



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

PRODUCCIÓN DE LICOPENO EN DIFERENTES ESTADIOS DE
MADURACIÓN DE TOMATES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS
(*Solanum lycopersicum* TA234)

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.B.Q. IRVING CELESTINO ROMERO LASCURAIN

Directores:

M.C. Javier de la Cruz Medina.

Dra. Elizabeth León García

Revisores:

Dr. Oscar González Ríos.

Dr. Gerardo Valerio Alfaro.

H. VERACRUZ, VER.

Enero, 2021



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

H. Veracruz, Ver., **16/diciembre/2020**
OFICIO No. ITV/DEPI/551/2020

Asunto: Autorización de impresión

**C. IRVING CELESTINO ROMERO LASCURAIN
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

"Producción de licopeno en diferentes estadios de maduración de tomate genéticamente modificado (*Solanum lycopersicum ta234*)"

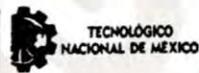
Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
Antorcha y Luz de Fuego Permanente

**BENIGNO ORTIZ MUÑOZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST**

**JAVIER DE LA CRUZ MEDINA
PRESIDENTE**



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**GERARDO VALERIO ALFARO
SECRETARIO**

**OSCAR GONZÁLEZ RÍOS
VOCAL**

**ELIZABETH LEÓN GARCÍA
SUPLENTE**





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

El presente trabajo de tesis titulado **"Producción de licopeno en diferentes estadios de maduración de tomate genéticamente modificado (*Solanum lycopersicum ta234*)"** presentado por el (la) C. Irving Celestino Romero Lascurain, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTOR

JAVIER DE LA CRUZ MEDINA

CO-DIRECTORA

ELIZABETH LEÓN GARCÍA

REVISOR

GERARDO VALERIO ALFARO

REVISOR

OSCAR GONZÁLEZ RÍOS



DEDICATORIA

**Está dedicada a mis padres Sonia
Lascurain y Héctor Romero**

RECONOCIMIENTOS

A mis padres M. Sonia Lascurain Monge, Héctor Romero Muñiz y mi hermano Héctor Miguel Romero Lascurain por su comprensión, animo, alegría y por su apoyo incondicional que hicieron la culminación de esta etapa importante en mi vida.

De igual manera a mis compañeros de generación y en especial a Sara Ivette Montero Salazar por su amistad, su apoyo académico y emocional en tiempos difíciles.

A la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA) por darme la oportunidad de estudiar y obtener un crecimiento profesional. Al CONACyt por brindarme el apoyo económico necesario para concluir mis estudios.

A mis asesores el M. en C. Javier de la Cruz Medina, la Dra. Elizabeth Leon García y el Dr. Hugo Sergio García Galindo, por la orientación, el seguimiento y apoyo recibido a lo largo del proyecto.

También quiero agradecer a mi familia en general a mis abuelitas, tíos, tías, primos y primas por su apoyo emocional

Por ultimo agradezco el apoyo de mis compañeros del laboratorio Post-cosecha

RESUMEN

Romero Lascurain, Irving Celestino, M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico Nacional de México campus Veracruz. Diciembre, 2020. **PRODUCCIÓN DE LICOPENO EN DIFERENTES ESTADIOS DE MADURACIÓN DE TOMATES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (*Solanum lycopersicum* TA234)**. Asesores: M.C. Javier de la Cruz Medina y Dra. Elizabeth León García

El licopeno es un carotenoide responsable de la coloración roja en los tomates; posee propiedades antioxidantes, por lo que su consumo previene diversos tipos de cáncer. Cabe señalar que más del 80% del licopeno en la dieta humana proceden del tomate el cual es considerado un fruto climatérico. En frutos de tomate genéticamente modificado con el gen de *TomloxB*, se han estudiado previamente en el laboratorio postcosecha, la interacción de LOX (lipoxigenasa) con etileno, encontrando una relación positiva de regulación de la enzima sobre la síntesis de etileno, y debido a que esta hormona regula la biosíntesis de compuestos bioactivos como el licopeno, es de interés estudiar el efecto del silenciamiento de LOX (lipoxigenasa) sobre la síntesis de licopeno a lo largo de su vida postcosecha. En el presente trabajo se cuantificó la concentración de licopeno en el tomate genéticamente modificado, esto permitió esclarecer la interacción con el gen silenciado. El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto del silenciamiento del gen *TomloxB* sobre la producción de licopeno en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* TA234). Como objetivos específicos (1) Determinar la actividad de LOX en sus diferentes estadios de maduración. (2) Evaluar la producción de licopeno en tomate genéticamente modificado durante su vida postcosecha en epicarpio y mesocarpio. (3) Determinar la relación entre el color y la síntesis de

licopeno en frutos modificados genéticamente. Se cuantificó el licopeno por espectrofotometría (Espectrofotometría Uv-Vis), por otra parte se midió la actividad lipoxigenasa empleándose la técnica de Gökmen utilizando un colorímetro Hunter lab®. Los resultados obtenidos en la actividad LOX revelaron que el silenciamiento del gen *TomloxB* disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la actividad enzimática del estadio quebrado al rosado en las 3 líneas transgénicas, mientras que en la línea 6H disminuyó su actividad en todos los estadios de maduración. Por otra parte la saturación del color no se vio afectada en las 3 líneas transgénicas mientras que la línea 6H obtuvo mayores grados °Hue (40.21) en el día 8 a comparación de las demás, obteniendo un tono más cercano a amarillo; esto podría estar relacionado con la concentración de licopeno (37.02 mg/ 100 g de epicarpio). Bajo las condiciones establecidas (temperatura a 25 °C) en la cuantificación de la concentración de licopeno en la línea 6H disminuyó significativamente en el día 8 y 12 pero a partir del día 16 esta no tuvo diferencia significativa con el tomate testigo, esto podría deberse a un retraso en la máxima concentración de licopeno, mientras que en el mesocarpio no hubo diferencia significativa con el tomate testigo por lo tanto el silenciamiento del gen *TomloxB* no afectó a la ruta de los carotenoides.

ABSTRACT

Romero Lascurain, Irving Celestino, MSc. Research Unit on Food and Development. National Technological Institute of Mexico, Veracruz campus. December, 2020.

PRODUCTION OF LYCOPENE IN DIFFERENT RIPENING STAGES OF GENETICALLY MODIFIED TOMATOES (*Solanum lycopersicum* TA234).

Advisors: Javier de la Cruz Medina, MSc and Elizabeth León García PhD.

Lycopene is a carotenoid responsible for the red coloration in tomatoes; It has antioxidant properties, so its consumption prior to various types of cancer. It should be noted that more than 80% of the lycopene in the human diet comes from the tomato, which is considered a climacteric fruit. In tomato fruits genetically modified with the TomloxB gene, the interaction of LOX (lipoxygenase) with ethylene has been previously studied in the postharvest laboratory, finding a positive relationship of regulation of the enzyme on ethylene synthesis, and due to the fact that This hormone regulates the biosynthesis of bioactive compounds such as lycopene. It is of interest to study the effect of the silencing of LOX (lipoxygenase) on the synthesis of lycopene throughout its postharvest life. In the present, the lycopene concentration in the genetically modified tomato was quantified, this includes clarifying the interaction with the silenced gene. The general objective of this work was to evaluate the effect of the silencing of the TomloxB gene on the production of lycopene in tomato fruits (*Solanum lycopersicum* TA234). As specific objectives (1) To determine the activity of LOX in its different stages of maturation. (2) Evaluate the production of lycopene in genetically modified tomato during its postharvest life in epicarp and mesocarp. (3) Determine the relationship between color and lycopene synthesis in genetically modified fruits. Lycopene was quantified by spectrophotometry using the extinction coefficient, on the other hand, the

lipoxygenase activity was measured using the Gökmen technique using a Hunter lab® colorimeter. The results obtained in the LOX activity revealed that the silencing of the TomloxB gene significantly decreased ($p < 0.05$) the enzymatic activity of the pink-broken stage in the 3 transgenic lines, while in the 6H line its activity decreased in all maturation stages. On the other hand, color saturation was not affected in the 3 transgenic lines, while the 6H line obtained higher degrees ° Hue (40.21) on day 8 compared to the others, obtaining a tone closer to yellow; this could be related to the lycopene concentration (37.02 mg / 100g of epicarp). Under the conditions established in this experiment, the concentration of lycopene in the 6H line decreased significantly on day 8 and 12, but from day 16 it did not have a significant difference with the control tomato, this could be due to a delay in the maximum concentration of Lycopene, while in the mesocarp there was no significant difference with the control tomato, therefore the silencing of the TomloxB gene did not affect the carotenoid pathway.

CONTENIDO

CONTENIDO	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS.....	xiv
1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- ANTECEDENTES	3
2.1.- Cultivos transgénicos.....	3
2.2.- El tomate: taxonomía, distribución geográfica y producción.....	5
2.2.1.- Estadios de maduración del tomate	8
2.2.2.- Actividad de LOX en la maduración	11
2.2.3.- Composición química	13
2.3.- Licopeno	16
2.3.1.- Fuentes y química.....	16
2.3.2.- Actividad anticancerígena.	18
2.3.3.- Biosíntesis de licopeno	23
2.4.- Métodos para cuantificar licopeno	25
2.5.- Síntesis de antecedentes	29
3.- JUSTIFICACIÓN	31
4.- HIPÓTESIS	32
5.- OBJETIVOS	33
5.1.- Objetivo general:	33
5.2.- Objetivos específicos:.....	33
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	34
6.1.- Metodología general.....	34
6.2.- Diseño de experimentos	35
6.3.- Cultivo y cosecha de la materia prima	36
	x

6.4.- Protocolo de esterilización de desechos y bioseguridad	38
6.5.- Actividad LOX.....	38
6.6.- Color	40
6.7.- Cuantificación de licopeno.....	41
6.8.- Análisis estadístico	43
7.- RESULTADOS.....	44
7.1.- Relación de los estadios de maduración con los grados HUE	44
7.2.- Actividad LOX.....	44
7.2.- Color	45
7.4.- Determinación del licopeno	48
8.- CONCLUSIONES	51
9.- RECOMENDACIONES	52
10.- ANEXOS	54
10.1.- Curva patrón Bradford	54
11.- BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Área de cultivo utilizando plantas transgénicas del año 1996 al 2017..	3
FIGURA 2: Principales países productores de tomate en el 2017.....	7
FIGURA 3: Principales países exportadores de tomate en el 2018	8
FIGURA 4: Relación del etileno con la maduración del fruto	9
FIGURA 5. Estadios de maduración del tomate.....	10
Figura 6: Compuestos obtenidos de la catálisis del ácido linoleico en la ruta de la lipoxigenasa (LOX).....	12
Figura 7: Posible mecanismo de la conexión de la LOX en la producción de etil.	13
FIGURA 8. Estructuras químicas de carotenoides presentes en el tomate	16
FIGURA 9. Estructura química del licopeno.....	17
FIGURA 10. Mecanismo propuesto del papel de licopeno en la prevención de enfermedades crónicas	20
FIGURA 11. Diagrama de la absorción y transporte del licopeno en el cuerpo humano	23
FIGURA 12. Ruta metabólica para la biosíntesis de los carotenoides	24
FIGURA 13. Cromatograma de los carotenoides en columna C ₁₈	26
FIGURA 14. Cromatograma de carotenoides en columna C ₃₀	26
FIGURA 15: Metodología general para cumplir los objetivos del proyecto.	34
FIGURA 16: Insecticida utilizado en el cultivo de tomate.....	37

FIGURA 17: Invernadero de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos	38
FIGURA 18: Diagrama de color según la escala CIE (L*a*b*).	41
FIGURA 19: Actividad LOX en diferentes estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística (P < 0.05).	45
FIGURA 20: Determinación de la luminosidad enos 6 estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística (P < 0.05).	47
FIGURA 21: Determinación de la saturación en los 6 estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística (P < 0.05).	47
FIGURA 22: Determinación de °Hue en los 6 estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística (P < 0.05).	48
FIGURA 23: Concentración de licopeno en el mesocarpio. Letras diferentes indican significancia estadística (P < 0.05).	49
FIGURA 24: Concentración de licopeno en el epicarpio. Letras diferentes indican significancia estadística (P < 0.05).	50
FIGURA 25: Curva de calibración de Bradford.	54

LISTA DE TABLAS

TABLA 1: Área por países de cultivos transgénicos en el año 2016 y 2017.	4
TABLA 2. Clasificación taxonómica del tomate (<i>Solanum lycopersium</i>).....	5
TABLA 3. Descripción de los estadios de maduración.	10
TABLA 4. Composición química y nutricional del tomate.	14
TABLA 5. Concentración de licopeno en el tomate.	15
TABLA 6: Licopeno en algunos alimentos.....	18
TABLA 7: Enfermedades que se pueden prevenir con la ingesta de licopeno	21
TABLA 8: Estudios donde se han cuantificado licopeno en tomates genéticamente modificados.	27
TABLA 9: Diseño de experimentos	35
TABLA 10: Relación de los °Hue con los 6 estadios de maduración del tomate..	44
TABLA 11: Cinética del tomate a los 26 días.	46

LISTA DE ABREVIATURAS

LOX	Lipoxigenasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
°C	Grados centígrados
C	Chroma
A	Absorbancia leída a 503
V	Volumen total la fase superior
P	Peso de muestra
PM	Peso molecular
ϵ	Coeficiente de extinción molar del licopeno
L	Luminocidad
cm	Centímetro
g	Gramo
g/L	Gramo por litro
s	Segundo
g/mol	Gramo por mol
h	Grados hue
mg	miligramo
mL	mililitro
μ kat	Micro katal
nm	Nanometro
min	Minutos
MPa	Mega pascales
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxílico
MEP	Metileritrol fosfato
MVA	Ácido mevalónico

IPP	Isopentenil difosfato
DMAPP	Dietilalil difosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato

1.- INTRODUCCIÓN

El licopeno es un carotenoide responsable de la coloración roja en los tomates; posee propiedades antioxidantes y anticancerígenas, por lo que su consumo representa un objetivo clave para prevenir muchos tipos de cáncer. Sus fuentes principales de obtención son frutas, hortalizas y microalgas. Sin embargo, se ha encontrado altas concentraciones en el hongo *Blakeslea*. Cabe señalar que más del 80% del licopeno en la dieta humana proceden de los tomates (Ordóñez *et al.*, 2009; Calvo *et al.*, 2012).

