



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN**  
**PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**  
**UNIDAD SINALOA**



**Caracterización de compuestos fenólicos libres,  
conjugados y ligados de tomate (*Solanum  
lycopersicum*) y de un subproducto industrial de  
tomate y evaluación de su bioactividad**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en C. XIOMARA PATRICIA PEREA DOMÍNGUEZ

GUASAVE, SINALOA, MÉXICO. DICIEMBRE DE 2018



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 12 del mes de noviembre del año 2018, el que suscribe **Xiomara Patricia Perea Domínguez** del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **B141355**, adscrito al **CIDIR Unidad Sinaloa**, manifiesto que es el autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los **Drs. Sergio Medina Godoy** y **Maribel Valdez Morales**, y cede los derechos del trabajo titulado **“Caracterización de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de un subproducto industrial de tomate y evaluación de su bioactividad”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [patricia\\_34@hotmail.com](mailto:patricia_34@hotmail.com); [smedinam@ipn.mx](mailto:smedinam@ipn.mx) y [maribelvaldez47@hotmail.com](mailto:maribelvaldez47@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Xiomara Patricia Perea Domínguez  
Nombre del alumno



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 12 horas del día 04 del mes de octubre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR- Sinaloa para examinar la tesis titulada:

**“Caracterización de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de un subproducto industrial de tomate y evaluación de su bioactividad”**

Presentada por el alumno:

<b>Perea</b>	<b>Domínguez</b>	<b>Xiomara Patricia</b>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: 

B	1	4	1	3	5	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Medina Godoy

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maribel Valdez Morales

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Melina López Meyer

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Laura Gabriela Espinosa  
Alonso

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Luna González

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION



## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 22 de octubre del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Sinaloa en su sesión ordinaria No. 10 celebrada el día 04 del mes de octubre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<b>Perea</b>	<b>Domínguez</b>	<b>Xiomara Patricia</b>							
<small>Apellido paterno</small>	<small>Apellido materno</small>	<small>Nombre (s)</small>							
		Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="padding: 2px 5px;">B</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">4</td> <td style="padding: 2px 5px;">1</td> <td style="padding: 2px 5px;">3</td> <td style="padding: 2px 5px;">5</td> <td style="padding: 2px 5px;">5</td> </tr> </table>	B	1	4	1	3	5	5
B	1	4	1	3	5	5			

Aspirante de: **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
**“Caracterización de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de un subproducto industrial de tomate y evaluación de su bioactividad”**

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
Obtención e identificación de las diferentes fracciones de compuestos fenólicos presentes en el fruto de tomate y un subproducto industrial y evaluación de su potencial bioactivo en diferentes modelos celulares.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

**Dr. Sergio Medina Godoy y Dra. Maribel Valdez Morales**

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:

**CIIDIR-Sinaloa**

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Medina Godoy

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maribel Valdez Morales

Aspirante

  
\_\_\_\_\_  
M.C. Xiomara Patricia Perea  
Domínguez

Presidente del Colegio

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION

## **RECONOCIMIENTO A PROYECTOS Y BECAS**

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección de la Dra. Maribel Valdez Morales y el Dr. Sergio Medina-Godoy.

El presente trabajo fue apoyado económicamente a través de los proyectos SIP-IPN 20160160, SIP-IPN 20171115, SIP-IPN 20182332 y SIP-IPN 20181449.

La alumna Xiomara Patricia Perea Domínguez, reconoce y agradece el apoyo de: El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la *Beca Nacional para Estudios de Doctorado* otorgada en el periodo comprendido de agosto-2014 a julio-2018.

## *Dedicatoria*

*Dedico esta tesis con cariño y agradecimiento a mi familia, mi gran pilar.*

## *Agradecimientos*

*Agradezco inmensamente al Laboratorio de Alimentos Funcionales de CIIDIR-Sinaloa y a quienes han formado parte de él durante mi estadía desde 2009, por las enseñanzas, por el apoyo, por las experiencias, por compartir sus conocimientos conmigo y por permitirme compartir lo que he aprendido con ustedes; por formarme como Maestra en Ciencias y ahora como Doctora en Biotecnología, pero sobre todo, por permitirme establecer grandes y muy valiosas amistades que, segura estoy, perdurarán por siempre.*

*A todos ustedes, gracias.*

*Expreso además, mi más profundo agradecimiento al CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa y a todos mis profesores y compañeros por el apoyo y por contribuir a mi formación.*

*Gracias a todos aquellos que de una u otra forma me apoyaron para conseguir culminar exitosamente esta etapa.*

## RESUMEN

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos, y su eliminación mediante mecanismos protectores denominados sistemas antioxidantes de la célula, lo que conlleva daño a biomoléculas, disfunciones fisiológicas, envejecimiento, muerte celular o patologías como el cáncer. Los radicales libres se forman de manera constante en la célula por fuentes endógenas y exógenas, entre las que destacan radiaciones UV, toxinas y plaguicidas. Dentro de los compuestos capaces de contrarrestar los efectos nocivos de los radicales libres destacan los compuestos fenólicos, los cuales pueden encontrarse de forma libre, conjugada o ligada en las células vegetales. En este trabajo se evaluó el contenido de compuestos fenólicos libres, conjugados (ácido hidrolizables y alcalino hidrolizables) y ligados de diferentes variedades de tomate y un subproducto industrial de tomate y se determinó su potencial bioactivo. Se determinó que las variedades de tomate analizadas, así como el subproducto industrial son buena fuente de compuestos fenólicos en sus diferentes formas (en un rango de 7.33 a 91.47 mg eq. de ácido gálico/mg extracto seco). Además, se determinó el perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC detectándose cinco ácidos fenólicos ( $\rho$ -cumárico, caféico, ferúlico, gálico y clorogénico), siendo el ácido caféico el más abundante; así mismo, se detectaron cinco flavonoides (catequina, quercetina, naringenina, kaempferol y rutina), siendo naringenina el más abundante. Se observó interesante actividad antioxidante, determinada por los métodos DPPH (25.79-252.35  $\mu\text{mol eq. Trolox/g extracto seco}$ ) y ORAC (64.09-1005.19  $\mu\text{mol eq. Trolox/g extracto seco}$ ). Adicionalmente, se evaluó la capacidad antiproliferativa de las diferentes fracciones de compuestos fenólicos en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. Los compuestos fenólicos alcalino hidrolizables de tomate saladette ( $\text{IC}_{50}=2.839 \mu\text{g de extracto seco/mL}$ ) y los ácido hidrolizables ( $\text{IC}_{50}=3.014 \mu\text{g de extracto seco/mL}$ ) del subproducto mostraron actividad antiproliferativa muy fuerte. Además, se buscó establecer un modelo celular para la evaluación del efecto inductor de estrés oxidativo de plaguicidas en eritrocitos humanos y determinar el efecto protector de compuestos fenólicos; sin embargo, y en contraste con lo previamente reportado en la literatura, el plaguicida seleccionado a las concentraciones probadas no alteró los indicadores de estrés oxidativo evaluados (enzimas antioxidantes). A partir de los



resultados obtenidos en este estudio, es posible concluir que las variedades de tomate saladette y grape y el subproducto industrial de tomate son fuentes ricas en compuestos fenólicos con una alta actividad antioxidante y efecto anti-proliferativo en líneas celulares de cáncer de mama. Además, la valorización del subproducto industrial de tomate, mediante el empleo de sus diferentes fracciones de compuestos fenólicos antioxidantes en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica, podría generar ingresos adicionales para la industria procesadora de tomate y reducir el problema de eliminación de desechos.

## ABSTRACT

Oxidative stress is an imbalance between production of free radicals and reactive metabolites, and their removal by antioxidant systems, which leads to damage to biomolecules, physiological dysfunctions, aging, cell death or pathologies such as cancer. Free radicals are formed constantly in the cell by endogenous and exogenous sources, such as UV radiation, toxins and pesticides. Phenolic compounds can decrease the damage of free radicals in the cell and they can be found free, conjugated and bound in plant cells. In this work, the concentrations of free, conjugates (acid-hydrolyzable and alkaline-hydrolyzable) and bound phenolic compounds from different tomato varieties and an industrial tomato by-product extracts were evaluated and their bioactive potential was determined. It was determined that the tomato varieties analyzed, as well as the industrial by-product, are a good source of phenolic compounds in their different forms (7.33-91.47 mg eq of gallic acid/mg dry extract). In addition, the phenolic compound profile was determined by HPLC. Five phenolic acids were detected (*p*-coumaric, caffeic, ferulic, gallic and chlorogenic); caffeic acid was the most abundant phenolic acid and it was found mainly in its conjugated. Five flavonoids were detected (catechin, quercetin, naringenin, kaempferol and rutin). Naringenin was the most abundant flavonoid and it was mainly detected in bound form. Good antioxidant activity determined by DPPH (25.79 -252.35  $\mu\text{mol Trolox eq./g dry extract}$ ) and ORAC (64.09-1005.19  $\mu\text{mol Trolox eq./g dry extract}$ ) methods was observed. Additionally, the anti-proliferative capacity of different fractions of phenolic compounds in the MCF-7 breast cancer cell line was evaluated. The alkaline-hydrolysable phenolic compounds from saladette tomato ( $\text{IC}_{50}=2.839 \mu\text{g of dry extract/mL}$ ) and the acid-hydrolyzables from by-product ( $\text{IC}_{50}=3.014 \mu\text{g dry extract/mL}$ ) showed very strong anti-proliferative activity. In addition, we sought to establish a cellular model for the evaluation of the oxidative stress inducing effect by plagucides in human erythrocytes and to determine the protective effect of phenolic compounds, however, and in contrast with previously reported, the selected pesticide at the tested concentrations did not change the indicators of oxidative stress evaluated (antioxidant enzymes). From our results we can conclude that saladette and grape tomato and industrial tomato by-product are rich sources of phenolic compounds with high antioxidant activity and strong anti-proliferative effect in

a breast cancer cell line. In addition, the valorization of industrial tomato by-product, through the use of its different fractions of antioxidant phenolic compounds in food, cosmetic or pharmaceutical industry, could generate additional income for the tomato processing industry and to reduce the waste disposal problem.

## CONTENIDO

La presente tesis consta de cinco capítulos. En el capítulo 1 se presenta una introducción general, se definen de los objetivos, justificación, hipótesis y una revisión bibliográfica que define conceptos importantes para la comprensión del documento, así como una revisión de los antecedentes de este trabajo.

El capítulo 2 presenta un artículo científico de investigación publicado en 2018 en la revista *Journal of Food Science and Technology*, como parte del trabajo para la obtención del grado. Este capítulo comprende la caracterización de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados a partir de tomate y subproducto industrial de tomate y la evaluación de su potencial bioactivo. El capítulo 3 corresponde a un artículo original de investigación sobre el efecto citotóxico de los compuestos fenólicos de tomate y subproducto industrial en la línea celular de cáncer de mama MCF-7. El capítulo 4 es un artículo original de investigación relativo al efecto inductor de estrés oxidativo de plaguicidas utilizando como modelo eritrocitos humanos. Es importante destacar que los capítulos 2, 3 y 4, redactados en el formato de artículo científico, son presentados en idioma inglés debido a que es el idioma requerido por las revistas elegidas para su publicación, los cuales serán enviados para su revisión y publicación en los próximos meses.

Finalmente, el lector encontrará en el capítulo 5 una discusión integradora de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo y las conclusiones generales, así como un apartado de literatura consultada en este último capítulo.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
<b>CAPÍTULO 1.</b> INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
<b>CAPÍTULO 2.</b> COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE VARIEDADES DE TOMATE Y UN SUBPRODUCTO INDUSTRIAL: FENÓLICOS LIBRES, CONJUGADOS Y LIGADOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	51
<b>CAPÍTULO 3.</b> ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES, CONJUGADOS Y LIGADOS DE TOMATE Y SUBPRODUCTO INDUSTRIAL EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA MCF-7	80
<b>CAPÍTULO 4.</b> ESTUDIO <i>in vitro</i> DEL EFECTO DEL PLAGUCIDA ORGANOFOSFORADO MALATIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN ERITROCITOS HUMANOS DE HABITANTES DEL NORTE DEL ESTADO DE SINALOA.	96
<b>CAPÍTULO 5.</b> DISCUSIÓN INTEGRADORA DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES	118
<b>ANEXOS</b>	128

# **CAPÍTULO 1:**

**INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN,  
HIPÓTESIS Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

# CONTENIDO DEL CAPÍTULO 1

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	4
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	7
<b>3. HIPÓTESIS</b>	8
<b>4. OBJETIVOS</b>	9
<b>5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	10
<b>5.1. Estrés oxidativo</b>	10
<b>5.2. Antioxidantes</b>	11
5.2.1 Clasificación	12
5.2.2. Compuestos fenólicos	18
5.2.3. Carotenoides	21
<b>5.3. Generación y fuentes de radicales libres</b>	21
5.3.1 Plaguicidas como compuestos generadores de estrés oxidativo	22
5.3.1.1 Compuestos que ejercen efectos protectores frente al daño celular inducido por plaguicidas	23
<b>5.4. Subproductos, residuos y desechos agroindustriales.</b>	25
5.4.1 Definiciones	25
5.4.2 Recuperación y valor agregado de residuos, subproductos y desechos agroindustriales.	26
5.4.3 Subproductos como fuentes de compuestos bioactivos	29
<b>5.5. Tomate</b>	31
5.5. 1 Importancia económica	31
5.5.2 Descripción botánica	32
5.5.3 Consumo	32
5.5.4 Industria procesadora de tomate en México	33
5.5.5 Subproducto de tomate como fuente de compuestos bioactivos	34
5.5.6 Ingredientes funcionales a partir de subproducto de tomate	37
<b>6. REFERENCIAS</b>	39

## ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO 1

	<b>Pág.</b>
<b>Figura C1.1.</b> Reacción redox mostrando la generación de varias especies reactivas de oxígeno.	10
<b>Figura C1.2.</b> Clasificación de los antioxidantes.	14
<b>Figura C1.3</b> Mecanismos de defensa antioxidante en el organismo.	15
<b>Figura C1.4.</b> Estructura química de algunos antioxidantes endógenos y exógenos más comunes.	17
<b>Figura C1.5.</b> Clasificación de los compuestos fenólicos con base en su estructura.	19
<b>Figura C1.6.</b> Representación de la estructura primaria de las paredes celulares de plantas y entrecruzamientos entre componentes estructurales y compuestos fenólicos.	20
<b>Figura C1.7.</b> Representación esquemática de diferentes técnicas de extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos de alimentos y sus efectos benéficos en la salud.	28



## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo se define como el estado en el cual los radicales libres alcanzan niveles excesivos en el organismo, ya sea por una elevada producción o por una remoción insuficiente de los mismos. La capacidad de reacción del exceso de los radicales libres con proteínas, lípidos y ADN tiene consecuencias patológicas y puede llevar a disfunciones fisiológicas, muerte celular o patologías como diabetes y cáncer, así como envejecimiento prematuro del organismo (Lazo-de-la-Vega-Monroy y Fernández-Mejía, 2013).

Los radicales libres se forman de manera endógena y exógena. Se ha establecido que en la célula eucariota, más del 90% de los radicales libres de oxígeno se generan en la mitocondria (Skulachev, 2012). Diversas enzimas oxidasas como la citocromo oxidasa mitocondrial y la xantina oxidasa también son poderosas fuentes de radicales libres. Además, algunas fuentes exógenas de radicales libres incluyen las radiaciones UV, rayos X, rayos gama, radiaciones de microondas, toxinas fúngicas, xenobióticos y ciertos plaguicidas y herbicidas (Sen *et al.*, 2010). Entre las fuentes exógenas, se encuentran los plaguicidas, los cuales son compuestos empleados comúnmente en agricultura para controlar plagas y prevenir enfermedades; esta es la medida más aceptada para la obtención de la máxima producción de los cultivos, a pesar de que se comprometa la inocuidad por problemas de residualidad (Martínez-Valenzuela *et al.*, 2009). El uso generalizado de plaguicidas, relacionado principalmente con su aplicación en la agricultura alrededor del mundo, se ha convertido en un preocupante problema ambiental y de salud, debido a que estos compuestos son altamente tóxicos para los organismos vivos (Bovet y Paccaud, 2012; Salama *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que las manifestaciones tóxicas inducidas por ciertos plaguicidas pueden estar asociadas al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y a la alteración del equilibrio entre compuestos pro-oxidantes y antioxidantes en la membrana lipídica como consecuencia de reacciones de peroxidación (Mohammad *et al.*, 2004; Salama *et al.*, 2013). En sangre, los eritrocitos son particularmente sensibles al daño oxidativo debido a la presencia de cantidades elevadas de ácidos grasos poliinsaturados en

sus membranas y una alta concentración celular de oxígeno y hemoglobina (Abdallah *et al.*, 2011).

Por otra parte, el tomate es uno de los frutos más versátiles y ampliamente utilizados. Es consumido en fresco y en una amplia gama de productos industrializados (De Sousa *et al.* 2008). México ocupa el décimo lugar mundial entre los países productores de tomate, con una producción de 3.4 millones de toneladas por año, y el estado de Sinaloa es el principal productor nacional, contribuyendo con un 27% de la producción (SIAP, 2018). Diversos estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de tomate y productos a base de éste reducen el riesgo de padecer enfermedades crónicas tales como, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer especialmente, cáncer de próstata (Willcox *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015; Paur *et al.*, 2016).

El procesamiento industrial de tomate genera cantidades considerables de subproductos que son utilizados principalmente para la alimentación animal o la producción de composta. El manejo de los subproductos de tomate es considerado un problema importante a enfrentar por las compañías procesadoras, debido a que no deben descargar estos residuos al ambiente (Knoblich *et al.* 2005; Bennamoun *et al.* 2016). En ese sentido, los subproductos industriales de tomate pueden ser recuperados con la finalidad de extraer valiosos metabolitos de interés mediante procesos químicos y biotecnológicos (Ravindran y Jaiswal, 2016).

Tradicionalmente, la bioactividad del tomate y de los productos a base de este ha sido atribuída a los carotenoides. Durante los últimos años, el tomate y sus subproductos han sido objeto de importantes investigaciones centradas principalmente en la recuperación de licopeno y  $\beta$ -caroteno, así como en la evaluación de su potencial bioactivo (Knoblich *et al.*, 2005; Strati y Oreopoulou 2011; Lavelli y Torresani 2011; Stajčić *et al.* 2015). Se ha demostrado que extractos de tomate y el licopeno poseen la capacidad de inhibir la cardiotoxicidad de antibióticos generada por la inducción de la producción de radicales libres (Karimi *et al.*, 2005). Así mismo, se ha reportado que el licopeno es capaz de proteger linfocitos frente al daño celular inducido por irradiación (Srinivasan *et al.*, 2009).

Más recientemente, se ha demostrado el efecto protector de dicho carotenoide frente a los efectos citotóxicos y genotóxicos de plaguicidas en linfocitos de sangre periférica humana (Aslantürk y Çelik, 2016).

Por otro lado, los compuestos fenólicos de tomate han demostrado una amplia gama de bioactividad tales como actividad antioxidante, antimutagénica y citotóxica *in vitro*, en tomate fresco, productos procesados y subproductos industriales (Capanoglu *et al.*, 2010; Ferreres *et al.*, 2010; Valdez-Morales *et al.*, 2014). Los compuestos fenólicos en las plantas pueden existir en formas solubles libres, solubles conjugadas (ácidas y alcalinas hidrolizables) e insolubles (Wang *et al.*, 2015). Recientemente, el análisis y la evaluación de la bioactividad de diferentes fracciones de compuestos fenólicos de fuentes vegetales y subproductos han atraído considerablemente la atención de los investigadores porque permite una caracterización más completa (Ambigaipalan *et al.*, 2016; Ayoub *et al.*, 2016).

Aunque se han realizado diversos estudios en tomate y subproductos, la mayoría de estos se han llevado a cabo empleando extractos fenólicos crudos y se carece de una identificación detallada de los compuestos fenólicos solubles, conjugados y ligados. Por lo tanto, existe demanda de un análisis exhaustivo de estos compuestos fenólicos y evaluación de su potencial bioactivo. Por lo anterior, en este estudio se planteó aislar, identificar y cuantificar diferentes fracciones fenólicas de tomate y subproducto y evaluar su potencial bioactivo en distintos modelos celulares, con la finalidad de sentar las bases para su aprovechamiento en el desarrollo de productos con alto valor agregado. Además, se buscó establecer un modelo celular para la evaluación del efecto protector de compuestos fenólicos frente al estrés oxidativo inducido por plaguicidas en eritrocitos humanos *in vitro*.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El tomate es un alimento de consumo común que debido a su importante contenido de antioxidantes ha mostrado gran potencial en la prevención de enfermedades. Tradicionalmente, el potencial bioactivo del tomate ha sido atribuido a los carotenoides (principalmente licopeno y  $\beta$ -caroteno), mostrándose un interés menor en los compuestos fenólicos. A la fecha no se ha reportado una caracterización completa de los compuestos fenólicos de tomate y se carece de una evaluación detallada de su potencial bioactivo.

Por otra parte, el procesamiento industrial de tomate para la producción de pasta y jugos genera anualmente grandes cantidades de subproductos que no son aprovechados y constituyen un problema de manejo para las industrias debido a que no deben ser descargados al ambiente sin tratamientos previos. En ese sentido, resulta importante realizar una caracterización detallada del contenido de compuestos fenólicos del subproducto y evaluación de su bioactividad mediante métodos *in vitro* y empleando líneas celulares, con la finalidad de determinar si constituye una buena fuente de compuestos bioactivos que pudieran ser utilizados en la producción de nutraceuticos u otras aplicaciones, que contribuyan a su valorización.

Adicionalmente, en el estado de Sinaloa en los últimos años se ha observado la aplicación indiscriminada de plaguicidas, principalmente relacionada con su uso en la agricultura, lo cual se ha convertido en un importante problema ambiental y de salud debido a la toxicidad de estos compuestos para los organismos vivos, en muchos casos relacionada con su capacidad de generar estrés oxidativo. Por tal motivo, resulta importante establecer un modelo celular para la evaluación de los efectos inductores de estrés oxidativo de plaguicidas, que sea accesible, que tenga relevancia biológica, que implique procedimientos sencillos y que permita, posteriormente, evaluar los efectos protectores de diferentes compuestos, como los compuestos fenólicos de tomate, frente al estrés oxidativo inducido por plaguicidas u otros compuestos.

### **3. HIPÓTESIS**

El tomate y el subproducto industrial de tomate son fuente importante de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados con actividad antioxidante en distintos modelos y actividad antiproliferativa en células cancerosas.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Obtener e identificar las diferentes fracciones de compuestos fenólicos presentes en el fruto de tomate y un subproducto industrial y evaluar su potencial bioactivo en diferentes modelos celulares.

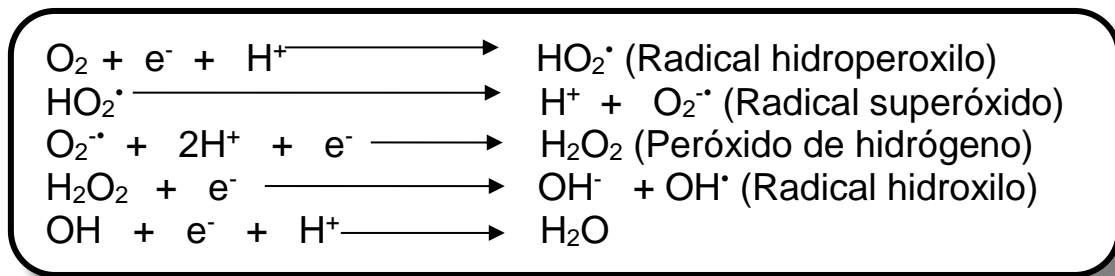
### Objetivos específicos

- Aislar, identificar y cuantificar diferentes fracciones de compuestos fenólicos del fruto de tomate y un subproducto industrial y evaluar su actividad antioxidante *in vitro* por distintos métodos.
- Evaluar el efecto antiproliferativo de diferentes fracciones de compuestos fenólicos de tomate y subproducto industrial en la línea celular de cáncer de mama MCF-7.
- Evaluar del efecto protector de compuestos fenólicos frente al estrés oxidativo inducido por plaguicidas en eritrocitos humanos *in vitro*.

## 5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 5.1 Estrés oxidativo

Los radicales libres se definen como especies químicas, capaces de existir de manera independiente, que poseen un electrón desapareado en un orbital atómico o molecular (Halliwell *et al.*, 1995). Los radicales libres más comunes en sistemas biológicos son las especies reactivas de oxígeno (ERO); éstos incluyen el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Hou *et al.*, 2005). Los organismos vivos están expuestos constantemente a las especies reactivas de oxígeno, formadas como subproductos de la respiración, el metabolismo, la autooxidación de los xenobióticos, o como resultado del estrés que acompaña a una serie de enfermedades (Anraku *et al.*, 2018). La Figura C1.1 muestra la generación de algunas especies reactivas de oxígeno.



**Figura C1.1.** Reacción redox mostrando la generación de varias especies reactivas de oxígeno. Fuente: Flora, 2009.

La acumulación de ciertas concentraciones de ERO es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular y los organismos vivos lo logran mediante el sistema de defensa antioxidante, lo que les permite mantener un equilibrio entre el desafío oxidativo y la protección. En condiciones de estrés oxidativo, el sistema de defensa antioxidante puede verse superado por la producción excesiva de ERO, lo que lleva a la activación de vías de señalización específicas y reacción con biomoléculas importantes con

impacto potencial en todo el organismo, lo que conduce a enfermedades y/o la muerte (Durackova, 2010; Murphy *et al.* 2011; Gebicki, 2016).

El estrés oxidativo ha sido entendido como una cantidad excesiva de ERO como resultado de un desequilibrio entre la generación y la capacidad de las células de detoxificar el exceso de estas especies. Por lo tanto, el estrés oxidativo es la repercusión de una mayor incidencia de radicales libres, pero también de una actividad reducida del sistema de defensa antioxidante protectora (Poljsak *et al.*, 2013). Los productos metabólicos generados por las ERO son capaces de atacar lípidos de membrana, proteínas y ADN (Poli *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2005); incluso, se considera que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la patogenia del envejecimiento y enfermedades degenerativas (Han *et al.*, 2007; Kadenbach *et al.*, 2013).

## **5.2. Antioxidantes**

En un sistema biológico, los antioxidantes pueden definirse como compuestos capaces de retrasar significativamente o inhibir la oxidación de otras moléculas cuando están presentes en concentraciones bajas en comparación con el sustrato oxidable (Halliwell, 1995; Pisoschi y Pop 2015). El sustrato oxidable puede ser cualquier molécula presente en materiales biológicos y alimentos, incluyendo carbohidratos, ADN, lípidos y proteínas (Wanasundara y Shahidi, 2005). De acuerdo con Sisein (2014) el término "antioxidante" se refiere a cualquier molécula capaz de estabilizar o desactivar radicales libres antes de que ataquen las células. Los seres humanos han desarrollado sistemas antioxidantes altamente complejos (enzimáticos y no enzimáticos), que trabajan sinérgicamente y en combinación entre sí para proteger las células y los sistemas de órganos del cuerpo contra el daño de los radicales libres.

Las funciones de los antioxidantes implican disminuir el estrés oxidativo pudiendo actuar de formas distintas: disminuyendo la concentración de oxígeno, previniendo la formación de la reacción en cadena secuestrando los radicales de iniciación, unión a los iones metálicos catalizadores y descomposición de los productos primarios de oxidación; y



previniendo la unión a proteínas, la mutación del ADN, las transformaciones malignas, así como otros parámetros del daño celular y el daño a tejido (Shahidi, 2000; Han *et al.*, 2007; Godic *et al.*, 2014).

### 5.2.1 Clasificación

Los antioxidantes pueden ser endógenos u obtenerse exógenamente, por ejemplo, como parte de la dieta o como suplementos. Algunos compuestos dietéticos que no neutralizan los radicales libres, pero mejoran la actividad endógena, también pueden clasificarse como antioxidantes (Sisein, 2014).

Además, los antioxidantes pueden ser clasificados en enzimáticos y no enzimáticos. Algunos de estos son producidos endógenamente, los cuales incluyen enzimas, moléculas de bajo peso molecular y cofactores enzimáticos (Ratnam, 2006). Las células han desarrollado un sistema enzimático que convierte los agentes oxidantes en moléculas no tóxicas, protegiendo al organismo de los efectos perjudiciales del estrés oxidativo (Gaté *et al.*, 1999). La mayoría de los ERO son neutralizados por los sistemas de defensa endógenos superóxido dismutasa (SOD), catalasa y el sistema peroxidasa/glutación (Hou, 2005).

SOD se considera la primera línea de defensa del organismo frente a los radicales libres. Esta enzima está presente en casi todas las células, y convierte el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La SOD mitocondrial y bacteriana contienen Mn, mientras que la SOD citosólica es un dímero que contiene Cu y Zn. Dado que el  $H_2O_2$  aún es capaz de reaccionar con las ERO, este debe ser degradado por otras dos enzimas, glutación peroxidasa o catalasa (Lazo-de-la-Vega-Monroy y Fernández-Mejía, 2013).

