

ESTRÉS OXIDATIVO: ESTUDIO DE COMPUESTOS CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES EN EL TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill.)¹

Eduardo A. Bernaténé

Instituto de Biología y Medicina Molecular [IBIMOL, ex PRALIB (UBA y CONICET)], Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB), Universidad de Buenos Aires (UBA), Junín 956, C1113AAD Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina,

Correo electrónico: eabernatene@conicet.gov.ar

Recibido el 2 de febrero de 2013; aceptado el 18 de abril de 2013

Resumen

La importancia frente al estrés oxidativo y la defensa antioxidante de los constituyentes de la dieta es motivo de muchos estudios; ciertas enfermedades como aterosclerosis, degeneraciones ligadas al envejecimiento y varios tipos de cáncer son causadas por el fenómeno de oxidación celular a través de la acción de los radicales libres. La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR; sigla en inglés: HPLC) resultó ser un método adecuado para la identificación y la cuantificación del glicósido de flavonol rutina y del carotenoide licopeno. Los valores determinados de rutina fueron de 1,85 mg/100 g PF para el cultivar Superman y 1,14 mg/100 g PF para el cultivar Trafalgar. Se encontró que el valor de licopeno variaba entre 9,16 mg/100 g PF y 8,05 mg/100 g PF para los cultivares Superman y Trafalgar, respectivamente. El conocimiento de los valores de sustancias con propiedades antioxidantes presentes en los frutos de tomate, realza su importancia al considerar el aporte que efectúa a los requerimientos diarios, brindando su caracterización como alimento funcional. También son el punto de partida cuando se planifican modificaciones genéticas para incrementar sus cantidades en los frutos de tomate y en las variaciones que se producen como consecuencia de los procesos tecnológicos de fabricación de productos basados en el tomate.

Palabras clave: tomate – antioxidantes – flavonoides - rutina – carotenoides - licopeno - *Lycopersicon esculentum*.

Abstract

The importance of oxidative stress and antioxidant defense of the constituents of the diet is the aim of many studies; some diseases, such as atherosclerosis, degeneration associated with aging and various cancers are caused by the phenomenon of oxidation cell through the action of free radicals. The high performance liquid chromatography (HPLC) proved to be a suitable method for the identification and quantification of the flavonol glycoside rutin and the carotenoid lycopene. Rutin values determined were 1.85 mg/100 g FW for Superman cultivar and 1.14 mg/100 g FW for Trafalgar cultivar. It was found that the value of lycopene varied between 9.16 mg/100 g FW and 8.05 mg/100 g FW for Superman and Trafalgar cultivars, respectively. The knowledge of the values of substances with antioxidant properties present in tomato fruits enhances its importance when considering the contribution made to the daily requirements, providing its characterization as a functional food. Substances with antioxidant properties are also the starting point when planning genetic modifications to increase quantities in tomato fruits and

¹ Trabajo realizado sobre la base de la tesis presentada por el autor para aspirar al grado de Magíster en Tecnología de los Alimentos, bajo la dirección de Arturo Vitale. Facultad Regional Avellaneda, Universidad Tecnológica Nacional.

the variations that occur as a result of technological processes of manufacture of tomato-based products.

Key words: tomato – antioxidants – flavonoids - rutin – carotenoids – lycopene - *Lycopersicon esculentum*.

Introducción

La génesis de la mayor cantidad de desórdenes neurodegenerativos es multifactorial y consiste en una interacción entre elementos ambientales y predisposición genética. Los radicales libres (RL) derivados del oxígeno molecular han sido considerados como asociados a factores de riesgo para una variedad de anomalías humanas, incluidas las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento. El daño a las biomoléculas tisulares (lípidos, proteínas y ADN) por la acción de los RL es postulado como una importante contribución a la fisiología del estrés oxidativo (Migliore y Coppedè, 2009).

Los RL se pueden definir como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en orbitales atómicos y moleculares. Los electrones no apareados brindan un considerable grado de reactividad al RL (Valko y colaboradores, 2007).

Las especies reactivas del oxígeno (en inglés, *reactive oxygen species*: ROS) son bien reconocidas por desempeñar un rol dual, tanto benéfico como deletéreo. Una amplia variedad de ROS es producida en el curso del metabolismo normal de los sistemas biológicos, pero su acumulación por encima de las necesidades de la célula puede producir daño a las biomoléculas. El estrés oxidativo describe la condición en la cual las defensas celulares antioxidantes son insuficientes para mantener el nivel de los ROS por debajo de un umbral tóxico (Migliore y Coppedè, 2009).

Los flavonoides y carotenoides son señalados como importantes compuestos con propiedades antioxidantes que se encuentran ampliamente difundidos en frutos y vegetales y por esta característica son incorporados al organismo a través de la ingesta.

Flavonoides

Los flavonoides componen un variado grupo de metabolitos secundarios, algunos de ellos fenólicos, siendo la mayoría poderosos antioxidantes *in vitro*. Gran cantidad de estudios epidemiológicos han mostrado una correlación directa entre una elevada ingesta de flavonoides y la disminución en el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diferentes tipos de cáncer y enfermedades relacionadas con el desarrollo de la ancianidad (Campbell y colaboradores, 2004; Min y Ebeler, 2008).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilos fenólicos y presentan excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), con dos anillos aromáticos (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C). La estructura básica de un núcleo flavonoide consiste en 15 átomos de carbono que en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, mientras que en el anillo B desde 1' al 6' (Figura 1).

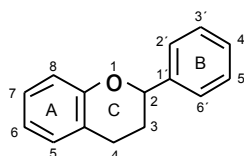


Figura 1. Estructura básica de los flavonoides

Carotenoides

Los carotenoides son los responsables de la mayoría de los colores amarillo, naranja y rojo que presentan los alimentos de origen vegetal. Con el transcurso de las décadas, los carotenoides incrementaron su importancia debido a sus propiedades antioxidantes, prevención del cáncer y disminución de las enfermedades cardiovasculares (Erdman y colaboradores, 2008).