Una fuente de licopeno debe presentar altas concentraciones de este carotenoide para poder llevar a cabo una explotación comercial. Para la extracción del licopeno se debe tener en cuenta los diferentes agentes físicos y químico, puesto que afectan su estabilidad, principalmente la exposición a la luz, el pH elevado, temperaturas altas y la exposición al oxígeno. Hoy en día existen varias técnicas para la extracción del licopeno, una de las más comunes es mediante el uso de solventes por etapas (Cardona *et al.*, 2006).

El tomate es una fuente importante de licopeno, este fruto de acuerdo a su comportamiento respiratorio es considerado climatérico, es decir una vez alcanzado su estado de maduración fisiológico temprano, este puede ser cortado y su proceso de maduración no se ve interrumpido. Lo anterior se ve favorecido por la presencia del etileno, el cual se genera a través de los daños mecánicos sobre los tejidos vegetales; este compuesto participa regulando la síntesis del licopeno y β -caroteno, además, promueve la degradación de la clorofila (Gómez *et al.*, 2002; Gil, 2010).

En el presente trabajo se cuantificara la concentración de licopeno presente en el tomate genéticamente modificado (*Solanum lycopersicum* TA234) en diferentes estadios de maduración, esto permitirá eventualmente esclarecer la interacción de

este carotenoide o su dependencia con respecto al gen silenciado. Se sabe que la concentración del licopeno varía de acuerdo a la especie de tomate y al tratamiento al que se encuentran sometidos; se espera que el carotenoide presente en los tomates genéticamente modificados sea comparable con la concentración de licopeno cuantificado en tomates sin alteraciones genéticas.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Cultivos transgénicos

La creciente demanda de frutas y hortalizas ha incentivado a la utilización de nuevas tecnologías, entre las que se destaca; la utilización de semillas genéticamente modificadas.

En 1996 se empezaron a comercializar los primeros cultivos transgénicos y se contaba con un área de 1.7 millones de hectáreas sembradas, sin embargo año con año, la siembra de cultivos genéticamente modificados va en aumento (**FIGURA 1**) llegando a plantarse 189.8 millones de hectáreas en el 2017 por 17 millones de agricultores en 24 países.

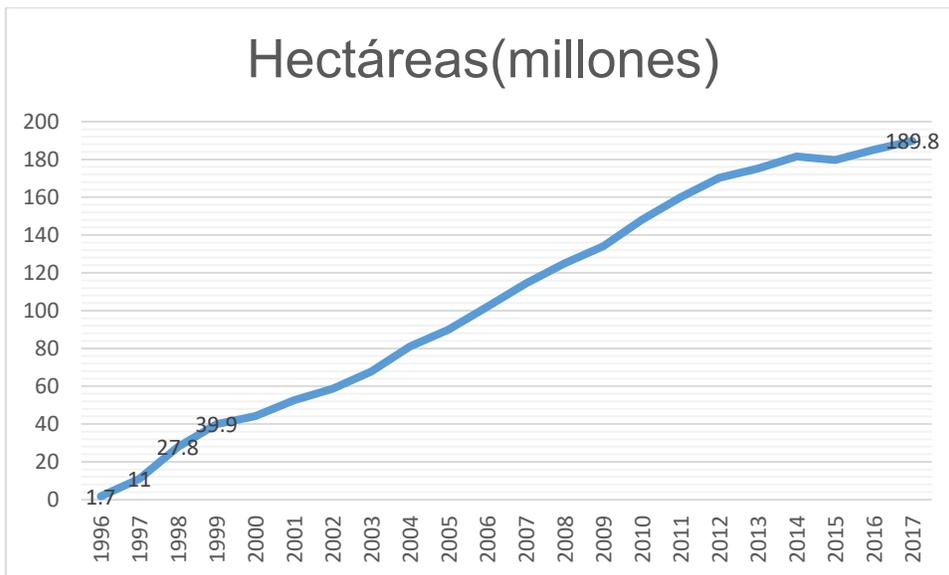


FIGURA 1: Área de cultivo utilizando plantas transgénicas del año 1996 al 2017. (ISAAA, 2017)

Distribución de cultivos transgénicos

Alrededor del mundo 24 países cultivan plantas transgénicas de los cuales 18 son los que destacan (**TABLA 1**), entre ellos se encuentra Estados Unidos como principal productor ocupando en el 2017 una área de 75 millones de hectáreas para cultivar, equivalente al 40% de las plantaciones mundiales y como segundo lugar se encuentra Brasil ocupando una área 50.2 millones de hectáreas en el 2017 equivalente al 26 % del área cultivada a nivel mundial.

TABLA 1: Área por países de cultivos transgénicos en el año 2016 y 2017.

Rango	País	2016	2017
1	USA	72.9	75
2	Brasil	49.1	50.2
3	Argentina	23.8	23.6
4	Canadá	11.6	13.1
5	India	10.8	11.4
6	Paraguay	3.6	3.0
7	Pakistán	2.9	3.0
8	China	2.8	2.8
9	Sudáfrica	2.7	2.7
10	Bolivia	1.2	1.3
11	Uruguay	1.3	1.1
12	Australia	0.9	0.9
13	Filipinas	0.8	0.6
14	Birmania	0.3	0.3
15	Sudán	0.1	0.2
16	España	0.1	0.1
17	México	0.1	0.1
18	Colombia	0.1	0.1

Fuente: (ISAAA, 2017)

Para el 2017 los cultivos más sembrados fueron la soja, el maíz, el algodón y la canola. De las 189.1 millones de hectáreas cultivadas en dicho año, el 80% correspondían al cultivo de soja y 32% del maíz (ISAAA, 2017). Cabe mencionar que la primera fruta en ser modificada genéticamente fue tomate FlavrSavr™, esto fue posible por la transferencia del gen *Bt*, con la finalidad de expresar endotoxinas efectivo para controlar plagas de importancia económica, en el año 2009 el área donde se cultivaban plantas con el gen *Bt* representaba el 15% del total de hectáreas (Ramón & Calvo, 2001; Sake *et al.*, 2011).

2.2.- El tomate: taxonomía, distribución geográfica y producción.

El género *Solanum* es originario de las regiones andinas específicamente de Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú y Chile. Posteriormente fue expandiéndose hasta llegar a México donde en un principio era considerada como maleza, pero al paso del tiempo fue domesticado en dicho lugar y desde allí se difundieron las formas cultivadas. (Jenkins, 1948).

TABLA 2. Clasificación taxonómica del tomate (*Solanum lycopersium*).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Lycopersicum</i>

Fuente: (López, 2016)

El tomate *Solanum lycopersicum* (**TABLA 2**), es una hortaliza perteneciente al orden Solanales de la familia Solanaceae. Presenta tallo grueso, pubescente, anguloso y de color verde; mide entre 2 y 4 cm de ancho, además, el tallo principal posee ramificaciones de tallos secundarios con hojas y racimos florales. Inicialmente el tallo posee una apariencia herbácea, compuesto de epidermis con pelos glandulares, corteza, cilindro vascular y tejido medular. Sus hojas son pinnadas y compuestas, presentan de siete a nueve folíolos peciolados que miden de 4-60 mm por 3-40 mm, la posición de estas pueden ser semirecta, horizontal o inclinada.

Su fruto es una baya bilocular o plurilocular, subesférica globosa o alargada, su peso puede oscilar entre unos pocos miligramos hasta 600 g; además, está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas. Inicialmente su coloración es verde y se vuelve rojo cuando llega a la etapa de maduración (Cestoni *et al.*, 2006). La época de producción de tomate se realiza durante todo el año, con algunas restricciones o limitaciones en invierno (Cultivos a campo abierto) sobre todo en zonas con altas probabilidades de heladas. En primavera - verano demuestra todo su potencial y donde se presenta las mayores ocurrencias de plagas y enfermedades (FAO, 2013).

Después de ser domesticado en México, fue introducido a Europa en el siglo XVI y en el siglo XIX se empezó a producir comercialmente, siendo el fruto de la planta muy bien aceptado alrededor del mundo, por las diversas presentaciones que puede ser procesado para el consumo humano, debido a esto, el tomate constituye una fuente económica importante basada en su consumo, producción y comercialización. Entre los principales países productores de este fruto se encuentra China (con producción del 49%), India (con producción del 9 %), Turquía (con producción del 5 %), Estados Unidos (con producción del 4 %); siendo México el noveno productor a nivel mundial en el 2017 con una producción 2 % equivalente 4, 243,058 toneladas (**FIGURA 2**) (Vergani, 2002; FAOSTAT, 2017).

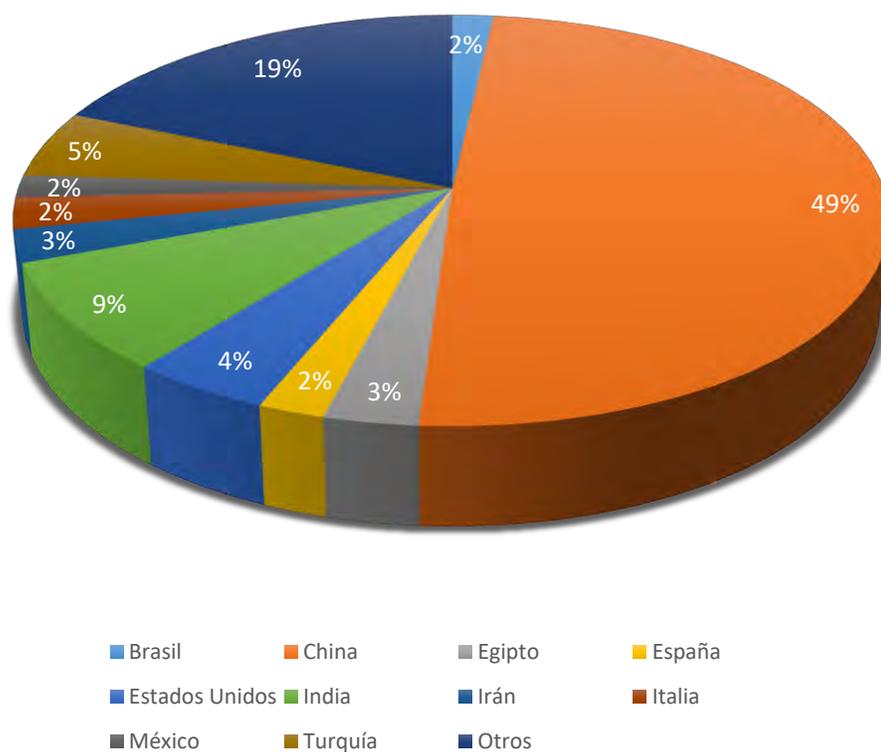


FIGURA 2: Principales países productores de tomate en el 2017. (FAOSTAT, 2017)

Mientras que los principales exportadores son: México, Países Bajos, España y Marruecos, donde México es el mayor exportador con 22% (**FIGURA 3**) (Fao, 2016).

Hoy en día la producción de tomate ha ido en aumento, esto es debido a la aplicación de nuevas tecnologías, así como también al aumento de áreas donde se cultiva (Díaz, 2014).



FIGURA 3: Principales países exportadores de tomate en el 2018 (*Fao, 2016*).

2.2.1.- Estadios de maduración del tomate

En la maduración del fruto, el etileno juega un papel muy importante ya que estimula a la síntesis de genes que codifican enzimas las cuales participan en las síntesis de los carotenoides como son; el licopeno y β -caroteno, así como en la degradación de la clorofila. (**FIGURA 4**) (*Hobson et al., 1993*).

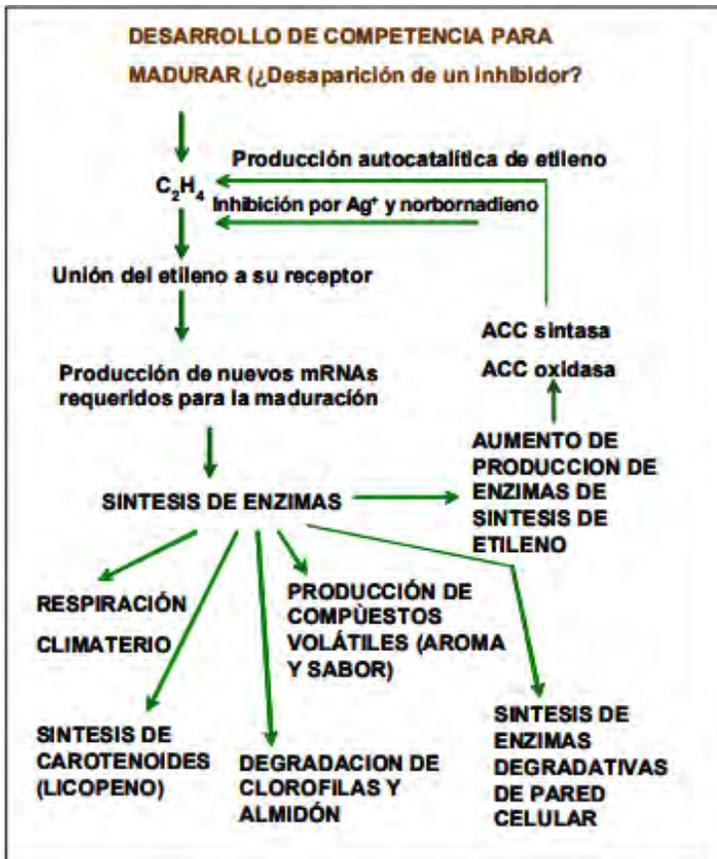


FIGURA 4: Relación del etileno con la maduración del fruto. (Asenjo, *et al.*, 2011)

El tomate es una fruta considerada climatérica, es decir; una vez alcanzada un estado temprano de madures fisiológica, puede ser cortada de la planta y su proceso de maduración no es interrumpida. Esto es debido a que sigue produciendo etileno, aun cuando es cosechada (Martínez *et al.*, 2017).