La enzima glutación peroxidasa está localizada en la mitocondria. Esta enzima cataliza la degradación de  $H_2O_2$  por reducción, donde dos moléculas de glutación son oxidadas a glutación disulfuro. La regeneración del glutación por la enzima glutación reductasa, requiere NADPH, el cual es oxidado a NADP<sup>+</sup>. La catalasa, por su parte, está localizada principalmente en los peroxisomas, y es capaz de desintoxicar la célula del  $H_2O_2$

que se difunde desde las mitocondrias al citosol, convirtiéndolo en agua y oxígeno molecular (Lazo-de-la-Vega-Monroy y Fernández-Mejía, 2013).

También existen mecanismos antioxidantes no enzimáticos, que en su mayoría ayudan a regenerar el glutatión disulfuro a glutatión. Las vitaminas antioxidantes como la C, E y el ácido alpha-lipóico actúan mediante dicho mecanismo (Lazo-de-la-Vega-Monroy y Fernández-Mejía, 2013). Los antioxidantes no enzimáticos pueden ser obtenidos de la dieta y éstos a su vez pueden ser clasificados en varios grupos, de los cuales la clase de los compuestos fenólicos es el más amplio (Ratnam, 2006). En la Figura C1.2 se describe esquemáticamente la clasificación de los antioxidantes mientras que en la Figura C1.3 se describe el mecanismo de defensa antioxidante en el organismo. En la Figura C1.4 se presentan las estructuras químicas de algunos antioxidantes endógenos y exógenos más comunes.

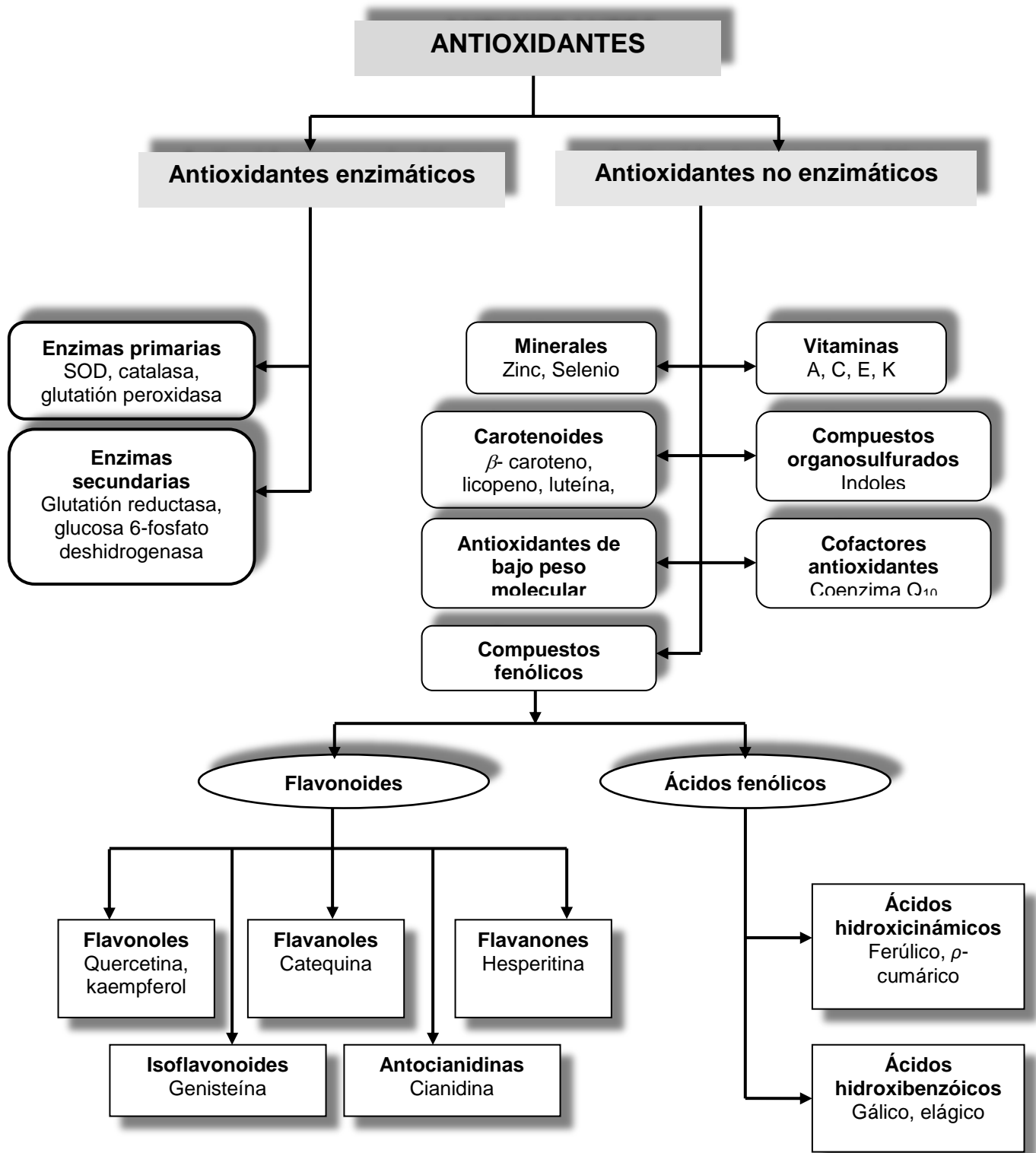
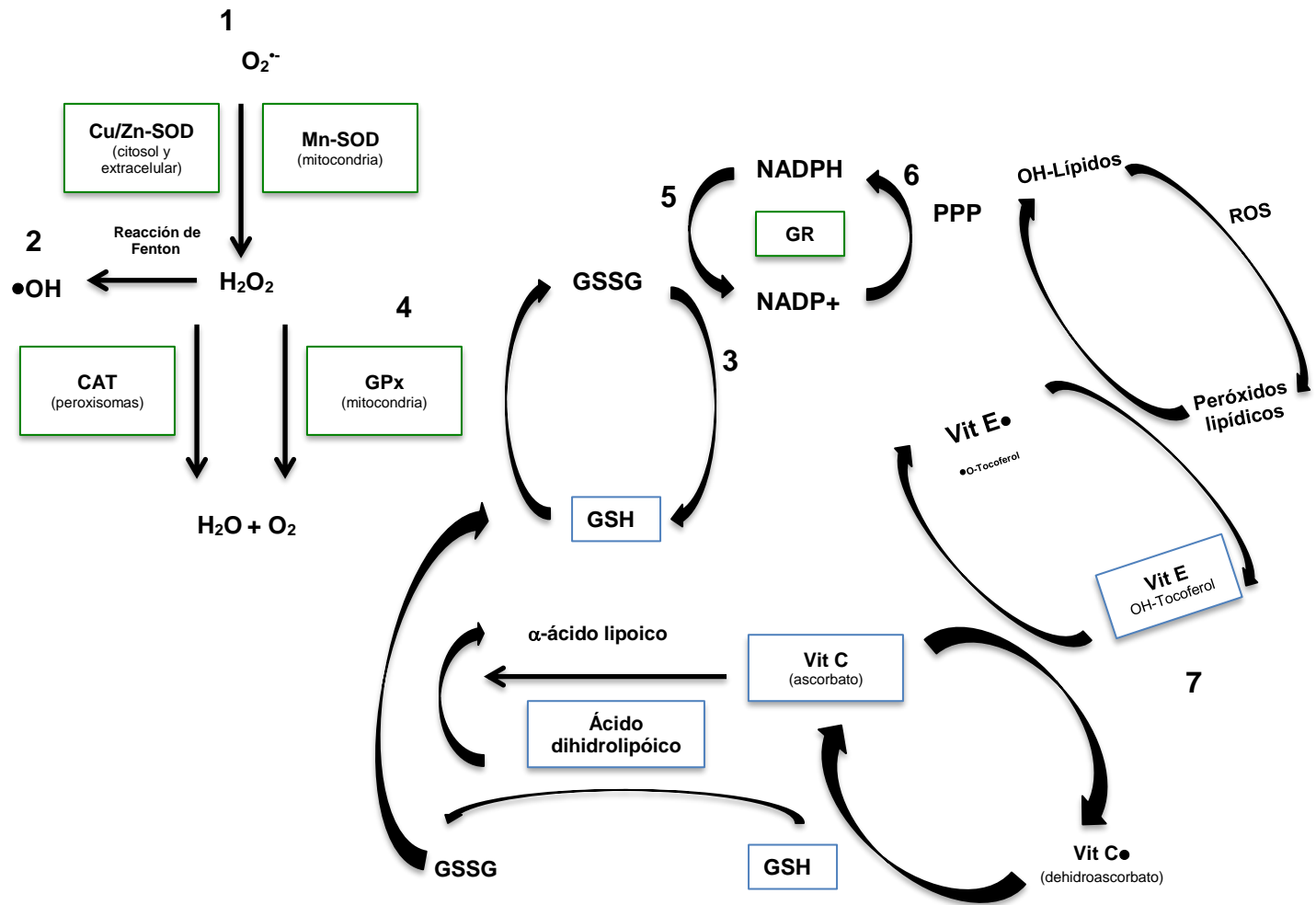


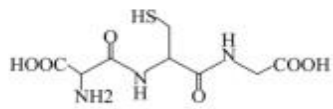
Figura C1.2. Clasificación de los antioxidantes. Fuente: Ratnam, 2006.



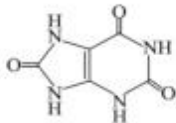
**Figura C1.3.** Mecanismos de defensa antioxidante en el organismo. Tomado de Mirończuk-Chodakowska *et al.* (2018) y Lazo-de-la-Vega-Monroy y Fernández-Mejía, 2013. 1- El radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) está formado por una reducción de oxígeno de un solo electrón. En una reacción catalizada por superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD o Mn-SOD), el radical superóxido se une a un electrón, lo que conduce a la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En la reducción adicional del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno

están implicadas dos enzimas: catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). **2-** En la reacción de Fenton, que es catalizada por metales de transición, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se transforma en radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), que además participa en las reacciones en cadena de radicales libres. **3-** El glutatión reducido (GSH), debido a la presencia del grupo tiol de cisteína, reacciona con radicales libres de proteínas u otras macromoléculas, restaurándolos a la forma reducida. **4-** El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se reduce por el glutatión reducido en una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El glutatión oxidado resultante oxida los tioles de las proteínas. **5-** El glutatión disulfuro se reduce con la glutatión reductasa (GR) usando hidrógeno de NADPH, que se oxida a  $NADP^+$ . **6-** NADPH se genera en la primera fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato (PPP). En esta fase, la glucosa-6-fosfato se deshidrogena por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa para ribulosa 5-fosfato, y al mismo tiempo dos moléculas de  $NADP^+$  se reducen a NADPH. **7-** La vitamina C y el ácido  $\alpha$ -lipoico apoyan la regeneración de GSSG (glutatión disulfuro) nuevamente en GSH. La vitamina E neutraliza los peróxidos lipídicos y termina las reacciones oxidativas en cadena como donante de hidrógeno. La forma no oxidada de la vitamina E puede ser regenerada por la vitamina C y el glutatión.

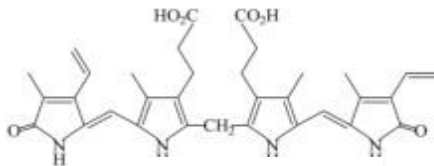
## Antioxidantes endógenos



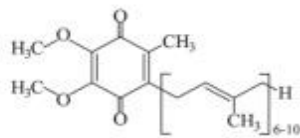
**Glutathión**



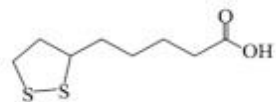
**Ácido úrico**



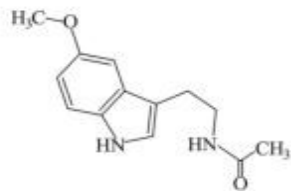
**Bilirrubina**



**Coenzima Q**

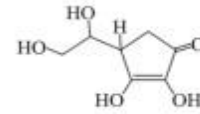


**Alfa ácido lipóico**

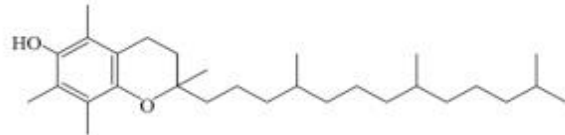


**Melatonina**

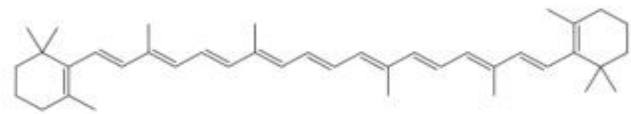
## Antioxidantes exógenos



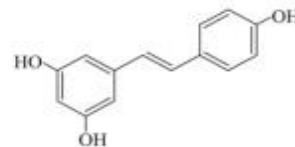
**Vitamina C**



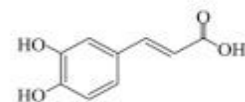
**Vitamina E**



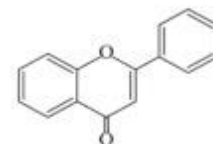
**$\beta$ -caroteno**



**Resveratrol**



**Ácido caféico**



**Típica estructura flavona**

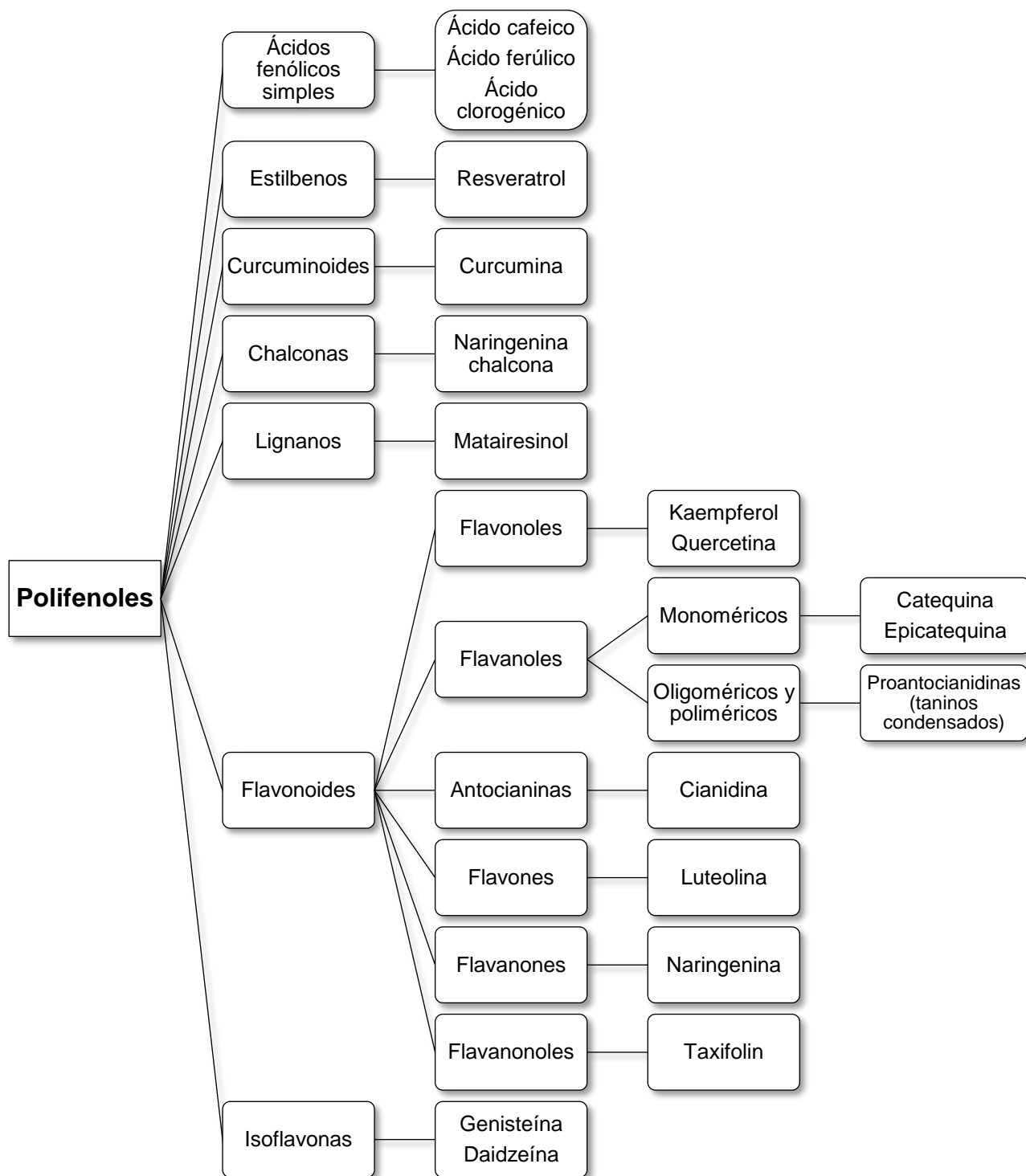
**Figura C1.4.** Estructura química de algunos antioxidantes endógenos y exógenos más comunes.

## 2.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias englobando más de 8000 compuestos de origen natural, los cuales poseen una característica estructural en común, un grupo fenol con al menos un grupo hidroxilo como sustituyente (Robbins, 2003). Su acción antioxidante se debe principalmente a su alta tendencia a quelar metales por los grupos referidos. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y constituyen uno de los grupos más importantes de metabolitos secundarios de las plantas (Roleira *et al.* 2015).

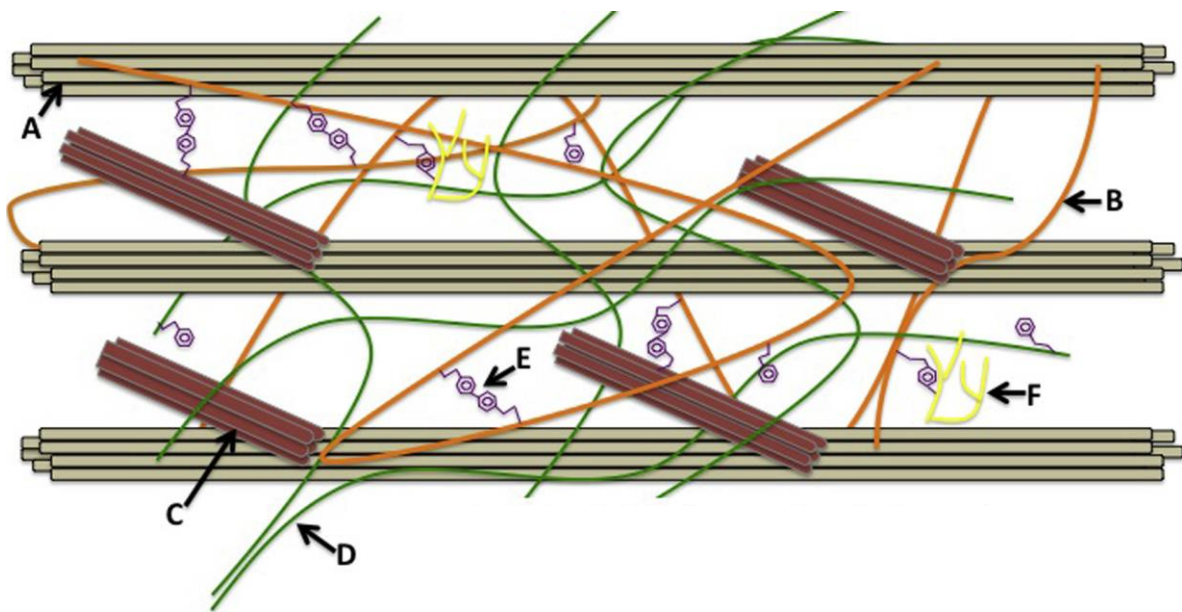
Los compuestos fenólicos han sido clasificados de acuerdo a su estructura (número de anillos fenol, y número y tipo de elementos estructurales ligados), la cual varía desde moléculas muy simples hasta compuestos altamente polimerizados. En esta clasificación estructural destacan los ácidos fenólicos simples, estilbenos, curcuminoides, chalconas, lignanos, flavonoides e isoflavonas (Figura C1.5) (Paliyath *et al.*, 2008; González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011), siendo los ácidos fenólicos y los flavonoides los más ampliamente distribuidos en plantas (frutos, tallos, raíces y granos) (Pietta, 2000; Han *et al.*, 2007).

Desde un punto de vista analítico los compuestos fenólicos pueden dividirse en extraíbles (formas solubles libres y solubles conjugadas) y no extraíbles o formas insolubles ligadas. Las formas libres están presentes principalmente en las vacuolas de las células vegetales, mientras que las formas solubles conjugadas o ésteres, se encuentran esterificados a moléculas de azúcares u otros componentes de bajo peso molecular; por su parte, las formas insolubles ligadas están unidas covalentemente a los componentes estructurales de las paredes celulares, como celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y proteínas estructurales, tal como se describe en la Figura C1.6 (De Mira *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015).



**Figura C1.5.** Clasificación de los compuestos fenólicos con base en su estructura. Fuente: González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011.





**Figura C1.6.** Representación de la estructura primaria de las paredes celulares de plantas y entrecruzamientos entre componentes estructurales y compuestos fenólicos. (A) Celulosa. (B) Hemicelulosa. (C) Proteínas estructurales. (D) Pectina. (E) Ácidos fenólicos. (F) Lignina. Fuente: Acosta-Estrada *et al.*, 2014.

En la naturaleza, los ácidos fenólicos se encuentran principalmente en sus formas insolubles o ligadas, mientras que los flavonoides se presentan como glicósidos con uno o múltiples residuos de azúcar ligados a los grupos OH (O-glicósidos) o mediante enlaces carbono-carbono (C-glicósidos) (Acosta-Estrada *et al.*, 2014.). En algunos estudios de actividad antioxidante *in vitro*, los fenólicos insolubles ligados han mostrado mayor capacidad antioxidante comparada con los compuestos libres y conjugados (Liyana-Pathirana y Shahidi, 2006; Chandrasekara y Shahidi, 2010).

### **5.2.3. Carotenoides**

Los carotenoides son moléculas lipofílicas y se encuentran principalmente en vegetales y frutas amarillas y anaranjadas. Son hidrocarburos que contienen al menos 40 carbonos con un extenso sistema de doble enlace conjugado. En plantas, pueden encontrarse esterificados a ácidos grasos y no esterificados. Los carotenoides sirven como pigmentos accesorios en la fotosíntesis y también protegen el aparato fotosintético del exceso de energía. Existen más de 650 tipos de carotenoides en la naturaleza, incluyendo hasta 100 que están presentes en la cadena alimentaria y en la dieta humana. Los humanos no son capaces de sintetizar carotenoides, por lo que deben ingerirlos a través de los alimentos o mediante vías de suplementación. Solo entre 30 y 40 carotenoides han sido encontrados en muestras de sangre humana, entre los que destacan licopeno, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -caroteno como los más abundantes (Zimmer y Hammond, 2007; Abuajah *et al.*, 2015; Eggersdorfer y Wyss, 2018; Gürbüz *et al.*, 2018).

### **5.3. Generación y fuentes de radicales libres**

Los radicales libres pueden ser formados mediante sustancias endógenas y exógenas. Estos se encuentran formándose continuamente en la célula y el medio ambiente. Algunas de las diferentes fuentes de radicales libres son las siguientes:

- Radiaciones UV, rayos X, rayos gama y radiación de microondas.
- Reacciones catalizadas por metales.

- Radicales libres de oxígeno en la atmósfera, considerados como contaminantes.
- Inflamación
- Neutrófilos estimulados por exposición a microorganismos.
- En las reacciones de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, las cuales generan radicales libres de oxígeno como producto.
- ERO formadas por varias fuentes como citocromo oxidasa mitocondrial, xantina oxidasas, neutrófilos y peroxidación lipídica.
- ERO generadas por el metabolismo del ácido araquidónico, plaquetas, macrófagos y células de músculo liso.
- Interacción con químicos, humo emanado por automóviles y humo del cigarro e ingesta de alcohol y ciertas drogas.
- Quema de material orgánica.
- Efluentes industriales, asbestos y algunos iones metálicos.
- Toxinas fúngicas, xenobióticos y ciertos plaguicidas y herbicidas (Sen *et al.*, 2010).
- La descomposición térmica del azo compuesto AAPH ((2,2'-azo-bis(2-amidino-propano) dihidrocloruro)) genera radicales peroxilo, por lo que se ha utilizado en sistemas celulares para inducir estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2014).

### 5.3.1 Plaguicidas como compuestos generadores de estrés oxidativo

Plaguicida es un término muy extenso que cubre una amplia gama de compuestos como insecticidas, fungicidas, herbicidas, nematicidas, reguladores de crecimiento de las plantas, entre otros (Tomer *et al.*, 2015). Se ha demostrado que los plaguicidas pueden inducir estrés oxidativo mediante la producción de radicales libres, aumentando la peroxidación lipídica y ocasionando un drástico incremento en la actividad de enzimas antioxidantes y en un grupo de componentes antioxidantes vitales en mamíferos (Agrawal y Sharma, 2010). El estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de plaguicidas como los organofosforados, organoclorados, *N*-metilcarbamatos, piretroides, triazinas, neonicotinoides, dicarbamatos y paraquat (Hernández *et al.*, 2013). Estudios epidemiológicos a largo plazo en humanos expuestos a mezclas de plaguicidas han reportado estimulación de enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica en eritrocitos

(Ogut *et al.*, 2011). Como consecuencia, los plaguicidas pueden perturbar las funciones fisiológicas y bioquímicas en células como los eritrocitos (Akhgari *et al.*, 2003). Además, se considera que el estrés oxidativo en eritrocitos conduce a alteraciones significantes en su estructura conformacional, lo que compromete el flujo efectivo de sangre y la absorción y liberación de oxígeno (Prasanthi y Rajini 2005). En contraste, los efectos nocivos de las ERO son balanceados por la acción de las enzimas antioxidantes y de los antioxidantes no enzimáticos (Halliwell, 1996).

### **5.3.1.1 Compuestos que ejercen efectos protectores frente al daño celular inducido por plaguicidas**

Algunos estudios han demostrado que ciertos compuestos antioxidantes tienen la capacidad de proteger células como los eritrocitos frente al daño inducido por plaguicidas. Durak *et al.* (2009) evaluaron el efecto protector de las vitaminas C y E frente al estrés oxidativo inducido por malatión en eritrocitos *in vitro*. Sus resultados indican que, a niveles bajos de malatión, los niveles de ácido ascórbico y  $\alpha$ -tocoferol a concentraciones similares a las presentes en el plasma, impiden la inducción del estrés oxidativo por malatión y que la combinación de ambos antioxidantes tiene un efecto sinérgico. Sin embargo, las vitaminas fueron ineficaces a concentraciones extremadamente altas de malatión, lo cual sugiere que la suplementación dietética de vitamina C y E podría ser útil en poblaciones expuestas a este plaguicida.

Por su parte, Abdallah *et al.* (2011) examinaron el potencial del plaguicida organofosforado dimetoato de inducir respuesta al estrés oxidativo en eritrocitos humanos *in vitro* y la capacidad de las vitaminas C y E de mitigar los efectos citotóxicos, concluyendo que estos antioxidantes pueden proteger los eritrocitos frente al estrés oxidativo inducido por dimetoato disminuyendo la peroxidación lipídica y la hiperactividad de SOD y CAT. Así mismo, Eroglu *et al.* (2013) demostraron que las concentraciones en plasma de vitaminas C y E pueden aminorar el estrés oxidativo inducido por ciertas dosis de diclorvos en eritrocitos *in vitro*.

Salama *et al.* (2013) investigaron el efecto del selenio y una combinación de vitaminas C y E en alteraciones bioquímicas inducidas por atrazina, dimetoato y endosulfán en eritrocitos y hepatocitos de rata *in vitro*, encontrando que los compuestos evaluados reducen el efecto lipoperoxidativo ocasionado por los plaguicidas en estudio. Más recientemente, Mossa *et al.* (2014) encontraron un efecto de mejora pronunciada producido por el selenio en ratas intoxicadas con diazinon. Por su parte, Cemek *et al.* (2010) observaron un efecto protector significativo de la vitamina E, el selenio y una combinación de ambos frente al daño inducido por plaguicidas organofosforados *in vivo* en ratas, particularmente en tejidos y sangre. Adicionalmente, se han reportado efectos positivos del flavonoide de origen natural rutina en la disminución del estrés oxidativo en ratas experimentalmente expuestas de forma crónica a metilpirimifos (Hussein *et al.*, 2013).

