad celular lo que podría dar indicio a diversos fenómenos como la señalización, la expresión génica o el proceso senescencia (Jefferies y col., 2003). En este sentido, en hojas senescentes se ha observado que la relación GSH/GSSG se redujo 90 % (Noctor y col., 2002) y durante la maduración de la variedad de jitomate 'Alicia Craig' la forma reducida de GSH mostró niveles altos en la etapa rompiente lo que podría correlacionar con el pico climatérico donde se ha reportado una producción de ERO en este estado (Jiménez y col., 2002). En jitomate '7705' una baja relación GSH/GSSG en estados de madurez tempranos podría indicar un alto índice de procesos metabólicos tales como el crecimiento, como observó en la maduración de guillomo (*Amelanchier alnifolia*) donde se sugiere que el GSH y enzimas asociadas a esta molécula como GR tienen papeles claves conteniendo el estrés oxidativo (Rogiers y col., 1998).

La actividad alta de la enzima APX en la etapa de madurez verde podría indicar que esta enzima tiene un papel importante en la remoción de H₂O₂ en

este estado. Así también esta enzima tiene una función importante en el metabolismo del A.A al usarlo como cofactor de la reacción para eliminar el peróxido de hidrógeno, de modo que la disminución en la actividad de la enzima APX coincide con el aumento del A.A durante la maduración de jitomate '7705'. Estos resultados coinciden con los reportados por Jimenez y colaboradores, (2002) y Loannidi y colaboradores, (2009) quienes observaron que durante la maduración del jitomate 'Alicia Craig' había un incremento en este metabolito antioxidante.

La acumulación de A.A encontrada en las últimas etapas de maduración del jitomate '7705' podrían indicar la diversidad de funciones de este metabolito, como cofactor de varias enzimas, en la resistencia al estrés, en la expansión celular, así como en el inicio de la senescencia (Loannidi y col., 2009). El consumo de este antioxidante en la dieta ha demostrado claros beneficios para la salud humana debido a que tanto los seres humanos como otros primates no son capaces de sintetizarlo debido a que tienen el último paso de la vía de síntesis mutado. Por lo tanto, hay un gran interés en el desarrollo de cultivos genéticamente modificados con altos niveles de antioxidantes como el A.A. Además de tener beneficios para la salud humana, los niveles altos de A.A generan una mayor tolerancia a ciertos tipos de estrés e incrementan la calidad postcosecha de las frutas (Di Matteo y col., 2010).

Durante el proceso de maduración del jitomate '7705' ocurren daños causados por las ERO, a las biomoléculas como las proteínas y los lípidos. El daño en ambas biomoléculas mostró la misma tendencia, presentándose un daño mayor en lipoperoxidación y proteínas oxidadas en jitomate en el estado de madurez rojo (Fig. 11,12) corroborando así que el proceso de maduración es

un proceso oxidativo de senescencia regulada que prosigue a la madurez fisiológica y lleva a la muerte del tejido. No hay duda de que el fenómeno de maduración en el desarrollo de tejidos acelera el inicio de la senescencia y por lo tanto la probabilidad de lesiones y muerte (Brady, 1987).

En estados de madurez avanzados, al parecer los sistemas antioxidantes no logran mantener a las biomoléculas sin daño oxidativo, quizá porque su actividad se reduce como se puede mostrar con la disminución de las enzimas antioxidantes o tal vez porque los niveles de las ERO que se generan son tan altos que estos sistemas antioxidantes prevaletentes no son suficientes para eliminarlos y que no produzcan daño oxidativo. En general los daños oxidativos de lípidos observados como niveles de LPO y la cantidad de grupos carbonilos detectados en frutos de jitomate 7705 en estado de madurez rojo coinciden con lo reportado durante la maduración del jitomate 'Alicia Craig' (Jimenez y col., 2002).

10 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que durante la maduración del jitomate '7705' ocurren cambios en el estado oxidativo.

En el estado de madurez verde la actividad de las enzimas GR y APX pertenecientes al ciclo ascorbato-glutati6n es alta. Los niveles elevados de GSH encontrados en este estado de maduraci6n tienen una buena correlaci6n con la actividad alta de la enzima GR, la cual produce GSH a partir de GSSG. Asimismo, los bajos niveles de AA pueden ser explicados por la actividad alta de APX, ya que esta enzima toma este metabolito como donador de electrones para detoxificar el H₂O₂. Los resultados obtenidos sugieren que en el estado de maduraci6n verde, los sistemas antioxidantes enzimáticos (GR y APX) son los encargados de la detoxificaci6n de las ERO, regenerando tambi6n mol6culas antioxidantes importantes como GSH.