Un tomate de calidad se obtiene cuando este se madura mientras permanece en la planta, de tal manera que alcanza un máximo sabor, sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías, estos son cosechados con un grado de maduración 3 (**FIGURA 5**) y almacenado en atmósferas modificadas con la finalidad de aumentar su vida de anaquel (Karder *et al.*, 1977; Gong *et al.*, 1994).

Para saber los estadios de maduración del tomate se recurre a técnica sensorial, donde relaciona el estadio de maduración con el color del fruto. Según Heuvelink basándose en la carta de colores del tomate recomendado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, el tomate presenta 6 estadios de maduración (**FIGURA 5**) (Heuvelink, 2005).

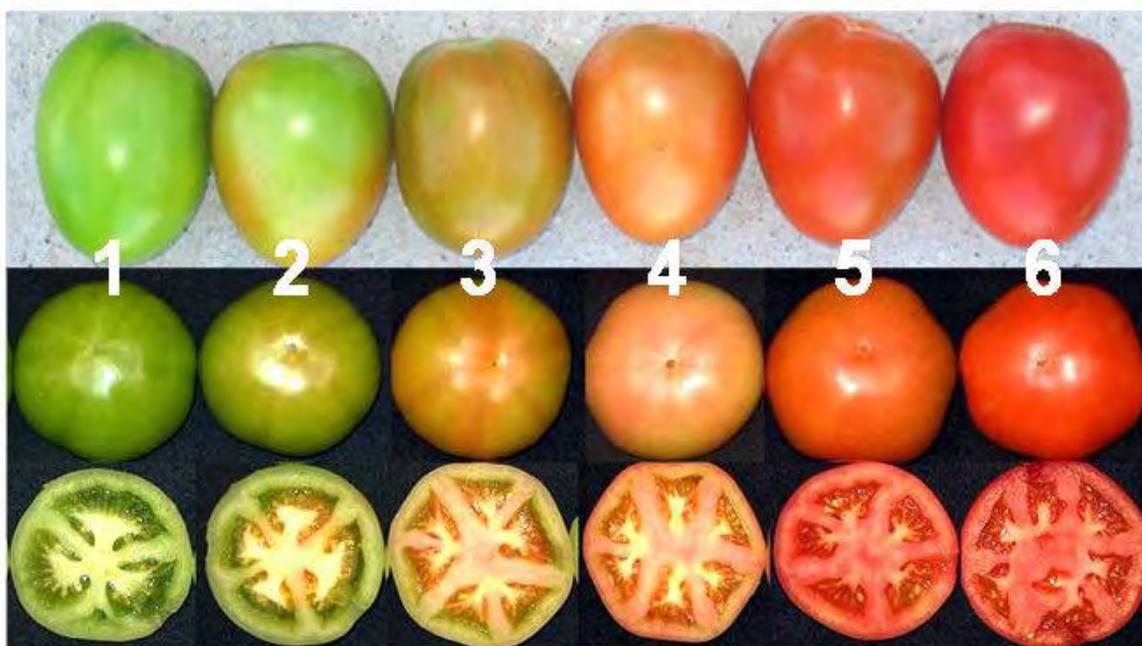


FIGURA 5. Estadios de maduración del tomate (THM, 2013).

Como se puede observar, el tomate presenta 6 estadios de maduración estos son identificados de acuerdo al color, que va desde verde al rojo (**TABLA 3**)

TABLA 3. Descripción de los estadios de maduración.

Estados de madurez	Descripción
1	Toda la superficie del fruto es verde, no hay color rojo visible.
2	Hay un ligero cambio de color de verde a canela–amarillo, rosado o rojo.

3	Más del 10%, pero menos del 30% de la superficie muestra un cambio definitivo a canela– amarillo, rosado, rojo o una combinación de estos colores.
4	Más del 30%, pero menos del 60% de la superficie muestra un cambio definitivo a rosado o rojo.
5	Más del 60%, pero menos del 90% de la superficie del fruto muestra un color rojo.
6	Más del 90% de la superficie del fruto muestra un color rojo.

Fuente: (Castro *et al.*, 2009).

2.2.2.- Actividad de LOX en la maduración

Las lipoxigenasas (LOX) son una familia de dioxigenasas de ácidos grasos que contienen hierro no hemo, que se pueden encontrar en plantas y animales (Brash, 1999) estas cataliza la hidroxidación de ácidos grasos poliinsaturados dando como resultados productos como los hidroperóxidos, a su vez estos tienden a formar radicales libres altamente reactivos, estos deterioran la membrana reaccionando con proteínas y aminoácidos (Pinhero *et al.*, 1998; Gardner, 1979). Sin embargo la mayoría de los hidroperóxidos son convertidos en otros compuestos por medio de algunas enzimas, es lo que generalmente se conoce como ruta de las lipoxigenasas (**FIGURA 6**).

Existen 3 áreas donde la actividad lipoxigenasa puede estar presente: en el crecimiento y desarrollo, senescencia y respuesta al daño del tejido vegetal o resistencia a plagas (Sanz *et al.*, 1992). Se conocen al menos, cinco isoformas de lipoxigenasas presentes en tomate las cuales son llamadas: TomloxA, TomloxB, TomloxC, TomloxD y TomloxE (Chen *et al.*, 2004). Entre las cuales se cree que principalmente tres isoformas (TomloxA, TomloxB y TomloxE) ejercen actividad durante la maduración del fruto.

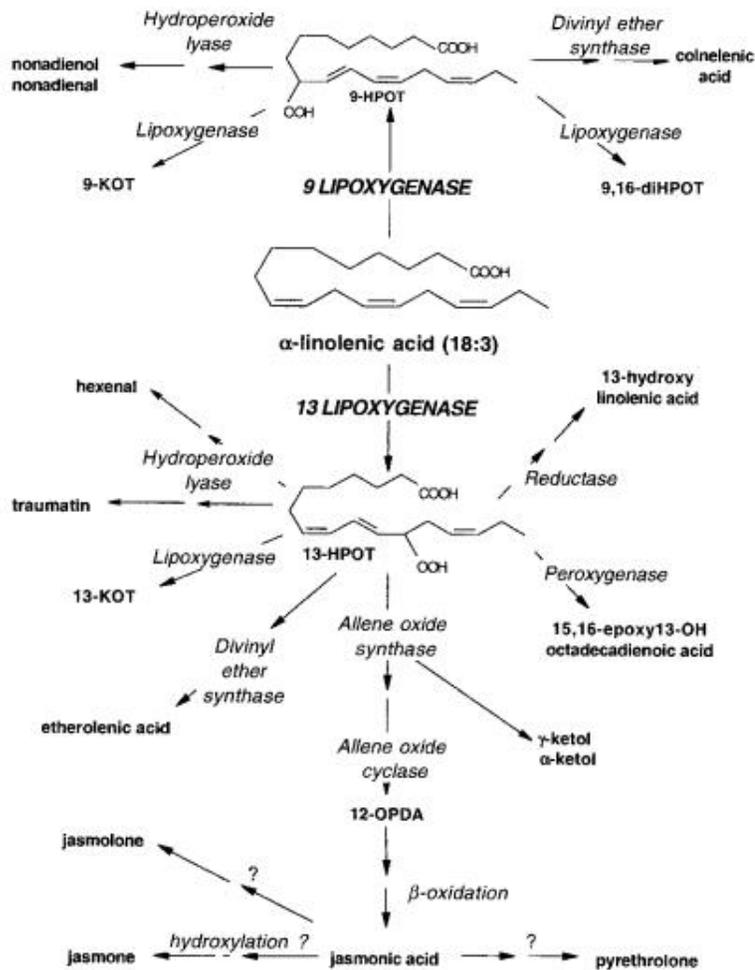


Figura 6: Compuestos obtenidos de la catálisis del ácido linoleico en la ruta de la lipoxigenasa (LOX). (Porta & Rocha , 2002)

2.2.2.1.- Relación entre LOX y etileno

La síntesis del etileno en plantas está clasificada en dos condiciones, en una condición estaría la síntesis de manera normal o biológica que se produce en ciertas etapas del desarrollo de las plantas y otra etapa sería como respuesta al estrés físico, químico y biológico de la planta. Se especula que los hidroperóxidos resultado de la actividad de la LOX pueden estar involucrados en tres aspectos fisiológicos vegetales lo cuales son la biosíntesis de etileno, senescencia y regulación enzimática. La síntesis de etileno vía S-adenosilmetionina es bien conocida excepto en el paso final donde 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) es convertido a

etileno, muchos autores sugieren que en esta etapa final hay necesidad de oxígeno por lo que sugieren la participación de radicales libres, debido a esto se ha sugerido la participación de LOX en este proceso (Yang & Hoffman, 1984)

Experimentos realizados por Wang y Yang en 1987 en hojas de avenas evidenciaron que existe una conexión entre ACC y la actividad LOX, concluyeron que la producción de radicales alcoxi producidos en la actividad lipoxigenasa son los causantes de la degradación de ACC a etileno (**FIGURA 7**).

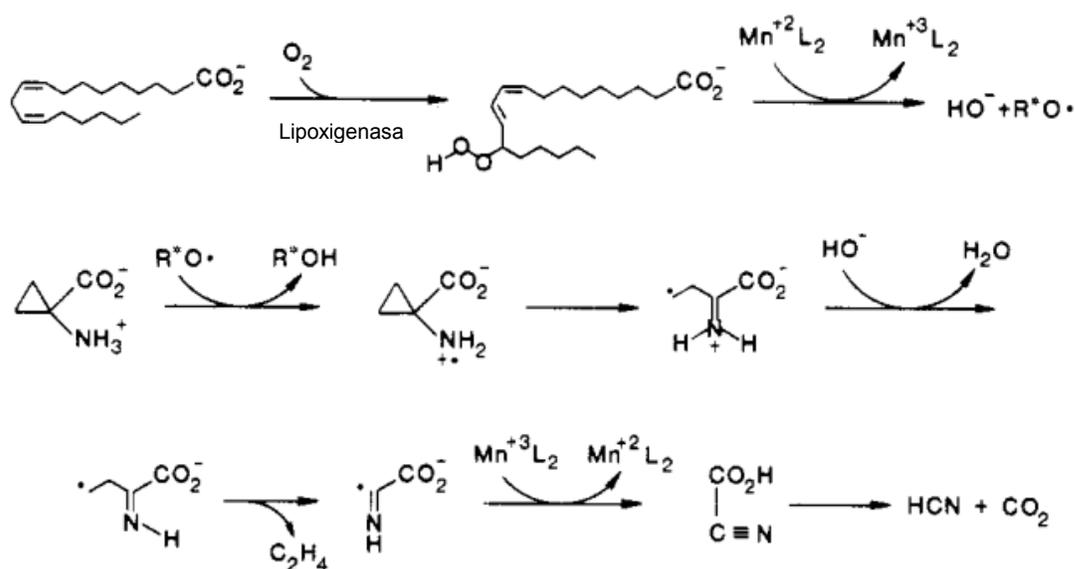


Figura 7: Posible mecanismo de la conexión de la LOX en la producción de etileno. (Pirrung, 1986)

Por otro lado Velázquez y colaboradores analizando tomates genéticamente modificados concluyeron que la que la lipoxigenasa b estaba relacionada con la actividad de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa), así mismo con la síntesis de etileno (Velázquez *et al.*, 2020).

2.2.3.- Composición química

La planta de tomate se cultiva de forma anual, siendo la recolección del fruto de forma general en los meses de verano. La porción comestible es de 94 g por cada 100 g de producto fresco, constituido principalmente por 94% de agua y 6% de

macronutrientes, que en su mayoría son los hidratos de carbono y ácidos orgánicos que contribuyen a dar al fruto textura y sabor característico (El Norte de Castilla, 2017; QCom.es, 2018).

TABLA 4. Composición química y nutricional del tomate.

Constituyentes	Contenido por cada 100 g
Energía (KJ)	56.00
Constituyentes básicos (g)	
Agua	94.70
Proteína	1.00
Grasa	0.10
Fibra dietética	1.60
Carbohidratos (g)	
Glucosa	0.90
Fructosa	1.00
Ácidos orgánicos (g)	
Cítrico	0.43
Málico	0.08
Vitaminas (mg)	
Vitamina C	18.00
Ácido nicotínico	0.70
β-caroteno (equivalente)	0.34

Fuente: (Fundación Española de Nutrición, 2013)

Entre las fuentes de nutrientes presentes en el tomate se encuentran las proteínas, carotenoides y vitamina C. Siendo el licopeno uno de los carotenoides más

importantes, su composición química varía según la variedad, las condiciones de cultivo, la época de producción, el grado de madurez, el tiempo y las condiciones de almacenamiento, entre otros factores (Fundación Española de Nutrición, 2013).

Los tomates y sus productos derivados son considerados importantes contribuidores de carotenoides en la dieta humana (**TABLA 5**), de entre los cuales el licopeno (**FIGURA 8**) representa el componente principal ya que comprende de un 80 a 90% de los pigmentos presentes en el tomate (Rao *et al.*, 2006).

TABLA 5. Concentración de licopeno en el tomate.