Por otra parte, diferentes extractos de plantas ricos en compuestos antioxidantes han mostrado la capacidad de ejercer acción protectora frente al daño celular inducido por plaguicidas, empleando distintos modelos de estudio. Kang *et al.* (2007) evaluaron el efecto de un extracto de *Ginkgo biloba* en células de la línea celular PC12 dañadas por el herbicida neurotóxico paraquat, encontrando que la incubación de las células con el extracto antes de exponerlas a paraquat resultó en una reversión de la disminución de la viabilidad celular inducida por el herbicida; además se observó que el colapso inducido del potencial de membrana mitocondrial fue atenuado por el extracto y se redujo el porcentaje de células apoptóticas. Adicionalmente, Atale *et al.* (2014) evaluaron el efecto de extractos del fruto *Syzygium cumini* en la cardiotoxicidad inducida por malatión en miocitos cardiacos de la línea H9C2 *in vitro*, sugiriendo que extractos metanólicos del fruto poseen la habilidad de proteger contra el estrés oxidativo inducido por el plaguicida en el modelo de estudio. Más recientemente, se ha demostrado el efecto protector del carotenoide licopeno frente a los efectos citotóxicos y genotóxicos de plaguicidas en linfocitos de sangre periférica humana (Aslantürk y Çelik, 2016).

Rjeibi *et al.* (2016) evaluaron los efectos hepatoprotectores del extracto metanólico de *Amaranthus spinosus* sobre la lesión hepática en ratas, inducida por la deltametrina (DLM), un plaguicida sintético piretroide. Sus resultados indican que los extractos ricos en

fitoquímicos como compuestos fenólicos y flavonoides, revierten la hepatotoxicidad inducida por el plaguicida, restaurando a niveles normales algunos indicadores como los biomarcadores hepáticos séricos, niveles hepáticos de peroxidación lipídica, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reducido y glutatión peroxidasa. Recientemente, Santo *et al.* (2018) evaluaron el efecto protector de extractos de *Uncaria tomentosa*, una planta originaria de América del Sur, frente al daño oxidativo y genotóxico inducido por glifosato-Round® en pez cebra. Sus resultados indicaron que los extractos protegieron de forma parcial contra el daño inducido por el herbicida al proporcionar efectos antioxidantes y antigenotóxicos, que podrían estar relacionados con los compuestos fenólicos identificados en el extracto.

Con base en la revisión previamente realizada, es posible afirmar que gran cantidad de productos vegetales son fuente importante de compuestos bioactivos, los cuales pueden proteger las células frente al estrés oxidativo inducido por agentes medioambientales como los plaguicidas o bien por otros compuestos o fuentes de radicales libres. En el siguiente apartado, se presenta una revisión bibliográfica de diferentes subproductos, residuos y desechos agroindustriales que se consideran buena fuente de compuestos bioactivos con posible efecto protector celular frente al daño oxidativo.

#### **5.4. Subproductos, residuos y desechos agroindustriales.**

##### **5.4.1 Definiciones**

Con cierta frecuencia al hablar sobre los residuos agroindustriales se utiliza en forma indistinta los términos: subproductos, residuos y desechos, sin importar que existe una diferencia conceptual entre ellos. Un “subproducto” es un producto secundario, bien conocido, generalmente útil, comercializable y por lo tanto con valor agregado, que resulta de un proceso industrial. El término “residuos”, se aplica a aquellos que pueden tener o no un valor comercial, porque son poco comunes o porque se generan en bajas cantidades, sin embargo, algunos de sus constituyentes aún en baja proporción, le pueden conferir algún interés para su utilización. Desde este punto de vista, los términos “subproducto” y

“residuo” podrían utilizarse como sinónimos, no así el término “desecho”, que está referido a aquellos materiales que no tienen algún valor comercial, no que poseen atributos de interés para ser utilizados en algún proceso, por lo que se considera como basura y se les debe dar una disposición final (Saval, 2012; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2015). En esta revisión, se hará referencia a los términos subproducto, residuo o desecho, según lo haya definido el autor original del documento consultado.

De acuerdo con la FAO (2011), aproximadamente una tercera parte de los alimentos producidos para el consumo humano se pierde o se desperdicia a nivel mundial, lo que equivale a alrededor de 1.3 mil millones de toneladas por año. Las pérdidas de vegetales y sus productos se presentan en distintos segmentos de la cadena de suministro:

1. Producción agrícola: pérdidas por daño mecánico y/o durante la cosecha.
2. Manipulación y almacenamiento post-cosecha: incluidas las pérdidas durante la manipulación, almacenamiento, transporte y distribución.
3. Procesamiento industrial o doméstico: por ejemplo, durante la producción de jugos, enlatado, etc. Las pérdidas también pueden ocurrir cuando los cultivos se clasifican como adecuados o no para el proceso, o durante el lavado, pelado, rebanado, concentrado por calor, entre otros.
4. Distribución: incluidas las pérdidas y los residuos en el sistema de mercado, por ejemplo, minoristas, supermercados, mercados mayoristas, entre otros.
5. Consumo: incluidas las pérdidas y el desperdicio durante el consumo en el hogar. (FAO, 2011).

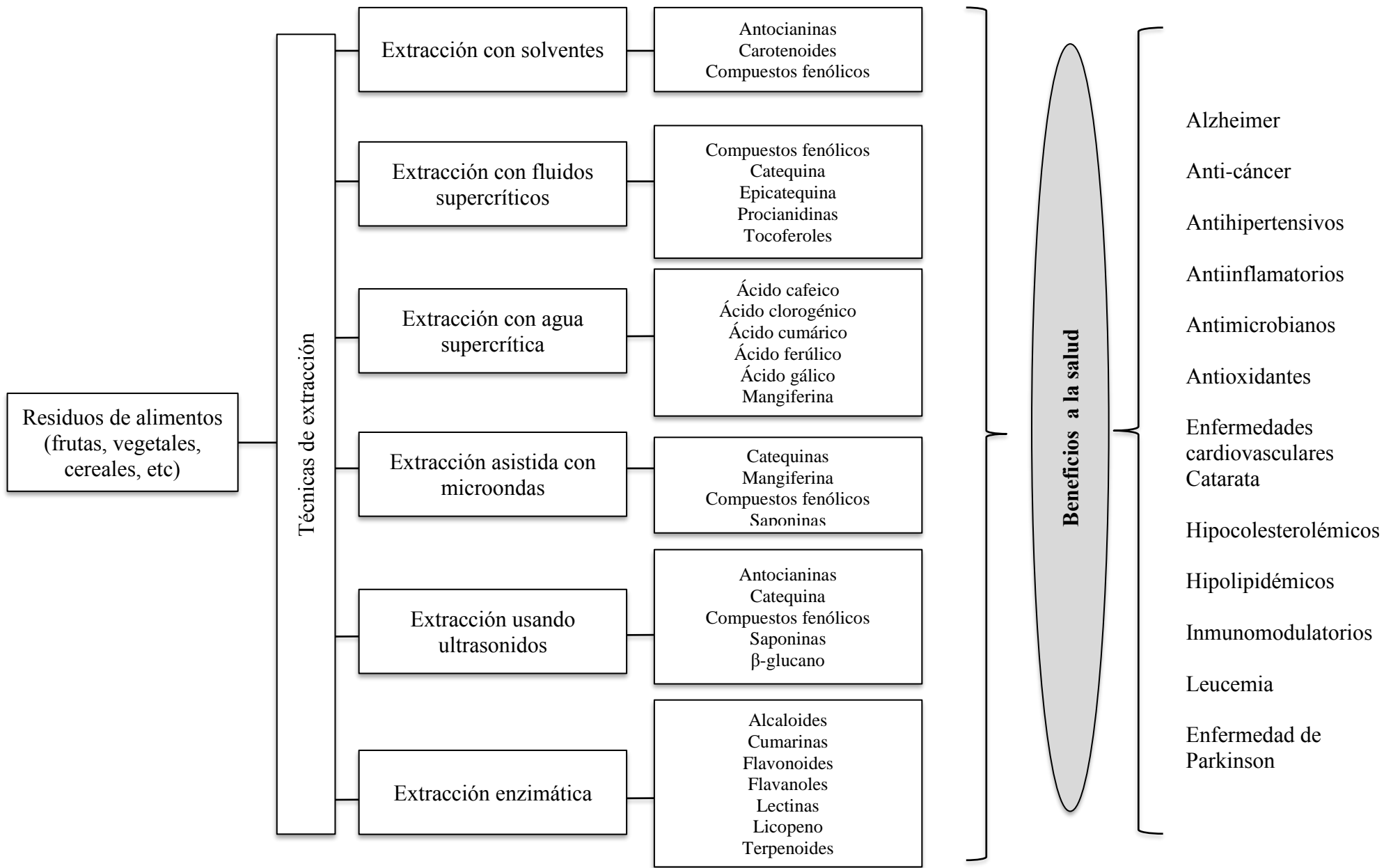
En América Latina, el 20% de la producción inicial de vegetales y sus productos se pierde al inicio de la cadena de suministro, en la producción agrícola, mientras que aproximadamente el 15% de la producción se pierde durante el procesamiento doméstico e industrial (FAO, 2011).

#### **5.4.2 Recuperación y valor agregado de residuos, subproductos y desechos agroindustriales.**

Los subproductos, residuos y desechos de alimentos ocasionan problemas de eliminación y contaminación potencial del medio ambiente, al mismo tiempo que se pierden nutrientes y compuestos valiosos. Los residuos y desechos de alimentos tradicionalmente se han utilizado como alimento para animales y fertilizantes, o bien, son depositados con otros desechos en vertederos o rellenos sanitarios. Sin embargo, la creciente necesidad de protección al ambiente, aunado al deseo de conservación de los recursos naturales, están fomentando una valorización más eficiente de los residuos para la producción de biocombustibles e ingredientes alimentarios (Lin *et al.*, 2013).

Los subproductos, residuos y desechos de la industria alimentaria son fuentes ricas en ingredientes funcionales, como fibra, minerales, fitoquímicos, entre otros. Encontrar alternativas de uso para dichos subproductos es de gran interés; sin embargo, generalmente contienen grandes cantidades de sólidos suspendidos y presentan alta demanda química y bioquímica de oxígeno, así como insuficiente estabilidad biológica, elevado contenido de agua o elevada actividad enzimática, lo cual influyen en las posibles soluciones de recuperación y costos de tratamiento. Debido a ello, los ingredientes potencialmente funcionales deben ser aislados o purificados antes de utilizarlos, por ejemplo, en una matriz alimentaria (Mirabella *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2017). Mediante el desarrollo de enfoques innovadores para valorizar los residuos de alimentos, la industria alimentaria puede reducir la presión del tratamiento de residuos y mejorar la sostenibilidad de la producción de alimentos (Jin *et al.*, 2018). En la Figura C1.7 se muestra una representación esquemática de diferentes técnicas de extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos y sus efectos benéficos en la salud.





**Figura C1.7.** Representación esquemática de diferentes técnicas de extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos de alimentos y sus efectos benéficos en la salud. Adaptado de: Kumar *et al.*, 2017.

### 5.4.3 Subproductos como fuentes de compuestos bioactivos

Los subproductos de la industria alimentaria difieren en su origen y pueden incluir un amplio rango de componentes, entre los que destacan: piel, tallos, hojas, semillas, cáscara, fibra, granos, pulpa, pasta comprimida después de la extracción de aceite, etc., dependiendo de la fuente de la cuál se obtengan. Los subproductos industriales pueden provenir de la industrialización de frutas y vegetales, cereales, legumbres, frutos secos y semillas oleaginosas, entre otros (Martins *et al.*, 2017). Las frutas y vegetales representan la forma más simple de alimentos funcionales debido a que son ricos en componentes bioactivos como compuestos fenólicos y carotenoides (Kumar *et al.*, 2017).

Las industrias de alimentos producen gran cantidad de residuos de frutas y vegetales (Mirabella *et al.* 2018). La industria procesadora de jugos produce entre el 20 y 60% de su materia prima como subproductos los cuales contienen piel, semillas y pulpa inutilizable y que podrían utilizarse para el desarrollo de productos nutraceuticos. Los subproductos de mango y durazno representan una buena fuente de fibra dietética antioxidante, alto contenido de polifenoles y carotenoides, además de prevenir el desarrollo de esteatosis hepática e hiperglucemia (Amaya-Cruz *et al.*, 2015).

La industria vinícola procesa aproximadamente el 75% de la uva que se produce anualmente. El orujo de uva es un subproducto abundante que se compone principalmente de piel, semillas y tallos. Varios estudios han explorado la posibilidad de emplear este subproducto como fuente de compuestos benéficos a la salud y su aplicación en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Beres *et al.*, 2017). Extractos de orujo de uva han sido incorporados exitosamente en películas comestibles de quitosado, proporcionando propiedades antioxidantes y posible aumento de la vida útil (Ferreira *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que extractos fenólicos de orujo de uva podrían reemplazar a los antioxidantes sintéticos empleados en alimentos. Garrido *et al.* (2011) utilizaron extractos de uva roja como antioxidantes naturales en hamburguesas.

El café es uno de los productos alimenticios más consumidos al rededor del mundo. El procesamiento de la cereza de café para la obtención de granos genera una variedad de subproductos dentro de los cuales destaca la pulpa que es desechada generando importantes problemas ambientales y económicos. Una alternativa de utilización de este subproducto ha sido la extracción de fitocomplejos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Magoni *et al.*, 2018). Pujol *et al.* (2013) investigaron la composición química de los desechos de café generados en la industria de café soluble y encontraron que los polifenoles totales y los taninos representan <6 y <4% de los desechos de café, respectivamente.

El orujo o pulpa de manzana es el residuo sobrante (25-30% del total) del total de manzana procesada para la obtención de jugo (Uyttebroek *et al.*, 2018). La pulpa de manzana contiene cantidades significativas de fibra dietética y fitoquímicos (Yan y Kerr, 2012) y ha recibido gran atención debido a que esta industria genera cantidades elevadas de residuos anualmente. Recientemente, Yates *et al.* (2017) utilizaron pulpa de manzana para producir varios compuestos de valor agregado incluyendo azúcares, polifenoles, pectina y biomateriales para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Karling *et al.* (2017) establecieron las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos de pulpa de manzana y determinaron que este residuo es una fuente valiosa de antioxidantes naturales con aplicaciones potenciales en las industrias alimentaria y farmacéutica. Por su parte, Ferrentino *et al.* (2018) recuperaron compuestos fenólicos de alto valor antioxidante empleando CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas como tecnología verde para la valorización de la pulpa de manzana.

Los cítricos, incluyendo naranjas, toronjas, limones, limas, mandarinas, entre otros, se encuentran entre las frutas más cultivadas mundialmente (Sharma *et al.* 2017). En contraste con otras frutas, tienen una porción comestible menor; debido a ello, grandes cantidades de desechos como piel y semillas, son eliminados durante el procesamiento de jugos y otros alimentos (Mirabella *et al.*, 2014). Únicamente la cáscara desechada representa casi el 50% de la masa del fruto. Estos desechos tienen un inmenso valor económico debido a su abundante contenido de varios flavonoides, carotenoides, fibra dietética, azúcares, polifenoles, aceites esenciales y ácido ascórbico. Además, estos

desechos contienen cantidades elevadas de azúcares adecuados para la fermentación y producción de bioetanol (Sharma *et al.* 2017).

El jalapeño es una de las variedades de chile preferidas por los consumidores en México. Más de 500 toneladas anuales son industrializadas, generando desechos compuestos principalmente por piel, semilla y placenta. Este subproducto ha sido estudiado previamente y se ha demostrado que posee un importante contenido de compuestos como rutina, epicatequina y catequina, así como diferentes capsaicinoides que le proporcionan buena actividad antioxidante, por lo que se ha considerado un ingrediente atractivo para el desarrollo de productos con aplicaciones alimentarias o no alimentarias (Sandoval-Castro, 2017).

El tomate representa el cultivo vegetal de mayor importancia económica a nivel mundial. No solo se comercializa en fresco, también se utiliza en la industria del procesamiento de alimentos como pasta, concentrado, jugo, catsup, en sopas, y gran cantidad de productos (Bergougnoux, 2014). En la siguiente sección se describe con mayor profundidad la generación de subproductos a partir del procesamiento industrial de tomate, la recuperación de compuestos bioactivos a partir del mismo y las posibles alternativas para su utilización.

## **5.5. Tomate**

### **5.5. 1 Importancia económica**

Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), la producción mundial de tomate ha incrementado de casi 160 millones de toneladas en el año 2011 a 177 millones de toneladas en 2016. China encabeza la lista de productores mundiales de tomate con aproximadamente 56 millones de toneladas en 2016, seguido de India, Estados Unidos y Turquía. México, por su parte, ocupa el décimo lugar en producción de tomate con 4 millones de toneladas en el

mismo año, lo cual representa aproximadamente un 2.25% de la producción mundial (FAO, 2016).

En México, el tomate ocupa el segundo lugar en el grupo de frutas y hortalizas con mayor producción en 2016, solo superado por la naranja y seguido de chiles y pimientos verdes, limón, plátano, mango y aguacate (FAO, 2016). El estado de Sinaloa es el líder nacional en producción de tomate contribuyendo con aproximadamente el 27% de la producción, con un rendimiento de 64 toneladas por hectárea; en 2017 el estado generó un aporte económico de 4 mil millones de pesos por la comercialización del fruto (SIAP, 2018). En el mismo año, la producción de tomate Saladette representó el 79.9% del total de la producción de tomate en México, el tomate bola el 16.5% y el tomate cherry el 3.6%. Sinaloa encabezó la lista de productores de tomate saladette y bola con un 23.1% y 53.8% de la producción nacional (FIRA, 2016).

### **5.5.2 Descripción botánica**

Desde un punto de vista botánico, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es un fruto tipo baya y no una hortaliza (Bergougnoux, 2014). Pertenece a la familia Solanaceae, que incluye más de 3000 especies, entre ellas varias plantas de importancia económica, como papas, berenjenas, tabaco, pimientos, entre otros. *Solanum* es el género más grande en la familia Solanaceae, que comprende de 1250 a 1700 especies. Las especies del género *Solanum* están presentes en todos los continentes templados y tropicales y son notables por su diversidad morfológica y ecológica. *Solanum* es probablemente el género más importante económicamente, que contiene especies de cultivos y muchas otras especies que producen compuestos venenosos o medicinales (Weese y Bohs, 2007).

### **5.5.3 Consumo**

Se estima que en 2011 el consumo mundial de tomate ascendió a 139.8 millones de toneladas. Durante 2015, el consumo nacional aparente de tomate rojo se ubicó en 1.26 millones de toneladas. Las variaciones en el consumo nacional aparente de tomate

dependen de las fluctuaciones de la producción, así como del nivel de las exportaciones. Por otra parte, el consumo *per capita* anual de tomate en México se ubica en alrededor de 15.2 kilogramos por año, volumen que es inferior al consumo *per capita* promedio mundial, de 20 kg (FAO, 2016; FIRA, 2016; SIAP, 2018).

La mayor parte del consumo mundial de tomate procesado se presenta en forma de pasta de tomate, que a su vez es el ingrediente principal de otros productos como catsup, salsas y jugos. Al producir estos últimos productos, la pasta de tomate se diluye al contenido deseado y se mezcla con otros ingredientes, como especias, sal, azúcar, vinagre e hidrocoloides (Tornberg, 2017).

#### **5.5.4 Industria procesadora de tomate en México**

La industria alimentaria actual en México procesa el tomate en infinidad de formas, desde pastas, zumos, purés, conservas de tomate enteros y pelados, fritos, en componentes de diversas salsas picantes o dulces, mermeladas, esencia para la elaboración de alimentos, saborizantes y otros productos (SAGARPA, 2017). Se estima que en México la industria procesa del 1 al 2% de la producción nacional anual, lo cual representa aproximadamente de 40,000 a 80,000 t anuales. El resto se destina al consumo en fresco nacional y de exportación (FIRA, 2016; WPTC, 2018), sin embargo, son necesarias estimaciones más precisas, considerando que según datos obtenidos en conversaciones personales con directivos de la empresa La Costeña en el estado de Sinaloa, solo en la planta ubicada en la Ciudad de Guasave se procesaron 50,000 t de tomate para producción de pasta durante la temporada 2018.

La producción de pasta de tomate genera 70-75 kg de residuos sólidos por tonelada de tomate fresco. Los residuos están compuestos principalmente por piel y semillas. Las semillas representan aproximadamente el 10% del fruto y 60% del residuo sólido (González *et al.*, 2011). Por lo anterior se estima que anualmente, a nivel nacional se producen hasta 6,000 toneladas de residuos de tomate y solo en la planta La Costeña en Guasave, durante 2018 se generaron aproximadamente 3,750 t de residuos de tomate.

Solo una pequeña cantidad de subproducto de tomate es utilizada para la alimentación animal o como fertilizante, y el resto se descarga al ambiente, volviéndose un importante problema de contaminación (Botinestean *et al.*, 2015). Esos subproductos son buena fuente de compuestos funcionales como fibra, minerales, carotenoides y compuestos fenólicos, cuya recuperación y utilización podría dar valor agregado a los procesos de transformación de tomate (Knoblich *et al.*, 2005; Stajčić *et al.*, 2015).

#### **5.5.4 Subproducto de tomate como fuente de compuestos bioactivos**

Los residuos industriales de tomate pueden ser recuperados para la obtención de metabolitos valiosos vía procesos químicos y biotecnológicos (Ravindran y Jaiswal, 2016). Debido a la expandida demanda global de procesos de manufactura y productos finales que ejerzan riesgos ambientales mínimos o nulos, durante los últimos años los residuos del procesamiento han sido objeto de importantes investigaciones con el objetivo específico de recuperar licopeno y  $\beta$ -caroteno mediante varios esquemas de extracción (Kalogeropoulos *et al.*, 2012).

Dada la necesidad de desarrollar métodos de extracción para la recuperación óptima de carotenoides de residuos de tomate, Strati y Oreopoulou (2012) realizaron una investigación para determinar la capacidad de extracción de carotenoides utilizando diferentes solventes orgánicos y determinaron el efecto de factores como el tiempo de extracción y la temperatura en el rendimiento. Por su parte, Poojary y Passamonti (2015) realizaron un modelamiento cinético del proceso de extracción de licopeno a partir de residuos del procesamiento de tomate, demostrando que las variables de proceso temperatura y composición del solvente tienen un fuerte efecto en la eficiencia de extracción. Además, se ha evaluado la extracción de carotenoides asistida por enzima y alta presión, a partir de residuos de tomate usando diversos disolventes orgánicos, encontrando que es posible incrementar los rendimientos de carotenoides y particularmente de licopeno mediante el uso de pectinasas (Strati *et al.*, 2015). Stajčić *et al.* (2015) reportaron contenidos importantes de carotenoides (licopeno y  $\beta$ -caroteno) en extractos del desecho

del procesamiento de jugo de tomate obtenidos con solvente. Además, los extractos exhibieron buena actividad antioxidante y anti-proliferativa.

Por otro lado, actualmente se busca valorizar los subproductos agroindustriales mediante el concepto innovador de biorrefinería, el cual se define como un enfoque para la generación de productos de valor agregado como bioquímicos, biocombustibles, entre otros, a partir de fuentes de energía renovables, en particular, de biomasa (Kehili *et al.*, 2016). En ese sentido, Kehili *et al.* (2016) se enfocaron en la valorización de subproductos industriales de tomate mediante la recuperación de compuestos de interés utilizando un proceso de biorefinería en cascada. El proceso integró la extracción de carotenoides con CO<sub>2</sub> supercrítico, seguido del aislamiento de proteínas de los residuos e hidrólisis de la materia lignocelulósica. Los resultados del estudio indicaron que los subproductos de tomate, no solo son una fuente natural de oleoresina rica en licopeno, aceite y proteína, sino que además, son buena fuente de materia lignocelulósica para la producción de bioetanol.

Recientemente y continuando con la línea de valorización de subproductos utilizando tecnologías verdes, Silva *et al.* (2018) optimizaron un proceso de extracción de licopeno a partir de residuos del procesamiento de tomate empleando una mezcla de solventes verdes como alternativa a los solventes orgánicos convencionales, y aplicando ultrasonidos para mejorar el rendimiento de la extracción, logrando proponer un método efectivo y amigable con el ambiente para el aprovechamiento del residuo.

En contraste con el estudio de carotenoides en subproductos de tomate, otros compuestos han recibido menor atención. Meshginfar *et al.* (2018) optimizaron las condiciones para la producción de un hidrolizado proteico con alto valor antioxidante y buena resistencia a la digestión a partir de proteínas extraídas de semillas de subproducto industrial de tomate. Por su parte, algunos estudios como el realizado por Kalogeropoulos *et al.* (2012) analizaron el contenido de varios compuestos bioactivos en subproductos de tomate, tales como esteroides, tocoferoles, terpenos, fenoles totales e individuales; además, realizaron la determinación de la capacidad antioxidante y compararon sus resultados con muestras de tomate sin procesar, encontrando que el subproducto es contiene cantidades



similares de compuestos fenólicos que la muestra sin procesar y que el contenido de tocoferoles, esteroides y terpenos fue superior en el subproducto.

Ćetković *et al.* (2012) estudiaron el subproducto del proceso de obtención de jugo de tomate como fuente potencial de compuestos fenólicos bioactivos. Determinaron el contenido de compuestos fenólicos mediante HPLC, actividad antioxidante y efecto antiproliferativo en líneas celulares, encontrando la presencia de diferentes ácidos fenólicos y flavonoides con buena actividad antioxidante. Además, los extractos de subproducto de tomate demostraron poseer efecto antiproliferativo en distintas líneas células cancerígenas (HeLa, MCF7 y MRC-5).

Por su parte, en México, Valdez-Morales *et al.* (2014) determinaron el perfil de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y antimutagénica de extractos metanólicos totales de piel y semilla de un subproducto de tomate obtenido mediante la simulación del proceso industrial para la obtención de pasta. Se reportaron compuestos fenólicos con importante actividad biológica, tales como ácido caféico, ácido ferúlico, quercetina-3- $\beta$ -O-glicósido, entre otros. Así mismo, se observó buena actividad antioxidante y efecto antimutagénico de todas las muestras. Además, se afirma que los extractos del subproducto podrían ser utilizados como ingrediente en la formulación de alimentos o como suplementos nutricionales. Por su parte, Robles-Ramírez *et al.* (2016) evaluaron el contenido de compuestos fenólicos totales de extractos de subproducto de tomate obtenidos con diferentes solventes.

En ese sentido, la mayoría de los estudios de evaluación de compuestos fenólicos en subproductos de tomate se ha realizado en extractos crudos, sin embargo, recientemente Perea-Domínguez *et al.* (2018) realizaron una identificación detallada de los compuestos fenólicos solubles libres, conjugados y ligados en subproducto industrial de tomate y evaluaron la actividad antioxidante de las diferentes fracciones de compuestos fenólicos obtenidas. Este trabajo demostró que la mayoría de los compuestos fenólicos en tomate se encuentran ligados a componentes estructurales de las paredes celulares, por lo que no pueden obtenerse mediante una extracción simple, requiriendo un proceso de hidrólisis para

liberarlos. Además, se encontró buena actividad antioxidante en las diferentes fracciones de compuestos fenólicos evaluadas, por lo que la obtención de estos compuestos se considera una buena opción para la valorización del subproducto.

Por otra parte, y de acuerdo con Kalogeropoulos *et al.* (2012), tomando como base el contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante, los subproductos del procesamiento de tomate podrían ser utilizados exitosamente como ingredientes para la formulación de alimentos funcionales ricos en antioxidantes.

### **5.5.5 Ingredientes funcionales a partir de subproducto de tomate**

Una tecnología relativamente simple para la recuperación y utilización de los subproductos de tomate consiste en la recuperación de polvos o extractos que podrían ser incorporados directamente en alimentos (Nour *et al.*, 2015). Recientemente, se han realizado estudios que conducen a la obtención y/o incorporación de extractos de subproductos de tomate como ingrediente en la formulación de alimentos funcionales ricos en antioxidantes (Nour *et al.*, 2015; Pinela *et al.*, 2017; Mehta *et al.*, 2018), así como mejorar la estabilidad oxidativa de ciertos productos (Abid *et al.*, 2017).

Pinela *et al.* (2017) establecieron y optimizaron un proceso de extracción asistida por microondas para la obtención de ingredientes ricos en nutrientes y antioxidantes a partir de residuos de tomate. Determinaron variables como niveles de azúcares totales, azúcares reductores, proteínas, compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, así como, capacidad antioxidante. De acuerdo con sus resultados, las condiciones óptimas de procesamiento establecidas favorecieron rendimientos elevados de extracción y la reducción en el consumo de solventes, lo cual constituye una alternativa sustentable a los métodos de extracción convencionales.

Nour *et al.* (2015) analizaron el contenido de varios compuestos bioactivos como ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno, licopeno, fenoles totales, minerales y micronutrientes en residuos de tomate, así como su capacidad antioxidante y elaboraron un ingrediente

funcional con posibles aplicaciones en la formulación de alimentos funcionales ricos en antioxidantes. Dicho ingrediente funcional fue incorporado en distintas cantidades a harina de trigo para la elaboración de un pan enriquecido en licopeno con características sensoriales aceptables.

