

(S4-P95)

## EVOLUCIÓN DE METABOLITOS ANTIOXIDANTES EN FRUTOS DE TOMATE MICRO-TOM ALMACENADOS A BAJA TEMPERATURA

L. GUILLÉN-MORENO, A. A. CALDERÓN y M. A. FERRER

Instituto de Biotecnología Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena

ETSIA. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203-Cartagena

[mangeles.ferrer@upct.es](mailto:mangeles.ferrer@upct.es)

### RESUMEN

La exposición prolongada a bajas temperaturas –por debajo de 15°C- ocasiona en el tomate y en otras especies de origen tropical o subtropical alteraciones fisiológicas que se denominan daños por frío. Estos daños por frío son especialmente relevantes en frutos climatéricos y ocasionan considerables pérdidas económicas debido a la disminución de calidad del fruto.

La exposición a bajas temperaturas desencadena una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos que permiten a las plantas adaptarse a esta situación de estrés. El frío puede conducir a modificaciones en la estructura de la célula que, a su vez, pueden originar, o bien un daño irreversible en los tejidos que conduce a la muerte de parte de sus células, o bien una adaptación a las condiciones estresantes. Las especies activas de oxígeno (EAO) generadas durante el periodo de estrés podrían ser las causantes de los daños inducidos por frío.

Las células vegetales disponen de una serie de sistemas antioxidantes, capaces de desactivar las EAO, constituidos por enzimas y por metabolitos de bajo peso molecular. Los principales metabolitos antioxidantes que controlan la homeostasis redox de naturaleza hidrosoluble son el ácido ascórbico, el glutatión y diversos compuestos fenólicos y, en frutos de tomate, dentro de los liposolubles destacan los carotenoides (licopeno) y diversos compuestos fenólicos asociados a la cutícula.

Con el objetivo de entender los cambios fisiológicos que tiene lugar en los frutos de tomate durante la conservación a bajas temperaturas se ha estudiado la evolución de los principales metabolitos antioxidantes y la capacidad antioxidante (estimada como capacidad atrapadora de radicales libres) en diferentes fracciones obtenidas de frutos de tomate de la variedad Micro-Tom en dos estadios de crecimiento: inicio de color (*breaker*) y rojo. Los resultados obtenidos sugieren que los compuestos fenólicos desempeñan un papel protector clave en estas circunstancias.

### ANTIOXIDANT COMPOUND EVOLUTION IN MICRO-TOM FRUITS UNDER LOW-TEMPERATURE EXPOSURE

**Key words:** Ascorbate, glutathione, phenolic compound, tomato

### ABSTRACT

Many horticultural crops are sensitive to low-temperature exposure, below 15°C, that produce the so called chilling injuries. Harvest of fresh fruits is usually done before the ripening process is too advanced and, in these circumstances many commodities, particularly pre-climacteric fruits, are highly sensitive to chilling injuries. Chilling injury is mediated, in part, by reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative damage to, or the apoptotic

death of cells. A large body of evidence substantiates that ROS-scavenge abilities would be related to chilling acclimation. Different enzymatic and non-enzymatic molecules are involved in scavenging excess ROS in plant cells. In this study, in an attempt to understand the physiological changes involved under low-temperature exposure, we analysed the evolution of ROS-scavenging compounds using Micro-Tom tomato fruits as a model system. Our data suggest that phenolic compounds may have an important protective role in these circumstances.

## INTRODUCCIÓN

El tomate es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia económica a nivel mundial. Su demanda está en continuo aumento ya que, el fruto de tomate y los productos derivados de éste son considerados alimentos saludables (Davies y Hobson, 1996). Según diversos estudios epidemiológicos el consumo de tomate puede reducir significativamente el riesgo de contraer enfermedades degenerativas, entre las que se incluyen varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas (Block et al., 1992; Agarwal y Rao, 2000; Giovannucci et al., 2002).