Conforme avanza la maduraci6n hasta alcanzar el estado rojo, la actividad de estas enzimas antioxidantes, as6 como los niveles de GSH disminuyen significativamente, mientras que los niveles de AA se incrementan. Por otra parte, la capacidad antioxidante del jitomate se incrementa en el estado de maduraci6n rompiente y se mantiene en los estados posteriores de maduraci6n. Estos resultados sugieren que la principal fuente de remoci6n de ERO en estados de maduraci6n posteriores al verde son los sistemas antioxidantes no-enzimáticos como el A.A y el licopeno (carotenoide responsable del color rojo de estos frutos) que esta reportado que se acumula durante la maduraci6n.

En el estado de maduración rojo, aunque se presenta una alta capacidad antioxidante, la cuantificación del daño oxidativo a lípidos y proteínas indicaron un daño significativamente mayor en ambas biomoléculas, respecto al observado en estado verde, lo cual podría deberse al proceso natural de senescencia al final de la madurez de consumo donde existe una acumulación de ERO que supera la capacidad de los sistemas antioxidantes prevaletentes, los cuales son insuficientes para la eliminación de estas especies.

Así mismo, los cambios en el estado oxidativo de jitomate '7705' pueden explicar los cambios en los niveles de los volátiles provenientes del metabolismo de carotenos, los cuales disminuyeron o permanecieron bajos en etapas avanzadas de la maduración de consumo. Esto podría deberse a que sus sustratos, los carotenos, están siendo usados para la síntesis de licopeno y β -caroteno.

11 PERSPECTIVAS

- ❖ Se necesita profundizar en el conocimiento de los mecanismos de regulación de la expresión de los genes correspondientes a las enzimas que generan los volátiles apocarotenoides, así como la regulación de su actividad y la producción de estos volátiles del aroma durante la maduración de los frutos, considerando que el aroma es un parámetro importante de la calidad sensorial del fruto para el consumo del ser humano.
- ❖ Por otro lado, son necesarios otros estudios para tener una visión general de los procesos oxidativos que tienen lugar durante la

maduración de frutos de jitomate '7705'. Por esta razón, es importante indagar acerca de las vías de señalización relacionadas con la expresión de las enzimas que intervienen en los mecanismos de detoxificación de las ERO ó en la síntesis y regeneración de metabolitos antioxidantes como el GSH y el A.A, aplicando diversas técnicas de biología molecular, y bioquímica para el estudio de estos procesos oxidativos durante la maduración de los frutos. En este sentido es relevante investigar los niveles de ERO, así como la actividad de otras enzimas pertenecientes al ciclo ascorbato-glutación tales como la dehidroascorbato reductasa y la monodehidroascorbato reductasa, así como, la evaluar las actividades de otras enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa, que también participan en la detoxificación de radicales libres. Estos resultados nos darían un panorama global de los sistemas antioxidantes enzimáticos durante la maduración del jitomate '7705'.

- ❖ También es necesaria la evaluación de la actividad de las enzimas productoras de las ERO como la Xantina Oxidasa y la NADPH oxidasa entre otras, para determinar la fuente de las ERO durante la maduración del jitomate '7705'.

12 BIBLIOGRAFIA

Abushita, A., Hebshi, E., Daood, A., Biacs, H. 1997. Determination of antioxidant vitamins in tomatoes. *Food Chemistry*. Vol. 60: pp 207-212.

Alexander, L., Grierson, D. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53: pp 2039-2055.

Asada, K. 1996. Radical production and scavenging in the chloroplasts. En Baker, N.R. (ed.), *Photosynthesis and the Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 123–150.

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

Bartley, G.E., Scolnik, P.A. 1995. Plant carotenoids: Pigment for photoprotection, visual attraction and human health. *Plant Cell*. Vol. 7: pp 1027-1038.

Beecher, G.R. 1997. Nutrient content of tomatoes and tomatoes products. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Vol. 218: pp 98-100.

Blackman, F., Parija, P. 1928. Analytic studies in plant respiration. *Proceedings of the Royal Society of London B*, Vol. 103: pp 412-445.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagersted, K. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. A review. *Annals of Botany*. Vol. 91: pp 179-194.

Brady, C.J. 1987. Fruit Ripening. *Plant Physiology*. Vol. 38: 155-178

Bramley, P.M. 2002. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53: pp 2107-2108.

Brand-William, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.1995. Use of a free radical method to evaluate activity antioxidant. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie. Food Science and Technology. Science + Technologie Alimentaire*. Vol. 28: pp 25-30.

Brennan, T., Frenkel, C.1977. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. *Plant Physiology*. Vol. 59: pp 411-416.