Desde el punto de vista químico pertenecen a la familia de los terpenos, es decir que están formados por unidades de isopreno. Esta característica les brinda sus particulares propiedades estructurales, la presencia de numerosos dobles enlaces conjugados y de un buen número de ramificaciones del tipo metilo situadas en posiciones regulares. Muchas de las investigaciones realizadas en nutrición han sido focalizadas en el licopeno, caroteno y luteína (Figura 2). Aquellos carotenoides que presentan nueve dobles ligaduras conjugadas o más, son capaces de atrapar el radical libre del oxígeno, el radical anión superóxido, siendo el licopeno el más efectivo (Bose y Agrawal, 2006; 2007).

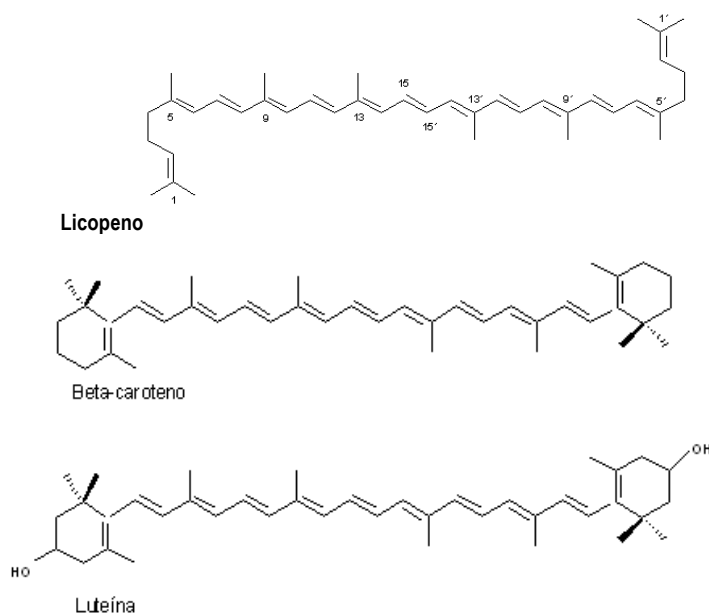


Figura 2. Estructuras químicas de licopeno, β -caroteno y luteína.

Importancia del Tomate

En la Argentina el tomate es una de las hortalizas más populares, pudiéndose adquirirla durante todo el año. Su lugar de producción abarca tanto los cinturones hortícolas de los centros urbanos como a las zonas de producción especializadas con destino para la industria. El tomate es una de las hortalizas más importantes desde diversos puntos de vista:

- por la cantidad consumida, aproximadamente 16 kg/persona/año, incluidos los productos industrializados.
- por el valor económico de la producción: 370000 tn de tomate procesado (INDEC, 2002) y 109100 tn de tomate fresco (CMCBA, 2012).
- por la superficie dedicada al cultivo: 42230 has (INDEC, 2002).

Para este estudio se eligió el tomate porque es un vegetal de amplia distribución mundial y

costo relativamente bajo y por participar en un elevado porcentaje en la dieta humana, tanto como producto fresco como en productos elaborados.

También es importante como alimento funcional *per se* o participando en la composición de un alimento funcional multicomponente. El tomate ha alcanzado esta categoría debido a la abrumadora evidencia epidemiológica que muestra su acción benéfica en la disminución de ciertos tipos de cáncer, enfermedades degenerativas, enfermedades vasculares y cardiovasculares (Toor y Savage, 2005; Boots y colaboradores, 2008; van Breemen y Pajkovic, 2008).

A pesar de la manifiesta importancia que presenta el cultivo del tomate y de los diversos tipos y cultivares del mismo, no se han realizado en nuestro país estudios que permitan determinar un perfil químico que los caracterice.

Desarrollo

Material de estudio

Se recolectaron frutos de tomate pertenecientes a los cultivares Superman (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Superman) y Trafalgar (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Trafalgar). Las muestras se tomaron en un establecimiento ubicado en la localidad de Pereyra, partido de Berazategui, provincia de Buenos Aires. Se cosecharon 5 kg de tomate de cada uno de los cultivares en el estado de madurez rojo brillante (USDA, 1991).

Luego de la cosecha, los tomates fueron lavados con agua corriente, escurridos y secados con un paño absorbente. Se guardaron en heladera a una temperatura de 4 °C/ 5 °C y al día siguiente se trasladaron al laboratorio.

Caracterización de los frutos

De cada cultivar se tomaron al azar 20 frutos y se efectuaron las mediciones correspondientes para caracterizarlos. Para describir el tipo de fruto las mediciones que se realizaron fueron peso, altura y diámetro en la parte media. Posteriormente de cada fruto se separaron las partes: epicarpio (piel), mesocarpio (pulpa) y semillas y se calculó el porcentaje con el cual cada una de ellas contribuía al peso total del fruto fresco.

Contenido de materia seca

Este procedimiento se llevó a cabo en cada una de las partes que se separaron en el paso anterior mediante la utilización de dos técnicas:

a) Secado en estufa: Las muestras, identificadas por individuo y parte a la que pertenecían, se dispusieron en cajas de Petri previamente taradas y se colocaron en estufa a 105 °C. Se pesaron diariamente hasta alcanzar constancia de peso. Luego se calculó el porcentaje de humedad (% H₂O) como:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / \text{peso inicial} \times 100$$

Para luego calcular el porcentaje de materia seca según:

$$\% \text{ MS} = 100 \% - \% \text{ H}_2\text{O}$$

b) Trampa de destilación Dean-Stark: Es un dispositivo utilizado para determinar el contenido de agua existente en una matriz.