Posteriormente, Robles-Ramirez *et al.* (2016) estudiaron la efectividad de la incorporación de extractos de subproducto de tomate en la prevención de la oxidación de aceite de canola. En el estudio, los autores concluyeron que el extracto etanólico de subproducto de tomate puede ser una buena alternativa para remplazar los antioxidantes sintéticos empleados en la protección de los aceites vegetales y las grasas de los alimentos frente a la rancidez.

Abid *et al.* (2017) investigaron el efecto de la incorporación de extractos de subproductos de tomate en la oxidación, propiedades químicas y perfil de ácidos grasos en mantequilla, encontrando que el extracto a bajas concentraciones inhibió considerablemente la formación de peróxidos, dienos conjugados y la descomposición de ácidos grasos insaturados, por lo que consideraron que el subproducto tiene gran potencial para ser utilizado como antioxidante para extender la vida útil de este tipo de productos.

Recientemente, Mehta *et al.* (2018) desarrollaron productos de panificación suplementados con residuos de tomate consiguiendo mejorar las propiedades nutrimentales como fibra dietética, vitamina C, actividad antioxidante y minerales. Además, la incorporación de los residuos de tomate condujo a la obtención de un producto con propiedades sensoriales aceptables, textura más suave y mejora de la vida útil.

## 6. REFERENCIAS

- Abdallah FB, Gargouri B, Bejaoui H, Lassoued S and Ammar-Keskes L. 2011. Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E *in vitro*. *Environment Toxicology*. 3: 287-91.
- Abid Y, Azabou S, Jridi M, Khemakhem I, Bouaziz, M, Attia H. 2017. Storage stability of traditional Tunisian butter enriched with antioxidant extract from tomato processing by-products. *Food Chemistry* 15: 476-482.
- Abuajah CI, Ogbonna AC, Osuji CM. 2015. Functional components and medicinal properties of food: a review *Journal of Food Science and Technology*. 52: 2522-2529.
- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*. 152: 46-55.
- Agrawal A y Sharma B. 2010. Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems: a review. *International Journal of Biological and Medical Research*. 1: 90-104.
- Akhgari M, Abdollahi M, Kebryaezadeh A, Hosseini R y Sabzevari O. 2003. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human and Experimental Toxicology*. 22(4): 205-211.
- Amaya-Cruz DM, Rodríguez-Gonzalez S, Perez-Ramírez IF, Loarca-Piña G, Amaya-Llano S, Gallegos-Corona MA, *et al.* 2015. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods*. 17: 93-102.
- Ambigaipalan P, de Camargo AC, Shahidi F. 2016. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64: 6584-604.
- Anraku M, Gebicki JM, Iohara D, Tomida H, Uekama K, Maruyama T, Hirayama F, Otagiri M. 2018. Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in *in vitro* and *in vivo* studies. *Carbohydrate Polymers*. 199: 141-149.

- Aslantürk ÖS y Çelik TA. 2016. Protective effect of lycopene against cytotoxic and genotoxic effects induced by mixture of two pesticides (dimethoate and lambda-cyhalothrin) on human peripheral blood lymphocytes. *Caryologia*: 1-9.
- Atale N, Gupta K, Rani V. 2014. Protective effect of *Syzygium cumini* against pesticide-induced cardiotoxicity. *Environmental Science and Pollution Research International*. 21(13): 7956-7972.
- Ayoub M, Costa de Camargo A, Shahidi F. 2016. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food Chemistry*. 197: 221-232.
- Bennamoun L, Hiligsmann S, Dakhmouche S, Ait-Kaki A, Kenza Labbani F-Z, Nouadri T, Meraihi Z, Turchetti B, Buzzini P, Thonart P. 2016. Production and properties of a thermostable, pH-stable exo-polygalacturonase using *aureobasidium pullulans* isolated from saharan soil of Algeria grown on tomato pomace. *Foods* 5: 1-20.
- Beres C, Costa G, Cabezudo I, da Silva-James N, Teles A, Cruz A, Mellinger-Silva C, Tonon R, Cabral L, Freitas S. 2017. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste Management* 68: 581-594.
- Botinestean A, Gruia AT, Jianu I. 2015. Utilization of seeds from tomato processing wastes as raw material for oil production. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. 17: 118-124.
- Bovet P y Paccaud F. 2012. Cardiovascular disease and the changing face of global public health: a focus on low and middle income countries. *Public Health Reviews*. 33: 397-415.
- Capanoglu E, Beekwilder J, Boyacioglu D, De Vos RC, Hall RD. 2010. The effect of industrial food processing on potentially health-beneficial tomato antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50: 919-930.
- Cemek M, Büyükben A, Büyükkuroğlu ME, Aymelek F, Tür L. 2019. Protective roles of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), selenium and vitamin E plus selenium in organophosphate toxicity in vivo: A comparative study. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 96 (3): 113-118.

- Ćetković G, Savatović S, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Vulić J, Mandić A, Četojević-Simin D. 2012. Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry*. 133: 938-945.
- Chandrasekara A y Shahidi, F. 2010. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(11): 6706–6714. Consulta: 16 junio 2018
- De Mira NV, Massaretto IL, Pascual C, Lanfer Marquez UM. 2009. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (5): 405-409.
- de Sousa AS, Borges SV, Magalhaães NF, Ricardo HV, Azevedo AD. 2008. Spray-dried tomato powder: reconstitution properties and colour. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51: 807-814.
- Durackova Z. 2010. Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiological Research*. 59 (4): 459-469.
- Durak D, Uzun FG., Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Kalender Y. 2009. Malathion-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E *in vitro*. *Environmental Toxicology*. 24(3): 235-42.
- Eggersdorfer M, Wyss A. 2018. Carotenoids in human nutrition and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 652: 18-26.
- Eroglu S, Pandir D, Uzun FG y Bas H. 2013. Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes *in vitro*. *Biological Research*. 46: 33-38.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2011. Global food losses and food waste-extent, causes and prevention. <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf>. Consulta: 13 agosto 2018.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Consulta: 13 agosto 2018.
- Ferreira CS, de Pinho MN, Cabral LMC. 2013. Solid-liquid extraction and concentration with processes of membrane technology of soluble fibres from wine grape pomace. *Técnico Lisboa*. 1-9.

- Ferrentino G, Morozova K, Kongi Mosibo O, Ramezani M, Scampicchio M. 2018. Biorecovery of antioxidants from apple pomace by supercritical fluid extraction, *Journal of Cleaner Production*. 186: 253-261.
- Ferreres F, Taveira M, Pereira DM, Valentão P, Andrade P (2010) Tomato (*Lycopersicum esculentum*) seeds: new flavonols and cytotoxic effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2854-2861.
- FIRA (Fideicomisos Instituidos en la Relación con la Agricultura). 2016. Panorama Agroalimentario. Tomate rojo 2016. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama\\_Agroalimentario\\_Tomate\\_Rojo\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agroalimentario_Tomate_Rojo_2016.pdf)
- Flora SJ. 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2 (4): 191-206.
- Garcia-Gonzalez L, Bijttebier S, Voorspoels S, Uyttbroek M, Elst K, Dejonghe W, et al. 2015. Cascaded valorization of food waste using bioconversions as core processes. *Advances in food biotechnology*. New York: Wiley.
- Garrido MD, Auqui M, Martí N, Linares MB. 2011. Effect of two different red grape pomace extracts obtained under different extraction systems on meat quality of pork burgers. *LWT - Food Science and Technology*. 44: 2238-2243.
- Gaté L, Paul J, Nguyen Ba G, Tew KD, Tapiero, H. 1999. Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 53(4): 169-18.
- Gebicki JM. 2016. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 595: 33-39.
- Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. 2014. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/860479>.
- González M, Cid C, Lobo G. 2011. Usage of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds in health. En: *Nuts and seeds in health and disease prevention*. Editores: Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel. Academic Press. pp: 1123-1132.

- González-Castejón M y Rodríguez-Casado A. 2011. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research*. 64(5): 438-455.
- González-Castejón M. y Rodríguez-Casado A. 2011. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research*. 64(5): 438-455.
- Gürbüz N, Uluişik S, Frary A, Frary A, Doğanlar S. 2018. Health benefits and bioactive compounds of eggplant. *Food Chemistry*. 268: 602-610.
- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. 1995. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 35 (1-2): 7-20.
- Halliwell B. 1996. Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 16: 33-50.
- Han X, Shen T, Lou H. 2007. Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*. 8 (9): 950-988.
- Hernández AF, Lacasaña M, Gil F, Rodríguez-Barranco M, Pla A, López-Guarnido O. 2013. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene–environment interaction perspective. *Toxicology*. 307: 95-102.
- Hou W, Lin R, Lee T, Huang Y, Hsu F, Lee M. 2005. The phenolic constituents and free radical scavenging activities of *Gynura formosana* Kiamnra. *Journal of the Science or Food and Agriculture*. 85 (4): 615-621.
- Hussein SA, Omayma A, Ragab A, Abd Elmaksoud H, Afaf D Abd El-Mageid, Alshaimaa, M. Said . 2013. Protective effect of rutin on antioxidant defense system and oxidative stress in erythrocytes and brain tissue of pirimiphos methyl intoxicated rats. *Benha Veterinary Medical Journal*. 24(1): 172-183.
- Kadenbach B, Ramzan R, Vogt S. 2013. High efficiency versus maximal performance — The cause of oxidative stress in eukaryotes: A hypothesis. *Mitochondrion*. 13 (1): 1-6.
- Kalogeropoulos N, Chiou A, Pyriochou V, Peristeraki A, Karathanos VT. 2012. Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science and Technology*. 49: 213-216.



- Kalogeropoulos N, Chiou A, Pyriochou V, Peristeraki A, Karathanos VT. 2012. Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science and Technology*. 49: 213-216.
- Kang X, Chen J, Xu Z, Li H, Wang B. 2007. Protective effects of *Ginkgo biloba* extract on paraquat-induced apoptosis of PC12 cells. *Toxicology In Vitro*. 21(6): 1003-9.
- Karling M, Bicas TC, De Lima VA, Oldoni TLC. 2017. Grape and apple pomaces from Southern Brazil: Valorization of by-products through investigation of their antioxidant potential. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 28 (10): 1857-1865.
- Kehili M, Schmidt LM, Reynolds W, Zammel A, Zetzl C, Smirnova I, Allouche N. 2016. Biorefinery cascade processing for creating added value on tomato industrial by-products from Tunisia. *Biotechnology for Biofuels*. 9: 261.
- Knoblich M, Anderson B, Latshaw D. 2005. Analyses of tomato peel and seed byproducts and their use as a source of carotenoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1166-1170.
- Kumar K, Yadav AN, Kumar V, Vyas P, Dhaliwal HS. 2017. Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*. 4: 18.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy ML y Fernández-Mejía C. 2013. Oxidative stress in diabetes mellitus and the role of vitamins with antioxidant action. En: *Oxidative stress and chronic degenerative diseases – a role for antioxidants*. Editor: Morales-González JA. In-Tech, Rijeka, Croatia.
- Li YF, Chang YY, Huang HC, Wu YC, Yang MD, Chao PM. 2015. Tomato juice supplementation in young women reduces inflammatory adipokine levels independently of body fat reduction. *Nutrition* 31: 691-696.
- Lin, CS, Pfaltzgraff LA, Herrero-Davila L, Mubofu EB, Abderrahim S, Clark JH, et al. 2013. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*. 6: 426-464.

- Liyana-Pathirana CM y Shahidi F. 2006. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(4): 1256-1264.
- Magoni C, Bruni I, Guzzetti L, Dell'Agli M, Sangiovanni E, Piazza S, Regonesi ME, Maldini M, Spezzano R, Caruso D, Labra M. 2018. Valorizing coffee pulp by-products as anti-inflammatory ingredient of food supplements acting on IL-8 release, *Food Research International*. 112: 129-135.
- Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Calderón-Segura ME, Villalobos-Pietrini, R, Waliszewski S, Félix-Gástelum R. and Álvarez-Torres, A. 2009. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International* 35: 1155-1159.
- Martins ZE, Pinho O, Ferreira IM. 2017. Food industry by-products used as functional ingredients of bakery products. *Trends in Food Science & Technology* 67: 106-128.
- Mehta D, Prasad P, Sangwan RS, Yadav SK. 2018. Tomato processing byproduct valorization in bread and muffin: improvement in physicochemical properties and shelf life stability. *Journal of Food Science and Technology*. 55 (7): 2560-2568.
- Meshginfar N, Sadeghi Mahoonak A, Hosseinian F, Ghorbani M, Tsopmo A. 2018. Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: mass spectrometry identification of peptides and stability to gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science and Technology*. 55(9): 3498-3507.
- Mirabella N, Castellani V y Sala S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*. 65: 28-41.
- Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. 2018. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*. 63(1): 68-78.
- Mohammad, A., Arkam, R., Shahin, S., Shekoufeh, N. y Ali, R. 2004. Pesticides and oxidative stress: A review. *Medical Science Monitor*. 10: 141-147.
- Mossa AT, Heikal TM, Mohafrash SM. 2014. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by aspirin and diazinon: the protective role of selenium. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 4 (Suppl 2): S603-S609.

- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, ... Winterbourn CC. 2011. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metabolism*. 13 (4): 361-366.
- Nour V, Ionica ME, Trandafir I. 2015. Bread enriched in lycopene and other bioactive compounds by addition of dry tomato waste. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 8260-8267.
- Ogut S, Gultekin F, Kisioglu AN, Kucukoner E. 2011. Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure. *Toxicology & Industrial Health*. 27: 820-825.
- Paliyath G, Murr DP, Handa AK, Lurie S. 2008. *Postharvest biology and technology of fruits, vegetables, and flowers*. Wiley-Blackwell Publishing. Iowa. 496 p.
- Paur I, Lilleby W, Bøhn SK, Hulander E, Klein W, Vlatkovic L, Axcrona K, Bolstad N, Bjørø T, Laake P, et al. 2016. Tomato-based randomized controlled trial in prostate cancer patients: Effect on PSA. *Clinical Nutrition*.
- Perea-Domínguez XP, Hernández-Gastelum LZ, Olivas-Olguin HR, Espinosa-Alonso LG, Valdez-Morales M, Medina-Godoy S. 2018. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*. 55(9): 3453-3461.
- Pietta P. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63 (7):1035-1042.
- Pinela, J, Prieto, MA, Barreiro, MA, Carvalho, AM, Oliveira, MB, Curran, TP, Ferreira, IC. 2017. Valorisation of tomato wastes for development of nutrient-rich antioxidant ingredients: A sustainable approach towards the needs of the today's society. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 41: 160-171.
- Pisoschi AM y Pop A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 97: 55-74.
- Poli G, Leonarduzzi F, Biasi F, Chiarpotto E. 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Current Medical Chemistry*. 11 (9): 1163-1182.

- Poljsak B, Šuput D, Milisav I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/956792>.
- Poojary M y Passamonti P. 2015. Extraction of lycopene from tomato processing waste: kinetics and modelling. *Food Chemistry*. 173: 943-50.
- Prasanthi K y Rajini PS. 2005. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following *in vitro* exposure to Fenvalerate and its metabolite. *Toxicology In Vitro* 19: 449-456.
- Pujol D, Liu C, Gominho J, Olivella M, Fiol N, Villaescusa I, Pereira H. 2013. The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products*. 50: 423-429.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Ravi Kumar MN. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. 113 (3): 189-207.
- Ravindran R y Jaiswal AK. 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*. 34: 58-69.
- Rjeibi I, Ben Saad A, Hfaiedh N. 2016. Oxidative damage and hepatotoxicity associated with deltamethrin in rats: The protective effects of *Amaranthus spinosus* seed extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84: 853-860.
- Robbins RJ. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (10): 2866-2887.
- Roleira F, Tavares-da-Silva E, Varela C, Costa S, Silva T, Garrido J, Borges F. 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chemistry*. 183: 235-258.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2017. Plan Agrícola Nacional 2017-2030. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257077/Potencial-Jitomate.pdf>

- Salama AK, Osman KA y Omran OA. 2013. Pesticides-induced oxidative damage: Possible in vitro protection by antioxidants. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. 5(5): 79-85.
- Sandoval-Castro C, Valdez-Morales M, Oomah BD, Gutiérrez-Dorado R, Medina-Godoy S, Espinosa-Alonso L. 2017. Bioactive compounds and antioxidant activity in scalded Jalapeño pepper industrial byproduct (*Capsicum annuum*). *Journal of Food Science and Technology*. 54 (7): 1999-2010.
- Santo GD, Grotto A, Boligon AA, Da Costa B, Rambo CL, Fantini EA, Sauer E, Lazzarotto LMV, Bertencello KT, JÃnior OT, Garcia SC, Siebel AM, Rosemberg DB, Magro JD, Conterato GMM, Zanatta L. 2018. Protective effect of *Uncaria tomentosa* extract against oxidative stress and genotoxicity induced by glyphosate Roundup® using zebrafish (*Danio rerio*) as a model. *Environmental Science and Pollution Research*. 25 (12): 11703-11715.
- Saval S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *Biotecnología*. 16 (2): 14-46.
- Sen S, Raja Chakraborty R, Sridhar CG, Yeruva R, Biplab De. 2010. Free radicals, antioxidants. Diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3 (1): 91-100.
- Shahidi F. 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*. 44(3): 158-163.
- Sharma K, Mahato N, Cho MH, Lee YR. 2017. Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches. *Nutrition*. 34: 29-46.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Atlas Agroalimentario 2018. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018). Consulta: 14 Septiembre 2018.
- Silva Y, Ferreira T, Celli G, Brooks M. 2018. Optimization of Lycopene Extraction from Tomato Processing Waste Using an Eco-Friendly Ethyl Lactate–Ethyl Acetate Solvent: A Green Valorization Approach. *Waste Biomass Valor* (2018). <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0317-7>.

- Sisein EB. 2014. Biochemistry of Free Radicals and Antioxidants. *Scholars Academic Journal of Biosciences*. 2(2): 110-118.
- Skulachev VP. 2012. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases, *Journal of Alzheimer's Disease*. 28: 283–289.
- Stajčić S, Četković G, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Mandić A, Četojević-Simin D. 2015. Tomato waste: Carotenoids content, antioxidant and cell growth activities. *Food Chemistry*. 172: 225-232.
- Strati IF y Oreopoulou V. 2011. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science and Technology*. 46: 23-29.
- Strati IF, Gogou E, Oreopoulou V. 2015. Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioproducts Processing*. 94: 668-674.
- Tomer V, Kaur Sangha J, Ramya HG. 2015. Pesticide: An appraisal on human health implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. 85(2): 451-463.
- Tornberg E. 2017. Influence of fibers and particle size distribution on food rheology. En: *Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition*. Volumen: *Advances in food rheology and its applications*. Editores: Ahmed J, Ptaszek P, Basu S. pp: 177-208.
- Uyttebroek M, Vandezande P, Van Dael M, Vloemans S, Noten B, Bongers B, Porto-Carrero W, Muñoz Unamunzaga M, Bulut M, Lemmens B. 2018. Concentration of phenolic compounds from apple pomace extracts by nanofiltration at lab and pilot scale with a techno-economic assessment. *Journal of Food Process Engineering*. 41 (1): 1-10.
- Valdez-Morales M, Espinosa-Alonso LG, Espinoza-Torres LC, Delgado-Vargas F, Medina-Godoy S. 2014. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 5281-5289.

- Wanasundara PK y Shahidi F. 2005. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Sexta edición, vol. 6. Editor: Shahidi F. John Wiley & Sons, Inc. pp. 431-489.
- Wang W, Guo J, Zhang J, Peng J, Liu T, Xin Z .2015. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. Food Chemistry. 171: 40-49.
- Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S. 2003. Tomato and cardiovascular health. Crit Rev Food Science and Nutrition. 43: 1-18.
- Wong DWS. 2006. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation Applied Biochemistry and Biotechnology. 133:87-112.
- WPTC-World processing tomato council. 2018. <https://www.wptc.to/releases-wptc.php>. Consulta: 16 julio 2018.
- Yan H y Kerr W. 2012. Total phenolics content, anthocyanins, and dietary fiber content of apple pomace powders produced by vacuum-belt drying. Journal of the Science of Food and Agriculture. 93 (6): 1499-1504.
- Yates M, Gomez M R, Martin-Luengo MA., Ibañez VZ, Serrano A.M.M. 2017. MultivalORIZATION of apple pomace towards materials and chemicals. Waste to wealth. Journal of Cleaner Production. 143: 847 853.
- Zhang J, Hou X, Ahmad H, Zhang H, Zhang L, Wang T. 2014. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. Food Chemistry. 15 (145): 57-65.

# CAPÍTULO 2:

## **COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE VARIEDADES DE TOMATE Y UN SUBPRODUCTO INDUSTRIAL: FENÓLICOS LIBRES, CONJUGADOS Y LIGADOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

## **PHENOLIC COMPOSITION OF TOMATO VARIETIES AND AN INDUSTRIAL TOMATO BY-PRODUCT: FREE, CONJUGATED AND BOUND PHENOLICS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY**

El presente capítulo ha sido publicado en la revista *Journal of Food Science and Technology* y es presentado en idioma inglés, tal como fue publicado.

Perea-Domínguez XP, Hernández-Gastelum LZ, Olivas-Olguin HR, Espinosa-Alonso LG, Valdez-Morales M, Medina-Godoy S. 2018. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*. 55(9): 3453-3461.



## ÍNDICE DE CONTENIDO DEL CAPÍTULO 2

	<b>Pág.</b>
<b>ABSTRACT</b>	54
<b>1. INTRODUCTION</b>	55
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b>	57
2.1 Chemicals and Reagents.	57
2.2 Biological material and sample processing	57
2.3 Color Analysis	57
2.4 Extraction of phenolic compounds from tomato and by-product	58
2.4.1 Extraction of SFP	58
2.4.2 Extraction of AKHP and AHP	58
2.4.3 Extraction of BP	59
2.5 Total phenolic content (TPC)	59
2.6 Antioxidant activity	59
2.6.1 DPPH assay	59
2.6.2 ORAC assay	60
2.7 Phenolic profile analysis by HPLC-DAD	60
2.8 Statistical analysis	61
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b>	62
3.1 Color determination	62
3.2 Total phenolic content (TPC)	63
3.3 Phenolic compounds profile by HPLC-DAD	66
3.4 Antioxidant capacity	69
3.5 Correlation analysis	72
<b>4. CONCLUSIONS</b>	73
<b>5. REFERENCES</b>	74
<b>Supplementary material</b>	78

	<b>Pág.</b>
<b>Figura C2.1.</b> CIELAB parameters of color of whole tomato fruit (Panel A) and fresh tomato by-product and parameters of color of samples powder (Panel B).	62
<b>Figura C2.2.</b> Distribution pattern of phenolic acids (Panel A) and flavonoids (Panel B) as free, conjugated, and insoluble-bound forms in grape tomato, saladette tomato, and by-product determined by HPLC-DAD.	71
<b>Figura suplementaria C2.1.</b> Scheme of the extraction process of soluble free, alkaline-hydrolysable, acid-hydrolysable and bound phenolic compounds.	78

## ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO 2

## ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO 2

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro C2.1.</b> Total phenolic content and antioxidant activity of different fractions of phenolic compounds of whole tomato fruits and industrial by-product.	63
<b>Cuadro C2.2.</b> Profile of individual phenolic acids and flavonoids in tomato and	68

tomato by-product extracts determined by HPLC-DAD.

**Cuadro suplementario C2.1.** Total phenolic content and antioxidant activity of 79  
different fractions of phenolic compounds of whole tomato fruits and industrial by-  
product expressed in grams of defatted sample.

### ABSTRACT

The aim of this study was to isolate, identify and quantify soluble free phenolics (SFP), conjugated acid-hydrolysable phenolics (AHP) and alkaline-hydrolysable phenolics (AKHP), and bound phenolics (BP) fractions from two tomato varieties (saladette and grape) and an industrial tomato by-product, as well as, to determine their antioxidant capacity. Phenolic composition was determined using Folin-Ciocalteu's method and HPLC-DAD. AHP were predominant in grape and saladette tomato extracts ( $91.47 \pm 17.28$  mg gallic acid equivalents (GAE) per g dry extract (DE) and  $57.41 \pm 8.80$  mg GAE per g DE, respectively), while BP form was predominant in tomato by-product ( $51.30 \pm 10.91$  GAE per g DE). AHP extract of grape tomato presented the highest antioxidant capacity by DPPH assay ( $252.35 \pm 42.55$   $\mu\text{mol}$  Trolox equiv (TE) per g DE). In the case of ORAC assay, AHP fractions from both grape ( $1005.19 \pm 138.52$   $\mu\text{mol}$  TE per g DE) and saladette tomatoes ( $804.16 \pm 131.45$   $\mu\text{mol}$  TE per g DE), and BP fraction from by-product ( $852.40 \pm 71.46$   $\mu\text{mol}$  TE per g DE) showed the highest ORAC values. Caffeic acid was the most abundant phenolic acid and it was found mainly in its conjugated forms. Naringenin was the most abundant flavonoid and it was mainly detected in bound form. Our analysis allowed a better characterization of phenolic compounds in whole tomato and by-product, remarking the importance of the fractionation. The valorization of the industrial tomato by-product, through the use of its different fractions of phenolic antioxidant compounds, could generate additional income to the tomato industry and reduce the waste disposal problem.

**Keywords:** free phenolics, conjugated phenolics, bound phenolics, phenolic profile, tomato by-product, antioxidant. **Abbreviations**<sup>1</sup>

## INTRODUCTION

Tomato is one of the most widely used and versatile fruit crops. It is consumed fresh and processed into a wide range of manufactured products (Sousa *et al.*, 2008). México ranks tenth worldwide among tomato-producing countries with approximately 2.7 million tons per year and the State of Sinaloa is the main tomato producer contributing with 27% of the national production (SIAP, 2016). Epidemiologic studies suggest that consumption of tomato and tomato-based products reduces the risk of chronic diseases such as cardiovascular disease and certain types of cancer especially, prostate cancer (Willcox *et al.*, 2003; Paur *et al.*, 2016).

Industrial processing of tomato generates a considerable amount of by-products that are used mainly for animal feed or turn into compost. The management of tomato by-products is considered an important problem faced by tomato processing companies, as they cannot be discharged to the environment (Bennamoun *et al.*, 2016). Industrial tomato by-products can be recovered in order to produce valuable metabolites via chemical and biotechnological processes (Ravindran y Jaiswal, 2016). A relatively simple recovery technology could consist of production of powders or extracts to be directly incorporated into foods (Nour *et al.*, 2015). Recently, studies have been conducted to incorporate extracts from tomato by-products as an ingredient in the formulation of antioxidant rich

---

<sup>1</sup> SFP, soluble free phenolics; AHP, acid-hydrolysable phenolic; AKHP alkaline-hydrolysable phenolic; BP, bound phenolics; GAE, gallic acid equivalents; CAE, catechin equivalents; TE, Trolox equivalents; TPC, total phenolic content; DE, dry extract.

functional foods (Nour *et al.*, 2015) as well as to improve the oxidative stability of dairy products (Abid *et al.*, 2017).

Traditionally, the bioactivity of tomato and its products has been attributed to carotenoids. During the last years, tomato and tomato by-products have been the subject of significant research mainly focused on recovery of lycopene and  $\beta$ -carotene, as well as, evaluation of their bioactive potential (Strati y Oreopoulou 2011; Lavelli and Torresani 2011; Stajčić *et al.*, 2015), however, also phenolic compounds have been reported widely as bioactive, like antioxidant, antimutagenic and cytotoxic activities *in vitro*, in fresh tomato, processed products and industrial by-products (Ferrerres *et al.*, 2010; Valdez-Morales *et al.*, 2014).

Phenolic compounds have been extensively characterized in tomato varieties from different countries, including genetically modified tomatoes and by-products (Barros *et al.* 2012; Ćetković *et al.*, 2012; Kalogeropoulos *et al.*, 2012; Valdez-Morales *et al.*, 2014). However, the chemical composition of tomatoes can vary among tissues of a single fruit and type of tomatoes, according to the cultivar, cultivation conditions, and handling and storage methods (Barros *et al.*, 2012). Phenolic compounds in plants may exist in free, soluble conjugated (acid and alkaline hydrolysable) and insoluble-bound forms (Wang *et al.*, 2015). Recently, analysis and evaluation of bioactivity of different fractions of phenolic compounds from vegetable sources and by-products have attracted the attention of researchers because it allows a more complete characterization (Ambigaipalan *et al.*, 2016; Ayoub *et al.*, 2016).

Although many studies have been realized on tomato and tomato by-products, most studies have been conducted in crude phenolic extracts and there is no detailed identification of soluble, conjugated and bound phenolic compounds. There is therefore demand for a comprehensive analysis of these bioactive phenolic compounds. Thus, in this study, we have isolated, identified and quantified soluble free phenolics (SFP), acid-hydrolysable phenolic (AHP), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP) and bound phenolics (BP) fractions from grape and saladette tomato and industrial tomato by-product. The total

and individual phenolic compounds in tomato extracts were identified and quantified by HPLC and the *in vitro* antioxidant capacity of the isolated fractions was also determined.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Chemicals and Reagents.