Fuente	Licopeno (mg/100g base húmeda)
Tomate, fresco	0.72-20
Tomate, jugo	5.00-11.60
Tomate, salsa	6.20
Tomate, sopa	7.99

Fuente: (Rao *et al.*, 2006)

Existen diversos carotenoides presentes tanto en el tomate como en sus derivados, algunos de ellos están conformados por estructuras cíclicas mientras que otros presentan estructuras más sencillas (**FIGURA 8**)

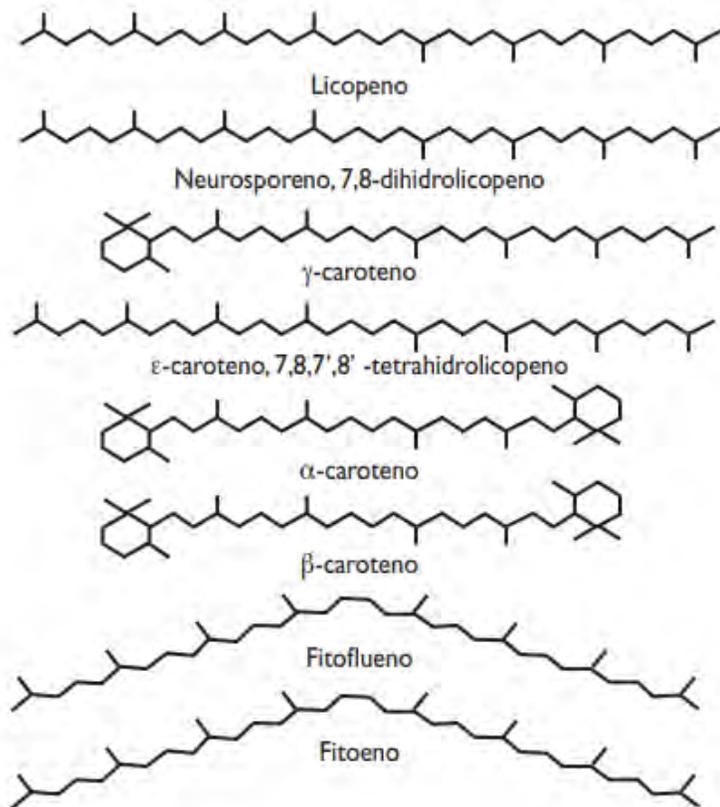


FIGURA 8. Estructuras químicas de carotenoides presentes en el tomate (Khachick et al., 2002).

2.3.- Licopeno

2.3.1.- Fuentes y química

El licopeno es pigmento carotenoides que les da la coloración roja a algunos alimentos siendo su principal función proteger contra la radiación solar a las plantas, esto lo lleva a cabo mediante la absorción de los rayos solares (Ordóñez *et al.*, 2009).

Este caroteno está constituido por átomos de 40 carbono y 56 de hidrogeno con 11 dobles enlaces conjugados y 2 no conjugados, presentando una estructura no cíclica con peso molecular de 536.88, este compuesto hidrocarbonado alifático, es soluble en lípidos (Periago *et al.*, 2001; Khachick *et al.*, 2002)

En la **FIGURA 9** se presenta la estructura química del licopeno que predomina en los vegetales donde se puede observar, además de lo antes mencionado, que se trata de una molécula no polar.

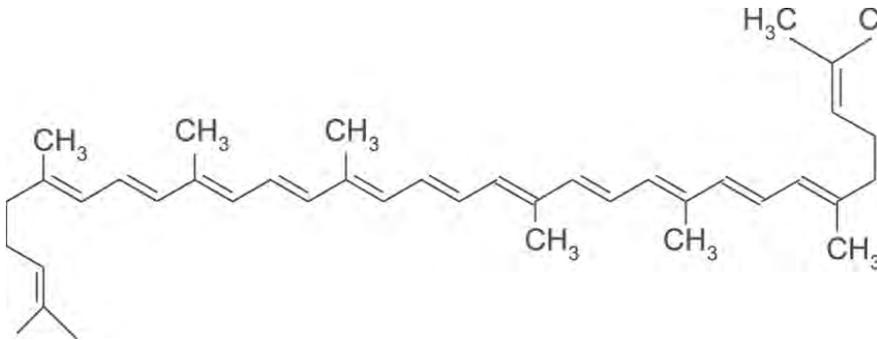


FIGURA 9. Estructura química del licopeno (Periago *et al.*, 2001).

En diversos artículos mencionan que el licopeno se encuentra más disponible cuando el producto se somete a tratamientos térmicos (como es la cocción) ya que de esta manera presenta una mejor absorción (Ordóñez *et al.*, 2009).

El licopeno se encuentra de manera natural en frutas, hortalizas y microalgas. Sin embargo, se ha encontrado altas concentraciones en el hongo *Blakeslea*. El tomate es una fuente importante de licopeno puesto que contiene alrededor de 90% de este caroteno en relación a todos los pigmentos presentes, debido a lo anterior el tomate es una de las principales fuentes de licopeno suministrada en las dietas (Lambelet *et al.*, 2008; Calvo *et al.*, 2012).

En la **TABLA 6** se presenta la concentración de licopeno en miligramos por cada 100 g de muestra en algunos productos que se comercializan, siendo notorio que el tomate es que presenta mayor concentración de licopeno comparado con los demás productos (Periago *et al.*, 2001).

TABLA 6: Licopeno en algunos alimentos

Nombre científico	Alimento	Tipo	mg/100g
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	Fresco	0.88 – 7.74
<i>Lycopersicum pimpinellifolium</i>	Tomate	Fresco	40
<i>Citrillus lanatus</i>	Sandia	Fresco	2.30-7.20
<i>Prunus armeniaca</i>	Albaricoque	Fresco	0.005
<i>Prunus armeniaca</i>	Albaricoque	Enlatado	0.065
<i>Prunus armeniaca</i>	Albaricoque	Deshidratado	0.86
<i>Citrus paradisi</i>	Pomelo rosa	Fresco	3.36

Fuente: (Periago *et al.*, 2001).

Hay diversos agentes que pueden afectar la estructura del licopeno, los cuales se agrupan en agentes físicos y químicos.

En los agentes químicos tenemos:

- Exposición a una alta concentración de oxígeno (Flujos mayores a 100 mL/min) (Kannan *et al.*, 2020)
- Exposición a pH menores 3.5 y mayores de 4.5 (Khaled *et al.*, 2015)

Y en los agentes físicos tenemos:

- Temperaturas mayores a 50 °C (Cole & Kapur, 1957)
- Presiones mayores a 40 MPa (Topal *et al.*, 2006)
- Exposición a la luz UV

2.3.2.- Actividad anticancerígena.

A diferencia de otros carotenoides el licopeno no tiene actividad provitamina A, ya que este no cuenta con anillos γ -iónico terminales, por lo que los efectos en humanos están dados por otro mecanismo de la vitamina A. De tal manera se ha

demostrado que el licopeno ayuda a la prevención del cáncer ya que ayuda a neutralizar los radicales libres (Heber & Lu , 2002).

Como lo describe en la **FIGURA 10** se plantea que el licopeno tiene varios mecanismos de regulación, esto inicia cuando el licopeno es ingerido en dietas ricas en este carotenoide, posteriormente es depositado en sangre y tejidos actuando como antioxidante (capturando especies reactivas de oxígeno) protegiendo así a las biomoléculas como lo son las proteínas, ADN y lípidos. Cuando estas biomoléculas se dañan son acumuladas en la célula provocando enfermedades crónicas como cardiovasculares, cáncer y osteoporosis, estos daños se llevan a cabo en el metabolismo siendo provocados por malas dietas y el humo del cigarro principalmente (Agarwal & Rao , 2000).

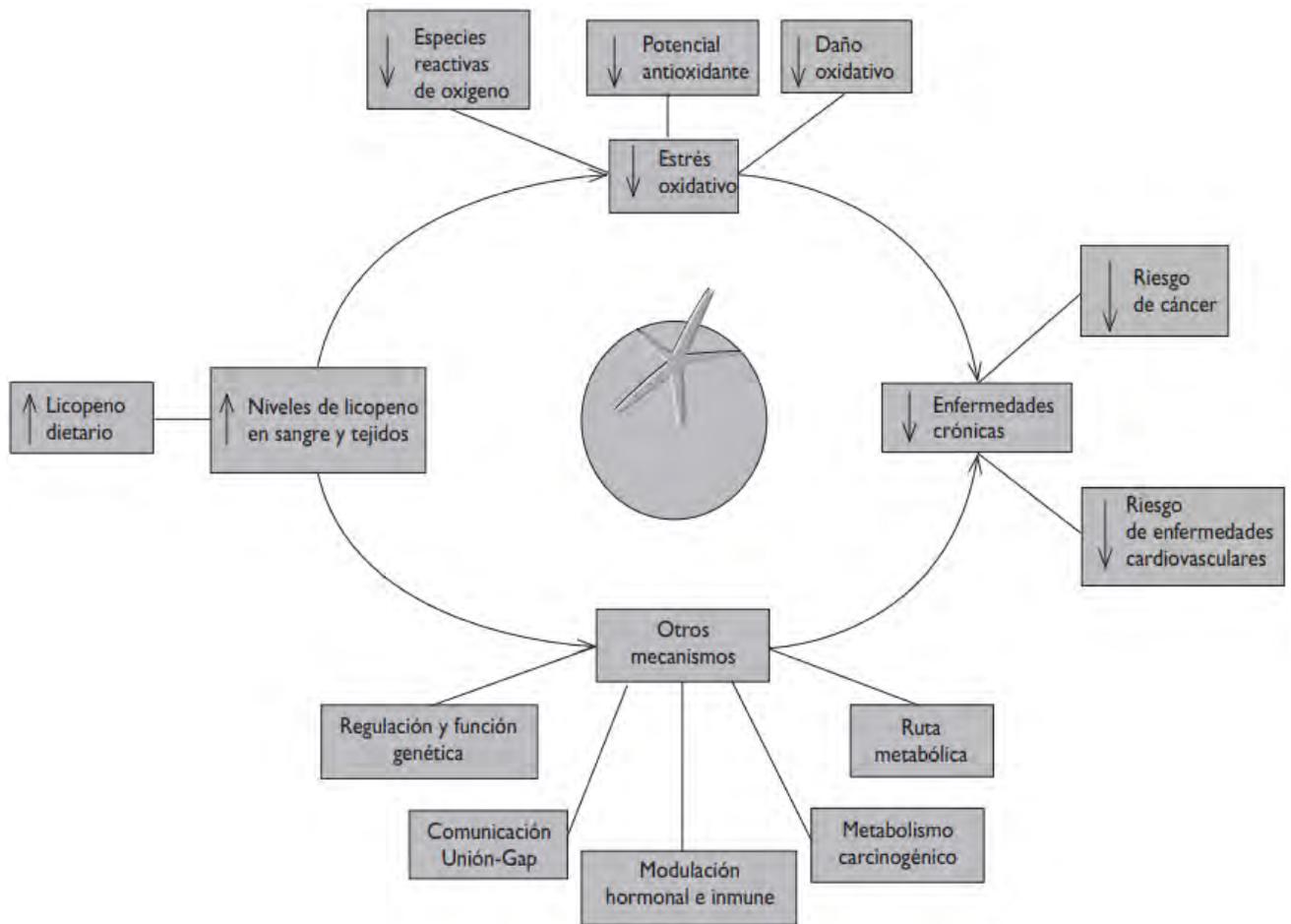


FIGURA 10. Mecanismo propuesto del papel de licopeno en la prevención de enfermedades crónicas (Agarwal & Rao , 2000).

Uno de los principales beneficios que ofrece el licopeno al ser consumido, es la prevención de diversas enfermedades.

Se ha reportado en diversos artículos, que la ingesta de licopeno ayuda a la prevención de diversos tipos de cáncer así como de varias enfermedades más (**TABLA 7**).

TABLA 7: Enfermedades que se pueden prevenir con la ingesta de licopeno

Enfermedad	Descripción	Referencia
Diabetes tipo 2	Artículos científicos han relacionado el contenido de licopeno a través de la ingesta de frutas y verduras con la prevención de diabetes tipo 2, teniendo una respuesta positiva.	(Valero <i>et al.</i> , 2011).
Osteoporosis	Se han realizado estudios sobre la relación de licopeno con los marcadores de recambio aunado a ello los riesgos de contraer dicha enfermedad, teniendo resultados favorables.	(Cruz, <i>et al.</i> , 2013)
Cáncer de mama	Se ha observado que el licopeno puede inhibir la proliferación de células de los tumores de cáncer de mama.	(Waliszewski & Blasco, 2010)
Cáncer de próstata	Se demostró que el licopeno detiene el crecimiento de células cancerígenas de próstata.	(Schwarz <i>et al.</i> , 2008)
Cáncer de colon	Se demostró que detiene el crecimiento en células cancerígenas.	(Tang <i>et al.</i> , 2011)

Además de tener beneficio sobre la salud humana, también se ha propuesto la utilización de este compuesto como colorante.

Absorción y distribución del licopeno en el cuerpo humano.

El licopeno es uno de los carotenoides que se encuentran en mayor cantidad en la sangre humana, teniendo una concentración en el plasma de 0.22 a 1.06 nmol/mL, representado hasta 21 a 43 % del total de carotenoides (Agarwal *et al.*, 2000).

Este carotenoide se encuentra presente en el tejido de algunos órganos humanos como la próstata, testículos, ovarios, riñones y el hígado (Cohen, 2002). La cantidad de licopeno en la sangre depende de su consumo en las dietas, pues se ha

demostrado que en personas que no consumen tomate durante 2 semanas, sus niveles de licopeno disminuyen notoriamente (Rao *et al.*, 1998).