Para la determinación del contenido de agua se pesaron 45 g de pulpa de cada cultivar y se mezclaron con 30 ml de tolueno. El baño térmico se reguló a 110 °C y se midieron los mililitros de agua que se recogían en el recipiente colector. El contenido de agua (% H₂O) se calculó como:

$$\% \text{ H}_2\text{O} = (\text{peso del H}_2\text{O} / \text{peso de la muestra}) \times 100$$

Por lo tanto, el porcentaje de materia seca es:

$$\% \text{ MS} = 100 \% - \% \text{ H}_2\text{O}$$

Preparación de las muestras y extracción

Cada una de las fracciones en las que se separó el fruto de tomate se secó hasta constancia de peso y posteriormente fueron transformadas en polvo mediante la utilización de un molinillo doméstico. El material pulverizado fue sometido a una doble extracción en caliente mediante un extractor tipo Soxhlet regulando la temperatura hasta alcanzar la ebullición.

La extracción lipofílica se realizó con 25 g de cada muestra separadamente, puesta en un cartucho fabricado "ad hoc" y se colocaron en el balón 150 ml de *n*-hexano. La temperatura se estabilizó hasta mantener el solvente en ebullición y el sistema permaneció a reflujo hasta que el solvente tuviera apariencia traslúcida; este estado se alcanzó aproximadamente a las 4 horas de iniciado el proceso. Se recogió el extracto lipofílico que se encontraba en el balón y se lo concentró utilizando un evaporador rotatorio, al vacío, con baño de agua termostatzado a 40 °C.

A continuación se procedió a una segunda extracción, pero utilizando metanol para obtener el extracto hidrofílico. Cada una de las muestras previamente extraídas se introdujo separadamente en el extractor y nuevamente se elevó la temperatura hasta mantener el solvente en ebullición hasta que el solvente de reflujo adquiriera apariencia transparente. Finalmente se procedió a la concentración del extracto hidrofílico. Todas las muestras fueron rotuladas y guardadas en freezer a -18 °C hasta su posterior análisis.

Aislamiento del licopeno

Para obtener las muestras de licopeno se tomaron 50 g de pulpa de tomate triturada y se colocaron en un erlenmeyer. Se agregaron 70 ml de acetona y se mezcló la pasta formada, durante varios minutos, previamente a la formación de una solución de aspecto gomoso. El tratamiento con acetona posibilitó la remoción de la mayor parte de agua contenida en la mezcla celular.

Posteriormente se filtró la mezcla al vacío a través de un embudo Büchner. Se descartó el filtrado de color amarillo. Luego se raspó con el mismo instrumento para recuperar el sólido y volver a colocarlo en el erlenmeyer y agregarle 50 ml de diclorometano para continuar la extracción. Luego de agitar la mezcla durante algunos minutos, se procedió a filtrarla al vacío. Esta operación se repitió tres veces más para completar la extracción.

En otro erlenmeyer se secó el filtrado con sulfato de sodio anhidro y se filtró la solución al vacío. El filtrado se trasvasó a un balón de 100 ml, previamente tarado. Se evaporó la solución a temperatura ambiente (20 °C) hasta sequedad en evaporador rotatorio al vacío. Se volvió a pesar el balón con el residuo de evaporación para determinar la cantidad de materia seca obtenida.

Desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución

La separación cromatográfica se realizó en forma isocrática en una columna de fase

reversa C₁₈. Como fase móvil se utilizó metanol/ agua en una proporción 65:35 (v/v), con el agregado de 1 % de H₃PO₄. La velocidad del flujo fue de 1 ml /minuto y se realizó a temperatura ambiente. El detector se mantuvo a una sensibilidad de AUFS = 0,1.

Las determinaciones se realizaron con un equipo de cromatografía líquida de alta resolución, marca Konik, modelo KNK-500, y una columna cromatográfica de fase reversa C₁₈, marca Luna, de tamaño 250 mm x 4,6 mm, con partículas de 5 µm de diámetro y 100 Å de poro. Se utilizó un detector ultravioleta-visible, marca KNK-029-757 conectado al integrador marca Bromma LKB-221.

Determinación de flavonoides.

Para determinar las condiciones óptimas de separación cromatográfica se ensayaron diferentes solventes, como así también diferentes combinaciones de los mismos. En primera instancia se usó metanol puro; luego se incorporó agua en porcentajes crecientes. Como no se alcanzaba una adecuada separación, se procedió a utilizar la llamada “supresión iónica”, agregando 1 % de H₃PO₄ a la fase móvil.

Se ensayaron diferentes longitudes de onda a las cuales se reguló el detector ultravioleta-visible. Las mismas fueron probadas a través de la información disponible en la bibliografía y del cálculo de los porcentajes de máxima absorción medidos en un espectrofotómetro, marca Jasco V-530 UV-Vis. Se determinó que la longitud de onda adecuada era 372 nm. Se inyectaron 20 µl de muestra, el caudal se reguló a un valor de 1 ml/minuto.

Determinación de licopeno

Para determinar las condiciones óptimas de separación cromatográfica se ensayaron diferentes solventes, al igual que diferentes combinaciones de los mismos, conducentes a variadas polaridades. En esta oportunidad, debido a las características del componente a determinar, en las pruebas se incluyeron solventes no polares. El patrón estándar de licopeno utilizado fue licopeno de tomate (Sigma).

Las longitudes de máxima absorción fueron probadas a través de la información disponible en la bibliografía y del cálculo de los porcentajes de máxima absorción medidos en un espectrofotómetro, marca Jasco V-530 UV-Vis con arreglo de diodos. Se determinó que la longitud de onda adecuada era 450 nm. También se ensayaron diferentes valores de flujo (ml/min).