Reagents including 2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide dihydrochloride (AAPH), Folin-Ciocalteu reagent, 2,2-diphenyl 1-picryl-hydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and phenolic standards (gallic acid, caffeic acid, ferulic acid,  $\rho$ -coumaric acid, chlorogenic acid, (+)-catechin hydrate, kaempferol, naringenin, quercetin and rutin) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). ACS and HPLC-grade solvents were purchased from Karal (Leon, Guanajuato, México).

### 2.2 Biological material and sample processing

Tomato fruits (saladette and grape varieties) grown in the State of Sinaloa were provided by a local farm during the first harvest of 2015. The fruits were stored at 25 °C until they reached the stage of maturity # 6 (last stage in USDA color scale). Tomatoes were cut into small cubes (1 cm<sup>3</sup>), frozen (-20 °C) and lyophilized. The by-product sample (which is comprised by peel and seeds) was provided by a local company (La Costeña®, Guasave, Sinaloa México), from industrial tomato processing line, operating to produce tomato paste. The industrial by-product was frozen and lyophilized. The samples were milled until obtaining a fine powder (TissueLyser II, Qiagen, Valencia, CA) and sieved (sieve number 35). Powdered samples were stored at -20 °C protected from light for further analysis.

### 2.3 Color Analysis

The color of fresh samples was recorded; ripe tomatoes was measured with a chroma meter CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Japan); 10 whole fruits of each type were evaluated in five points, three equidistant equatorial points and two axial. The color of fresh by-product and powdered samples were also recorded placing a representative

samples in a petri plate. L\*, a\*, and b\* CIELab parameters were determined using a white standard CR-A43 and Chroma values were calculated.

## **2.4 Extraction of phenolic compounds from tomato and by-product**

Different fractions of phenolic compounds were sequentially extracted from grape and saladette tomato powder and by-product powder. Previously, samples were defatted as follow: the fine powder (4 g) was transferred to an Erlenmeyer flask, 20 mL of hexane were added and the mixture was kept in a mechanical shaker during 1 h at 25 °C. The mixture was filtered and the final defatted flour was dried in a hood at room temperature (RT). In the case of saladette tomato, after filtered, the sample was dried in oven during 1 h at 45 °C. Three independent samples were obtained for at least 3 analytical replicates. SFP, AHP, AKHP and BP were extracted following the procedure reported by Kim *et al.* (2006) with some modifications, as described below (Supplementary Figure C2.1).

### **2.4.1 Extraction of SFP**

Defatted tomato powder was extracted twice with 80% (v/v) ethanol at a ratio 5:1 (v/w) during 1 h at RT. The mixture was centrifuged (3914 g) at RT during 5 min, -the pellet obtained was preserved for extraction of BP- and the combined supernatant was concentrated in a vacuum evaporator at 37 °C and lyophilized to get a dry extract. The resulting dry extract was dissolved in 4 mL of acidified water (pH 2 with HCl) for each gram of defatted tomato powder used for extraction. Then, the mixture was partitioned with ethyl ether at a 1:1 (v/v) ratio and centrifuged (3914 g) at RT during 5 min and the organic phase was recovered. The extraction was repeated twice more. Combined ether layer, which contain SFP, was dried under stream of gaseous nitrogen.

### **2.4.2 Extraction of AKHP and AHP**

The water phase previously obtained was neutralized at pH 7 with 2 M NaOH and lyophilized. The residue was dissolved in 4 mL of 2 M NaOH and stirred during 4 h at RT.



Solution was then acidified to pH 2 and extracted with ethyl ether at 1:1 (v/v) ratio, two times as described above; resulting ether layer contained AKHP and water phase was used for the extraction of AHP. Conjugated phenolic compounds contained in the water phase were hydrolyzed with 3 mL of 6 M HCl and heated at 95 °C during 20 min. The mixture was partitioned one time with ethyl ether at 1:1 (v/v) ratio. The organic phases, which contain AHP and AKHP, were dried under stream of gaseous nitrogen.

### **2.4.3 Extraction of BP**

The residue from SFP extraction equivalent to 1 g of sample was mixed with 2 M NaOH (40 mL) and stirred during 4 h at RT. After extraction, the mixture was acidified to pH 2 with HCl and BP were recovered one time with ethyl ether. BP fraction was dried using a vacuum evaporator.

### **2.5 Total phenolic content (TPC)**

TPC of extracts was determined by the Folin-Ciocalteu's assay, according to Swain and Hills (1959) with modifications and adapted to microplate. Briefly, 140 µL of distilled water, 10 µL of extract at 1 mg/mL in methanol, blank or standard and 10 µL of freshly prepared Folin-Ciocalteu reagent (1:1 v/v in water) were mixed and incubated at room temperature in dark during 3 min. Additionally, 40 µL of 7.5 % (w/v) sodium carbonate was added, and the mixture was incubated at 45 °C during 15 min in the dark, then the absorbance was read at 760 nm. (+)-Catechin (0-300 µg/mL) and gallic acid (0-200 µg/mL) were used as standards and the results were expressed in mg (+)-catechin equivalents and gallic acid equivalents per g dry extract.

### **2.6 Antioxidant activity**

#### **2.6.1 DPPH assay**

Antiradical activity of extracts of phenolic compounds was determined according to Cardador-Martínez *et al.* (2006) with minor modifications. A solution of 150  $\mu\text{M}$  DPPH $\cdot$  was prepared in 80% (v/v) methanol. 20  $\mu\text{L}$  of sample, blank, standard or control and 200  $\mu\text{L}$  of DPPH solution were added to a 96 wells microplate. Absorbance was measured every 10 min from 0-30 min at 515 nm. Trolox (0-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used as standard and the results were expressed as  $\mu\text{mol}$  Trolox equiv (TE)/g dry extract. All determinations were carried out by triplicate.

### **2.6.2 ORAC assay**

The ORAC value of the different fractions of phenolic compounds from tomato and by-product was measured according Prior *et al.* (2003). For the assay, SFP, AHP, AKHP and BP extracts previously dissolved in methanol were diluted in ORAC buffer (potassium phosphate buffer, pH 7.4) and a trolox standard curve (0-30 mg/L) was prepared. At the day of analysis 87  $\mu\text{M}$  fluorescein and 70 mM AAPH solutions were prepared in ORAC buffer. A 96 wells black microplate was prepared containing 25  $\mu\text{L}$  of blank (ORAC buffer); standard, control or sample and 200  $\mu\text{L}$  of fluorescein solution were added. Then, 50  $\mu\text{L}$  of freshly prepared AAPH solution were quickly added. The plate was incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Readings of fluorescence were every 2 min during 76 cycles using a DTX 880 multimode detector, Beckman Coulter (Brea, CA, USA) (excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 530 nm). The results were expressed as  $\mu\text{mol}$  TE per g dry extract. Determinations were carried out by triplicate.

### **2.7 Phenolic profile analysis by HPLC-DAD**

The phenolic compounds profile was determined by HPLC-DAD. SFP, AHP, AKHP and BP fractions of each sample were obtained as previously described and dissolved in methanol for the analysis. Extracts were filtered (nylon membrane, 0.45  $\mu\text{m}$  and 25 mm diameter) and analyzed in a Dionex UltiMate 3000 liquid chromatograph equipped with a titanium quaternary pump (LPG-3400AB), an autosampler (WPS-3000TBPL), a column oven, and a photodiode array detector DAD- 3000(RS) (Thermo

Fisher Scientific, New York, NY, USA). An Acclaim 120A (C18, 5  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ , 4.6  $\times$  250 mm) column was used for separation of phenolics according to the analytical method described by Valdez-Morales *et al.* (2014). The phenolic compounds were identified and quantified using pure standards, using retention time and absorption spectral characteristics. The fixed wavelengths were 270 nm (gallic acid), 280 nm ((+)-catechin), 300 nm (ferulic acid, *p*-coumaric acid and naringenin), 320 nm (caffeic and chlorogenic acids) and 360 nm (kaempferol, quercetin and rutin). The analysis was performed in triplicate. The data were processed using Chromeleon 7.0 software (Dionex, Thermo Fisher Scientific).

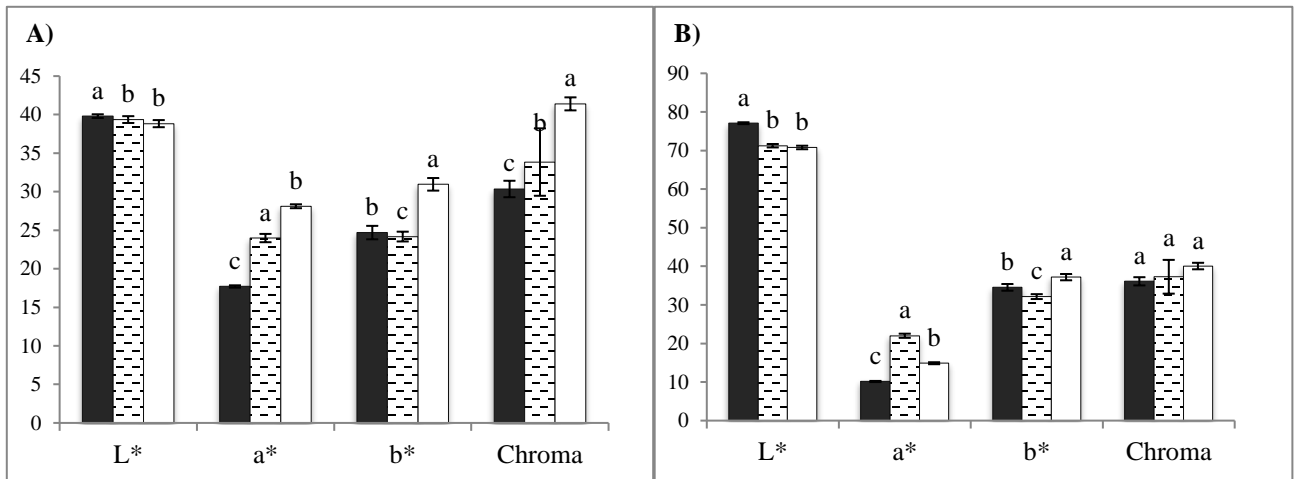
## **2.8 Statistical analysis**

Analysis of variance, multiple ranges test (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) and correlation analysis were done with Statgraphics  $\text{\textcircled{R}}$  Plus (Statistical Graphics Corp., Herndon, VA, USA).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Color determination

Color (CIELAB scale) of whole fruits and the fresh by-product were determined (Figure C2.1 A). Significant differences ( $p \leq 0.05$ ) were found in the parameter  $L^*$  (luminosity) between samples, being grape fruit the most lightness. The fresh by-products shown both high redness (parameter  $a^*$ ) and yellowness (parameter  $b^*$ ) index, as well being the sample with the most striking color (Chroma) ( $p \leq 0.05$ ). In addition, the color parameters of the flours constituting a mixture of the components of the whole fruit and by-product, ie, pulp, peel and seed (Figure C2.1 B), were determined. In this case, the grape tomato is the most luminous, but remains the furthest from the redness index ( $p \leq 0.05$ ). The mixture of saladette tomato components provided a high redness index to their flour, while the by-product powder is high yellowness index. Correlations analysis between color and content of individual phenolic compounds are described below.



**Figure C2.1.** CIELAB parameters of color of whole tomato fruit (Panel A) and fresh tomato by-product and parameters of color of samples powder (Panel B).  $n = 10$  for tomato

fruits and  $n= 5$  for by-product;  $n= 6$  for sample powder. Different letters indicate statistically significant difference between treatments (multiple-range test; Tukey,  $p\leq 0.05$ ). Bars represent standard deviation (SD). Grape tomato (■), Saladette tomato (▨), By-product (□)

### 3.2 Total phenolic content (TPC)

In order to obtain a more complete phenolic characterization from tomato samples, SFP, BP, AHP, and AKHP were sequentially obtained from grape, saladette tomatoes, and by-product. Significant differences ( $p\leq 0.05$ ) in extraction yields per fraction were observed (Table C2. 1). SFP from grape tomato, SFP from saladette tomato and AKHP from industrial by-product showed a significantly higher yield ( $p\leq 0.05$ ) than the other fractions obtained from different samples. In addition, it was observed that the AHP fraction of all samples generated lowest yields ( $p\leq 0.05$ ).

When analyzing the TPC of each extract (Table C2.1), it was observed that SFP fractions of the three samples showed the lowest concentrations ( $p\leq 0.05$ ) in comparison to the other fractions. Results are expressed as mg GAE per g defatted sample (multiplying extraction yield by TPC per mg of DE) (Table C2.1 ), SFP represent ~30% of TPC in saladette and grape tomato, meanwhile in by-product it represent only ~19%. This means that SFP fraction contains other compounds co-extracted along with phenolics compounds, supporting our strategy to perform different process to release phenolics compounds from the matrix in which they are contained. We consider that other water-soluble compounds, such as some sugars, may have been extracted, increasing the yield of dry extract.

**Table C2.1.** Total phenolic content and antioxidant activity of different fractions of phenolic compounds of whole tomato fruits and industrial by-product.

Sample	Fraction	Yield (mg DE per g defated sample)	Total phenolic content <sup>a</sup>					Antioxidant activity				
			mg GAE per g DE		mg CAE per g DE		DPPH ( $\mu\text{mol TE per g DE}$ )	ORAC ( $\mu\text{mol TE per g DE}$ )				
Grape tomato	<b>SFP</b>	49.97±4.05	a	9.04±.21	f	6.09±1.16	g	38.55±6.56	d	131.64±0.73	d	
	<b>BP</b>	10.63±2.09	ef	32.87±2.4	cd	28.79±3.46	de	87.86±13.87	c	635.88±28.01	e	
	<b>AHP</b>	3.93±0.59	f	91.47±17.28	a	86.02±17.0	a	252.35±42.5	a	1005.19±138.5	c	
	<b>AKHP</b>	14.40±5.53	def	36.84±5.75	c	33.89±5.71	cd	86.41±23.65	c	653.82±190.83	a	
	<b>Total</b>	<i>78.93</i>		<i>170.22</i>		<i>154.79</i>		<i>465.17</i>		<i>2426.53</i>	b	
Saladette tomato	<b>SFP</b>	33.80±5.98	b	11.08±1.37	ef	7.74±2.60	g	35.86±9.64	d	107.75±12.87	e	
	<b>BP</b>	9.10±0.54	ef	21.85±2.37	de	18.25±2.99	efg	60.79±6.80	c	430.83±53.54	d	
	<b>AHP</b>	5.90±1.07	ef	57.41±8.80	b	53.54±8.94	b	150.59±39.9	b	804.16±131.45	c	
	<b>AKHP</b>	17.90±3.56	cde	25.04±8.47	cde	22.51±7.77	def	60.56±7.45	c	288.65±62.41	a	
	<b>Total</b>	<i>66.7</i>		<i>115.38</i>		<i>102.04</i>		<i>307.8</i>		<i>1631.39</i>	b	
By-product	<b>SFP</b>	29.60±2.66	bcd	13.40±3.66	ef	10.25±2.28	fg	25.79±6.47	d	141.44±47.67	d	
	<b>BP</b>	28.67±5.11	bcd	51.30±10.91	b	46.36±10.7	bc	83.56±10.26	c	852.40±71.46	e	
	<b>AHP</b>	5.65±0.78	ef	32.23±5.77	cd	29.49±5.89	de	88.17±19.87	c	468.25	a	
	<b>AKHP</b>	31.65±10.68	bc	7.33±0.60	ef	5.72±0.29	fg	nd		±139.14	b	
	<b>Total</b>	<i>95.57</i>		<i>104.26</i>		<i>91.82</i>		<i>197.52</i>		<i>1526.18</i>	c	

Values are the mean of three replicates of three independent experiments ( $X \pm SD$ ,  $n = 3$ ). Values marked by the same letter within the same column are not statistically significantly different (multiple-range test; Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Soluble free phenolics (SFP), bound phenolics (BP), acid-hydrolysable phenolics (AHP), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP), dry extract (DE), Trolox equivalents (TE). <sup>a</sup>Total phenolic content was quantified with the Folin–Ciocalteu method. GAE–Gallic acid equivalents, CAE–(+)-catechin equivalents, nd–No detected.

Insoluble BP represent ~18% of TPC in whole tomato samples, whereas in by-product sample, BP represent ~67% of TPC indicating that the major phenolic compounds in tomato waste were not extractable by aqueous ethanol but released upon alkaline hydrolysis. This result may be due to the fact that by-product, came from a process that eliminate most of pulp from tomato fruit, resulting in a sample composed mainly of peel and seeds. By that reason phenolics in the insoluble forms are rich in this samples, since they are covalently bound to cell wall structural components such as cellulose, hemicellulose, lignin, pectin and structural proteins (Wong 2006) It is important note that bound forms of phenolic compounds can be released and absorbed in the organism during digestion process (Acosta-Estrada *et al.*, 2014) and high contribution of BP to the antioxidant activity, even higher than free and esterified fractions, has been reported (Liyana-Pathirana y Shahidi 2006).

The AHP fraction generated extracts rich in phenolic compounds. Grape tomato extract showed an AHP content significantly higher than the other extracts ( $p \leq 0.05$ ), followed by saladette tomato and finally the industrial by-product extract. In defatted tomato powder AHP represent approximately from 24 to 30% of TPC while in by-product AHP content decreased to 10% of TPC. We consider that, in whole tomato, AHP possesses high bioactive potential. Kim *et al.* (2006) reported highest phenolic compounds in alkaline hydrolyzed fraction compared to acidic hydrolyzed phenolic in wheat bran. We are reporting highest concentration of AHP than AKHP, contrasting with that report.

Our results of TPC of all fractions from tomato by-product are similar to those reported by Peschel *et al.* (2006), who performed a solvent fractionation of crude phenolic extract from tomato canning industry by-product. El-Malah *et al.* (2015) optimized the extraction conditions of phenolic compounds from tomato waste by assisted methods (ultrasound and microwave), achieving lower yields of TPC (101.5-162.5 mg GAE/100 g dry weigh) than those found in this study (212.88 mg GAE/100 g of sample). Recently, Robles-Ramírez *et al.* (2016) reported lower yields of TPC in tomato waste extracts from tomato cultivated in Mexico.

### 3.3 Phenolic compounds profile by HPLC-DAD

We obtain the phenolic compounds profile of SFP, AHP, AKHP and BP fractions from grape and saladette tomatoes and an industrial tomato by-product by HPLC-DAD (Table C2. 2). Ten compounds were identified and quantified (five phenolic acids and five flavonoids). Caffeic acid was the most abundant phenolic acid in the analyzed samples in concordance with that reported before in whole tomato fruit and different tomato by-products (Barros *et al.*, 2012; Ćetković *et al.*, 2012; Valdez-Morales *et al.*, 2014) and this phenolic acid is also found mainly in its conjugated forms. Also, significant amounts of ferulic acid were detected in all fractions tested. The AHP fractions of all samples are rich in *p*-coumaric acid. Flavonoids analysis indicates that by-product present the highest concentrations of quercetin and catechin in both bound and conjugated forms. Naringenin was the most abundant flavonoid in accordance with previously reported (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2012) and it was mainly detected in bound form in whole tomatoes and by-product. Naringenin concentration in BP fraction of by-product was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than those found in different fractions of whole tomato. Ćetković *et al.* (2012) reported lower concentrations of naringenin-derivative in tomato by-product. This may be due, at least in part, to the fact that quantification was performance on soluble phenolic fraction. Naringenin has been previously investigated for its ability to inhibit growth of breast, colon, gastric and prostate cancer cells and it causes apoptosis in human pancreatic cancer cells (Park *et al.*, 2017).



**Table C2.2.** Profile of individual phenolic acids and flavonoids in tomato and tomato by-product extracts determined by HPLC-DAD.

Sample	Fraction	Phenolic acids and flavonoids (mg per g DE)										TPC by HPLC (mg per g DE)
		Caffeic acid	Chlorogenic acid	Ferulic acid	Gallic acid	$\rho$ -Coumaric acid	Total phenolic acids					
Grape tomato	SFP	0.25±0.00	d	0.49±0.04	a	1.59±0.10	bc	nd	nd	nd	2.33	
	BP	15.73±0.44	b	nd		1.08±0.20	d	nd	nd	16.81		
	AHP	22.34±2.25	a	nd		2.36±0.19	a	2.32±0.30	a	5.86±0.62	ab	32.88
	AKHP	21.91±3.52	a	0.37±0.04	b	2.53±0.00	a	1.25±0.00	b	1.32±0.06	cd	27.38
	<b>Total</b>	<b>60.23</b>		<b>0.86</b>		<b>7.56</b>		<b>3.57</b>		<b>7.18</b>		<b>79.4</b>
Saladette tomato	SFP	0.89±0.14	d	0.13±0.02	c	0.54±0.5	e	nd	0.15±0.02	de	1.71	
	BP	3.84±0.28	cd	nd		1.59±0.06	bc	nd	1.12±0.03	de	6.55	
	AHP	15.50±1.57	b	nd		1.54±0.13	c	nd	5.38±0.68	b	22.42	
	AKHP	14.22±1.55	b	0.12±0.00	c	1.2±0.13	d	nd	0.80±0.10	de	16.34	
	<b>Total</b>	<b>34.45</b>		<b>0.25</b>		<b>4.87</b>		<b>nd</b>		<b>7.45</b>		<b>47.02</b>
By-product	SFP	0.28±0.01	d	0.08±0.00	c	0.24 ± 0.02	f	nd	0.12±0.01	e	0.72	
	BP	1.82±0.15	d	nd		0.45±0.01	ef	nd	2.33±0.02	c	4.60	
	AHP	7.28±0.72	c	nd		1.85±0.08	b	1.43±0.22	b	6.72±0.70	a	17.28
	AKHP	2.41±0.63	cd	nd		0.70±0.04	e	nd	0.40±0.05	de	3.51	
	<b>Total</b>	<b>11.79</b>		<b>0.08</b>		<b>3.24</b>		<b>1.43</b>		<b>9.57</b>		<b>26.11</b>
		Catechin	Kaempferol	Naringenin	Quercetin	Rutin	Total flavonoids					
Grape tomato	SFP	nd	0.048±0.00	e	0.22±0.03	f	0.27±0.01	cd	0.12±0.01	c	0.66	
	BP	1.23±0.01	b	nd		13.24±0.57	b	nd	0.55±0.03	a	15.02	
	AHP	1.39±0.05	b	0.31±0.02	a	nd		0.79±0.25	c	nd	2.49	
	AKHP	nd	nd		nd		0.10±0.01	d	0.27±0.01	b	0.37	
	<b>Total</b>	<b>2.62</b>	<b>0.36</b>	<b>13.46</b>	<b>1.16</b>	<b>0.94</b>	<b>18.54</b>	<b>97.94</b>				
Saladette tomato	SFP	nd	0.04±0.00	e	0.19±0.01	ef	0.20±0.01	d	0.08±0.01	de	0.51	
	BP	nd	0.19±0.00	c	4.54±0.42	c	0.85±0.12	c	nd		5.58	
	AHP	nd	nd		1.57±0.18	de	0.83±0.09	c	nd		2.40	
	AKHP	1.03±0.06	bc	0.24±0.03	b	nd		0.08±0.01	d	0.30±0.01	b	1.65
	<b>Total</b>	<b>1.03</b>	<b>0.47</b>	<b>6.3</b>	<b>1.96</b>	<b>0.38</b>	<b>10.14</b>	<b>57.16</b>				
By-product	SFP	0.18±0.01	d	0.04±0.00	e	1.74±0.16	d	0.26±0.01	cd	0.10±0.00	cd	2.32
	BP	0.54±0.01	cd	0.08±0.00	d	25.22±1.26	a	5.89±0.14	a	0.05±0.00	e	31.78
	AHP	4.39±0.33	a	0.19±0.00	c	1.28±0.16	def	3.09±0.34	b	nd		8.95
	AKHP	nd	nd		nd		4.56±0.06	cd	nd		4.56	
	<b>Total</b>	<b>5.11</b>	<b>0.31</b>	<b>28.24</b>	<b>13.80</b>	<b>0.15</b>	<b>47.61</b>	<b>73.72</b>				

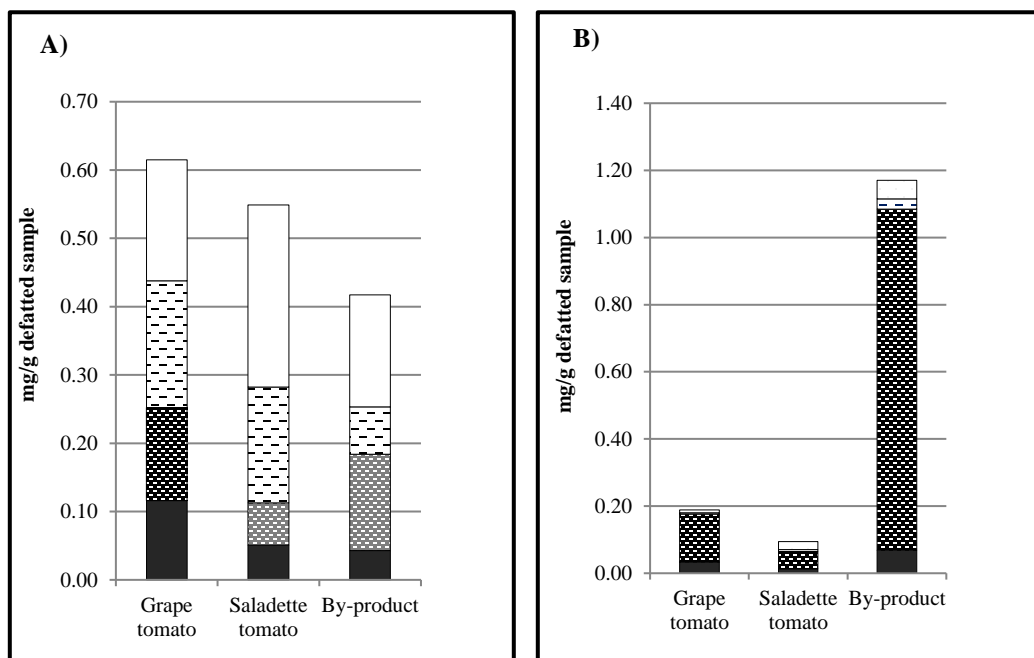
Three independent extractions were carry on and analyzed by HPLC-DAD ( $X \pm SD$ ,  $n= 3$ ). Values marked by the same letter within the same column of phenolic acids or flavonoids are not statistically significantly different (multiple-range test; Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Soluble free phenolics (SFP), bound phenolics (BP), acid-hydrolysable phenolics (AHP), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP), dry extract (DE), no detected (nd), TPC (Total phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) determined by HPLC).

Distribution patterns of phenolic acids and flavonoids as free, conjugated, and insoluble-bound forms in grape tomato, saladette tomato, and by-product are shown in Figure C2.2. In grape tomato, total phenolic acids (as the sum of the individual phenolic acids) were predominantly in the conjugated acid hydrolysable fraction, whereas in saladette and by-product, which comes from the processing of saladette tomato, phenolic acids were mainly in the alkaline-hydrolysable fraction. Phenolic acids were detected in low concentration as soluble free form. Flavonoid contents of grape and by-product followed the same order BP > SFP > AKHP > AHP while in saladette the order was BP > AKHP > SFP > AHP. It is very interesting to see that the highest amount of flavonoids in tomato samples was detected as insoluble-bound form. These findings highlight the importance of extracting the insoluble-bound fraction during total phenolic characterization. Pomegranate by-products has similar flavonoids distribution pattern (Ambigaipalan *et al.*, 2016).

### 3.4 Antioxidant capacity

Table C2.1 shows the results of antioxidant capacity obtained for each fraction evaluated. In the case of the DPPH assay, the AHP extract of grape tomato presented the highest antioxidant capacity, followed by the AHP of saladette tomato. In the case of the by-product, high antioxidant capacity was observed in the AHP and BP fractions. The extracts of AHP fraction showed the highest antioxidant capacity in this study, while SFP showed lower antioxidant capacity. The antioxidant capacity of samples evaluated using the ORAC methodology was higher than that determined using the DPPH methodology. AHP fractions from both grape and saladette tomatoes, and BP fraction from by-product showed the highest ORAC values ( $p > 0.05$ ). Previously, good contribution of BP to the antioxidant activity, even higher than free and esterified fractions (alkaline hydrolysable fraction), has been reported by Liyana-Pathirana and Shahidi (2006). Kim *et al.* (2006) and Wang *et al.* (2013) reported higher antioxidant activity of AKHP than AHP fraction for bran samples, unlike to our results, this behavior could be attribute to different type of samples. On the other hand, Valdez-Morales *et al.* (2014) reported lower values of antioxidant activity in peel and seed of an industrial tomato by-product by both methods DPPH (0.514  $\mu\text{mol TE}$

per g and 0.836  $\mu\text{mol TE per g}$ , respectively), and ORAC (7.053  $\mu\text{mol TE per g}$  and 10.283  $\mu\text{mol TE per g}$ , respectively) than those found in this study (3.53  $\mu\text{mol TE per g}$  by DPPH assay and 35.64  $\mu\text{mol TE per g}$  by ORAC assay) (Supplementary Table C2.1). Even, the BP fraction from by-product showed greater antioxidant activity than that reported by Valdez-Morales *et al.* (2014). These results may be due that the fractionation method used in this study effectively released a greater amount of antioxidant compounds.