La asimilación del licopeno en el humano tiene lugar durante el proceso de digestión de los lípidos, es decir, el licopeno se encuentra incorporado en los lípidos durante su transporte en el organismo. El proceso inicia desde la ingesta del caroteno las cuales se van incorporando al intestino delgado; en este sitio y con la ayuda de las sales biliares se forman emulsiones llamadas micelas, las cuales serán degradadas por la actividad de lipasas intestinales liberando así los lípidos y los carotenos presentes, los cuales serán transportados al interior de las células epiteliales. Una vez absorbidos los carotenos, son incorporadas a moléculas de quilomicrones (así como otras lipoproteínas LDL y VLDL), siendo liberadas en el torrente sanguíneo para ser movilizada a varios tejidos del cuerpo humano (Parker, 1996; Sthal *et al.*, 1996)

En la **FIGURA 11** se representa de forma gráfica desde la absorción hasta la liberación de los quilomicrones al torrente sanguíneo. Donde del 10 al 30 % del licopeno será absorbido en el intestino delgado a través de células epiteliales, esta variación de absorción va a depender de varios factores entre los cuales son: la edad, el estado hormonal, los niveles lipídicos en la sangre, malos hábitos entre otros (Sthal *et al.*, 1996; Rao *et al.*, 1999)

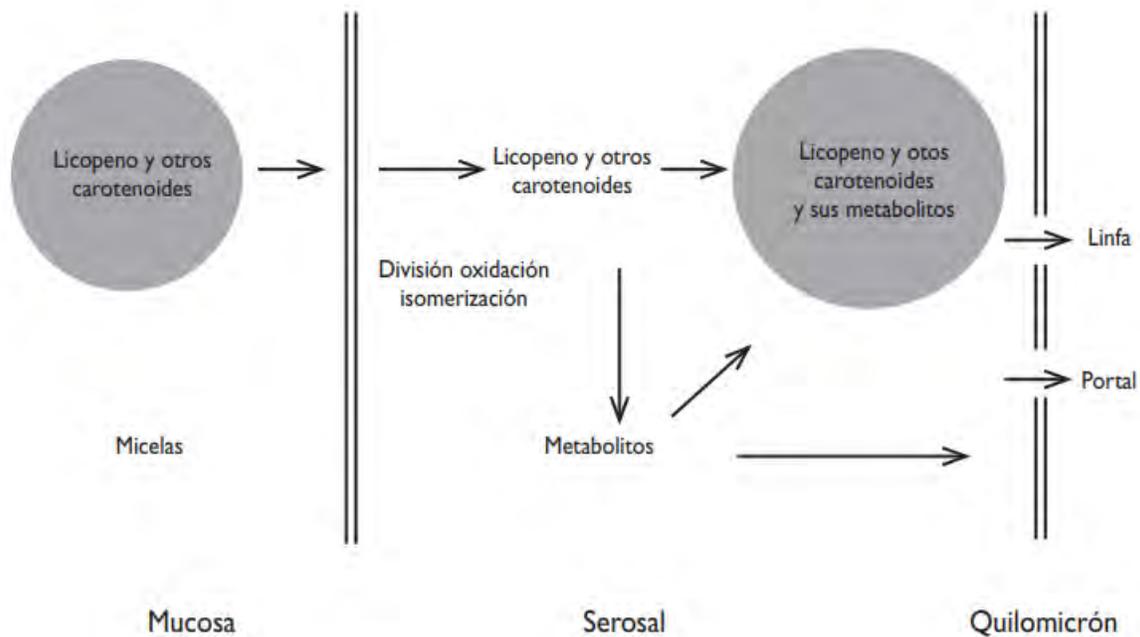


FIGURA 11. Diagrama de la absorción y transporte del licopeno en el cuerpo humano (Rao *et al.*, 2006).

2.3.3.- Biosíntesis de licopeno

Como se ha mencionado anteriormente el licopeno es sintetizado en plantas, verduras y hongos (por ejemplo *Blakeslea*). Actualmente se sabe que el licopeno puede ser sintetizado por dos rutas metabólicas; una es por los productos de la ruta del ácido mevalónico (MVA) y la otra por derivados de la ruta metileritrol fosfato (MEP) (Collins *et al.*, 2006; Sandman, 2001).

El licopeno se sintetiza en hongos a partir de la ruta del MVA, mientras que en plantas lo hace por medio de las dos rutas, dando como resultado cinco isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dietilalil difosfato (DMAPP), que son los precursores necesarios para la síntesis de los carotenoides. Se tiene como hipótesis que los carotenoides en las plantas se sintetizan en los cloroplastos y cromoplastos por medio de la ruta de MEP donde 3 moléculas de IPP y 1 de DMAPP más la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa forman geranylgeranyl difosfato (GGPP), esta

molécula es utilizada en varias rutas metabólicas entre ellas la síntesis de carotenoides (Collins *et al.*, 2006; Sandman, 2001).

Dos moléculas de GGPP forman fitoeno por medio de una condensación, seguido de ello, el fitoeno es convertido a beta caroteno por la enzima fitoeno desaturasa y a partir del licopeno la ruta se divide en dos, esto para la formación de compuestos cíclicos (Collins *et al.*, 2006).



FIGURA 12. Ruta metabólica para la biosíntesis de los carotenoides (Collins *et al.*, 2006).

El etileno influye mucho en la síntesis del licopeno puesto que esta fitohormona estimula los RNAm que codifica a la fitoeno sintasa y por otro lado esta enzima provoca la síntesis de fitoeno siendo este último precursor del licopeno.

2.4.- Métodos para cuantificar licopeno

Existen varias formas de cuantificar el licopeno, entre ellas se encuentran:

- Colorimetría: El color es un estímulo que nuestro cerebro recibe a través del ojo provocado por la radiación de luz visible, pero este estímulo también depende del medio que lo rodea, por lo que se ha establecido condiciones estándares para la aplicación de este método que se basa en la persuasión del color para cuantificar dichos componentes (Montes *et al.*, 2004).
- Espectrofotometría: este método resulta ser unos de los más prácticos puesto que las cuantificaciones se realizan de una manera rápida compara con el método HPLC. En este método se tienen varias formas espectrales como lo son UV-visible, IR, EM y RMN, donde los carotenoides tiene un rango de 400 – 500 nm (Mínguez-Mosquera, 1997).
- Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): esta técnica es utilizada debido a que los carotenoides son sustancias no polares, utilizando la fase reversa, anteriormente la cuantificación de carotenoides se llevaba a cabo en la columna C₁₈ (**FIGURA 13**), pero investigaciones han demostrados que la columna C₃₀ (**FIGURA 14**) es la más apropiada para la cuantificación de estos (Sander *et al.*, 1994; Sander *et al.*, 2000; Dachtler *et al.*, 1998).

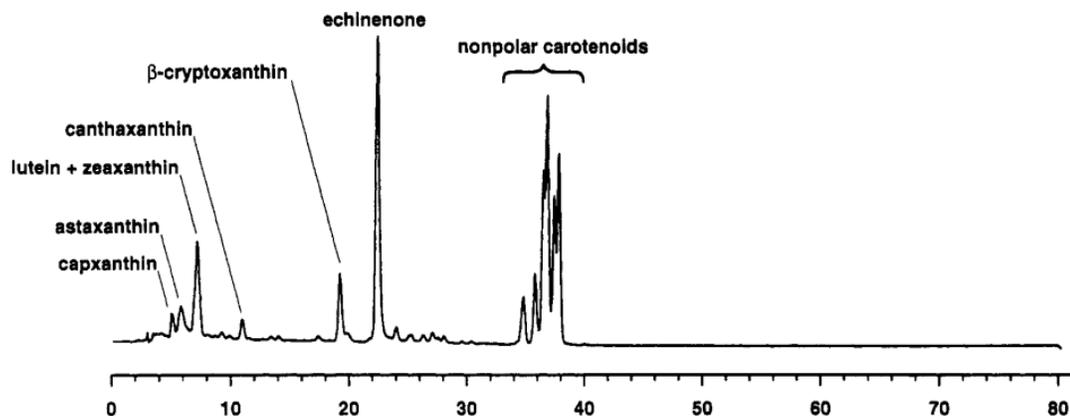


FIGURA 13. Cromatograma de los carotenoides en columna C₁₈ (Sander *et al.*, 1994).

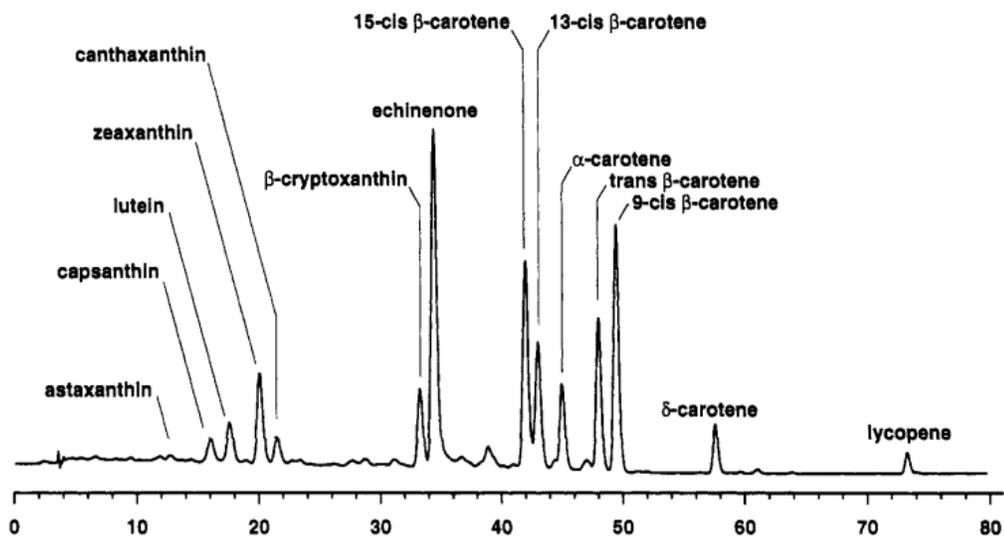


FIGURA 14. Cromatograma de carotenoides en columna C₃₀ (Sander *et al.*, 1994).

Si bien la cuantificación por espectrometría y colorimetría son los métodos más rápidos, el HPLC resulta ser mejor opción ya que permite una mayor versatilidad, selectividad, sensibilidad y fiabilidad (Candelas *et al.*, 2002).

En la **TABLA 8** se presenta una recopilación de trabajos que han realizado cuantificación de licopeno en tomates y sus derivados; especificando que métodos

han utilizado para la extracción de dicho caroteno, esto es con la finalidad de poder seleccionar el método más apropiado.

TABLA 8: Estudios donde se han cuantificado licopeno en tomates genéticamente modificados.

Cita	Fuente y modificación	Métodos para cuantificar	Resultados
(Bird et al., 1991)	Fuente: <i>Lycopersicon esculentum</i> var. Ailsa Modificación: silenciamiento del gen <i>pTOM5</i>	Extracto: no especificado HPLC • Longitud de onda: 300 - 700 nm	El licopeno, se redujo a <0.1%
(Sheehy et al., 1988)	Fuente: <i>Lycopersicon esculentum</i> var. UC82B Modificación: silenciamiento del gen <i>PG cDNA</i>	Extracto: acetona/hexano, 1:2 (vol/vol) Espectrofotometro • Longitud de onda: 503 nm	Sin cambios en los niveles de licopeno
(Römer et al., 2000)	Fuente: <i>Solanum lycopersicum</i> Modificación: inserción del gen <i>crtl</i>	Extracto: no especificado HPLC Longitud de onda: 503 nm	β -caroteno aumentó 45 % del contenido total

Mehta et al., 2002)	Fuente: <i>Solanum lycopersicum</i> Modificación: inserción del gen <i>ySAMdc</i>	Extractos: no especificado Espectrofotometro Longitud de onda: 470 nm	Aumento 200–300% más de licopeno
(Sun et al., 2012)	<i>Solanum lycopersicum</i> var. Jia Bao Modificación: silenciamiento del gen <i>SINCE1</i>	Extractos: no especificados HPLC • Longitud de onda: 450 nm	Aumento: 30–45% del total de carotenoides
(Meng et al., 2016)	<i>Solanum lycopersicum</i> Modificación: silenciamiento del gen <i>SolyWRKY41</i>	Extractos: hexano / acetona / etanol (50:25:25 v/v/v) HPLC • Longitud de onda: 450 nm	El contenido de licopeno en frutos rojos aumentó en 2–77 %
(Takayama et al., 2017)	<i>Solanum lycopersicum</i> Modificación: eliminación del dominio autoinhibidor de <i>SIGAD2</i> y <i>SIGAD3</i>	Extractos: hexano / acetona / etanol (50:25:25 v/v/v) Espectrofotómetro • Longitud de onda: 663 nm y 453 nm	No se observó una disminución significativa

En el laboratorio poscosecha de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos instituto tecnológico nacional de México campus Veracruz se ha trabajado anteriormente con el tomate modificado con el gen *TomloxB* en anti-sentido, realizando los siguientes proyectos:

- El efecto del silenciamiento de *TomloxB* sobre la maduración del fruto del tomate transgénico (*Solanum Lycopersicum*) (León, 2017).
- El análisis fisiológico del tomates genéticamente modificados (*Solanum Lycopersicum*) (León, 2017).
- Efecto del silenciamiento del gen *TomloxB* en la producción de etileno del tomate (*Solanum Lycopersicum*) (Velázquez, 2018).

2.5.- Síntesis de antecedentes

Desde que el tomate (*Solanum lycopersicum*) empezó a ser comercializado en todo el mundo en el siglo XVIII, este fue creando popularidad hasta llegar a ser uno de los frutos más comercializados. En el año 2018 México es el país con mayor exportación de tomate en el mundo, exportando el 21% del total.

La producción de tomate ha ido en aumento esto es debido a las extensiones de área de cultivo y a la implementación de tecnologías postcosechas, unas de las tecnologías postcosecha busca controlar la producción de etileno, ya que el etileno es la fitohormona que estimula la síntesis de muchas enzimas que participan en la maduración del fruto, en este proceso también se lleva a cabo la síntesis de algunas vitamina y antioxidantes.

Uno de los antioxidantes que se encuentra en mayor concentración es el licopeno, Según Rao y colaboradores en el 2006 la concentración de licopeno en tomate (*Solanum lycopersicum*) varía de 0.72 a 20 mg/100g base húmeda. El licopeno es un carotenoide compuesto por 40 carbonos, 56 hidrógenos, 11 dobles enlaces conjugados y es no polar por lo tanto es soluble en lípidos. Siendo esta una molécula poco estable por lo que algunos agentes químicos como la alta concentración de oxígeno y pH elevados, y agentes físicos como temperaturas elevadas, exposición a la luz UV y presiones altas, pueden afectar a la estructura de este carotenoide.

El consumo de licopeno es de gran importancia ya que está comprobado científicamente que este puede prevenir diversas enfermedades metabólicas como

son; cáncer de próstata, cáncer de mama, diabetes tipo 2, cáncer de colon, osteoporosis, entre otros, esto es debido a su actividad antioxidante.

Actualmente se han creados varios tomates transgénicos con distintos fines, algunos son modificados para la agregación o mayor producción de algún antioxidante, vitaminas o aminoácido, como Römer y colaboradores en el 2000 quienes agregaron el gen *cr1* para obtener mayor producción de beta caroteno, ya que este caroteno es provitamina A dándole valor agregado nutricionalmente. Otros modificaron su genoma para ser resistentes a compuestos químicos (plaguicidas), enfermedades y plagas, reduciendo gastos en su producción. Por lo que existen reportes sobre la variación en la concentración de licopeno en frutos modificados genéticamente con diferentes genes. Sin embargo, no existe información sobre la evaluación del licopeno en frutos modificados con el gen *TomloxB* en anti-sentido.