El almacenamiento a bajas temperaturas permite alargar la vida comercial de frutos y hortalizas al ralentizar el metabolismo general, la transpiración, la actividad respiratoria, la emisión de etileno, la actividad de diversas enzimas, así como la expresión de ciertos genes (McKersie y Leshem, 1994). La exposición prolongada a bajas temperaturas –por debajo de 10°C- ocasiona en el tomate y en otras especies de origen tropical o subtropical (i.e., melón, cítricos, fruta de hueso y diversos frutos tropicales) alteraciones fisiológicas que se denominan daños por frío. Los daños por frío pueden retrasar el crecimiento y el desarrollo, reducen la productividad e incluso pueden provocar la muerte de la planta (McKersie y Leshem, 1994).

Las plantas frente a condiciones medioambientales adversas ponen en marcha una secuencia compleja de acciones. Esta bien establecido que en situaciones de estrés biótico y abiótico se produce un rápido aumento en la producción de especies activadas del oxígeno (EAO) conocido como “explosión oxidativa” (oxidative burst). Existen diversos estudios que demuestran que la exposición a bajas temperaturas conlleva a una acumulación de peróxido de hidrógeno (Prasad et al., 1994; Prasad, 1996; Prasad, 1997; Sala 1998). El papel de las EAO en situaciones de estrés abiótico ha sido objeto de innumerables estudios debido a que estas especies han sido implicadas en los procesos que conducen a la aclimatación al estrés (Prasad et al., 1994; Foyer et al., 1997; Mittler, 2002).

A pesar de todos estos datos y de su interés económico, faltan estudios de carácter fisiológico encaminados a dilucidar las posibles causas de los daños por frío. Las especies activas de oxígeno (EAO) que se generan durante el periodo de estrés podrían ser las causantes de los daños inducidos por frío. Además, son muchos los estudios que sugieren que la capacidad de algunas plantas para minimizar los daños producidos por el frío podría estar relacionada con su poder desactivador de las EAO. Las células disponen de una serie de sistemas antioxidantes, capaces de desactivar las EAO, constituidos por enzimas y por metabolitos de bajo peso molecular. Por ello, y con el objetivo de entender los cambios fisiológicos que tiene lugar en los frutos de tomate durante la conservación a bajas temperaturas hemos analizado cómo evolucionan los principales compuestos antioxidantes no enzimáticos, tanto de naturaleza soluble como lipófila.

Para llevar a cabo nuestros estudios se utilizarán frutos de tomate en dos estadios de crecimiento (breaker y maduro) de la variedad Micro-Tom. Este cultivar constituye un excelente sistema modelo para estudios fisiológicos, bioquímicos y genómicos (Meissner et al., 1997; Emmanuel y Levy, 2002).

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo principal que se pretende alcanzar con este trabajo es determinar la evolución de los distintos metabolitos antioxidantes y la capacidad antioxidante (estimada como capacidad atrapadora de radicales libres) en diferentes fracciones obtenidas de frutos almacenados a bajas temperaturas.

Los resultados obtenidos presentan un doble interés. Por una parte, desde un punto de vista fisiológico, contribuyen a comprender mejor la respuesta de los frutos de tomate a las bajas temperaturas. Por otra parte, desde un punto de vista nutricional, algunos de los compuestos cuya evolución se ha analizado están reconocidos como componentes beneficiosos para la salud, por lo que es importante conocer cómo afecta el proceso de almacenamiento de los frutos a sus niveles.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Condiciones de cultivo

Las semillas de tomate se desinfectaron con una disolución de hipoclorito sódico al 0.5% y Tween-80 al 0.25% durante 10 min. Posteriormente, se mantuvieron en imbibición durante 24 horas en oscuridad, a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se sembraron en alvéolos de plástico que contenían una mezcla de vermiculita:perlita:fibra de coco:sustrato floral:estiércol compostado de oveja en una proporción de 1:1:1:2:0,2. Las plantas se cultivaron en una cámara de cultivo (Sanyo MRL350) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad y con un régimen de temperatura de 25 °C durante el día y de 15 °C durante la noche. La humedad se mantuvo constante por irrigación periódica. Tras la antesis, las flores fueron polinizadas a mano y, el número de frutos desarrollados por planta fue de 4-6. La recolección de los frutos se hizo en los estadios *breaker* y rojo. El cambio de color de los frutos se determinó mediante el empleo de un colorímetro Minolta Chroma Meter CR 300.