**Figure C2.2.** Distribution pattern of phenolic acids (Panel A) and flavonoids (Panel B) as free, conjugated, and insoluble-bound forms in grape tomato, saladette tomato, and by-product determined by HPLC-DAD. Soluble free phenolics (SFP ■), bound phenolics (BP ▣), acid-hydrolysable phenolics (AHP ▤), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP □).

### 3.5 Correlation analysis

We perform correlation analyses between color of samples, TPC by Folin–Ciocalteu, antioxidant activity, individual phenolic compounds and TPC by HPLC. A positive and significant correlation was found between antioxidant activity by DPPH and TPC expressed as mg GAE ( $r= 0.894$ ,  $p=0.0000$ ) and mg CAE ( $r=0.8958$ ,  $p=0.0000$ ). Both, caffeic and  $p$ -coumaric acid content were positively correlated to antioxidant activity by DPPH ( $r= 0.6805$ ,  $p=0.0149$  and  $r= 0.7402$ ,  $p=0.0144$ , respectively) and ORAC ( $r= 0.9303$ ,  $p=0.0000$  and  $r= 0.6881$ ,  $p=0.0278$ , respectively); it means that those phenolic acids are the main compounds that contribute to the antioxidant activity of tomato extracts. Positive correlations between TPC by HPLC and TPC by Folin–Ciocalteu ( $r= 0.6599$ ,  $p=0.0195$  and  $0.6634$ ,  $p=0.0187$  for GAE and CAT respectively) were observed. Furthermore, TPC by HPLC correlated positively with antioxidant activity by DPPH ( $r= 0.6634$ ,  $p=0.0187$ ) and ORAC ( $r=0.6627$ ,  $p=0.0187$ ). Negative correlations between rutin and parameter  $a^*$  of color ( $r=-0.9978$ ,  $p=0.0427$ ) and between caffeic acid and  $b^*$  ( $r=-0.9995$ ,  $p=0.0202$ ) were observed. Finally, naringenin and quercetin showed a strong positive correlation with parameter  $b^*$  ( $r=0.9998$ ,  $p=0.0120$  and  $r=0.9979$ ,  $p=0.0412$ ). Since rutin is a precursor of pigments, its reduction and increase of red color (parameter  $a^*$ ) could be attributed to this process. However, for the rest of the compounds further analysis should be conducted in order to establish a cause-effect mechanism. Shen *et al.* (2009) reported a negative correlation of all color parameter with phenolic and flavonoids content in rice grain.

#### 4. CONCLUSIONS

From the results, we can conclude that tomato by-product is rich in phenolic compounds with high antioxidant activity, and these are mainly bound to structural components of cell walls. Considering this information, it is important to take into account extraction methodologies of these compounds for the analysis of phenolic bioactivity, as well as studies of their potential applications, to achieve maximum utilization of the by-product as well characterization of other tomato varieties. The valorization of the industrial tomato by-product, through the use of its different fractions of phenolic antioxidant compounds, could generate additional income to the tomato industry and reduce the waste disposal problem. Finally, to the best of our knowledge, this is the first report of identification of soluble free, conjugated (acid and alkaline hydrolysable) and bound phenolic compounds from industrial tomato by-product as well in whole tomato fruit.

## 5. REFERENCES

- Abid Y, Azabou S, Jridi M, Khemakhem I, Bouaziz M, Attia H. 2017. Storage stability of traditional Tunisian butter enriched with antioxidant extract from tomato processing by-products. *Food Chemistry*. 15:476-482.
- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Urbe JA, Serna-Saldívar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem* 152: 46-55.
- Ambigaipalan P, de Camargo AC, Shahidi F. 2016. Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities. *J Agric Food Chemistry*. 64: 6584-604.
- Ayoub M, Costa de Camargo A, Shahidi F. 2016. Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food Chemistry*. 197: 221-232.
- Barros L, Dueñas M, Pinela J, Carvalho AM, Santos Buelga C, Ferreira IC. 2012. Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers varieties in northeastern Portugal homegardens. *Plant Foods for Human Nutrition*. 67: 229-234.
- Bennamoun L, Hiligsmann S, Dakhmouche S, Ait-Kaki A, Kenza Labbani F-Z, Nouadri T, Meraihi Z, Turchetti B, Buzzini P, Thonart P. 2016. Production and properties of a thermostable, pH-stable exo-polygalacturonase using *aureobasidium pullulans* isolated from saharan soil of Algeria grown on tomato pomace. *Foods* 5: 1-20.
- Cardador-Martínez A, Albores A, Bah M, Calderón-Salinas V, Castaño-Tostado E, Guevara-González R, Shimada-Miyasaka, Loarca-Piña G. 2006. Relationship among antimutagenic, antioxidant and enzymatic activities of methanolic extract from common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Foods for Human Nutrition*. 61:161-168. doi: doi.org/10.1007/s11130-006-0026-4.
- Ćetković G, Savatović S, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Vulić J, Mandić A, Četojević-Simin D. 2012. Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry*. 133: 938-945.
- El-Malah MH, Hassanein MM, Areif MH, Al-Amrousi EF. 2015. Utilization of Egyptian tomato waste as a potential source of natural antioxidants using solvents, microwave

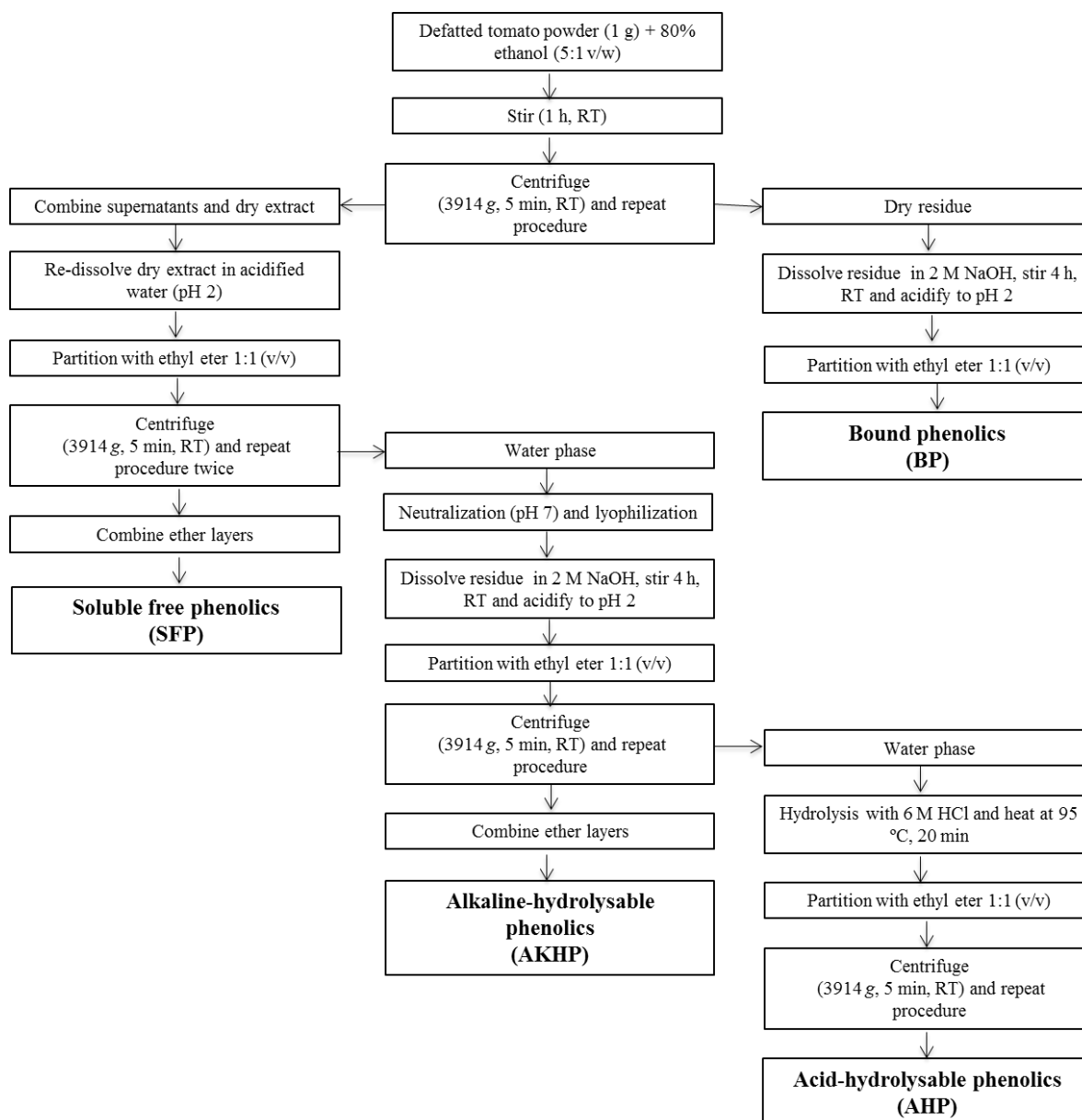
- and ultrasound extraction methods. *American Journal of Food Technology*. 10: 14-25.
- Ferreres F, Taveira M, Pereira DM, Valentão P, Andrade P. 2010. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: new flavonols and cytotoxic effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 2854-2861.
- Kalogeropoulos N, Chiou A, Pyriochou V, Peristeraki A, Karathanos VT. 2012. Bioactive phytochemicals in industrial tomatoes and their processing byproducts. *LWT-Food Science Technology*. 49: 213-216.
- Kim K, Tsao R, Yang R, Cui S. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*. 95: 466-473.
- Lavelli V, Torresani MC. 2011. Modelling the stability of lycopene-rich by-products of tomato processing. *Food Chemistry*. 125: 529-535.
- Liyana-Pathirana CM, Shahidi F. 2006. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 1256-1264.
- Nour V, Ionica ME, Trandafir I. 2015. Bread enriched in lycopene and other bioactive compounds by addition of dry tomato waste. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 8260-8267.
- Park HJ, Choi YJ, Lee JH, Nam MJ. 2017. Naringenin causes ASK1-induced apoptosis via reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. 99:1-8.
- Paur I, Lilleby W, Bøhn SK, Hulander E, Klein W, Vlatkovic L, Axcróna K, Bolstad N, Bjørro T, Laake P, *et al.* 2016. Tomato-based randomized controlled trial in prostate cancer patients: Effect on PSA. *Clinical Nutrition*. doi: 10.1016/j.clnu.2016.06.014.
- Peschel W, Sánchez-Rabaneda F, Diekmann W, Plescher A, Gartzía I, Jiménez D, Lamuela-Raventós R, Buxaderas S, Codina C. 2006. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*. 97: 137-150.
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity



- (oxygen radical absorbance capacity (ORAC-FL) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3273-3279.
- Ravindran R and Jaiswal AK. 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*. 34: 58-69.
- Robles-Ramírez MC, Monterrubio-López R, Mora-Escobedo R, Beltrán-Orozco MC. 2016. Evaluation of extracts from potato and tomato wastes as natural antioxidant additives. *ALAN* (On line) 66:066-073. [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222016000100008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222016000100008&lng=es&nrm=iso). Accessed 01 August 2017.
- Shen Y, Jin L, Xiao P, Lu Y, Bao J. 2009. Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight. *Journal of Cereal Science* 49: 106-111.
- SIAP (Servicio de información agroalimentaria y pesquera). 2016. Atlas agroalimentario 2016. First edition. Mexico. pp. 92-93.
- Sousa AS de, Borges SV, Magalhães NF, Ricardo HV, Azevedo AD. 2008. Spray-dried tomato powder: Reconstitution properties and colour. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51: 807-814.
- Stajčić S, Četković G, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Mandić A, Četojević-Simin D. 2015. Tomato waste: Carotenoids content, antioxidant and cell growth activities. *Food Chemistry*. 172: 225-232.
- Strati I, Oreopoulou V. 2011. Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food Science & Technology*. 46: 23-29.
- Swain T, Hillis WE. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 10: 63-68.
- Valdez-Morales M, Espinosa-Alonso LG, Espinoza-Torres LC, Delgado-Vargas F, Medina-Godoy S. 2014. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 5281-5289.
- Vallverdú-Queralt A, Medina-Remón A, Casals-Ribes I, Andres-Lacueva C, Waterhouse AL, Lamuela-Raventos RM. 2012. Effect of tomato industrial processing on

- phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity. *LWT-Food Science Technology*. 47: 154-160.
- Wang T, Raddatz J, Chen G. 2013. Effects of microfluidization on antioxidant properties of wheat bran. *Journal of Cereal Science*. 58: 380-386.
- Wang W, Guo J, Zhang J, Peng J, Liu T, Xin Z. 2015. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. *Food chemistry*. 171: 40-49.
- Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S. 2003. Tomato and cardiovascular health. *Crit Rev Food Science and Nutrition*. 43: 1-18.
- Wong DWS. 2006. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 133: 87-112.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL



**Supplementary Figure C2.1.** Scheme of the extraction process of soluble free, alkaline-hydrolysable, acid-hydrolysable and bound phenolic compounds.

**Supplementary Table C2.1.** Total phenolic content and antioxidant activity of different fractions of phenolic compounds of whole tomato fruits and industrial by-product expressed in grams of defatted sample.

Sample	Fraction	Total phenolic content <sup>a</sup>				Antioxidant activity			
		$\mu\text{g GAE per g defatted sample}$		$\mu\text{g CAE per g defatted sample}$		DPPH ( $\mu\text{mol TE per g defatted sample}$ )		ORAC ( $\mu\text{mol TE per g defatted sample}$ )	
Grape tomato	<b>SFP</b>	441.68± 48.61	bc	295.58±38	bc	0.68±0.10	b	6.95±0.09	bc
	<b>BP</b>	415.64±42.71	bcd	369.10±50.61	bc	1.04±0.15	c	8.38±0.49	b
	<b>AHP</b>	432.89±60.49	bcd	407.70±61.89	b	1.20±0.15	c	3.78±1.37	bc
	<b>AKHP</b>	317.21±35.49	de	270.15±40.81	cd	0.76±0.22	c	4.71±0.95	bc
	<b>Total</b>	<i>1607.42</i>		<i>1342.53</i>		<i>3.68</i>		<i>23.82</i>	
Saladette tomato	<b>SFP</b>	464.74±40.77	b	261.20±34.12	cd	1.14±0.16	c	3.23±0.23	bc
	<b>BP</b>	188.90±11.99	f	156.47±15.91	de	0.52±0.05	c	3.60±0.18	bc
	<b>AHP</b>	352.82±46.34	bcd	327.63±37.02	bc	1.02±0.15	b	4.00±1.31	bc
	<b>AKHP</b>	329.40±22.39	cd	295.59±31.38	bc	0.96±0.05	c	6.01±0.21	bc
	<b>Total</b>	<i>1335.86</i>		<i>1040.89</i>		<i>3.64</i>		<i>16.84</i>	
By-product	<b>SFP</b>	403.88±61.99	bcd	299.41±27.90	bc	0.68±0.10	d	4.10±0.77	bc
	<b>BP</b>	1424.80±136.40	a	1285.59±156.89	a	2.53±0.35	a	27.24±3.92	a
	<b>AHP</b>	123.40±17.77	f	112.68±17.05	e	0.32±0.04	c	1.77±0.17	c
	<b>AKHP</b>	176.74±14.56	ef	137.92±6.94	de	nd		2.53±1.27	bc
	<b>Total</b>	<i>2128.82</i>		<i>1835.6</i>		<i>3.53</i>		<i>35.64</i>	

Values are the mean of three replicates of three independent experiments ( $X \pm SD$ ,  $n = 3$ ). Values marked by the same letter within the same column are not statistically significantly different (multiple-range test; Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Soluble free phenolics (SFP), bound phenolics (BP), acid-hydrolysable phenolics (AHP), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP), dry extract (DE), no detected (nd), Trolox equivalents (TE). <sup>a</sup>Total phenolic content was quantified with the Folin–Ciocalteu method. GAE-Gallic acid equivalents, CAE-(+)-catechin equivalents.

# **CAPÍTULO 3:**

**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE COMPUESTOS  
FENÓLICOS LIBRES, CONJUGADOS Y LIGADOS DE TOMATE Y  
SUBPRODUCTO INDUSTRIAL EN LA LÍNEA CELULAR DE  
CÁNCER DE MAMA MCF-7**

**ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY OF FREE, CONJUGATES AND  
BOUND PHENOLIC COMPOUNDS FROM TOMATO AND TOMATO  
BY-PRODUCTS ON HUMAN BREAST CANCER CELL LINE (MCF-  
7).**

## ÍNDICE DE CONTENIDO DEL CAPÍTULO 3

	Pág.
<b>ABSTRACT</b>	<b>83</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>84</b>
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b>	<b>86</b>
2.1 Biological material and sample processing	86
2.2 Extraction of phenolic compounds from tomato and by-product	86
2.3 Cytotoxicity assays	86
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>88</b>
<b>4. CONCLUSIONS</b>	<b>93</b>
<b>5. REFERENCES</b>	<b>94</b>

### ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO 3

	<b>Pág.</b>
<b>Figure C3.1.</b> Efecct soluble free phenolics (SFP), bound phenolics (BP), acid-hydrolysable phenolics (AHP), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP) from <b>A)</b> saladette tomato, <b>B)</b> by-product and <b>C)</b> grape tomato, on growth of MCF-7 breast cancer cell line.	89

### ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO 3

	<b>Pág.</b>
<b>Table C3.1.</b> Anti-proliferative activity of different fractions of phenolic compounds from tomato and tomato by-products on the MCF-7 cell line (IC <sub>50</sub> , µg DE/mL)	90

**ANTI-PROLIFERATIVE ACTIVITY OF FREE, CONJUGATES AND BOUND PHENOLIC COMPOUNDS FROM TOMATO AND TOMATO BY-PRODUCTS ON HUMAN BREAST CANCER CELL LINE (MCF-7).**

**ABSTRACT**

Epidemiological studies have demonstrated the inverse correlation between increasing consumption of fruits and vegetables and incidences of breast cancer risk. It has been suggested that the consumption of tomato and tomato-based products can reduce the risk of chronic degenerative diseases and certain types of cancer, and this capacity has been related to their phytochemical content. In this work, the anti-proliferative activity of soluble free phenolics (SFP), conjugated acid-hydrolysable phenolics (AHP) and alkaline-hydrolysable phenolics (AKHP), and bound phenolics (BP) fractions from two tomato varieties (saladette and grape) and an industrial tomato by-product was evaluated in the MCF-7 breast cancer cell line. AKHP from saladette tomato and AHP from by-product showed very strong anti-proliferative activity while BP from saladette, SFP, BP and AKHP from by-product and AHP from grape tomato showed strong anti-proliferative activity. We can conclude that the evaluated tomato varieties and tomato by-product are excellent sources of phenolic compounds with anti-proliferative activity on human breast cancer cell line.



## INTRODUCTION

Breast cancer is the most common cancer in females. The deteriorating environment, and lifestyle flaws are raising the frequency of this disease (Patel, 2018). Epidemiological studies have demonstrated the inverse correlation between increasing consumption of fruits and vegetables and incidences of breast cancer risk (Gandini *et al.*, 2000; Steinmetz and Potter, 1996). Tomato is one of the most widely used and versatile fruit crops. It is consumed fresh and processed into a wide range of manufactured products (Sousa *et al.* 2008). Epidemiologic studies suggest that consumption of tomato and tomato-based products reduces the risk of chronic diseases such as cardiovascular disease and certain types of cancer (Willcox *et al.* 2003; Paur *et al.* 2016). It has been reported that tomato extracts containing lycopene inhibit the growth of cells of colorectal cancer in a dose-dependent manner (Ramos-Bueno *et al.*, 2015). Previous research has linked the anti-proliferative effect of extracts from different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells with their content of phenolic compounds (Saunders, 2009). Moreover, several classes of flavonoids having a variety of substituents on A ring have been investigated for their anti-proliferative activity against MCF-7 human breast cancer cells (Pouget *et al.*, 2001). Even recent reviews have reported how various research groups showed the *in vitro* anticancer effect of various flavonoids on different cell lines, for example quercetin, luteolin, genistein on human breast cancer MCF-7 and apigenin, kaempferol, catechin, luteolin, genistein on human thyroid cancer cell lines (Raffa *et al.*, 2017).

Industrial processing of tomato generates a considerable amount of by-products that are used mainly for animal feed or turn into compost. The management of tomato byproducts is considered an important problem faced by tomato processing companies, as they cannot be discharged to the environment (Bennamoun *et al.* 2016). Industrial tomato by-products can be recovered in order to produce valuable metabolites via chemical and biotechnological processes (Ravindran and Jaiswal, 2016). Previously, Četković *et al.* (2012) evaluated the anti-proliferative effect of crude extracts of phenolic compounds from tomato waste in the MCF-7 cell line, however, phenolic compounds in plants may exist in

free, soluble conjugated (acid and alkaline hydrolysable) and insoluble-bound forms (Wang *et al.* 2015).

Interestingly, one of our previous studies has shown that tomato and tomato by-product are important sources of free, conjugates and bound phenolic compounds with good antioxidant activity, suggesting their potential use as sources of high added value polyphenols (Perea-Domínguez *et al.*, 2018). In this work, the anti-proliferative activity of different fractions phenolic compounds from tomato and industrial tomato by-product in the MCF-7 breast cancer cell line was evaluated for the first time.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Biological material and sample processing

Tomato fruits (saladette and grape varieties) grown in the State of Sinaloa were provided by a local farm during the first harvest of 2015. The fruits were stored at 25 °C until they reached the stage of maturity # 6 (last stage in USDA color scale). Tomatoes were cut into small cubes (1 cm<sup>3</sup>), frozen (-20 °C) and lyophilized. The by-product sample (which is comprised by 60% peel and 40% seeds) was provided by a local company (La Costeña®, Guasave, Sinaloa México), from industrial tomato processing line, operating to produce tomato paste. The industrial by-product was frozen and lyophilized. The samples were milled until obtaining a fine powder (TissueLyser II, Qiagen, Valencia, CA) and sieved (sieve number 35). Powdered samples were stored at -20 °C protected from light for further analysis.

### 2.2 Extraction of phenolic compounds from tomato and by-product

Different fractions of phenolic compounds were sequentially extracted from grape and saladette tomato powder and by-product powder. Previously, samples were defatted as follow: the fine powder (4 g) was transferred to an Erlenmeyer flask, 20 mL of hexane were added and the mixture was kept in a mechanical shaker during 1 h at 25 °C. The mixture was filtered and the final defatted flour was dried in a hood at room temperature (RT). In the case of saladette tomato, after filtered, the sample was dried in oven during 1 h at 45 °C. SFP, AHP, AKHP and BP were extracted following the procedure reported by Kim *et al.* (2006) with modifications of Perea-Domínguez *et al.* (2018).

### 2.3 Cytotoxicity assays

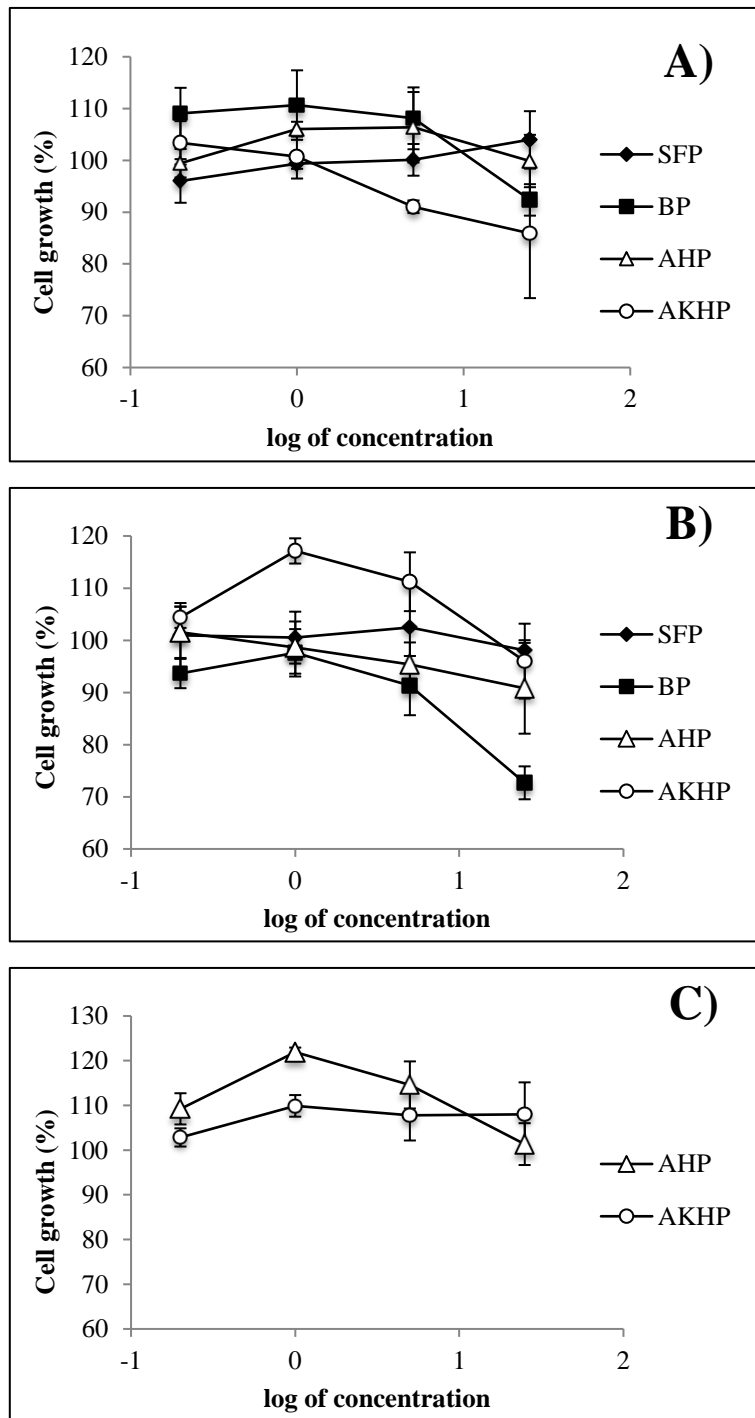
Cytotoxicity assays were carried out following the methodology described by Campos-Lara and Mendoza-Espinoza (2011). MCF-7 cells were maintained in RMPI 1640 medium with 10% fetal bovine serum and cultured at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in

air (100% humidity). Cells at log phase of their growth cycle were treated in triplicate at various concentrations of the test samples (0.2, 1, 5 and 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and incubated for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . Cell concentrations were determined by the sulforhodamine B method, this colorimetric method expresses the results in growing cell percentage in relation to the control using the following formula, % grown cell =  $(A_t - A_b)/(A_c - A_b) \times 100$ , where,  $A_t$ = absorbance value of test compound,  $A_b$ = absorbance value of blank,  $A_c$  = absorbance value of control. Results were expressed as  $\text{IC}_{50}$  obtained using a nonlinear regression.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

We examined the anti-proliferative effect of different fractions of phenolic compounds from tomato and industrial tomato by-products in the MCF-7 breast cancer cell line. The effect of different concentrations of phenolic compounds from the different samples is shown in Figure C3.1. The AKHP fraction from saladette tomato (Fig. C3.1 A) notably decrease cell growth at higher concentration of extract. The same pattern is observed for the BP fraction. In the case of by-products (Fig. C3.1 B), this tendency is observed mainly in the BP, AHP and AKHP samples. Grape AHP extracts also show a tendency to decrease cell growth, as the concentration increases (Fig. C3.1 C).

Table C3.1 shows the  $IC_{50}$  values, defined as the half inhibitory concentration of cell growth.  $IC_{50}$  values were calculated normalizing the graph of cell growth. According to the criteria previously defined by Wibowo *et al.* (2011), compounds with  $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$  are considered with very strong activity (inhibition); strong:  $< 5\text{--}10 \mu\text{g/mL}$ ; moderate:  $10\text{--}20 \mu\text{g/mL}$ ; weak:  $20\text{--}100 \mu\text{g/mL}$  and not active  $> 100 \mu\text{g/mL}$ . Previously, Şahin *et al.* (2018) evaluated the cytotoxic effects of platinum nanoparticles obtained from pomegranate extract on the MCF-7 cell and they found that the nanoparticles inhibited MCF-7 proliferation with an  $IC_{50}$  of  $17.84 \mu\text{g/mL}$  after 48 h of incubation.



**Figure C3.1.** Efect soluble free phenolics (SFP), bound phenolics (BP), acid-hydrolysable phenolics (AHP), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP) from **A)** saladette tomato, **B)** by-product and **C)** grape tomato, on growth of MCF-7 breast cancer cell line.

**Table C3.1.** Anti-proliferative activity of different fractions of phenolic compounds from tomato and tomato by-products on the MCF-7 cell line (IC<sub>50</sub>, µg DE/mL).