3.- JUSTIFICACIÓN

Debido a que México es uno de los principales exportadores de tomate (*Solanum lycopersicum*) en todo el mundo, es deseable la aplicación de nuevas tecnologías postcosechas que aumenten su vida de anaquel, sin afectar sus propiedades nutricionales y organolépticas. Una de estas tecnologías es la utilización de tomates genéticamente modificados los cuales poseen un silenciamiento postranscripcional que provoca una menor producción de enzimas que participan o interfieren en la ruta metabólica del etileno, resultando con ello una maduración más prolongada.

Uno de los antioxidantes más abundantes en el tomate es el licopeno, este caroteno además de actuar como antioxidante y secuestrador de radicales libres es responsable de la coloración roja del tomate, siendo este un indicador del grado de madurez del tomate.

La ingesta licopeno es importante en la salud humana puesto que está comprobado científicamente que ayuda a prevenir diversas enfermedades metabólicas, esto es debido a su actividad antioxidante.

Debido a la importancia del licopeno en la salud humana y dándole atributos organolépticos al fruto, se requiere un análisis sobre el contenido de este caroteno en tomates transgénicos, los cuales poseen un silenciamiento postranscripcional del gen que codifica la lipoxigenasa y estudiar su interacción o dependencia con esta enzima.

4.- HIPÓTESIS

Según Rao y colaboradores en el 2006 la concentración de licopeno en tomate fresco (*Solanum lycopersicum*) es de 0.72 a 20 mg/100g base húmeda. En el presente trabajo se cuantificó licopeno de tomates genéticamente modificados los cuales presentan un silenciamiento en el gen que codifica la lipoxigenasa, actualmente la relación entre actividad lipoxigenasa y la senescencia del fruto no se tiene bien elucidada por lo que existen hipótesis entre una posible relación de la actividad lipoxigenasa y la producción de etileno, estudios in vitro han demostrado que podría haber una posible conexión pero muchos experimentos in vivo demuestran que no hay alguna relación, debido a esto faltan más análisis para elucidar la participación de LOX en la senescencia del fruto. Una de las hipótesis explica una posible conexión entre la enzima lipoxigenasa y la síntesis de etileno, en ella expone que la lipoxigenasa al catalizar los ácidos grasos poliinsaturados libera radicales alcoxi, actuando este como un biocatalizador en la síntesis de etileno a partir 1-aminociclopropano-1-carboxilato y por otro lado el etileno estimula la síntesis de ARNm que codifica a la enzima fitoeno sintasa la cual participa en la ruta de los carotenoides produciendo fitoeno, siendo este precursor del licopeno. Debido a lo anterior se tiene como hipótesis que el silenciamiento del gen *TomloxB* podría modificar la producción de licopeno.

5.- OBJETIVOS

5.1.- Objetivo general:

Evaluar el efecto del silenciamiento del gen *TomloxB* sobre la producción de licopeno en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* TA234).

5.2.- Objetivos específicos:

- Determinar la actividad de LOX en sus diferentes estadios de maduración.
- Evaluar la producción de licopeno en tomate genéticamente modificado durante su vida postcosecha en epicarpio y mesocarpio.
- Determinar la relación entre el color y la síntesis de licopeno en frutos modificados genéticamente.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Metodología general

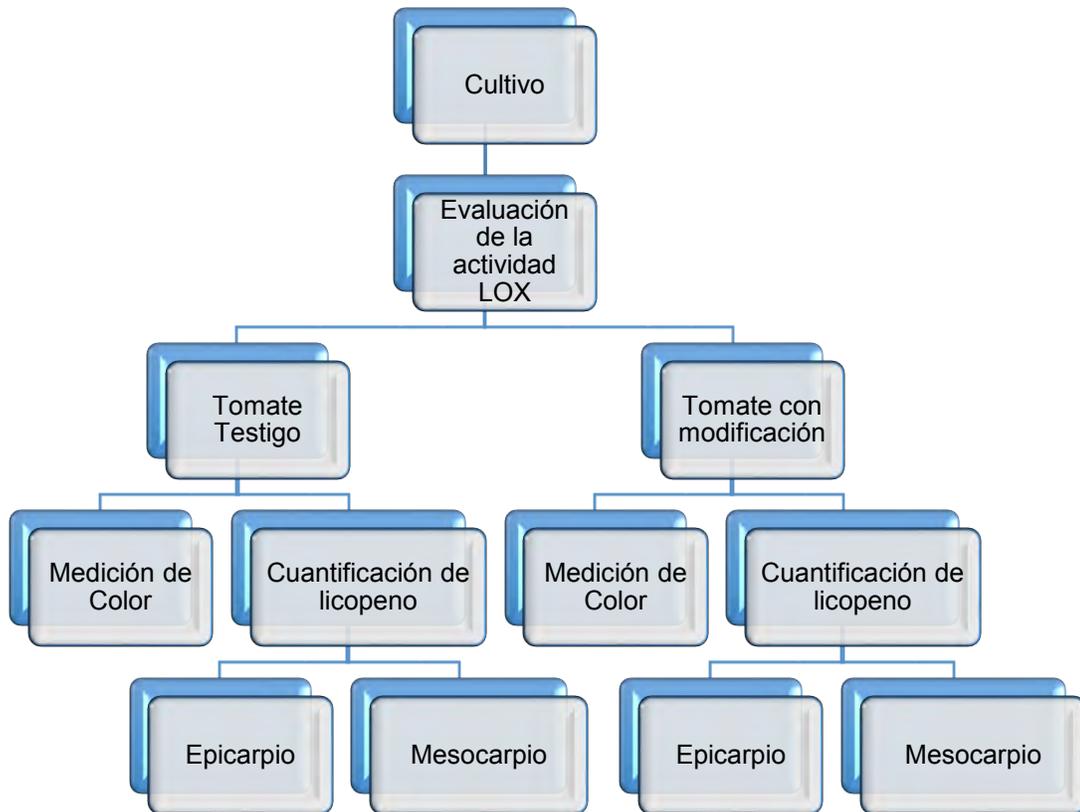


FIGURA 15: Metodología general para cumplir los objetivos del proyecto.

Como se puede mostrar en la **FIGURA 15** primero se realizó el cultivo de 3 líneas transgénicas y una línea sin modificación genética (línea testigo), todas serán cultivadas en las mismas condiciones, posterior a su cosecha se realizó la evaluación de la actividad lipoxigenasa en 5 estadios de maduración, esto con la finalidad de observar si el gen de interferencia sigue expresándose. Una vez evaluado la actividad LOX, se determinó el color como concentración de licopeno en mesocarpio y epicarpio a partir del estadio maduración "rosado".

6.2.- Diseño de experimentos

Una vez evaluada la actividad LOX se empleó un diseño de experimentos, el cual fue completamente al azar de 2x2x8, donde se evaluó tanto el tomate testigo como los transgénicos a partir del estadio de maduración "rosado" cada 4 días hasta llegar al día 26, teniendo como variables de respuesta: °Hue, Cromo, L, concentración de licopeno en mesocarpio y epicarpio.

TABLA 9: Diseño de experimentos

Tomate	Muestras	Tiempo postcosecha
Testigo	Mesocarpio	Rosado
		Rosado + 4 días
		Rosado + 8 días
		Rosado + 12 días
		Rosado + 16 días
		Rosado + 20 días
		Rosado + 24 días
		Rosado + 26 días
	Epicarpio	Rosado
		Rosado + 4 días
		Rosado + 8 días
		Rosado + 12 días
		Rosado + 16 días
		Rosado + 20 días
		Rosado + 24 días
		Rosado + 26 días
	Mesocarpio	Rosado

Genéticamente modificados		Rosado + 4 días
		Rosado + 8 días
		Rosado + 12 días
		Rosado + 16 días
		Rosado + 20 días
		Rosado + 24 días
		Rosado + 26 días
	Epicarpio	Rosado
		Rosado + 4 días
		Rosado + 8 días
		Rosado + 12 días
		Rosado + 16 días
		Rosado + 20 días
		Rosado + 24 días
Rosado + 26 días		

Todo el procedimiento se llevara a cabo a temperatura de 25 °C

6.3.- Cultivo y cosecha de la materia prima

La variedad de tomates que se utilizó en este trabajo es TA234, estas fueron cultivadas invernadero ubicado en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Tecnológico Nacional de México campus Veracruz donde fueron sembradas 3 líneas transgénicas: 5.1C, 1I y 6H, así como una línea sin modificación genética la cual será el tomate testigo, todas se cultivaron en las mismas condiciones que a continuación se presentan:

- **Temperatura:** 25°C.
- **Riego:** El riego se realizó por aspersión cada 2 días.

- **Fertilización:** Como sustrato se utilizó una mezcla de 80/20 tierra arcillosa-lombricomposta, posteriormente se fertilizo cada 2 semanas utilizando triple 17.
- **Control de maleza:** El control de la maleza se realizó manualmente.
- **Control de plagas:** Se utilizó un control químico (**FIGURA 16**) .
- **Poda y tutorado:** La poda y tutorado se realizaba cada semana.
- **Cosecha:** Los tomates serán cosechados previos a su maduración de acuerdo a la carta del color de tomates recomendado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, puesto que, se llevará a cabo un análisis del licopeno. Se realizará un estudio paralelo, cuantificando el licopeno presente en tomates que no fueron modificados genéticamente.



FIGURA 16: Insecticida utilizado en el cultivo de tomate.



FIGURA 17: Invernadero de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos.

6.4.- Protocolo de esterilización de desechos y bioseguridad

Todo el material biológico genéticamente modificado (frutos, semillas, flores, etc.) fue esterilizado en autoclave (Eco SHEL mod. CVQ-1085L.) a 121 °C y 1.5 atm durante 15 minutos antes de ser desechado, esto para evitar la diseminación accidental del material genético.

6.5.- Actividad LOX

Para realizar la actividad LOX se utilizaron los siguientes materiales, equipos y reactivos:

Materiales

Tubos eppendorf de 2 mL, nitrógeno líquido, disco con membrana de 42 μ L y tubos de ensayo con tapas.

Equipos

Centrifuga, baño maría y espectrofotómetro

Reactivos

Buffer de fosfato pH 7, ácido linoleico, Tween 20 y NaOH 1N

El procedimiento es el siguiente:

Obtención de la muestra

Como primer paso se obtuvo el mesocarpio y epicarpio de 5 tomates (sin semillas), seguido de ello se trituro en un mortero con nitrógeno líquido; el extracto obtenido se colocó en tubos eppendorf y se centrifugo a 14 000 rpm durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante con una pipeta desechable de 3 mL posteriormente se colocó en un segundo tubo eppendorf, seguido de ello se centrifugo a 12 000 rpm durante 3 min. Se separó el sobrenadante y se filtró en discos con membrana de 0.42 nm de poro, el extracto obtenido se utilizó en la reacción.

Preparación del sustrato

Para ello se colocó 2 mL de buffer de fosfato en un matraz aforado, se le adiciono 42 µL de ácido linoleico, se agito manualmente, seguido de ello se agregó 39 µL de Tween 20 y 1 ml de buffer. Después se agregó 250 µL de NaOH 1 N se agito manualmente, posteriormente se aforo con buffer fosfato, a partir de ese momento se mantuvo en oscuridad (envolviéndolo en papel aluminio) y en refrigeración hasta su utilización.

Reacción LOX

La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo para ello; se agregó 40 µL de muestra, añadiendo 1360 µL de buffer y 2640 µL de sustrato seguido de ello, se colocó a baño maría con temperatura de 37° C durante 10 min, después, se colocó en un baño de hielo a una temperatura de 5 °C, esto con la finalidad de detener la reacción.

Lectura de la reacción

La lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro Agilent modelo 8453 donde se leyó primero el blanco (compuesto solo de 1360 μL buffer y 2640 μL sustrato) a 234 nm, después se leyeron las muestras. Todo se hizo por triplicado utilizando el método de Gökmen donde la unidad de actividad de la lipoxigenasa es definida como el incremento de la absorbancia de 0.001 a 234 nm por minuto por mg de proteína, utilizando una curva de calibración de Bradford (Gökmen *et al.*, 2002).

6.6.- Color

Se utilizó un colorímetro de la marca Hunter Lab, Modelo 4500L, empleando la escala CIE, para ello se tomaron muestras de cada línea y se registraron los valores de L^* , a^* y b^* en 3 puntos diferentes de cada fruto.

Seguido de ello, se calculó el chroma con la siguiente ecuación:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

Donde C^* es el Chroma que nos indica la saturación del color, mientras que a^* es la coordenada que representa desde el tono verde hasta el color rojo y b^* es la coordenada que se representa desde el tono amarillo hasta el azul. De la misma manera se calculó los $^{\circ}\text{Hue}$ con la siguiente ecuación:

$$h = \arctan(b^*/a^*)$$

Donde h son los $^{\circ}\text{Hue}$ que indica el tono del color, a^* y b^* indican las coordenadas antes mencionadas.

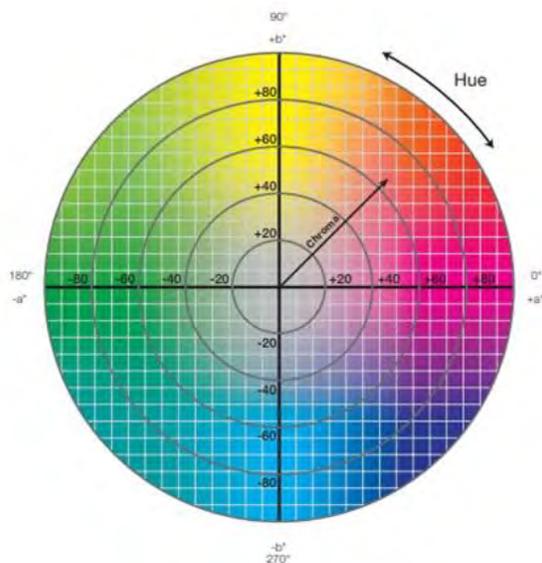


FIGURA 18: Diagrama de color según la escala CIE (L*a*b*).