### Tratamiento de los frutos

Tras la recolección los frutos se incubaron en la oscuridad a 6°C o a 20 °C durante 0, 6, 48, 168 y 360 horas. Transcurrido el periodo de incubación, los frutos se congelaron y trituraron en presencia de N<sub>2</sub> líquido y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

### Determinación de los niveles de ascórbico, glutatión, fenoles y capacidad antioxidante

La determinación de AA se llevó a cabo mediante HPLC según el protocolo descrito por Jiménez et al. (2002).

Los niveles de glutatión total (GSH + 2 GSSG) se determinaron mediante el método de reciclado enzimático tal y como se describe en Griffith (1980).

La determinación de los fenoles totales se llevó a cabo según el método de Marigo (1973).

La determinación del poder antioxidante de los extractos se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Brand Williams *et al.* (1995).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evolución de metabolitos antioxidantes y capacidad antioxidante en frutos Micro-Tom en el estadio de crecimiento “breaker” sometidos a distintas temperaturas de almacenamiento

La Figura 1.A muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento (20 ° y 6 °C) sobre los niveles de ácido ascórbico (AA) y glutatión (GSH) en frutos de tomate en el estadio de crecimiento breaker. En ella se observa que en frutos incubados a 20 °C, los niveles de ácido ascórbico aumentan de forma significativa respecto a los valores obtenidos en frutos control (0 h) durante el almacenamiento a tiempos largos. La exposición a bajas temperaturas

(6 °C) provoca a medio (48 h) y largo plazo (7 y 15 días) un aumento de los niveles de AA respecto a los niveles observados en los frutos incubados a 20 °C. En ambos tratamientos, los mayores niveles de AA se observan a los 7 días, registrándose un incremento en la concentración de AA respecto del control del 19 y 25 % en frutos incubados a 20 y 6 °C, respectivamente. En relación con la evolución de los niveles de glutatión, en general se observa que la exposición a bajas temperaturas (6 °C) provoca un aumento de los niveles de GSH total respecto a los niveles observados en los frutos incubados a 20 °C. Pero, en este caso, y a diferencia de lo observado con los niveles de AA, la diferencia entre el contenido de GSH total en frutos almacenados a 6 y 20°C aumenta conforme aumenta el tiempo de tratamiento, siendo máxima a los 15 días.

Con el fin de comprobar si el almacenamiento de los frutos a bajas temperaturas ejercía algún efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos solubles, se procedió a la cuantificación de los mismos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.C. En dicha figura se muestra que el comportamiento de los frutos sometidos a ambos tratamientos fue similar desde un punto de vista cualitativo, aunque la magnitud del aumento en los niveles de compuestos fenólicos con respecto a los frutos control fue mayor en el caso de los tomates almacenados a 20°C. Esta diferencia podría explicarse teniendo en cuenta la ralentización en el metabolismo de los frutos almacenados a baja temperatura.

Una de las técnicas más utilizadas para determinar la actividad antioxidante de un extracto o de un fluido es la determinación del potencial antioxidante total. Uno de los métodos más utilizados, por su rapidez y simplicidad, para llevar a cabo esta determinación es el basado en la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). El radical DPPH posee una banda de absorción centrada alrededor de 517 nm que desaparece al ser reducido por un compuesto con actividad antioxidante (Brand Williams et al., 1995). En la Figura 1.E se muestra el efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la capacidad de atrapamiento de radicales libres en extractos metanólicos procedentes de frutos de tomate breaker sometidos a distintas temperaturas de almacenamiento. Como se observa en esta figura, no se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos a 20 °C y a 6 °C. Asimismo se observa que la evolución de la capacidad desactivadora de radicales de los extractos metanólicos no purificados es similar a la evolución de los niveles de fenoles solubles y no difiere en gran medida de la evolución de los niveles de ácido ascórbico. Dado que el ácido ascórbico es parcialmente soluble en metanol al 70 %, cabe esperar que el poder antioxidante total de los extractos sea la suma de ambos tipos de compuestos, compensándose el mayor contenido en ascórbico de los frutos almacenados a 6 °C (Fig. 1.A), con los mayores niveles de fenoles solubles de los frutos almacenados a 20 °C (Fig. 1.E). Por ello, se procedió a una purificación parcial de los extractos metanólicos originales, obteniéndose, así, una fracción enriquecida en compuestos fenólicos y libre, en gran medida, de ácido ascórbico, glutatión y otros antioxidantes polares. Como se observa en la figura, la evolución de la capacidad antioxidante total de los extractos parcialmente purificados es muy parecida a la evolución de compuestos fenólicos solubles totales en los extractos metanólicos (Fig. 1.C, -△-), por lo que esta capacidad, en esta fracción, podría venir determinada en gran medida por su contenido en compuestos fenólicos.