Métodos estadísticos

Se efectuaron los cálculos de parámetros descriptivos, como media aritmética (\bar{x}_m), desvío estándar (D.S.) y coeficiente de variación porcentual (CV %).

También se efectuó el análisis que establece la relación entre el analito y la medida experimental. Se trató de alcanzar la mejor relación lineal entre los puntos experimentales, o sea, el mejor ajuste para los datos. Por lo tanto se utilizó el método de regresión lineal simple para resumir la relación entre dos variables en una situación en la que una de las variables predice a la otra (Moore, 2000).

Se utilizó el test *t de Student* como método para abordar la comparación de dos medias (Skoog y colaboradores, 1995; Norman y Streiner, 1996). Todas las determinaciones se realizaron con un error de $p = 0,05$.

Resultados

En la caracterización morfológica de los frutos analizados se observó que el peso promedio de los ejemplares del cultivar Trafalgar fue superior en un 27 % a los del cultivar

Superman. Para ambos, la forma resultó ser ligeramente achatada, ya que la relación altura / diámetro para Superman y Trafalgar fue de 0,89 y 0,85 respectivamente; este valor coincide con el asentado en el Registro Nacional de Cultivares.

En la Tabla 1 se registran los parámetros para cada cultivar con el análisis estadístico correspondiente (media aritmética, desvío estándar y coeficiente de variación porcentual).

Tabla 1. Caracterización morfológica de los frutos

PARÁMETROS	SUPERMAN			TRAFALGAR		
	X_m	D.S.	C.V. %	X_m	D.S.	C.V. %
Peso (g)	106,78	9,85	9,22	136,12	23,19	17,03
Altura (mm)	54,57	5,41	9,91	56,40	2,79	4,94
Diámetro (mm)	61,14	3,02	4,93	65,60	3,01	4,63

X_m = media aritmética D.S. = desvío estándar, C.V.% = coeficiente de variación porcentual

La Tabla 2 muestra el porcentaje con el que contribuye cada fracción del fruto (piel, pulpa y semillas) al peso total del fruto fresco, con el análisis estadístico correspondiente (media aritmética, desvío estándar y coeficiente de variación porcentual).

Tabla 2. Participación de cada fracción del fruto en el peso fresco total

PARÁMETROS	SUPERMAN			TRAFALGAR		
	X_m	D.S.	C.V. %	X_m	D.S.	C.V. %
Piel (%)	13,65	5,31	38,9	13,78	0,49	3,55
Pulpa (%)	62,07	5,60	9,02	61,79	6,84	11,06
Semilla (%)	24,26	3,58	14,75	24,41	6,87	28,14

X_m = media aritmética D.S. = desvío estándar, C.V.% = coeficiente de variación porcentual

Determinación de materia seca

La determinación de los porcentajes de materia seca por el método de constancia de peso y por el método de Dean-Stark se muestra en la Tabla 3. Cuando se compararon las determinaciones de MS, dentro de cada variedad, por el método de constancia de peso y el método de Dean-Stark, no se encontraron diferencias significativas al nivel de $p = 0,05$.

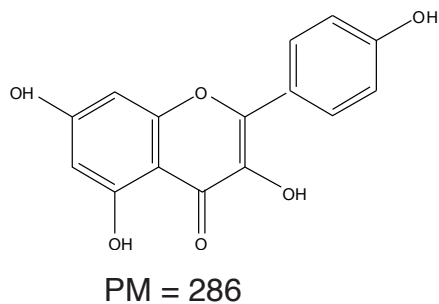
Tabla 3. Determinación del porcentaje de materia seca

PARÁMETRO	SUPERMAN			TRAFALGAR		
	X_m	D.S.	C.V.%	X_m	D.S.	C.V.%
En estufa (%)	7,11	1,46	20,53	4,88	0,69	14,13
Dean Stark (%)	7,54	1,25	16,57	5,16	1,69	32,75

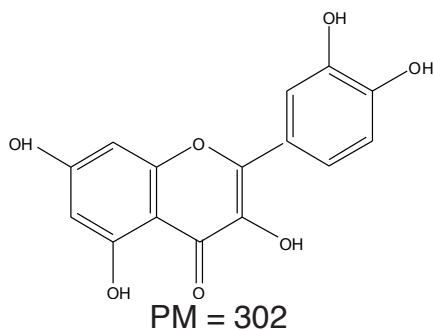
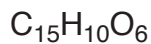
X_m = media aritmética D.S. = desvío estándar, C.V.% = coeficiente de variación porcentual

Análisis cromatográfico de los patrones de referencia de flavonoides

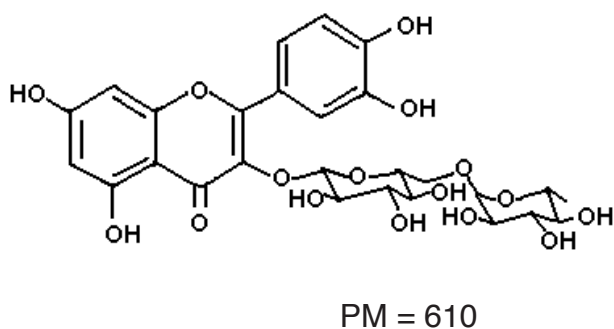
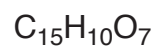
Se buscaron las condiciones óptimas de corrida cromatográfica de los flavonoides en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con los patrones de referencia correspondientes a las agliconas de los flavonoles canferol y quercetina y del 3-O-rutinósido de quercetina, es decir rutina (Figura 3).



Canferol



Quercetina



Rutina

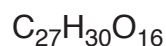


Figura 3. Estructura química de canferol, quercetina y rutina (quercetina-3-O-rutinósido)

Se seleccionó la longitud de onda para el detector UV sobre la base del máximo de absorción de los flavonoides en cuestión, 370 nm, como se observa a modo de ejemplo, en el espectro UV de la quercetina en la Figura 4.