6.7.- Cuantificación de licopeno

Reactivos

Se utilizó n-hexano (Merck) grado HPLC, acetona (Merck) grado HPLC, etanol absoluto (Merck) con una pureza de 99.8 % y Agua destilada.

Equipos

Se utilizó una balanza analítica Sartorius modelo BL 2100 (Alemania), una parrilla con agitador y un espectrofotómetro Agilent® modelo 8453 (China).

Preparación de la muestra

Todos los pasos descritos a continuación se realizaron con la luz tenue y a una temperatura de 25 °C.

Como primer paso se realizó la separación manual del epicarpio y el mesocarpio, las cuales se analizarán por separado, posteriormente se pesaron 500 mg de muestra y se pulverizaron con nitrógeno líquido, seguido de ello, el material

pulverizado se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL forrado con papel aluminio donde se incorporó 60 mL de una mezcla de Hexano/acetona/etanol (2:1:1:) la cual se mantuvo en agitación magnética durante 3 h, pasado ese tiempo se le adicionaron 3 mL de agua destilada, dejándola reposar 5 min, esto con fin de separar las fases polares (agua, etanol y acetona) de las no polares (hexano y licopeno), finalmente se colectó la fase superior (hexano y licopeno) y se determinó su absorbancia por medio del espectrofotómetro a una longitud de 503 nm, utilizando hexano como blanco.

Cuantificación de licopeno

La concentración de licopeno fue estimada utilizando el coeficiente molar de extinción en hexano, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Licopeno} \left(\frac{mg}{100g} \right) = \frac{(A)(PM)(V)(100)}{(\epsilon)(P)(L)}$$

Donde:

A = absorbancia leída a 503 nm

V = volumen total la fase superior

PM = peso molecular del licopeno (536.9 g/mol)

P = peso de muestra

ϵ = coeficiente de extinción molar del licopeno en hexano (ϵ M/1 cm) del licopeno (17.2×10^4 M/cm).

L = longitud de la celda (1 cm)

6.8.- Análisis estadístico

Los datos se expresan como valor medio ya que muestran una distribución normal, los cuales fueron analizados por ANOVA de una sola vía para cada una de las respuestas. Para comparar los resultados de todas las variables de respuestas se utilizó Tukey. El nivel de significación estadística se estableció para un valor de $p < 0,05$.

7.- RESULTADOS

7.1.- Relación de los estadios de maduración con los grados HUE

Antes de realizar la actividad LOX, se estableció la relación entre los estadios de maduración fisiológicos y los °Hue con la finalidad de obtener datos cuantitativos a partir de datos subjetivos, estos se muestran en la **TABLA 10**

TABLA 10: Relación de los °Hue con los 6 estadios de maduración del tomate.

Estadio de maduración						
h	111.79 ± 2.56	89.81 ± 3.21	78.12 ± 4.87	59.77 ± 7.01	45.43 ± 4.73	37.23 ± 2.02

7.2.- Actividad LOX

La actividad de LOX se midió en 5 estadios de maduración que va desde el estadio "quebrado" hasta el "rojo". En todos los estadios de maduración los frutos Testigos tuvieron mayor actividad enzimática esto como consecuencia del silenciamiento del gen *TomloxB*, siendo más alta en el estadio "quebrado", mientras que 5.1c y 1l tuvieron mayor actividad en el estadio de maduración "rojo" y la línea 6H en el estadio "rayado", por otra parte del estadio "quebrado" al "rosado" hubo diferencia significativa (0.05) de los tomates genéticamente modificados con respecto al tomate testigo, mientras la línea 6H tuvo diferencia significativamente más baja (0.05) en todos los estadios de maduración fisiológico con respecto al tomate testigo. A continuación se muestran en la **FIGURA 19**, los resultados de la actividad lipoxigenasa medida en μkat empleando el método de Gökmen.

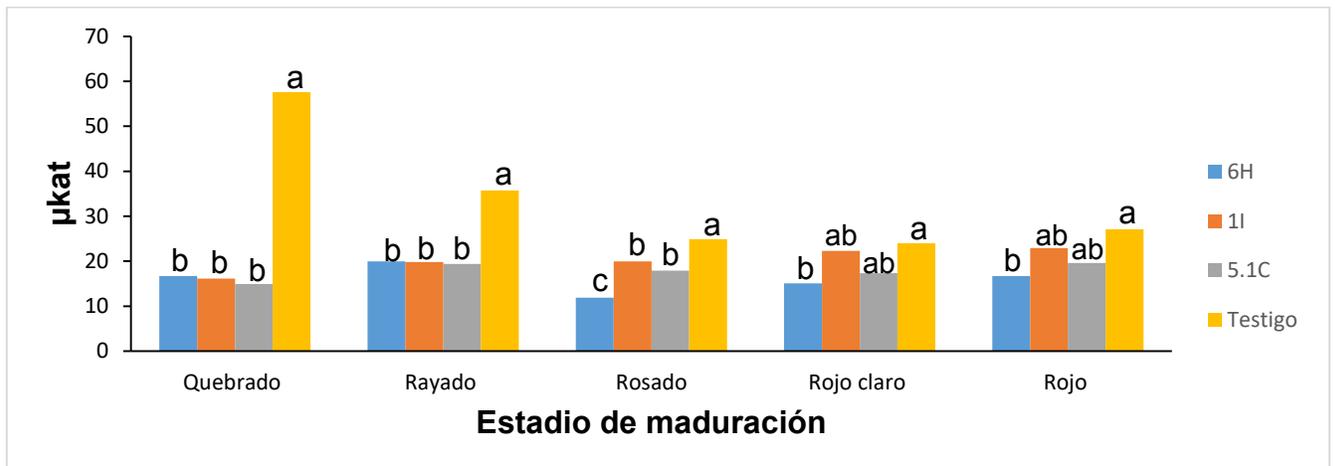


FIGURA 19: Actividad LOX en diferentes estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$).

Algunos autores como Leon en el 2017 y Ferrie en el 1994 reportan que la mayor actividad enzimática en el estadio de maduración "rojo" (Ferrie *et al.*, 1994; León, 2017) mientras que Sheng en el 2000 reporta mayor actividad en el estado "rayado" (Sheng *et al.*, 2000) y Griffiths en 1999 en el rayado más 3 días (Griffiths *et al.*, 1999) estas diferencias donde expresa su mayor actividad podrían deberse a la técnica de maduración, la fecha de corte, el genotipo o al método de cuantificación, por otra parte se debe reportar datos cualitativos para obtener una mejor comparación, ya que los estadios de maduración son datos subjetivos.

7.2.- Color

Se midieron parámetros como lo son la luminosidad, Chroma y grados Hue a partir del estadio de maduración "rosado" evaluándolo cada 4 días hasta llegar al día 26 tanto en el tomate testigo como en las 3 líneas transgénicas como se muestra en la **TABLA 11** donde por apariencia visual se puede apreciar que los tomates testigos llegaron a su senescencia en el día 8, mientras la línea 6H mostro signos de

senescencia el día 16, esto es resultado del silenciamiento anti-sentido del gen *TomLOXB*, ya que la línea 6H mantuvo diferencia significativa en todos los estadios de maduración con respecto a la línea testigo.

TABLA 11: Cinética del tomate a los 26 días.

Días	1	4	8	12	16	20	24	26
Testigo								
6H								
11								
5.1C								

A continuación se muestran los resultados de la medición de los parámetros del color:

Luminosidad

En el día 1 tanto líneas transgénicas como la líneas testigo tuvieron su máxima luminosidad, mientras que en los días siguientes esta disminuye esto podría deberse a que la lipoxigenasa cataliza la hidroxidación de ácidos grasos poliinsaturados perdiendo la luminosidad con el pasar del tiempo, Por otra parte en el día 1, 12 y 16 las líneas transgénicas no mostraron diferencia significativa con respecto a la línea testigo, y en el día 4 y 24 la línea 11 mostro diferencia significativa con los tomates testigos, mientras que 6H en día 8 mostro diferencia significativa más alta que el tomate testigo como se puede apreciar en la **FIGURA 20**.

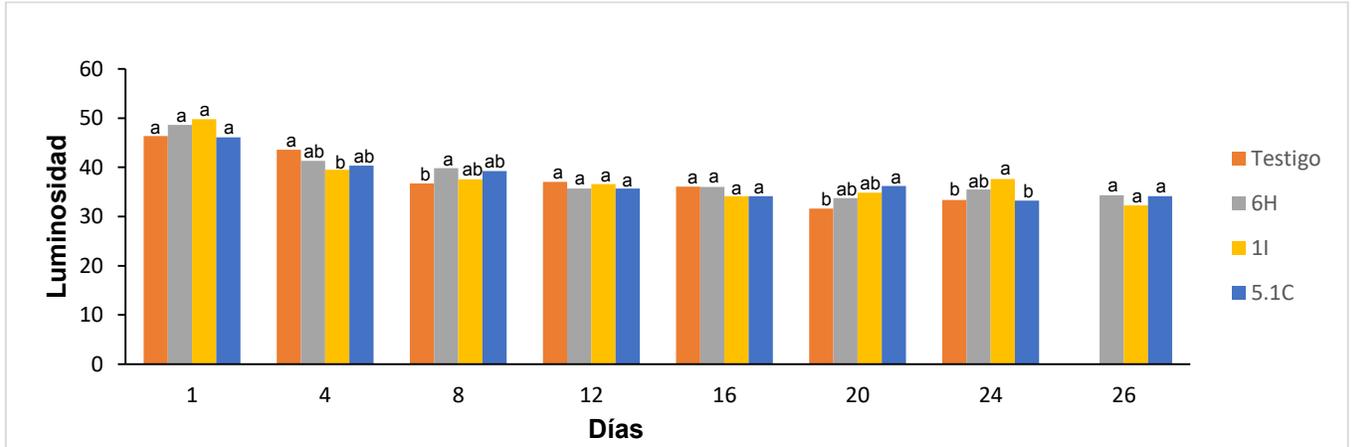


FIGURA 20: Determinación de la luminosidad en los 6 estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$).

Chroma

En el parámetro chroma donde se mide la saturación del color no hubo diferencia significativa de los tomates transgénicos con respecto al tomate testigo esto coincide con León en el 2017.

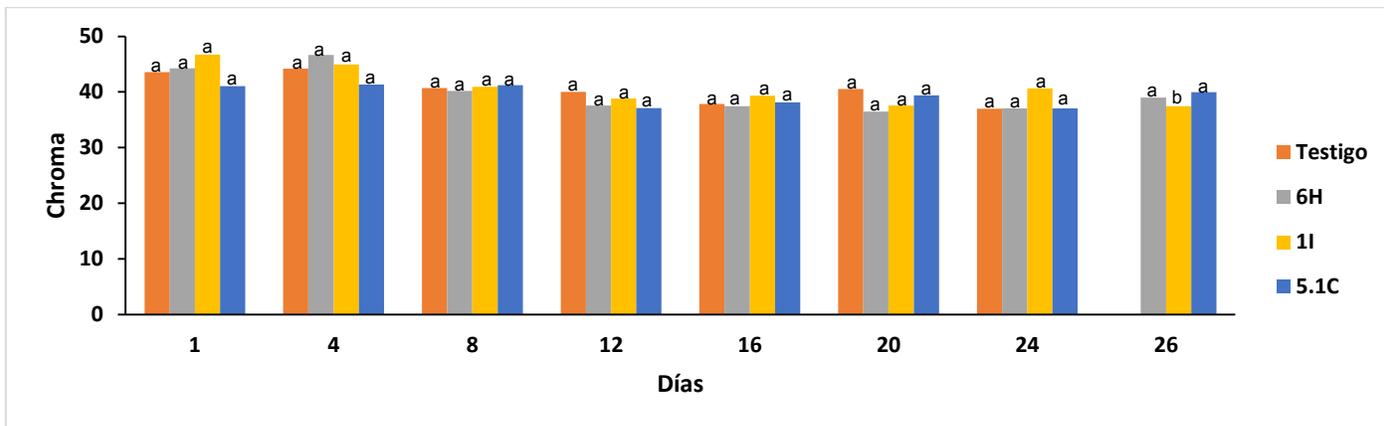


FIGURA 21: Determinación de la saturación en los 6 estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$).

°Hue

Los °Hue muestran el tono del color, siendo este un indicador visual del grado de madurez fisiológica tanto tomates genéticamente modificados como tomates testigos mostraron mayor unidades en el día 1 como se muestra en la **Figura 22** obteniendo tonos más cercanos al amarillo, por otra parte en el día 8 hubo diferencia significativamente más alta de la línea 6H con respecto a los tomates testigos esto podría estar relacionada a la concentración de licopeno.

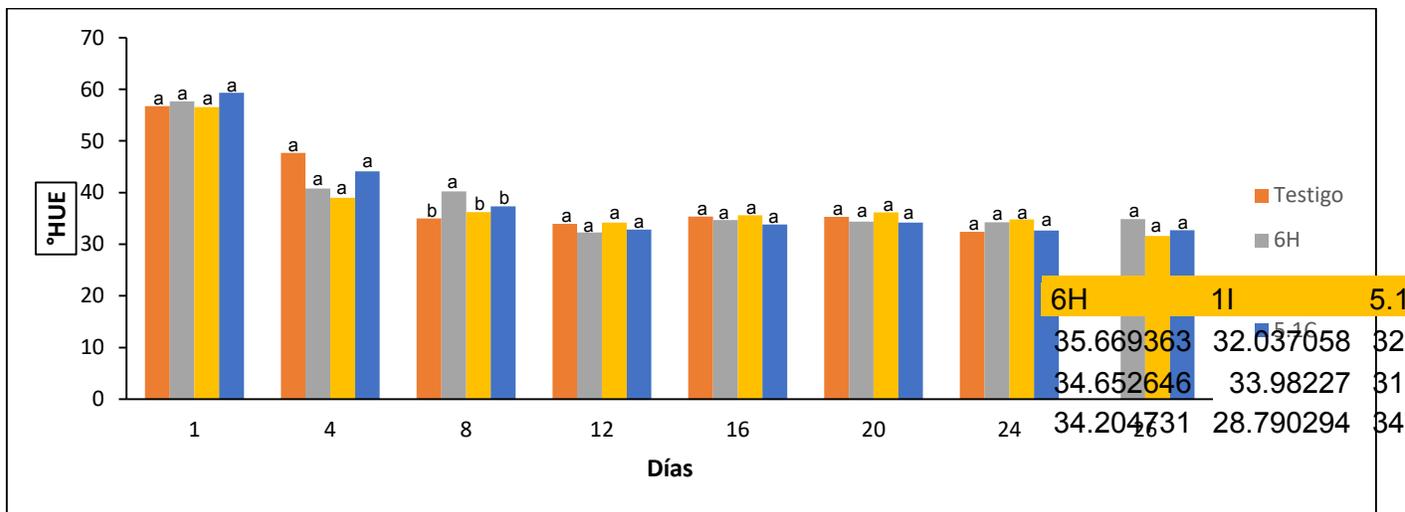


FIGURA 22: Determinación de °Hue en los 6 estadios de maduración. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$).