En las Figuras 1.C (-□-) y 1.E (-□-) se muestran la evolución de los niveles de compuestos fenólicos en las fracciones orgánicas de frutos almacenados a 20 y 6 °C y la capacidad antioxidante de la fracción orgánica. Se observa que, al menos para tiempos medios y largos de incubación, la acumulación de fenoles se correlaciona con la capacidad antioxidante total, por lo que, sin descartar la presencia de otro tipo de compuestos, éstos podrían contribuir en gran medida a la capacidad desactivadora de radicales en los frutos.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Cano et al. (2003), quienes identificaron al licopeno como el principal compuesto antioxidante en extractos lipofílicos de tomate. Sin embargo, el hecho de que el estudio mencionado fuese llevado a cabo con frutos recién cortados elimina la posible inducción de la síntesis de fenoles complejos en respuesta al almacenamiento.

### **Evolución de metabolitos antioxidantes y capacidad antioxidante en frutos Micro-Tom, en el estadio de crecimiento rojo, sometidos a distintas temperaturas de almacenamiento**

La evolución de los niveles de ácido ascórbico en tomates en el estado de crecimiento rojo almacenados a 20 °C y 6 °C se muestra en la Figura 1.B (-○-). En dicha figura se observa que a tiempos cortos (6 horas) el comportamiento de los frutos es diferente en función de la temperatura de incubación. Así, a 20 °C se produce un ligero aumento de los niveles de ascórbico, mientras que a 6 °C se produce una caída con respecto al control. La imposición de una doble situación de estrés a los tomates podría suponer una rápida eliminación del pool de ascórbico reducido, lo que determinaría la bajada observada. En el caso de los frutos almacenados a 20 °C las condiciones de estrés más atenuadas, junto con un metabolismo más activo, podría dar lugar a una respuesta adaptativa que implicaría el aumento en los niveles de ascórbico reducido. Esta respuesta adaptativa también se observaría en tomates refrigerados, aunque a tiempos más largos (48 horas).

En relación con la evolución de los niveles de glutatión total (Figura 1.B (-□-), se observa un perfil similar al de la evolución del ácido ascórbico a tiempos cortos (6 horas). Es decir, aumento en tomates almacenados a 20 °C y disminución (más acusada que la del ácido ascórbico en este caso) a 6 °C. A tiempos más largos los niveles de este compuesto son similares y a 15 días la concentración en los tejidos de los frutos almacenados a 6 °C es significativamente mayor que en los tomates mantenidos a 20 °C.

En la Figura 1.D se muestra la evolución de los niveles de fenoles solubles en los extractos metanólicos parcialmente purificados obtenidos de tomates rojos almacenados a 20 °C y a 6 °C. En dicha figura se observa que, a ambas temperaturas, el almacenamiento conlleva una caída de los niveles de compuestos fenólicos, siendo esta caída más acusada en los tomates incubados a 20 °C. Este hecho podría deberse a la mayor actividad de la fenoloxidasas presentes en los frutos durante el almacenamiento. La actividad de estas enzimas, posiblemente participando en reacciones de control de los niveles de especies activadas del oxígeno, podría dar lugar a la aparición de compuestos fenólicos más complejos (oligómeros), ente otros productos.