<b>Sample</b>	<b>Fraction</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg DE/mL)</b>
Saladette tomato	SFP	128.4
	BP	9.386
	AHP	11.03
	AKHP	2.839
By-product	SFP	8.445
	BP	7.687
	AHP	3.014
	AKHP	6.67
Grape tomato	AHP	5.666
	AKHP	43.01

Soluble free phenolics (SFP), bound phenolics (BP), acid-hydrolysable phenolics (AHP), alkaline-hydrolysable phenolic (AKHP), dry extract (DE). IC<sub>50</sub> activity (inhibition): very strong < 5 µg/mL; strong < 5–10 µg/mL; moderate: 10–20 µg/mL; weak: 20–100 µg/mL and not active > 100 µg/mL (Wibowo *et al.*, 2011).

Our results show that the SFP fraction from saladette tomato has no anti-proliferative activity against the MCF-7 breast cancer cell line, while the AHP fraction of the same sample showed moderate anti-proliferative activity. In contrast, BP from saladette showed strong anti-proliferative activity and AKHP showed very strong anti-proliferative activity, with an  $IC_{50} = 2.839 \mu\text{g}$  of dry extract/mL. The fractions SFP, BP and AKHP of the byproduct resulted with strong activity, while the fraction AHP has very strong anti-proliferative activity ( $IC_{50} = 3.014 \mu\text{g}$  of dry extract/mL). Two fractions of phenolic compounds from grape tomato were evaluated and weak inhibitory activity of AKHP fraction was observed while the AHP fraction showed strong anti-proliferative effect against the MCF-7 was observed.

The tomato phenolic extracts used in this work for cytotoxic assays has been previously tested by our research group for total phenolic compounds, detection and quantitation of individual phenolic acids and flavonoids, and antioxidant activity by DPPH and ORAC assays (Perea-Domínguez *et al.*, 2018). It is not possible to establish a direct relationship between the anti-proliferative activity found in this work and the previously reported antioxidant activity.

Regarding to the content of phenolic compounds, AHP fraction from the by-product stands out for its content of  $p$ -coumaric and caffeic acids, as well as its ferulic and gallic acid content. AHP fraction is the extract with the highest phenolic acid content of all by-product fractions analyzed. About flavonoids, it was determined that AHP contains mainly catechin and quercetin. AKHP fraction of saladette tomato has twice caffeic acid concentration as AHP fraction from the by-product but it has a significantly lower concentration of  $p$ -coumaric acid. (+)-Catechin was the main flavonoid found in this fraction. Previously, pure quercetin has exhibited cell proliferation-inhibiting activity in MCF-7 cells (Han *et al.*, 2001). In addition, it is known that quercetin has shown *in vitro* anti-cancer effect in different cell lines (human lung cancer, human oral cancer, human leukemia) while catechin has shown effect in human thyroid and prostate cancer cell lines (Raffa *et al.*, 2017).



It is possible to appreciate that the samples with weak or no anti-proliferative activity were those with the lowest concentrations of flavonoids and both lack catechin. Within the perspectives, it would be interesting to carry out a more complete analysis of flavonoids and phenolic acids and to determine if there is a correlation with the anti-proliferative activity of the fractions and phenolic compounds.

Previously, Četković *et al.* (2012) evaluated the anti-proliferative effect of crude extracts of phenolic compounds from tomato waste in the MCF-7 cell line and reported that the anti-proliferative effects of the extracts were observed at concentrations higher than 6.3 mg/ mL while the IC<sub>50</sub> values ranged between 20.3 and 23.7 mg/mL. Those concentrations are much higher than those found in this study and according to the criteria considered in our study, the extracts evaluated by Četković *et al.* (2012) are considered not active (IC<sub>50</sub> > 100 µg/mL).

Ramos-Bueno *et al.* (2015) reported that tomato extracts obtained with petroleum ether inhibited the growth of HT-29 cells of colorectal cancer in a dose-dependent manner with IC<sub>50</sub> values of 150 µg/mL and attributed the effect to lycopene in the extract, which has been shown a wide range of health benefits. Meanwhile, Stajčić *et al.* (2015) observed anti-proliferative effects of carotenoid extracts from tomato waste in MCF-7, HeLa and MRC-5 cell lines at concentrations ≤ 125 µg/mL. The carotenoid contents exhibited a strong correlation with anti-proliferation activity.

#### 4. CONCLUSIONS

From the results, we can conclude that BP and AKHP from saladette, AHP, SFP, BP and AKHP from by-products, and AHP from grape tomato are excellent sources of phenolic compounds with anti-proliferative activity on human breast cancer cell line. It should be noted that all fractions of phenolic compounds from the industrial by-product showed strong or very strong anti-proliferative activity, therefore it is very interesting to focus on the detailed study of these compounds, because they come from an industrial waste that is not currently used, which has been shown to be an important source of compounds with good biological activities. Additional experiments are needed to determine the effect of the extracts of phenolic compounds in the different phases of the cell cycle of the MCF-7 line, as well as to investigate the cytotoxic activity of the extracts in other cell lines. To the best of our knowledge, this is the first report of the anti-proliferative activity of free, conjugated and bound phenolics from tomato and tomato by-product on breast cancer cell line.

## 5. REFERENCES

- Bennamoun L, Hiligsmann S, Dakhmouche S, Ait-Kaki A, Kenza Labbani F-Z, Nouadri T, Meraihi Z, Turchetti B, Buzzini P, Thonart P. 2016. Production and properties of a thermostable, pH-stable exo-polygalacturonase using *aureobasidium pullulans* isolated from saharan soil of Algeria grown on tomato pomace. *Foods*. 5: 1-20.
- Campos-Lara M and Mendoza-Espinoza JA. 2011. Cytotoxic evaluation of fluvastatin and rosuvastatin and effect of fluvastatin in the hela cell cycle. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 5(3): 322-326.
- Ćetković G, Savatović S, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Vulić J, Mandić A, Četojević-Simin D. 2012. Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. *Food Chemistry*. 133: 938-945.
- Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P. 2000. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *European Journal of Cancer*. 36: 636-646.
- Han D, Tachibana H, Yamada K. 2001. Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 37:275-282.
- Kim K, Tsao R, Yang R, Cui S. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*. 95: 466-473.
- Patel S. 2018. Breast cancer: Lesser-known facets and hypotheses. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 98: 499-506.
- Paur I, Lilleby W, Bøhn SK, Hulander E, Klein W, Vlatkovic L, Axcrona K, Bolstad N, Bjørro T, Laake P, et al. 2016. Tomato-based randomized controlled trial in prostate cancer patients: Effect on PSA. *Clinical Nutrition*. 36(3): 672-679.
- Perea-Domínguez XP, Hernández-Gastelum LZ, Olivas-Olguin HR, Espinosa-Alonso LG, Valdez-Morales M, Medina-Godoy S. 2018. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*. 55(9): 3453-3461.

- Pouget C, Lauthier F, Simon A, Fagnere C, Basly JP, Delage C, Chulia AJ. 2001. Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 11(24):3095-3097.
- Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, Plescia F, Daidone G. 2017. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 142: 213-228.
- Ramos-Buen RP, Romero-González R, González-Fernández MJ, Guil-Guerrero JL. 2015. Phytochemical composition and *in vitro* anti-tumour activities of selected tomato varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 97(2): 488-496.
- Ravindran R and Jaiswal AK. 2016. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*. 34: 58-69.
- Şahin B, Aygün A, Gündüz H, Şahin K, Demir E, Akocak S, Şen F. 2018. Cytotoxic effects of platinum nanoparticles obtained from pomegranate extract by the green synthesis method on the MCF-7 cell line. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 163: 119-124.
- Saunders C. 2009. The anti-proliferative effect of different tomato varieties on the human colon adenocarcinoma cells. *Bioscience Horizons*. 2 (2): 172-179.
- Sousa AS de, Borges SV, Magalhães NF, Ricardo HV, Azevedo AD. 2008. Spray-dried tomato powder: Reconstitution properties and colour. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51: 807-814.
- Stajčić S, Četković G, Čanadanović-Brunet J, Djilas S, Mandić A, Četojević-Simin D. 2015. Tomato waste: Carotenoids content, antioxidant and cell growth activities, *Food Chemistry*. 172: 225-232.
- Steinmetz KA, Potter JD. 1996. Vegetables, fruit, and cancer prevention a review. *Journal of The American Dietetic Association*. 96, 1027–1039.
- Wang W, Guo J, Zhang J, Peng J, Liu T, Xin Z. 2015. Isolation, identification and antioxidant activity of bound phenolic compounds present in rice bran. *Food chemistry*. 171: 40-49.
- Wibowo A, Ahmat N, Hamzah AS, Sufian AS, Ismail NH, Ahmad R, Jaafar FM, Takayama H. 2011. Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatica*. *Fitoterapia*. 82 (4): 676-681.

Willcox JK, Catignani GL, Lazarus S. 2003. Tomato and cardiovascular health. *Crit Rev Food Science & Nutrition*. 43: 1-18.

# **CAPÍTULO 4:**

**ESTUDIO *in vitro* DEL EFECTO DEL PLAGUCIDA ORGANOFOSFORADO MALATIÓN EN LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN ERITROCITOS HUMANOS DE HABITANTES DEL NORTE DEL ESTADO DE SINALOA.**

***In vitro* STUDY OF THE EFFECT OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDE MALATHION IN ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY IN HUMAN ERYTHROCYTES FROM INHABITANTS OF NORTHERN OF SINALOA STATE, IN MEXICO.**

## ÍNDICE DE CONTENIDO DEL CAPÍTULO 4

	<b>Pág.</b>
<b>ABSTRACT</b>	99
<b>1. INTRODUCTION</b>	100
<b>2. MATERIAL AND METHODS</b>	102
2.1 Chemicals	102
2.2 Ethical considerations.	102
2.3 Erythrocytes preparation	102
2.4 Hemoglobin determination	102
2.5 Treatment of erythrocytes	104
2.6 SOD activity	104
2.7 GPx activity	104
2.8 Statistical analysis	105
<b>3. RESULTS AND DISCUSSION</b>	107
3.1 Hb determination	107
3.2 Antioxidant enzyme assays	108
3.2.1 Measurement of SOD activity	108
3.2.2 Measurement of GPx activity	110
<b>4. CONCLUSIONS</b>	114
<b>5. REFERENCES</b>	115

## ÍNDICE DE FIGURAS DEL CAPÍTULO 4

	Pág.
<b>Figure C4.1.</b> SOD activity (inhibition rate %) in control (without malathion) and experimental groups (25, 75 and 200 $\mu$ M malathion) in erythrocytes of seven individuals.	109
<b>Figure C4.2.</b> GPx antioxidant activity	111

## ÍNDICE DE CUADROS DEL CAPÍTULO 4

	Pág.
<b>Table C4.1.</b> Hemoglobin concentration in packed red blood cells of individuals of the involved in this study	107



## ABSTRACT

Organophosphorus (OP) compounds are the most widely used class of pesticides for agricultural and landscape pest control. OP insecticides may induce oxidative stress leading to the generation of free radicals and alteration in the antioxidant system. Malathion is one of the most commonly used OP pesticide in the environment for agricultural and domestic purposes and oxidative stress has been reported as a possible mechanism of malathion toxicity. In this work, we studied the malathion effect in two of the main antioxidant enzymes in human erythrocytes isolated from inhabitants of Northern of Sinaloa state, in Mexico. Results showed that high purity malathion at concentrations tested did not show an inductive effect of oxidative stress related to SOD and GPx activity. The oxidative effects observed for malathion in literature, at least in part, might arise from impurities, in the technical or commercial grade mixtures, therefore we consider necessary the evaluation of oxidative stress inducing by individuals degradation products of malathion. Besides, the results obtained in this study may provide information of a change in the oxidative response of the inhabitants of the Northern of Sinaloa state compared with others regions, taking into consideration that it is a region with intensive use of wide range of pesticides.

**Keywords:** malathion, oxidative stress, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, human erythrocytes.

## INTRODUCTION

Pesticides are compounds commonly used in agriculture to pests control and diseases prevention; this is the most accepted strategy to obtaining the maximum crops production and the highest quality (Martinez-Valenzuela *et al.*, 2009). The widespread use of pesticides in agriculture, public health and household environments results in continuous exposure of human populations. Exposure to low-level of pesticides is known to produce a wide variety of biochemical changes, some of which may be responsible for the adverse biological effects reported in human and experimental studies (Gupta *et al.*, 1998; Banerjee *et al.*, 1999; Kalender *et al.*, 2005; García-García *et al.*, 2016; Rizzati *et al.*, 2016).

Pesticides lead to the generation of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), and hydroxyl (-OH) radicals, which have harmful effects on human health. Reacting with biological macromolecules, these radicals cause enzyme inactivation, DNA damage and initiate lipid peroxidation by accumulating in polyunsaturated fatty acids. If these oxidants cannot be removed by antioxidant defense systems, they cause oxidative stress. Oxidative stress is observed to contribute to pathological conditions like DNA damage and cancer (Ogut *et al.*, 2015).

Organophosphorus (OP) compounds are the most widely used class of pesticides for agricultural and landscape pest control (Rezg *et al.*, 2010). They can reach the food chain and enter the human body causing seriously health problems by means of acetylcholinesterase inhibition and oxidative stress (Lu *et al.*, 2008; Soltaninejad and Abdollahi, 2009). Malathion (O,O-dimethyl-S-1,2-bis ethoxy carbonyl ethyl phosphorodithionate) is one of the most commonly used OP pesticide in the environment for agricultural and domestic purposes (Fakhri-Bafghi *et al.*, 2016). Like other OP compounds, malathion is known to inhibit acetylcholinesterase activity, an effect that is thought to underlie the neurotoxicity elicited by these compounds (Kwong, 2002). Additionally, oxidative stress has been reported as a possible mechanism of malathion toxicity (Yarsan *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2010; Bhatti *et al.*, 2013).

In blood, erythrocytes are particularly susceptible to oxidative damage due to the presence of high amounts of polyunsaturated fatty acids in their cell membranes and high concentrations of oxygen and hemoglobin (Hb). Under normal physiological conditions, erythrocytes are well equipped with several biological mechanisms comprising several antioxidant enzymes to defend against intracellular oxidative stress (Abdallah *et al.*, 2011). The function of this antioxidant system is to keep free radicals under or at innocuous physiological levels. SOD, GPx, glutathione reductase (GR) and catalase (CAT) are involved in the disposal of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ . SOD catalyzes dismutation of  $O_2^{\cdot-}$  to  $H_2O_2$  and  $O_2$  and GPx and CAT enzymes decompose the  $H_2O_2$  to non toxic compounds. GR catalyzes the reduction of oxidized glutathione to reduced form, which is the substrate of GPx (Efe *et al.*, 2004). Recently, Durak *et al.* (2009) reported alterations in the activity of antioxidant enzymes and increase of lipid peroxidation in human erythrocytes exposed to malathion *in vitro*.

On the other hand, Sinaloa state, in the northwest of Mexico, is the national leader in production of vegetables and grains such as tomato and corn (SIAP, 2018). However, farming is based on the use of a high volume of pesticides, which have had negative impact on the environment (García-Gutiérrez and Rodríguez-Meza, 2012); they also represent a potential risk to human health. In this area of the country, genotoxic damage has been found in farm workers occupationally exposed to mixtures of pesticides (Martinez-Valenzuela *et al.*, 2009) and possible genotoxic risk for children who are in residential proximity to agricultural areas with intense aerial pesticide applications has been reported (Gómez- Arroyo *et al.*, 2013). In this work, we examined the effect of different doses of malathion in two of the main antioxidant enzymes, SOD and GPx, in human erythrocytes isolated from inhabitants of northern of Sinaloa state.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Chemicals**

Malathion (purity 98.7 %), Hb and SOD activity kits were purchased from Sigma-Aldrich (Catalog numbers MAK115 and 19160, respectively). GPx kit was purchased from Cayman's chemical (Catalog number 703102).

### **2.2 Ethical considerations.**

This project was evaluated and approved by The Research Ethics Committee of The National School of Biological Sciences (IPN) in Mexico (research protocol #CEI-ENCB-030/2015). Written consent was obtained from all the adults who participated in the study.

### **2.3 Erythrocytes preparation**

The preparation of erythrocytes was performed by following the procedure described by Durak *et al.* (2009). Six milliliters of fresh blood were collected in heparinized tubes from eight healthy volunteers from Sinaloa state by venipuncture; they were considered based on the following inclusion criteria: individuals between 20 and 30 years old, non-taking medication, non-smoking and non-agricultural workers. Erythrocytes were separated from blood plasma by centrifugation (1500 rpm during 5 min) and then washed three times with a cold isotonic saline solution (0.9% NaCl). The supernatant and the buffy coat were carefully removed after each wash. After separation, packed erythrocytes were suspended in phosphate buffer at pH 7.40 to obtain a 5% cellular suspension.

### **2.4 Hemoglobin determination**

Concentration of Hb was determined using the Hb assay kit from Sigma-Aldrich. Packed red blood cells were dissolved 200-fold in water. 50  $\mu$ L of diluted sample were added into wells and 200  $\mu$ L of reagent were added. Water as blank (50  $\mu$ L) and calibrator

(50  $\mu$ L) were added into additional wells of a clear bottom 96 well plate. The diluted calibrator is equivalent to 100 mg/dL Hb. The plate was incubated during 5 min at room temperature and the absorbance was measured at 400 nm. Concentration of Hb was calculated as follow:

$$\text{Concentration of Hb} = \frac{(\text{A}_{400} \text{ sample}) - (\text{A}_{400} \text{ blank}) \times 100 \text{ mg/dL} \times \text{sample dilution}}{(\text{A}_{400} \text{ calibrator}) - (\text{A}_{400} \text{ blank})}$$

## 2.5 Treatment of erythrocytes

The doses of malathion that were used in this study were selected based on the work of Durak *et al.* (2009), who previously showed that 25, 75, and 200  $\mu\text{M}$  malathion induce oxidative stress in erythrocytes. Erythrocytes were divided into non-treated control and experimental groups. The control group was incubated during 1 h at 37 °C in phosphate buffered saline. Erythrocytes in the experimental groups were treated with 25, 75, or 200  $\mu\text{M}$  malathion. After incubation, the cell mixtures were stored at -20 °C during 24 h. The mixtures were thawed; the erythrocytes were destroyed by osmotic pressure, and then subjected to centrifugation (10,000 x g, 15 min, 4 °C). Supernatants were isolated and SOD and GPx activities were determined.

## 2.6 SOD activity

SOD activity was determined using commercial kit: SOD determination kit from Sigma-Aldrich. 20  $\mu\text{L}$  of sample solution were added to each sample and blank 2 wells, and 20  $\mu\text{L}$  of double distilled water were added to each blank 1 and blank 3 wells. Subsequently, 200  $\mu\text{L}$  of WST-1 ((2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2Htetrazolium) monosodium salt) working solution were added to each well, and mixed. 20  $\mu\text{L}$  of dilution buffer were added to each blank 2 and blank 3 wells and finally, 20  $\mu\text{L}$  of enzyme working solution (xanthine oxidase) were added to each sample and blank 1 wells, and then mixed thoroughly. The plate was incubated at 37 °C during 20 min and the absorbance was readed at 450 nm. SOD activity (inhibition rate %) was calculated using the following equation:

$$\text{SOD activity (inhibition rate \%)} = \left\{ \frac{[(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3}) - (\text{Asample} - \text{Ablank 2})]}{(\text{Ablank 1} - \text{Ablank 3})} \right\} \times 100$$

## 2.7 GPx activity

For determination of GPx activity in the hemolysate, Cayman's Chemical GPx activity assay kit was used. 20  $\mu$ L of sample was added to a 96 well plate. 100  $\mu$ L of assay buffer and 50  $\mu$ L of co-substrate mixture were added to the plate. The co-substrate mixture contained reconstituted in water, the lyophilized powder of NADPH, glutathione, and glutathione reductase. Three background wells were also designated which contained 100  $\mu$ L of assay buffer and 50  $\mu$ L of co-substrate mixture. Three positive control wells were also designated which contained 100  $\mu$ L of assay buffer, 50  $\mu$ L of co-substrate mixture, and 20  $\mu$ L of diluted GPx (control). The reactions were initiated by adding 20  $\mu$ L of cumene hydroperoxide to the plate. The plate was shaken during 5 s to ensure mixing. The absorbance was measured at 340 nm once every min during 6 min. The activity of GPx in the samples was then determined by first obtaining the change in absorbance of the samples over the 6 min period. The same was done with the background wells and the positive control wells. GPx activity was then calculated by dividing the change in absorbance at 340 nm, calculated for each sample, by the NADPH extinction coefficient of 0.00373  $\mu$ M<sup>-1</sup> as follows:

$$\text{GPx activity} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min})}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19 \text{ mL}}{0.02 \text{ mL}} \times \text{sample dilution} = \text{nmol/min/mL}$$

## 2.8 Statistical analysis

To verified if the data follows a normal distribution, Shapiro-Wilk normality tests were performed. Statistical comparisons were carried out using a one way analysis of variance (ANOVA) followed by multiple ranges tests (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). To assess the response of SOD to malathion in the set of individuals, data were adjusted to a generalized linear model; previously, angular transformation (arcsine) was performed for values expressed as percentages to adjust it to a normal distribution. All analyzes were performed with Statgraphics Centurion XV software.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Hb determination

Hb concentration in packed red blood cells of each individual was determined spectrophotometrically based on the improved Triton®/NaOH method, in which Hb is converted to a colorimetric product measured at 400 nm. Results are shown in Table C4.1. Hb values for individuals ranged from 18.98 to 25.43 g/dL and statistical analysis showed significant differences in Hb concentration between individuals ( $p \leq 0.05$ ). Hb data were correlated with the response of each individual to malathion and the results are discussed below.

**Table C4.1.** Hemoglobin concentration in packed red blood cells of individuals of the involved in this study<sup>1</sup>.

<b>Individual</b>	<b>Hb concentration in packed red blood cells (g/dL)</b>	<b>Oxidative stress induced by malathion</b>
1	22.16 ± 0.69 <sup>bc</sup>	+
2	18.98 ± 0.05 <sup>a</sup>	+
3	23.84 ± 0.63 <sup>cde</sup>	-
4	22.73 ± 1.03 <sup>bc</sup>	-
5	24.67 ± 0.63 <sup>de</sup>	-
6	25.43 ± 0.18 <sup>e</sup>	-
7	23.38 ± 0.03 <sup>cd</sup>	-
8	21.63 ± 0.79 <sup>b</sup>	-

<sup>1</sup>Values are the mean of three replicates. Different letters within a column mean statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ).



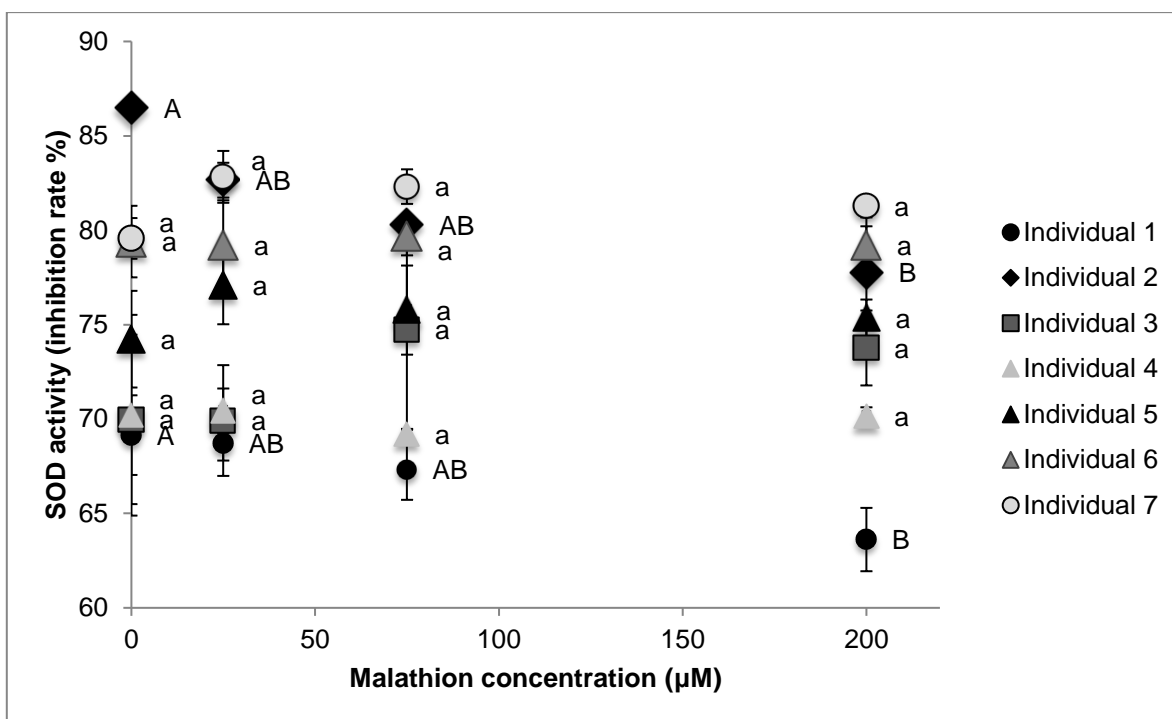
## 3.2 Antioxidant enzyme assays

### 3.2.1 Measurement of SOD activity

The capacity of the organophosphorus pesticide malathion to induce oxidative stress in human erythrocytes was assessed. The effect of malathion on SOD activity was evaluated by utilizing Dojindo's highly water-soluble tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye upon reduction with a superoxide anion. The rate of the reduction with  $O_2$  is linearly related to the xanthine oxidase activity, and is inhibited by SOD. Different concentrations of malathion (25, 75 and 200  $\mu\text{M}$ ) were evaluated and compared with a control group of erythrocytes in the absence of malathion. Figure C4.1 shows the effect of different doses of malathion in SOD activity of seven individuals who were selected based on inclusion criteria previously mentioned.

ANOVA by individuals were performed and the results showed that in individuals one and two there were not significant differences ( $p > 0.05$ ) in SOD activity between cells that were treated with 25 and 75  $\mu\text{M}$  malathion compared to non-treated cells, however, 200  $\mu\text{M}$  malathion significantly decreased the enzyme activity ( $p \leq 0.05$ ). Nevertheless, malathion showed no significant effect on SOD activity in the other the subjects evaluated. No strong correlation between Hb concentration in red blood cells of individuals and SOD activity was found ( $r = -0.4047$ ).

Wide interindividual variations may exist regarding antioxidative capacity, affecting individual susceptibility against deleterious oxidative reactions, thus suggesting that the enzyme activity in a blood sample may reflect differences in the antioxidative defense. Besides, it has been shown that antioxidant enzymes activity is influenced by life-style, age and environmental factors, among others (Andersen et al., 1997).



**Figure C4.1.** SOD activity (inhibition rate %) in control (without malathion) and experimental groups (25, 75 and 200 µM malathion) in erythrocytes of seven individuals. Values are the mean of two replicates. Different letters in intraindividual series mean significant differences ( $p \leq 0.05$ ). Capital letters were assigned to those individuals who have significant differences between experimental groups.

To assess the response of SOD to different doses of malathion in the set of selected individuals, data were adjusted to a generalized linear model due to variations in the response of SOD among subjects observed. The data indicated that the adjusted model explained 83.83% of the variability in SOD and no statistically significant differences in SOD activity for the experimental groups were found, therefore, in our study, malathion at concentrations tested did not show an inductive effect of oxidative stress related to SOD activity in human erythrocytes of inhabitants from the northern region of Sinaloa state.