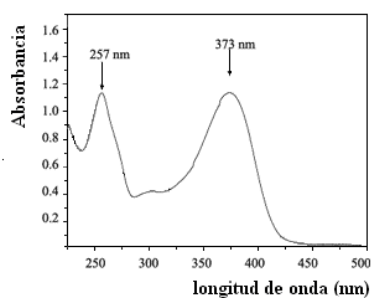


Figura 4. Espectro de absorción UV de la quercetina

En las condiciones de corrida cromatográfica seleccionadas (*vide supra*), los picos correspondientes a los patrones de canferol, quercetina y rutina, como así también los tiempos a los cuales fueron eluidos, se observan en los correspondientes cromatogramas de las Figuras 5, 6 y 7.

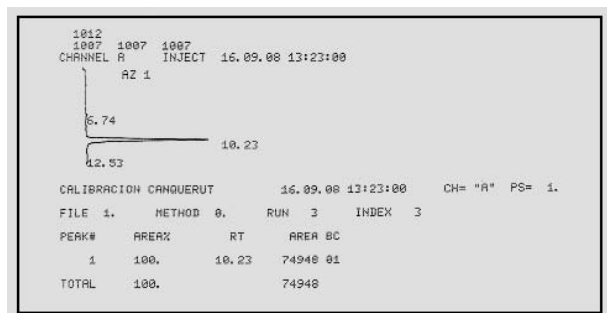


Figura 5. Cromatograma de detección de canferol

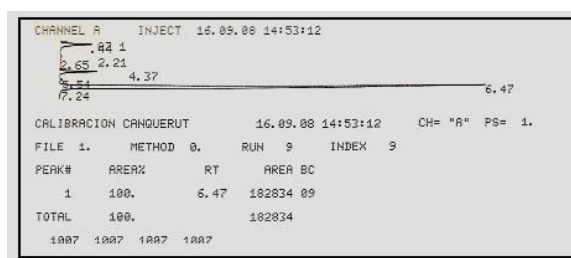


Figura 6. Cromatograma de detección de quercetina

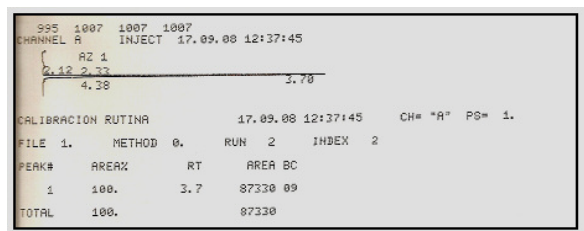


Figura 7. Cromatograma de detección de rutina

Determinación cuantitativa de los flavonoides

La cantidad de flavonoides presentes en las muestras se determinó a partir de la relación de áreas de los picos de los cromatogramas correspondientes a canferol, quercetina y rutina, utilizando una curva de calibración.

Para determinar si el sistema de detección proporcionaba una correlación lineal entre la relación de áreas y la relación de concentraciones, se prepararon las curvas de regresión para cada uno de los flavonoides, elaboradas a partir de 5 puntos. Para ello, se prepararon las soluciones stock y sus correspondientes diluciones. Cada solución se inyectó en el cromatógrafo líquido (HPLC) por triplicado. La linealidad del sistema en el intervalo de concentraciones estudiadas se verificó mediante el análisis de regresión por el método de cuadrados mínimos (Figuras 8, 9 y 10).