La capacidad antioxidante total de los extractos metanólicos procedentes de frutos rojos almacenados a 20 y a 6 °C muestra un patrón muy similar, con una caída muy acusada para tiempos cortos (Figura 1.F, -○-). Para tiempos largos de incubación (15 días) y en el caso de tomates mantenidos a 20 °C se observa un ligero repunte de la actividad antioxidante total, posiblemente relacionado con el aumento observado en los niveles de ácido ascórbico y glutatión. La purificación parcial de los extractos, con el consiguiente enriquecimiento en compuestos fenólicos muestra que existe una buena correlación entre los niveles de estos compuestos y la capacidad antioxidante de los extractos, tanto a 20 °C, como a 6 °C (Figura 1.F, -△-). Como ya se ha comentado, los compuestos fenólicos podrían contribuir de forma significativa a la capacidad antioxidante total (medida como capacidad atrapadora de radical DPPH) de los extractos lipofílicos obtenidos de tomate. La evolución de estos compuestos en dichos extractos se representa en la Figura 1.F (-□-). En ella se observa un comportamiento muy similar para los dos tratamientos térmicos ensayados, con un descenso más brusco a tiempos cortos para tomates almacenados a 20 °C y niveles ligeramente superiores a tiempos largos para este mismo tratamiento. Durante el tiempo de almacenamiento de los frutos, es probable que se produzcan reacciones de oxidación de los compuestos fenólicos solubles por

parte de fenoloxidasas, lo cual podría formar parte de los mecanismos defensivos del fruto frente a una situación de estrés oxidativo. Estas reacciones de oxidación dan lugar, en muchos casos, a la formación de oligómeros, por condensación (acoplamiento oxidativo) de moléculas de fenoles simples, lo que origina compuestos con un carácter mucho más lipofílico. Los datos mostrados estarían de acuerdo con esta hipótesis, ya que durante el tiempo de almacenamiento de los frutos se produce una disminución en los niveles de fenoles simples y el aumento comentado en los niveles de compuestos fenólicos en los extractos lipofílicos.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que la evolución de la capacidad antioxidante total de los extractos solubles y de la fracción orgánica son similares a la evolución de compuestos fenólicos totales presentes en dichos extractos. Por tanto, la capacidad antioxidante, en ambas fracciones, podría venir determinada en gran medida por su contenido en compuestos fenólicos. De hecho, la buena correlación observada entre ambos sugiere que los compuestos fenólicos podrían desempeñar un papel relevante en la protección de los frutos a los daños por frío.

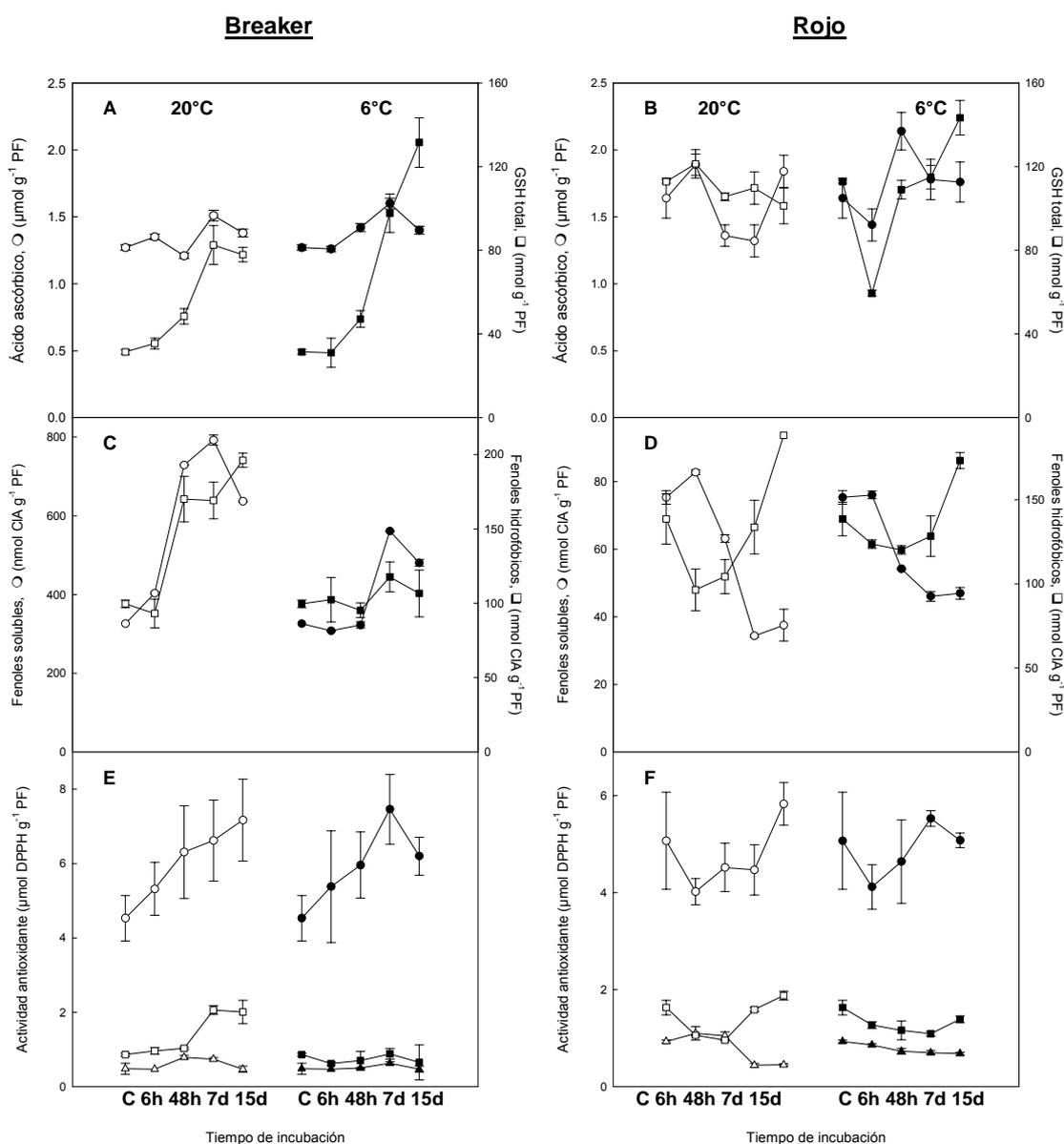
## AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Egea y Weiss por la aportación del material vegetal objeto de estudio. Este trabajo ha sido subvencionado por el MCYT con la aportación de fondos FEDER (Proyectos BIO2001-1620 y REN2002-02952) y por la Fundación Séneca (Proyectos PI-14/00888/FS/01 y PB/23/FS/02).

## BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal S, Rao AV (2002). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Ass. J.* 163: 739-744
- Block G, Patterson B, Subar AF. (1992). Fruit, vegetable and cancer prevention a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18: 1-29
- Brand Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 20: 25-30
- Cano A, Acosta M, Arnao MB (2003) Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.)
- Davies JN, Hobson GE. (1996). The constituents of tomato fruit. The influence of environment, nutrition and genotype. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15: 205-279
- Emmanuel E, Levy AA. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 112-117
- Foyer CH, López-Delgado H, Dat J, Scott IM. (1997). Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254
- Foyer CH, Noctor G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC. (2002). Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk. *J. Nat. Cancer Inst.* 94 (5): 391-398

- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem.* 106: 207-12
- Jiménez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P. (2002). Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* 124: 751-758
- Marigo G (1973) Methode de fractionnement et d'estimation des composés phenoliques chez les vegetaux. *Analysis* 2: 106-110
- McKersie BD, Leshem YY. (1994). Chilling stress. En: B.D. McKersie and Y.Y. Leshem, Editors, *Stress and stress coping in cultivated plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 79-103
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A. (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant J.* 12: 1465-1472
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6: 65-74
- Prasad TK. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant J.* 10:1017-1026
- Prasad TK. (1997). Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiol* 114: 1369-1376
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K (2003) Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, Fruits, and Teas. *J. Agric. Food Chem.* 51: 571 – 581
- Sala JM. (1998). Involvement of oxidative stress in chilling injury in cold-stored mandarin fruits. *Postharvest Biol. Technol* 13: 255-261



**Figura 1.** Evolución de metabolitos antioxidantes en extractos procedentes de frutos de tomate *breaker* (panel izquierdo) y rojo (panel derecho) almacenados a 20°C y 6°C durante 0, 6, 48, 168 y 360 h. **A y B:** Evolución de ascórbico (-○-) y glutatión total (-□-). **C y D:** Evolución de fenoles solubles (-○-) e hidrofóbicos (-□-). **E y F:** Evolución de la capacidad antioxidantes en extractos metabólicos brutos (-○-) y parcialmente purificados (-△-). Capacidad antioxidante de la fracción orgánica (-□-).