Carrari, F., Fernie, A.R. 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 57: pp 1883-1897.

Christopher, I., Cazzonelli, A.J., Cuttriss, S., Cossetto, B., William Pye, Peter Crisp., JimWhelan, E., Jean Finnegan, C., Barry, J., Pogsona G. 2009. Regulation of carotenoid composition and shoot branching in arabidopsis by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell*. Vol. 21: pp 39-53.

Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M., Cruz De Carvalho, M., A Darcy., Lameta, S., Zuily-Fodil., Y. 2006. Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of Botany* . Vol. 98: pp 1279–1287.

Cruz-Rus, E., Botella, M., Valpuesta, V., Gomez-Jimenez, M. 2010. Analysis of genes involved in L-ascorbic acid biosynthesis during growth and ripening of grape berries. *Journal of Plant Physiology*. Vol.167: pp 739–748.

Di Mascio, P., Kaiser H., Sies, H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 274: pp 532-538.

Di Mascio, P., Murphy, M., Sies, E.H. 1991. Antioxidant defense system: the role of carotenoids, tocopherols and tiols. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 38: pp 118-125.

Di Matteo, A., Sacco, A., Anacleria, M., Pezzotti, M., Delledonne, M., Ferrarini, A., Frusciante, L., Barone, A. 2010. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology*. 10/163.

Edwards, E., Rawsthorne, S., Mullineaux, P. 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*. Vol. 180: pp 278-284.

FAOSTATDatabaseResults2008<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>

Foyer, H., Descourvieres, P., Kuner J. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*. Vol. 17: pp 507-523.

Frenkel, C. 1976. Regulation of ripening in Barlett pears with sulfhydryl reagents. *Botanical Gazette*. Vol. 137: pp 154-159.

Giovannucci, E. 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 91: pp 317-331.

Giuntini, D., Graziani, G., Lercari, B., Fogliano, V., Soldatini, F., Ranieri, A., 2005. Changes in a carotenoid and ascorbic acid in fruits of different tomato genotypes related to the depletion of UV-B radiation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53: pp 3174-3175.

Goddart, M.S., Matthews, R. H. 1979. Contribution of fruit a vegetables to human nutrition. *HotScience*. Vol. 14: pp 245-247.

Hamilton, G. 1974. Chemicals models and mechanism for oxigenases. *Molecular Mechanism of oxygen activation*. Vol. 34: pp 405-451.

Hancock, RD., Viola, R. 2005. Improving the nutritional value of crops through enhancement of L-ascorbic acid (vitamin C) content: rationale and biotechnological opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53: pp 5248-5257.

Hobson, G., Grierson, D. 1993. Tomato. In Seymour, G., Taylor J. y Tiucker G. (ed). *Biochemistry of fruit ripening*. Chapman and Hall Publishing. London, pp. 405-442.

Huang, D., Ou, B., Ronald, L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Quemistry*. Vol. 54: pp 1841-1856.

Jefferies, H., Coster, J., Khalil, A., Bot, J., Rosalie, D., McCauley, D., Hall, J. 2003. Glutathione basic science review. *ANZ. . Journal of Surgery*. Vol. 73: pp 517-522.

Jiménez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., 2002. Changues in oxidative process and components of antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta*. Vol. 214: pp 751-758.

Klee, H. 2010. Improving the flavor of the fresh fruits: genomic, biochemistry and biotechnology. *New Phytologist*. Vol. 187: pp 54-56.

La Vecchia, C. 1997. Mediterranean epidemiological evidence on tomatoes and the prevention of digestive tract cancer. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Vol. 218: pp 125-128.

Lenucci, M., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., Dalessandro, D. 2006. Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 54: pp 2606-2613

Leonardi, C., Ambrosino, P., Espósito, F., Fogliano, V. 2000. Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48: pp 4723-4727.

Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Meir, A., Zamir, D., Tadmor, Y. 2005. Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol.53: pp 3142-3143.

Linster, C., Clarke, S. 2008. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Cell Press*. Vol. 12. pp.1360-1385.

Loannidi, E., Kalamaki, M., Engineer, C., Pateraki, I. Ifigeneia, A., Giovannonni, J., Kanellis, A. 2009. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 60: pp. 663–678.

Matamoros, A., Loscos, J., Karl-Josef, D., Pedro, M., Tejo, A., Becana. M. 2010. Function of antioxidant enzymes and metabolites during maturation of pea fruits. *Journal of Experimental Botany*. Vol 61: pp 87-97.

Mustacich, D. 1999. Measurement of glutathione and glutathione disulfide. *Current Protocols in Toxicology*. John Wiley & Sons, Inc: 6.2.1-6.2.14.