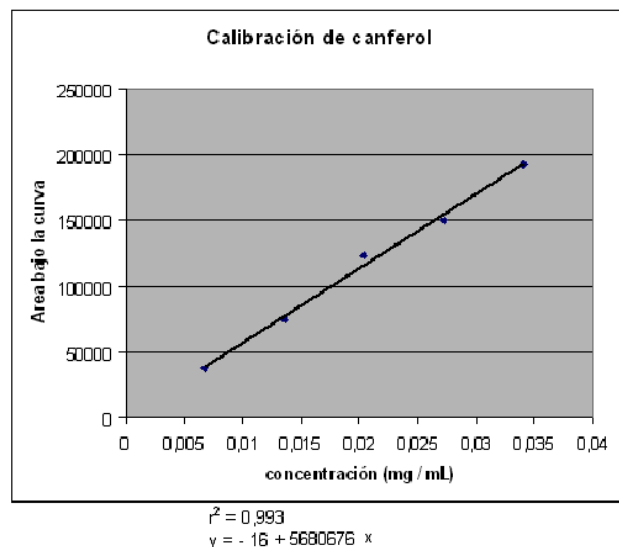


Figura 8. Curva de calibración de canferol

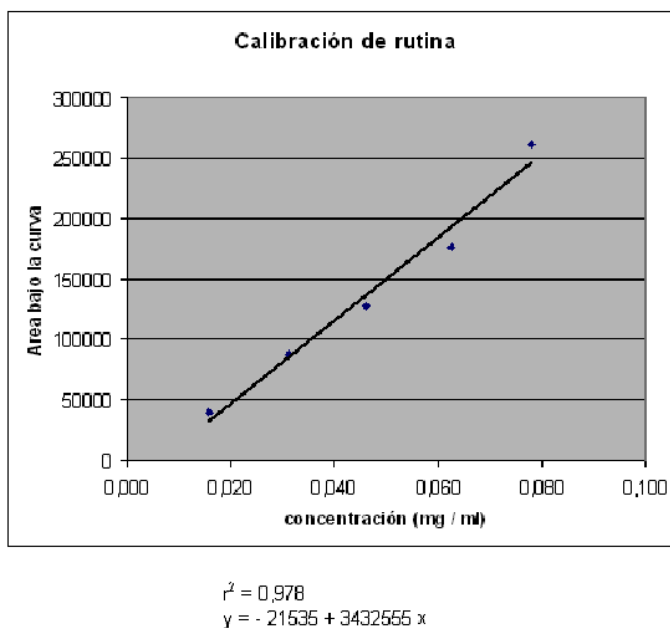


Figura 9. Curva de calibración de rutina

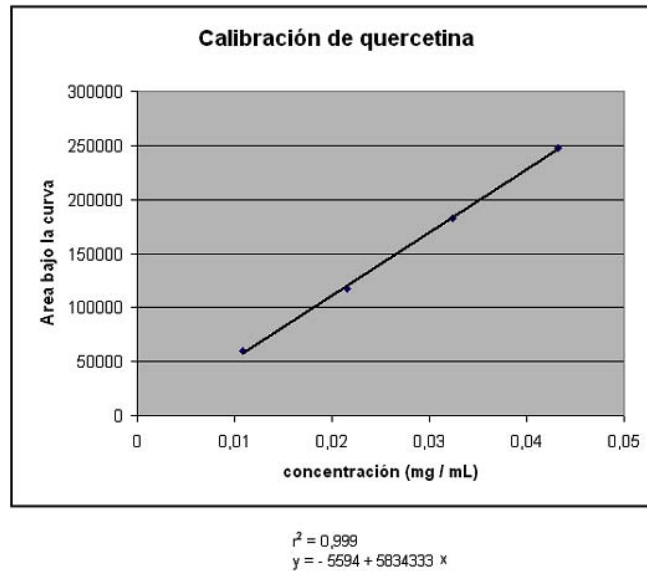


Figura 10. Curva de calibración de quercetina

Flavonoides presentes en los dos cultivares de tomate estudiados

Al analizar los cromatogramas de las diferentes partes de los dos cultivares de tomate, se detectó la presencia de rutina en piel y pulpa del cultivar Superman y sólo en piel en el caso del cultivar Trafalgar (Tabla 4).

Tabla 4. Contenido de rutina en diferentes partes de los dos cultivares de tomate, Superman y Trafalgar

Cultivar	Partes	mg de rutina/100 g PS	mg de rutina/100 g PF
Superman	Piel	23,77	1,18
	Pulpa	13,48	0,67
Trafalgar	Piel	22,84	1,14
	Pulpa	nd	nd

nd: no detectado

Considerando los pesos promedio de los frutos frescos, el porcentaje de participación de cada parte del fruto y el contenido de rutina que se determinó en cada parte del tomate, se estimó el aporte total de rutina (mg) que provee cada fruto en su estado natural. De esta forma, se puede evaluar de un modo más práctico el aporte de un fruto promedio a la ingesta diaria (Tabla 5).

Tabla 5. Estimación del aporte de rutina por fruto

Cultivar	Pesos promedios			Aporte de rutina (mg/100 g PF)		Contenido total de rutina
	Fruto (g)	Piel (g)	Pulpa (g)	Piel	Pulpa	
Superman	106,78	14,57	66,27	1,18	0,67	0,6159
Trafalgar	136,12	18,67	84,11	1,14	nd	0,2128

nd: no detectado

Carotenoides estudiados

Los carotenoides se obtuvieron mediante cromatografía en columna de mediana presión. Las diferentes bandas presentaban una secuencia de colores desde el rojo intenso, pasando por el naranja y finalizando en el amarillo. Posteriormente, cada fracción eluida, que correspondía a un color de banda, fue sometida a cromatografía líquida de alta resolución, detectándose la presencia de licopeno en concordancia con la banda de color rojo intenso.

Para poder obtener una mejor separación de los picos de elución se procedió a introducir variantes en el flujo y en la combinación de los solventes utilizados, de modo de obtener mayores tiempos de elución. Así, se detectaron β -caroteno (banda color naranja) y luteína (banda color amarillo).

Para establecer el $\lambda_{\text{máx}}$ se obtuvo el espectro de absorción UV-Visible en *n*-hexano obteniendo como resultado tres picos a 425 nm, 450 nm y 478 nm. De este modo se optó por fijar la longitud de onda de detección en 450 nm. También se realizó el espectro de absorción del licopeno en metanol, obteniéndose las siguientes $\lambda_{\text{máx}}$: 341 nm, 429 nm (hombro), 449 nm y 475 nm (Figura 11).

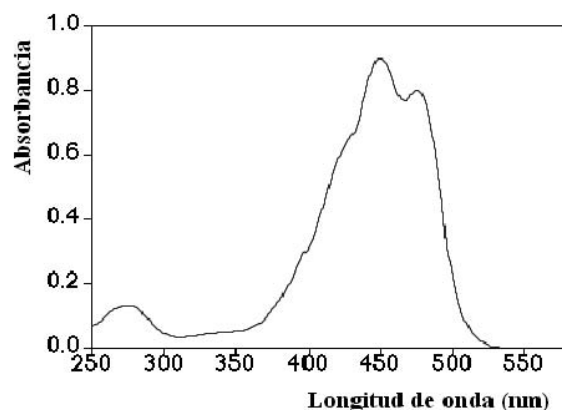


Figura 11. Espectro de absorción de β -caroteno en metanol

Para la construcción de la curva de calibración se preparó una solución madre de licopeno de tomate y sus correspondientes diluciones. Nuevamente, cada solución se inyectó en el cromatógrafo líquido por triplicado y el cromatograma que se obtuvo se muestra en la Figura 12.