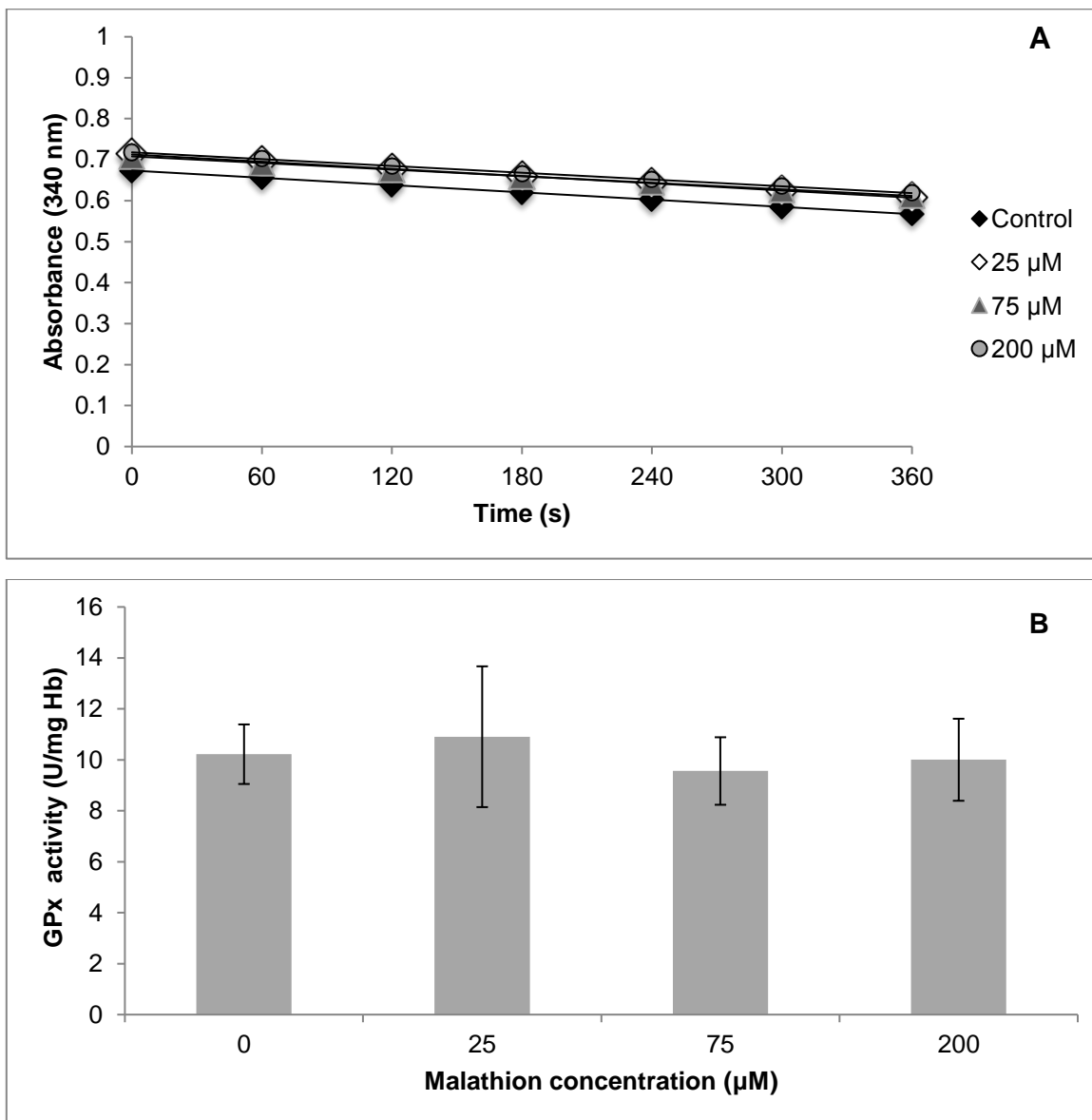
### 3.2.2 Measurement of GPx activity

To confirm the findings obtained previously in SOD activity, GPx enzyme activity in different experimental groups was evaluated. This assay measures GPx activity indirectly by a coupled reaction with glutathione reductase. Oxidized glutathione, produced upon reduction of hydroperoxide by GPx, is recycled to its reduced state by glutathione reductase and NADPH. The oxidation of NADPH to NADP<sup>+</sup> is accompanied by a decrease in absorbance at 340 nm. Figure C4.2 A) shows NADPH oxidation kinetics into the control group at different concentrations of malathion, and Figure C4.2 B) shows the GPx antioxidant activity expressed as U per mg Hb. No significant differences in GPx activity were found between control and different concentrations of malathion ( $p > 0.05$ ). These results are consistent with our data described above for the SOD enzyme, and it is possible to affirm that, malathion 25-200  $\mu\text{M}$  does not cause alterations in the main antioxidant enzymes in red blood cells.

Malathion is a commonly used organophosphorus insecticide reported to be inducer of oxidative stress both *in vivo* and *in vitro*, but the reports are conflicting. Yarsan *et al.* (1999) reported that technical grade malathion (95%) reduced the activity of SOD and GPx in erythrocytes of mice that were given malathion orally for periods from 15 to 120 days. In contrast, Bhatti *et al.* (2013) investigated the effect on SOD and GPx activities in erythrocytes of male Wistar rats orally administered with an acute dose of malathion (analytical grade, purity not available), reporting a significant increase in the activity of both enzymes compared to the untreated control group. According to Brocardo *et al.* (2005), the differences found may be due, malathion exposure to the regime employed, the tissue distribution, among other factors.

Oxidative stress has been reported as a possible mechanism of malathion toxicity in humans. Moore *et al.* (2010) examined the role of oxidative stress as a possible mechanism of malathion-induced cytotoxicity and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells, by assessing lipid peroxidation, among other tests; their results showed a significant increase in MDA levels in cells exposed to malathion following 48 h. Although purity of

malathion was high (98.2%), minimum concentration used in their study was 30 times higher than maximum concentration of our study and the exposure time was much longer.



**Figure C4.2.** GPx antioxidant activity. C4 A) shows the NADPH oxidation kinetics in the control and different concentrations of malathion (25, 75 and 200  $\mu\text{M}$  malathion) and Figure C4.2 B) shows the GPx antioxidant activity. Values are the mean of three replicates. Bars represent standard deviation.

Besides, Durak *et al.* (2009) reported a significant decrease in SOD activity in human erythrocytes subjected to concentrations of 25, 75 and 200  $\mu\text{M}$  of malathion during

1 hour, in a study conducted in Turkey. Moreover, authors reported a significant decrease, of approximately 40%, of GPx activity at 200  $\mu\text{M}$  of malathion. These results are contrasting with our findings. However, they used a commercial preparation of malathion, which contains 95% malathion and residues of malaoxon and isomalathion. Malaoxon, is the first and main degradation products of malathion which is formed by the oxidation of malathion and isomalathion results from the thermal or photo-chemical isomerization of malathion (Błasiak *et al.*, 1999).

In our study, the purity of malathion used was 98.7% and our results clearly indicated that even the highest the concentrations of malathion used (200  $\mu\text{M}$ ), showed no significant effect on the activity of antioxidant enzymes tested. Taking into account the above-cited results, we can consider that oxidative effects observed for malathion may, at least in part, arise from impurities, including malaoxon and isomalathion, in the technical or commercial grade mixtures.

According to Błasiak and Stankowska (2001) malathion was demonstrated to have genotoxic properties in studies with humans *in vivo*, but, the great majority of this research was performed with technical-grade malathion or the insecticide without determination of purity. In order to elucidate the genotoxic potency of the main compounds present in commercial preparations of malathion Błasiak *et al.* (1999) investigated the DNA-damaging effect of this insecticide, malaoxon and isomalathion, all at purity of at least 99.8% by use of comet assay. Human lymphocytes were incubated with 25, 75 and 200  $\mu\text{M}$  of the chemicals for 1 h at 37 °C. Malathion did not cause any significant changes in the comet length of the lymphocytes, throughout the range of concentrations tested. Malaoxon and isomalathion introduced damage to DNA in a dose-dependent manner. The effect induced by malaoxon was more pronounced than that caused by isomalathion. The reported genotoxicity of malathion might, therefore, be a consequence of its metabolic biotransformation to malaoxon or the presence of malaoxon and isomalathion as well as other unspecified impurities in commercial formulations of malathion.

On the other hand, there are few studies focused on evaluating changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. In Spain, Lopez (2005) found that people occupationally exposed to pesticides had significantly lower levels of SOD compared to unexposed controls and that years of exposure to pesticides predict significantly lower SOD activity, indicating that continued exposure to pesticides could have a cumulative effect on SOD, gradually decreasing their activity. In addition, it was reported that individuals exposed to organophosphorus pesticides have significantly lower levels of GPx. However, other studies have reported the opposite effect, that is, an increase of SOD and GPx in the individuals with more than 5 years of direct exposure to pesticides (Prakasam et al., 2001).

Meanwhile, Wu *et al.* (2001) investigated the effect of arsenic long-term indirect exposure, on antioxidant capacity in plasma of apparently healthy population, and their results suggest that indirect exposure to the environmental toxicant may cause deleterious effects by decreasing the level of antioxidant capacity in plasma of individuals. In this regard, the results obtained in this study may provide information of a change in the oxidative response of the inhabitants of the northern of Sinaloa state compared with others regions, taking into consideration that it is a region with intensive use of wide range of pesticides, and the populations is exposed to residues in air, soil, water and food, but *in vivo* studies are needed.

#### 4. CONCLUSIONS

The results of our study clearly showed that high purity malathion had no effect in the activity of antioxidant enzymes evaluated related to oxidative stress, at the concentrations tested. We consider necessary the evaluation of oxidative stress inducing by individuals degradation products of malathion. Although, the population is exposed to commercial grade malathion, in Mexico we can find variety of available commercial formulations, which vary widely in composition. In addition, the degradation products of malathion are generated depending handling and storage conditions, so it is important, when working with malathion commercial grade, at laboratory level, to determine the reagent composition studied and correlating the concentration of the different components with the effects found, and thus, not assign specific effects to the main component of a mixture without considering all its components. Besides, further analysis are needed to correlate the oxidative response of inhabitants of northern of Sinaloa state with the presence of pesticides in blood, and *in vivo* studies are needed.

## 5. REFERENCES

- Abdallah FB, Gargouri B, Bejaoui H, Lassoued S and Ammar-Keskes L. 2011. Dimethoate-induced oxidative stress in human erythrocytes and the protective effect of vitamins C and E in vitro. *Environment Toxicology*. 3: 287-91.
- Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F and Grandjean P. 1997. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem*. 43 (4): 562-568.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST and Chakraborty AK. 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol. Lett*. 107: 33-47.
- Bhatti GK, Sidhu IP and Bhatti JS. 2013. Protective Effect of Melatonin Against Malathion Induced Alterations in Antioxidant Defense System and Morphology of Erythrocytes in Wistar Rats. *J. Basic Appl. Sci*. 9: 438-446.
- Blasiak J and Stankowska D. 2001. Genotoxicity of malaoxon: Induction of oxidized and methylated bases and protective effect of  $\alpha$ -Tocopherol. *Pestic Biochem Phys* 71:88-96.
- Blasiak J, Jaloszynki P, Trzeciak A, Szyfter K. 1999. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutat Res*. 445:275-283.
- Brocardo PS, Pandolfo P, Takahashi RN, Rodrigues AL, Dafre AL. 2005. Antioxidant defences and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicol*. 207:283-291.
- Durak D, Uzun FG, Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M and Kalender Y. 2009. Malathion-Induced Oxidative Stress in Human Erythrocytes and the Protective Effect of Vitamins C and E in vitro. *Environmental Toxicology* 24(3): 235-42.
- Efe H, Kirci D, Deger O, Yildirmis S, Uvdu HA and Orem C. 2004. Erythrocyte antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in patients with types IIb and IV hyperlipoproteinemias. *Tohoku J Exp Med*. 202(3): 163-172.
- Fakhri-Bafghi MS, Ghasemi-Niri SF, Mostafalou S, Navaei-Nigjeh M, Baeri M., Mohammadirad A and Abdollahi M. 2016. Protective Effect of Selenium-Based



- Medicines on Toxicity of Three Common Organophosphorus Compounds in Human Erythrocytes In Vitro. *Cell Journal (Yakhteh)* 17(4): 740–747.
- García-García C, Parrón T, Requena M, Alarcón R, Tsatsakis A, Hernández A. 2016. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level, *Life Sciences*. 145: 15 274-283.
- García-Gutiérrez C and Rodríguez-Meza GD. 2012. Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable* 8 (3): 1-10.
- Gómez-Arroyo S, Martínez-Valenzuela C, Calvo-González S, Villalobos-Pietrini R, Waliszewski S, Calderón-Segura ME, Martínez-Arroyo A, Félix-Gastélum R And Lagarda-Escarrega A. 2012. Assessing the genotoxic risk for mexican children who are in residential proximity to agricultural areas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29 (3) 217-225.
- Gupta A, Gupta A and Shukla GS. 1998. Effects of neonatal quinalphos exposure and subsequent withdrawal on free radical generation and antioxidative defenses in developing rat brain. *J. Appl. Toxicol.* 18: 71-77.
- Kalender S, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Açikgoz F, Durak D, Ulusoy Y, Kalender Y. 2005. Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*. 211: 197-206.
- Kwong TC. 2002. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther. Drug Monit.* 24: 144-149.
- López GO. 2005. Influencia de la exposición crónica a plaguicidas sobre diversos marcadores bioquímicos (esterasas y enzimas antioxidantes ) en trabajadores de invernadero de la costa oriental de Andalucía. PhD Theshis. Granada, Spain.
- Lu C, Barr DB, Pearson MA and Waller L.A. 2008. Dietary intake and its contribution to longitudinal organophosphorus pesticide exposure in urban/suburban children. *Environ. Health Perspect.* 116 (4): 537-542.
- Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S, Calderón-Segura ME, Villalobos-Pietrini, R, Waliszewski S, Félix-Gástelum R. and Álvarez-Torres, A. 2009. Genotoxic biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in the north of Sinaloa State, Mexico. *Environment International* 35: 1155-1159.

- Moore PD, Yedjou CG and Tchounwou PB. 2010. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environmental toxicology* 25(3):221-6.
- Ogut S, Kucukoner E, Gultekin F and Gurbuz N. 2015. A study of long-term pesticide application amongst agricultural workers: total antioxidant status, total oxidant status and acetylcholinesterase activity in blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85(1):155-159.
- Prakasam A, Sethupathy S and Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta* 2001; 310: 107-112.
- Rezg R, Mornagui B, El-Fazaa S and Gharbi N. 2010. Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 21 (7): 345-357.
- Rizzati V, Briand O, Guillou H, Gamet-Payraastre L., 2016 Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature, *Chem. Biol. Interact.* 254: 231-246.
- SIAP (Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2018. Atlas Agroalimentario 2018. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018). Reviewed: 14 Septiembre 2018.
- Soltaninejad K and Abdollahi M. 2009. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Medical Science Monitor* 15(3):RA75-90.
- Wu MM, Chiou HY, Wang TW, Hsueh YM, Wang IH, Chen CJ and Lee TC. 2001. Association of blood arsenic levels with increased reactive oxidants and decreased antioxidant capacity in a human population of northeastern Taiwan. *Environ Health Perspect.* 109(10): 1011-1017.
- Yarsan E, Tanyuksel M, Celik S and Aydin A. 1999. Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bull Environ Contam Toxicol.* 63(5): 575-81.

# **CAPÍTULO 5:**

## **DISCUSIÓN INTEGRADORA DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES GENERALES**

## ÍNDICE DE CONTENIDO DEL CAPÍTULO 5

	<b>Pág.</b>
5.1 DISCUSIÓN INTEGRADORA DE RESULTADOS	120
5.2 CONCLUSIONES GENERALES	125
5.3 REFERENCIAS	126

## 5.1 DISCUSIÓN INTEGRADORA DE RESULTADOS

En este estudio, se aislaron, identificaron y cuantificaron los compuestos fenólicos libres, conjugados (ácidohidrolizables y alcalinohidrolizables) y ligados de tomate saladette, tomate grape y de un subproducto industrial del procesamiento de tomate para la producción de pasta, producido en la planta La Costeña, en la Ciudad de Guasave, Sinaloa (Capítulo 2). El tomate saladette es uno de los más consumidos en la región y a nivel nacional, además de ser una de las variedades más utilizadas para la producción de pasta de tomate. Por su parte, el tomate grape ha mostrado importante actividad biológica (Valdez-Morales *et al.*, 2014), por lo que fue elegido como punto de referencia o comparación. El objetivo fue realizar una caracterización detallada del contenido de compuestos fenólicos y la bioactividad de dichos materiales, para generar opciones que permitan un máximo aprovechamiento de los subproductos, debido a que en la literatura se carecía de dicha información.

Las muestras que mostraron los rendimientos superiores de extracción fueron los compuestos fenólicos libres de tomate saladette y grape y los compuestos alcalino hidrolizables del subproducto, mientras que menores rendimientos de extracción se observaron en las fracciones de compuestos ácido hidrolizables de todas las muestras. Sin embargo, al analizar el contenido de compuestos fenólicos totales de las diferentes fracciones, se observó que los compuestos libres contenían menores concentraciones de fenólicos totales. Lo anterior significa que, aunque se obtienen elevadas cantidades de extracto seco durante la primera extracción del proceso, este extracto no arrastra la mayoría de los compuestos fenólicos de tomate, y es necesario realizar los distintos procesos de hidrólisis para desprender más eficientemente estos metabolitos secundarios de la matriz en la que están contenidos. En ese sentido, se considera que otros compuestos hidrosolubles, como algunos azúcares pudieron haber sido arrastrados en el extracto, aumentando el rendimiento de extracto seco.

Adicionalmente, se observó que en el subproducto industrial la mayoría de los compuestos fenólicos (~67%) se encuentran en forma ligada, obteniéndose altos rendimientos de fenoles totales en dicha fracción. Estos resultados indicaron que, la mayor parte de los compuestos fenólicos en dicha muestra no pueden ser recuperados mediante una extracción simple y se requieren procesos adicionales de hidrólisis alcalina, para liberarlos de la matriz en la que están contenidos. Esto puede deberse, principalmente, a que el subproducto proviene de un proceso en el cual, la mayor parte de la pulpa es removida, quedando básicamente piel y semilla en el residuo y cabe destacar que los compuestos fenólicos se encuentran principalmente unidos a componentes estructurales abundantes en las paredes de la piel como celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y proteínas estructurales (Wong, 2006). Es importante mencionar que los compuestos fenólicos ligados pueden ser liberados y absorbidos en el organismo durante el proceso de digestión (Acosta-Estrada *et al.*, 2014) y que previamente se ha observado que estos compuestos han mostrado buena aportación a la actividad antioxidante, incluso superior a las fracciones de fenólicos libres y esterificados (Liyana-Pathirana y Shahidi 2006).

Las fracciones ácido hidrolizables, resultaron ser ricas en compuestos fenólicos, aunque los rendimientos fueron bajos. No obstante, es de suma importancia tomar en consideración esta fracción debido a que dentro de las alternativas de utilización de subproductos se encuentra la recuperación de polvos o extractos que podrían ser incorporados directamente en alimentos (Nour *et al.*, 2015). Recientemente, algunos estudios han incorporado pequeñas cantidades de extractos de subproductos de tomate como ingredientes en la formulación de alimentos ricos en compuestos antioxidantes (Nour *et al.*, 2015; Pinela *et al.*, 2017; Mehta *et al.*, 2018), o bien extractos que contribuyen a mejorar la estabilidad oxidativa de alimentos (Abid *et al.*, 2017). Además, se han desarrollado productos de panificación suplementados con residuos de tomate, consiguiendo mejorar sus propiedades nutrimentales y actividad antioxidante (Mehta *et al.*, 2018). Estos ejemplos, constituyen buenas alternativas para el aprovechamiento de los extractos de compuestos fenólicos del subproducto de tomate.

La evaluación del perfil compuestos fenólicos de tomate y subproducto mediante HPLC-DAD permitió identificar diez compuestos individuales en las diferentes fracciones (cinco ácidos fenólicos y cinco flavonoides) y el análisis de los patrones de distribución de estos compuestos como libres, conjugados e insolubles ligados mostró que en tomate grape, los ácidos fenólicos predominan en su forma conjugada y se liberaron mediante hidrólisis ácida, mientras que en tomate saladette y subproducto, los ácidos fenólicos predominan en su forma alcalino hidrolizable. Resultó muy interesante observar que las concentraciones más alta de flavonoides en las muestras de tomate y subproducto fueron detectadas en su forma insoluble ligada. Este resultado realza la importancia de extraer la fracción de compuestos insolubles ligados durante la caracterización de compuestos fenólicos en diferentes muestras.

En relación a la capacidad antioxidante mediante el método DPPH, los extractos ácido hidrolizables mostraron la mayor actividad en las muestras de tomate completo, mientras que, en el subproducto, los extractos ácido hidrolizables y ligados presentaron mejor actividad antioxidante. Resultados similares se obtuvieron mediante el método de ORAC. Previamente, se reportaron buenas contribuciones de los compuestos fenólicos ligados a la actividad antioxidante, incluso superiores a las fracciones de compuestos fenólicos libres y esterificados (Liyana-Pathirana y Shahidi 2006). Adicionalmente, Valdez-Morales *et al.* (2014) reportaron valores inferiores de actividad antioxidante en piel y semilla de un subproducto industrial por ambos métodos (DPPH y ORAC) que los encontrados en este estudio. Estos resultados pueden deberse a que el método de fraccionamiento empleado en este estudio es efectivo en la liberación y extracción de compuestos antioxidantes.

Por otra parte, se evaluó la actividad antiproliferativa de los extractos de compuestos fenólicos libres, conjugados y ligados de tomate saladette y subproducto industrial, y los extractos de compuestos fenólicos conjugados de tomate grape, empleando la línea celular de cáncer de mama MCF-7. De acuerdo con los resultados obtenidos en este último estudio, no fue posible establecer una relación directa entre la actividad antioxidante de los extractos (Capítulo 2) y la actividad antiproliferativa (Capítulo 3). Sin embargo, al

analizar el contenido de compuestos fenólicos individuales de las muestras evaluadas en la línea celular antes mencionada, se observó que la fracción de fenólicos ácido hidrolizables, que mostró actividad antiproliferativa muy fuerte, destacó por su contenido de ácidos fenólicos ( $\rho$ -cumárico, caféico, ferúlico y gálico) y en su perfil se observó que contenía los flavonoides catequina y quercetina. Por su parte, la fracción de compuestos fenólicos alcalino hidrolizables de saladette, otra de las fracciones con fuerte actividad antiproliferativa, mostró un contenido de ácido caféico que duplicó la concentración de la fracción ácido hidrolizable del subproducto, pero posee una concentración significativamente menor de ácido  $\rho$ -cumárico. Dentro de su contenido de flavonoides destaca la catequina como mayoritaria. Fue posible observar que las muestras con actividad antiproliferativa débil o nula fueron aquellas con las menores concentraciones de flavonoides totales y ambas carecen del flavonoide catequina.

Estudios previos han mostrado que compuestos fenólicos puros como quercetina, poseen la capacidad de inhibir la proliferación celular de la línea MCF-7 (Han *et al.*, 2001). Además, se sabe que quercetina ha mostrado efectos antiproliferativos en diferentes líneas celulares de cáncer (cáncer de pulmón, cáncer oral, leucemia, entre otros) mientras que catequina ha mostrado efectos en la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata y de tiroides (Raffa *et al.*, 2017), por lo que podría considerarse que los flavonoides presentes en los extractos evaluados en este estudio influyeron de manera importante en la actividad antiproliferativa. Dentro de las perspectivas, resultaría interesante realizar un análisis más amplio de flavonoides y ácidos fenólicos y determinar si existe correlación con la actividad antiproliferativa de las fracciones de compuestos fenólicos.

Así mismo, es importante resaltar que las diferentes fracciones de compuestos fenólicos del subproducto industrial analizadas en este estudio, mostraron buena o muy buena actividad antiproliferativa, así como buena actividad antioxidante y son buena fuente de compuestos fenólicos, por lo que podrían considerarse como una excelente fuente de compuestos bioactivos, con potencial para su aplicación en la formulación de nutracéuticos u otras aplicaciones, dando de esta manera valor agregado al proceso de producción de pasta de tomate.



Finalmente, en este estudio se buscó establecer un modelo celular para la evaluación del efecto protector de compuestos fenólicos frente al estrés oxidativo inducido por plaguicidas en eritrocitos humanos *in vitro* (Capítulo 4), con la finalidad de contar con un procedimiento con relevancia biológica y relativamente sencillo que permitiera determinar la capacidad antioxidante de fitoquímicos de interés. Se evaluó la capacidad de inducción de estrés oxidativo de uno de los plaguicidas más ampliamente utilizados en el estado de Sinaloa, malatión, en glóbulos rojos aislados de donadores voluntarios; sin embargo, y en contraste con lo previamente reportado en la literatura, malatión a las concentraciones probadas no alteró los indicadores de estrés oxidativo evaluados (enzimas antioxidantes). Por tal razón, no fue posible evaluar la capacidad de disminución de estrés oxidativos de los diferentes extractos de compuestos fenólicos estudiados, por lo que se sugiere realizar estudios adicionales en los que se prueben diferentes agentes inductores de estrés oxidativo como productos de degradación del malatión u otros compuestos utilizando como modelo eritrocitos, ya que éste modelo se considera ampliamente aceptado para el estudio de sustancias protectores frente al estrés oxidativo.

## 5.2 CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, es posible concluir que las variedades de tomate saladette y grape y el subproducto industrial de tomate son fuentes ricas en compuestos fenólicos con una alta actividad antioxidante y efecto anti-proliferativo en líneas celulares de cáncer de mama. Además, los compuestos fenólicos del subproducto industrial se encuentran principalmente unidos a componentes estructurales de las paredes celulares. Teniendo en cuenta esta información, es importante considerar que es necesario implementar metodologías de fraccionamiento e hidrólisis para la extracción de compuestos fenólicos, obteniendo extractos que arrastren la mayor cantidad posible de compuestos bioactivos. De esta manera, se podría aprovechar al máximo el potencial del subproducto como fuente de compuestos bioactivos. La valorización del subproducto industrial de tomate, mediante el empleo de sus diferentes fracciones de compuestos fenólicos antioxidantes en la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica, podría generar ingresos adicionales para la industria procesadora de tomate y reducir el problema de eliminación de desechos.

Adicionalmente, es necesario realizar análisis de bioactividad empleando distintas líneas o modelos celulares, así como estudios de estabilidad de los extractos. Uno de los modelos recomendados en este estudio, es el empleo de eritrocitos humanos *in vitro* y evaluación de la capacidad de los extractos de compuestos fenólicos de disminuir o contrarrestar los efectos inductores de estrés oxidativo de compuestos xenobióticos en dichas células, midiendo los principales indicadores de estrés oxidativo (enzimas antioxidantes y peroxidación lipídica). Se considera que este es un modelo con relevancia biológica, ampliamente aceptado por la comunidad científica y que puede generar resultados confiables y reproducibles. No obstante, en el presente trabajo no fue posible evaluar el efecto protector de los compuestos fenólicos de tomate frente al estrés oxidativo inducido por plaguicidas empleando como modelo eritrocitos, debido a la falta de respuesta de las enzimas antioxidantes al agente inductor utilizado, por lo que dentro de las perspectivas del proyecto descata la evaluación de otros agentes inductores de estrés oxidativo en el mismo modelo.

### 5.3 REFERENCIAS

- Abid Y, Azabou S, Jridi M, Khemakhem I, Bouaziz, M, Attia H. 2017. Storage stability of traditional Tunisian butter enriched with antioxidant extract from tomato processing by-products. *Food Chemistry* 15:476-482.
- Acosta-Estrada BA, Gutiérrez-Uribe JA, Serna-Saldívar SO. 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*. 152: 46-55.
- Han D, Tachibana H, Yamada K. 2001. Inhibition of environmental estrogen-induced proliferation of human breast carcinoma MCF-7 cells by flavonoids. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 37:275-282.
- Liyana-Pathirana CM y Shahidi F. 2006. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(4): 1256-1264.
- Mehta D, Prasad P, Sangwan RS, Yadav SK. 2018. Tomato processing byproduct valorization in bread and muffin: improvement in physicochemical properties and shelf life stability. *Journal of Food Science and Technology*. 55 (7): 2560-2568.
- Nour V, Ionica ME, Trandafir I. 2015. Bread enriched in lycopene and other bioactive compounds by addition of dry tomato waste. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 8260-8267.
- Perea-Domínguez XP, Hernández-Gastelum LZ, Olivas-Olguin HR, Espinosa-Alonso LG, Valdez-Morales M, Medina-Godoy S. 2018. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*. 55(9): 3453-3461.
- Pinela, J, Prieto, MA, Barreiro, MA, Carvalho, AM, Oliveira, MB, Curran, TP, Ferreira, IC. 2017. Valorisation of tomato wastes for development of nutrient-rich antioxidant ingredients: A sustainable approach towards the needs of the today's society. *IFSET* 41: 160-171.
- Raffa D, Maggio B, Raimondi MV, Plescia F, Daidone G. 2017. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 142: 213-228.

- Valdez-Morales M, Espinosa-Alonso LG, Espinoza-Torres LC, Delgado-Vargas F, Medina-Godoy S. 2014. Phenolic content and antioxidant and antimutagenic activities in tomato peel, seeds, and byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 5281-5289.
- Wong DWS. 2006. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 133: 87-112.

## ANEXOS

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron presentados en los siguientes foros internacionales:

- ***“7<sup>th</sup> Euro-Global Summit on Toxicology and Applied Pharmacology”***. Roma, Italia (2016). En este foro, el trabajo titulado ***“In vitro study of the effect of the organophosphorus pesticide malathion in antioxidant enzymes activity in human erythrocytes from inhabitants of Northern of Sinaloa state, in Mexico”*** se hizo acreedor a la distinción ***“Best Poster Presentation Award”*** otorgada por el comité organizador del congreso a la autora de la presente tesis.
- ***“European Food Chemistry & Eating Disorder Congress”***. Ámsterdam, Holanda (2018). En este foro, el trabajo titulado ***“Phenolic composition of two tomato varieties and an industrial tomato byproduct: free, conjugates and bound phenolics and antioxidant activity”*** se hizo acreedor a la distinción ***“Best Poster Presentation Award”*** otorgada por el comité organizador del congreso a la autora de la presente tesis.