Nakano, A., Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Physiology*, Vol. 22: pp 867-880.

Nguyen, L.M., Schwartz, S.J. 1999. Lycopene: Chemical and biological properties. *Food Technology*. Vol. 53: pp 38-45.

Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H., Foyer, H. 2002. Intereactions between the biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53: pp 1283-1304.

Paliyath, G., Murr, P., Handa, K., Lurie, S. 2004. *Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers*. Editorial Wiley-Blackwell. USA: pp 8. 123,156.

Peralta, I.E., Knapp, S., Spooner, D.M. 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genetics Cooperative Report*. Vol. 56: pp 6-12.

Piña, Z.M., Piña, E. 2008. E. Daño a blancos celulares. En Martínez, M.M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo*. Editorial Manual Moderno, México, pp 97-115.

Raffo, A., Leonardi, C., Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro., L, Bugianesi., R.G. 2002. Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Cv. Naomi F1) harvest at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50: pp 6550-6556.

Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Intervention in Aging*. Vol. 2: pp 219-136.

Rick, Ch.M. 1978. El tomate. *Investigación y Ciencia*. Vol. 25: pp 44-55.

Rinalducci, S., Murgiano, L., Zolla, L. 2008. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 59: pp 3781-3801.

Rogiers, G.N., Suzy, Y., Mohan, K., Richard, K. 1998. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. *Annals of Botany*. Vol. 81: pp 203-211.

Ronen, G., Cohen, M., Zamir, D., Hirschberg, J. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development. *The Plant Journal*. Vol. 17: pp 341-351.

Shao, H., Li-Ye, C., Hua, Z., Cong-Min, K. 2008. Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*. Vol.4: pp 8-14.

Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53: pp 1305-1319.

Simkin, A., Schwartz, S., Aldridge, M., Taylor, M., Klee, H. 2004. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone and geranylacetone. *The Plant Journal*. Vol. 40: pp 882-892.

Slimestad, R., Verheul, J.M. 2005. Seasonal variations in the level of plant constituents in greenhouse production of cherry tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53: pp 3114-3115.

Smith, I., Vierthaler, K.T. 1988. Assay of glutathione in crude tissue homogenates using 5, 5`dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analysis Biochemistry*, Vol. 175: pp 408-412.

Tieman, M.D., Zeigle, M., Schmelz. G., Taylor, P. 2006. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57: pp. 887–896.

Tieman, D., Klee, H.J., Mathieu, S., Cin, V., Fei, Z., Li, H., Taylor, M. 2009. Flavour compounds in tomato fruits: identification of loci and potential pathways affecting volatile composition. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 40: pp 325–337.

Torres, W.H. 2008. El dioxígeno y sus especies. En Martínez, M.M. (Ed.). Radicales libres y estrés oxidativo. Editorial Manual Moderno, México, pp 25-46.

Vranova, E., Dirk, I., Breusagem, V. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53: pp 1227-1236.

White, J.W. 2002. Recent Advance in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53: pp 1995-200.

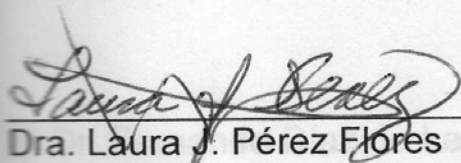
Wickens, A.P. 2001. Aging and the free radical theory. *Respiration Physiology*. Vol.128: pp 379-391.

Yilmaz, E., 2001. The chemistry of fresh tomato flavor. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. Vol. 25: 149-155.

Zuchi, K., Matzuse, N., Kitano, M. 2009. Developmental and tissue-specific changes in oxidative parameters and antioxidant systems in tomato fruits grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*. Vol. 122: pp 362-368.

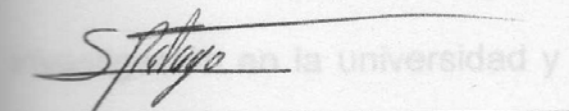
Los miembros del jurado de exámen, designados por el posgrado en Biología Experimental, abajo firmantes aprobaron la tesis **“Estado oxidativo y producción de volátiles del jitomate en función de los estados de maduración”**. Por Omar Roberto López Vidal quien realizó la disertación pública el 21 de Julio del 2011, en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Presidente



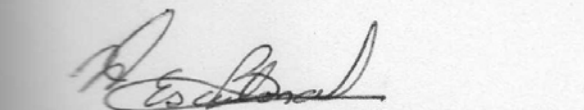
Dra. Laura J. Pérez Flores

Secretario



Dra. Clara Pelayo Zaldívar

Vocal



Dr. Héctor B. Escalona Buendía

Vocal



Dr. Francisco Cruz Sosa