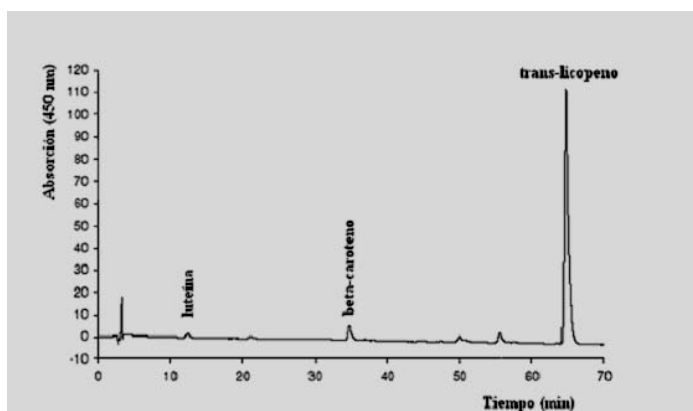
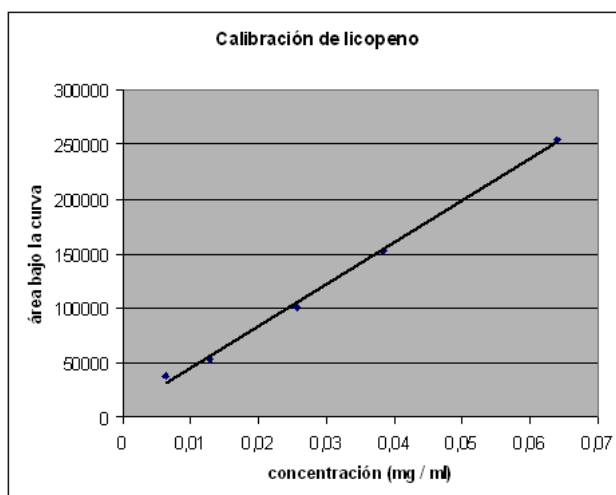


Figura 12. Cromatograma HPLC de un extracto de carotenoides de un cultivar de tomate a 450 nm (*trans*-luteína, *trans*- β -caroteno y *trans*-licopeno)

La linealidad del sistema en el intervalo de concentraciones establecidas se verificó mediante el análisis de regresión por el método de cuadrados mínimos (Figura 13).



$$r^2 = 0,997; y = 6838 + 3832195 x$$

Figura 13. Curva de calibración de licopeno

En los cultivares de tomate rojo-verde y rojo se destaca todo-*trans*-licopeno con valores de hasta 9 mg/100 g de PF. En cantidades mucho menores se encuentran fitoeno, β -caroteno, licopeno-1,2-epóxido, fitoflueno a y b y luteína. Además, se detectaron los isómeros 9-*cis*- y 13-*cis*-licopeno, y el producto de oxidación del licopeno: 2,6-ciclicopeno-1,5-diol, los cuales se originaron principalmente en la extracción del *trans*-licopeno y naturalmente, sólo se encuentran en pequeñas cantidades (trazas) o nada en tomates (Tabla 6). En los tomates amarillos se encuentra licopeno sólo en trazas. Predominan los carotenoides luteína y β -caroteno.

Tabla 6. Contenido de carotenoides (mg/100 g PF)

Compuesto	Cultivares	
	Superman	Trafalgar
Luteína	0,05	0,06
β -caroteno	0,29	0,54
9- <i>cis</i> - β -caroteno	n.d.	n.d.
<i>trans</i> -licopeno	8,91	7,53
9- <i>cis</i> -licopeno	0,04	0,18
13- <i>cis</i> -licopeno	0,21	0,34
licopeno total	9,16	8,05

Discusión

La cromatografía líquida de alta resolución resultó ser una herramienta adecuada para la separación cuali-/cuantitativa de los flavonoides y el licopeno de los cultivares de tomate en estudio. La determinación de las longitudes de onda de máxima absorción redujo el número de variables a ajustar.

Cuando se probó la detección de otros flavonoides en las mismas condiciones cromatográficas se observó una superposición entre los tiempos de retención de los tres flavonoides ensayados en primer término (rutina, canferol y quercetina) y los que surgieron del

segundo ensayo. Para poder “abrir” el cromatograma se modificaron las condiciones de corrida, como por ejemplo variando el nivel de sensibilidad del detector y el valor del flujo. De este modo se pudo detectar (datos no mostrados) la presencia de otros flavonoides en el fruto de tomate.

Si bien los contenidos de rutina determinados no presentaron diferencia significativa desde el punto de vista estadístico entre ambos cultivares estudiados, la leve diferencia observada en el contenido de rutina en el cultivar Superman respecto al otro cultivar, puede deberse a su presencia tanto en piel como en pulpa.

Otra causa es que el mayor peso y tamaño del cultivar Trafalgar está muy probablemente asociado a un mayor contenido de agua (% MS = 4,88 % - 5,16 %) por lo tanto diluye la concentración del compuesto cada 100 g de PF. Este efecto puede además tener mayor incidencia que el referido, al poseer mayor superficie de piel (cultivar Trafalgar) que podría considerarse como responsable de una mayor cantidad de flavonoides.

Conclusiones

Analizar los flavonoides y los carotenoides, como dos de las familias de compuestos antioxidantes más destacados por su acción promotora de una vida saludable, es un paso importante en la evaluación del comportamiento de un número elevado de alimentos que se caracterizan por presentarse como un sistema conformado por una matriz acuosa.

Los antioxidantes son un grupo variado de compuestos químicos, entre los cuales se encuentran los carotenoides y compuestos polifenólicos provenientes del metabolismo secundario, o también llamado “especial”, de las plantas.

Está debidamente probado el efecto benéfico de los compuestos antioxidantes sobre la salud humana, especialmente en lo referido a diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardíacas, cardiovasculares y neurodegenerativas. Actualmente, el concepto de salud asociado a una dieta variada y balanceada cuenta con suficiente apoyo científico basado en una gran cantidad de estudios de suplementación y epidemiológicos.

El tomate es un alimento de consumo masivo, ya sea al estado crudo o formando parte de productos que lo contienen en su elaboración, que se encuentra disponible a lo largo de todo el año. El cinturón hortícola del Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA) es un polo de gran importancia en la generación y posterior abastecimiento de este producto en su área de influencia.

La elección de los cultivares Superman y Trafalgar se fundamentó en que fueron los más difundidos en la campaña 2007-2008, entre los productores de la localidad de Pereyra, Ezpeleta.

Cuando se cuantificó el contenido de agua en un sistema que la posee en más del 90% de su peso, no se encontraron diferencias significativas entre el método de constancia de peso mediante la utilización de estufa y la determinación por medio de la trampa de Dean-Stark.

En los métodos extractivos se estandarizaron las condiciones (masa de la muestra, temperatura de extracción y determinación del punto final de la misma) para poder contar con una solución suficientemente concentrada.

La extracción del licopeno se efectuó a través de un método rutinario de laboratorio de relativa sencillez. La posterior separación de las fracciones según color y polaridad del solvente utilizado arrojó resultados satisfactorios.

Considerar el mayor espectro de variables que pueden incidir en el desarrollo del cultivo de tomate, y en consecuencia, en la producción de antioxidantes es un factor importante a examinar previo a la evaluación cuantitativa. Las diferencias en el genotipo, en el manejo del cultivo, las condiciones ambientales y el estado de madurez del fruto al momento de cosecha son elementos de los cuales no se puede prescindir cuando se realiza la evaluación final del proceso.

Por lo tanto, establecer el protocolo adecuado para realizar una valoración precisa de

laboratorio brindará las condiciones requeridas para cuantificar el atributo de alimento funcional que posee el tomate. En consecuencia, esta ponderación permitiría establecer un valor agregado que redundaría en un precio diferencial de la materia prima (*commodity*).

Este trabajo es una contribución al conocimiento químico cuali-cuantitativo de los componentes principales del tomate, pudiendo así determinar su valor como alimento funcional en base a su perfil antioxidante. Con valores de esta característica podrían generarse bases de datos, en diversos niveles de escala, que proveyeran información básica para el cálculo de los aportes de compuestos antioxidantes que se efectúan a través de la dieta. Y con ese valor determinar su contribución a los requerimientos diarios.

Agradecimientos

Varias instituciones y personas prestaron su apoyo y colaboración para que la concreción de este trabajo fuese posible: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y su Unidad Ejecutora, Instituto de Biología y Medicina Molecular [IBIMOL, ex PRALIB (Programa de Radicales Libres) (UBA y CONICET)]; Prof. Dra. Alicia B. Pomilio, por el apoyo brindado como Directora del Ing. E.A. Bernatené en la Carrera del Personal de Apoyo (CONICET); Prof. Dr. Arturo A. Vitale, por el aporte de su vasta experiencia en el campo de la Química Orgánica y su invaluable disposición en la labor diaria; Tecnonuclear S.A. por haber brindado parte de la infraestructura necesaria para plasmar el presente trabajo.

Referencias

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. (2008). *Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical*. European Journal of Pharmacology 585, 325-337.

BOSE, K. S.; AGRAWAL, B. K. (2006). *Effect of long term supplementation of tomatoes (cooked) on levels of antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate, lipid profile and glycated haemoglobin in Type 2 diabetes mellitus*. The West Indian Medical Journal 55, 274-278.

BOSE, K. S. y AGRAWAL, B. K. (2007). *Effect of lycopene from tomatoes (cooked) on plasma antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in grade-I hypertension*. Annals of Nutrition & Metabolism 51, 477-481.

CAMPBELL, J. K.; CANENE-ADAMS, K., LINDSHIELD, B. L.; BOILEAU, T. W.; CLINTON, S. K.; ERDMAN Jr. J. W. (2004). *Tomato phytochemicals and prostate cancer risk*. The Journal of Nutrition 134, 3486S-3492S.

INDEC. 2002. *Censo Nacional Agropecuario 2002. Hortalizas: superficie implantada a campo o bajo cubierta por especie, según provincia. Total del país*. Buenos Aires [en línea]. Disponible en: www.indec.mecom.gov.ar/proyectos/cna/cna_defini.asp. [Última fecha de acceso: 20 de mayo de 2012].

CMCBA. (2012). *Boletín del tomate N° 19*. Buenos Aires [en línea]. Disponible en: www.mercadocentral.com.ar/site2006/publicaciones/boletin/pdf/tomate29.pdf. [Última fecha de acceso: 20 de mayo de 2012].

ERDMAN JR. J. W., FORD, N. A.; LINDSHIELD, B. L. (2008). *Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function?* Archives of Biochemistry and Biophysics 483, 229-235.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. (2009). *Environmental-induced oxidative stress in*

neurodegenerative disorders and aging. Mutation Research 674, 73-84.

MIN, K.; EBELER, S. E. (2008). *Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels*. Food and Chemical Toxicology 46, 96-104.

MOORE, D.S. (2000). Análisis de relaciones. En *Estadística Aplicada Básica* (132-171). Antoni Bosch, España.

NORMAN G. R.; STREINER D. L. (1996). *Bioestadística*. Ed. Harcourt, España.

SKOOG, D. A.; WEST, D. H.; HOLLER, F. J. (1995). *Evaluación de los datos analíticos*. Mc Graw-Hill, Méjico.

TOOR, R. K.; SAVAGE, G. P. (2005). *Antioxidant activity in different fractions of tomatoes*. Food Research International 38, 487-494.

USDA. (1991). United States Standards for Grades of Fresh Tomatoes. USA [línea]. Disponible en: www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5050331. [Última fecha de acceso: 19 de mayo de 2012].

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZURA, M.; TELSER, J. (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 39, 44-84.

VAN BREEMEN, R. B.; PAJKOVIC, N. (2008). *Multitargeted therapy of cancer by lycopene*. Cancer Letters 269, 339-351.