7.4.- Determinación del licopeno

La cuantificación de licopeno se realizó tanto en el epicarpio (piel) como en el mesocarpio (pulpa), elaborando una cinética donde se analizaron los frutos cada 4 días, partiendo desde el estadio de maduración "rosado" donde el fruto silvestre perdió su integridad física el 25, mientras que frutos transgénicos aun persistían.

Concentración de licopeno en el mesocarpio

En el estudio estadístico nos indica que en el mesocarpio no existe alguna diferencia significativa del día 1 al 24. También se puede apreciar que el tomate testigo y la línea transgénica 5,1C alcanza una mayor concentración de licopeno en el día 20 (43 mg / 100 g epicarpio y 43.62 mg / 100 g epicarpio) mientras que las línea 1I lo hace en el día 24 (43.27 mg / 100 g epicarpio) y la línea 6H en el día 26 (42.60 mg / 100 g epicarpio), esto es debido al silenciamiento anti sentido del gen que codifica a la LOX provocando una madurez más prologada y así mismo una acumulación máxima de carotenoides más tardía en el mesocarpio.

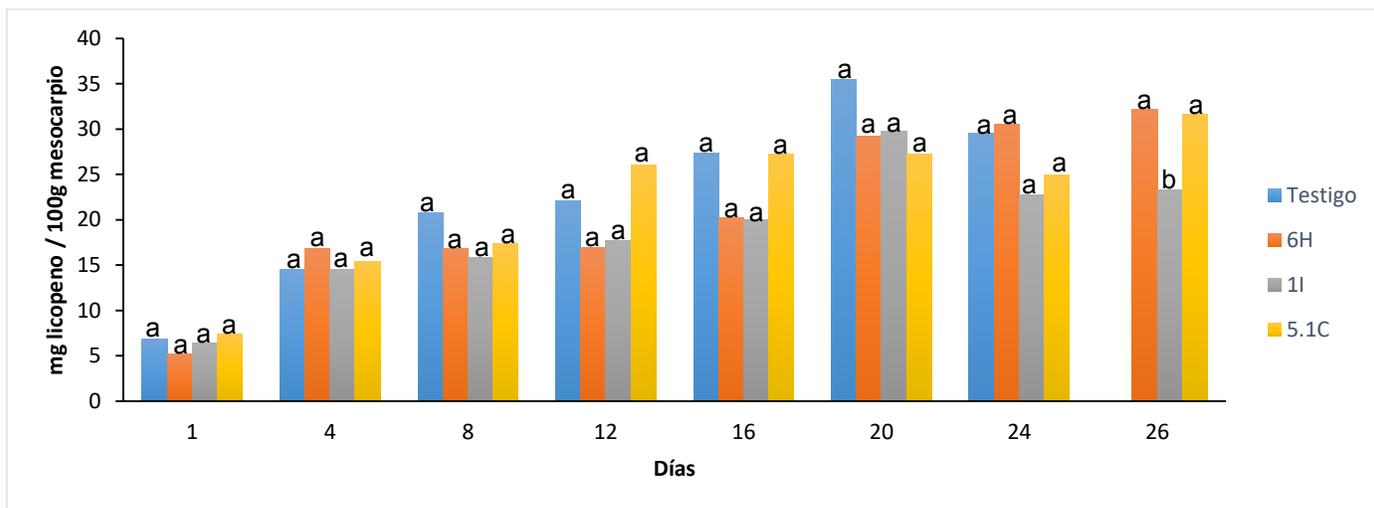


FIGURA 23: Concentración de licopeno en el mesocarpio. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$).

Diversos autores han propuesto una posible conexión entre el etileno con la lipoxigenasa, ya que la lipoxigenasa al catalizar la hidropoxidación de ácidos grasos poliinsaturados, esta produce radicales alcoxi que son utilizados para catalizar la síntesis de etileno a partir de ACC (Wang y Yang, 1987), y el etileno a su vez estimula los RNAm que codifican algunas enzimas que intervienen en la ruta metabólica de los carotenoides, provocando con ello una producción exponencial más tardía.

Concentración de licopeno en epicarpio

Estudios estadísticos indican que no hay diferencia significativa los días 1,2,16, 24 y 26, siendo los días 8 y 12 donde existe una diferencia entre la línea 6H y la silvestre, esto podría estar relacionado a su baja actividad LOX.

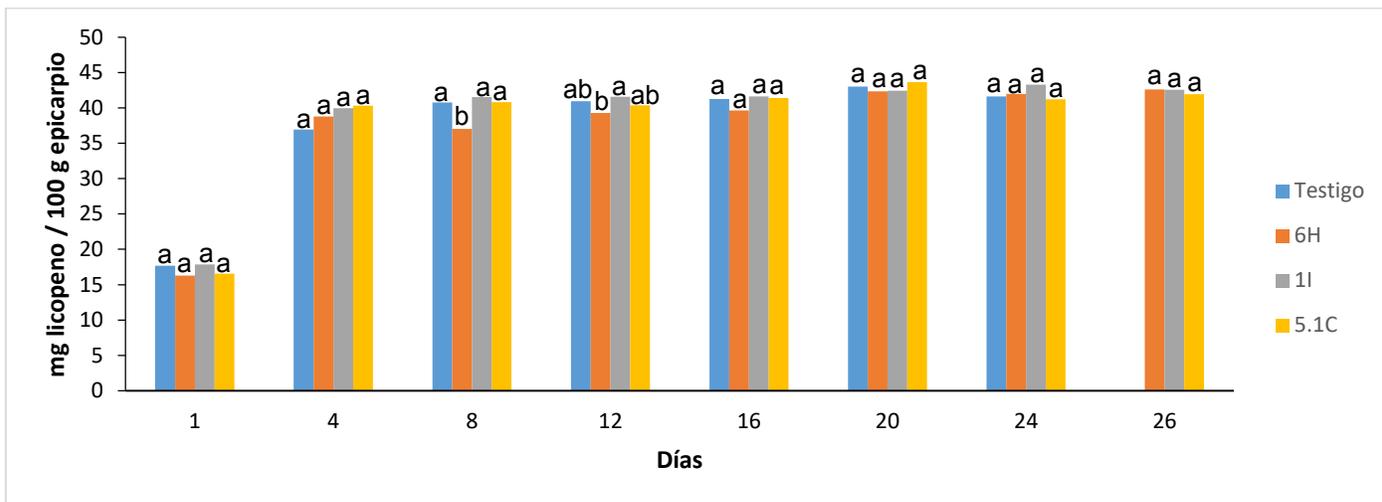


FIGURA 24: Concentración de licopeno en el epicarpio. Letras diferentes indican significancia estadística ($P < 0.05$).

8.- CONCLUSIONES

- El silenciamiento del gen *TomloxB* disminuyó significativamente la actividad LOX del estadio quebrado al rosado en las 3 líneas transgénicas, mientras que en la línea 6H disminuyó su actividad enzimática en todos los estadios de maduración, siendo así la línea con menor actividad LOX.
- Tanto los tomates testigos como los tomates genéticamente modificados tuvieron mayor luminosidad en el día 1, mientras que en los días siguientes esta disminuye esto podría deberse a que la lipoxigenasa cataliza la hidroperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados perdiendo la luminosidad con el pasar del tiempo.
- La saturación del color (Chroma) no se vio afectada por el silenciamiento del gen *TomloxB*.
- La línea 6H obtuvo mayor °Hue (40.21) en el día 8 a comparación de las demás obteniendo un tono más cercano a amarillo; esto podría estar relacionado con la concentración de licopeno.
- El silenciamiento del gen *TomloxB* no disminuyó significativamente la producción del licopeno en el mesocarpio a partir del estadio de maduración "Rosado".
- La línea 6H obtuvo una menor concentración de licopeno en el epicarpio en el día 8 y 12 a comparación de los frutos testigos. Esto podría deberse a que la línea 6H fue la que obtuvo menor actividad enzimática en los estadios de maduración analizados, ya que estudios han demostrado que una menor actividad LOX retrasa la aparición del pico máximo del etileno (Velázquez *et al.*, 2020), siendo el licopeno fuertemente influenciado por el metabolismo del etileno.

9.- RECOMENDACIONES

- Debido a que muchas líneas muestran comportamientos diferentes a través del tiempo en cuanto a su actividad lipoxigenasa, es deseable realizar un estudio de estabilidad genética.
- Debido a la pandemia SARS-CoV-2 (COVID-19) este proyecto no fue concluido como se planteó en un inicio, por lo que se recomienda una evaluación en conjunto de la actividad lipoxigenasa, respiración y la cuantificación de licopeno, esto es para tener más elucidado la dependencia de estas 3 variables.

ANEXOS

10.- ANEXOS

10.1.- Curva patrón Bradford

La curva de calibración de Bradford se realizó mediante lecturas en un espectrofotómetro Agilent modelo 8453 (China) a 595 nm.

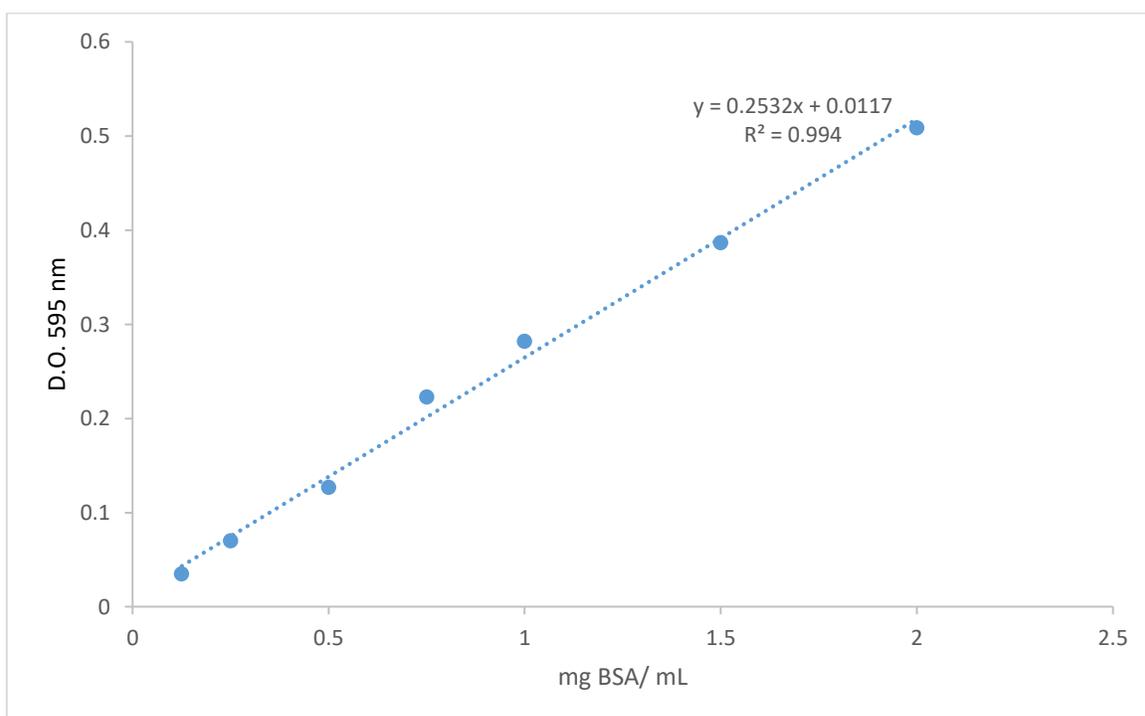


FIGURA 25: Curva de calibración de Bradford.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, S., & Rao, A. V. (2000). Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, 739-744.
- Aràndiga et. al., G. A. (2008). Estudio del licopeno del tomate como colorante natural desde la perspectiva analítica e industrial. Obtenido de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/5544/Resum.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Asenjo, J., Morales , L., Sainz , R., & Tapia , L. (2011). *PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES VOLÁTILES DURANTE MADURACIÓN DE LOS FRUTOS* .
- Astorga, F., Luna , N., Gómez, G., Esteban, W., Pacheco, P., Angel , Y., & Bastías , E. (2017). variación estacional del contenido de licopeno en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de salinidad y exceso de boro en el valle de Illuta, norte de Chile. *IDESIA*, 35(4), 105-110.
- Bird, C., Ray, J. A., Fletcher, J., Boniwell, J., Bird, A., Teulie, C., . . . Schuch , W. (1991). Using Antisense RNA to Study Gene Function: Inhibition of Carotenoid Biosynthesis in Transgenic Tomatoes. *Bio/Technology*, 9(7), 635–639.
- Brash, L. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 274(34).
- Calvo, B. S., Gómez, C. C., López, N. C., & Royo, B. M. (2012). *Nutrición, Salud y Alimentos Funcionales*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Candelas, M. G., & Alanís, M. G. (2002). Extracción y cuantificación por HPLC de licopeno en tomate y polvo de tomate.

- Candelas, M. G., Alanis, M. G., & Del Río, F. (2006). Cuantificación del licopeno y otros carotenoides en tomate y polvo de tomate. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 10(19), 1-11.
- Candelas, M., Alanis, M., Bautista, M., Del Río, F., & García, C. (2005). Contenido del licopeno en jugo de tomate secado por aspersion. *Revista Mexicana de la Ingeniería Química*, 4(3), 299-307.
- Cardona, E. M., Ríos, L. A., & Restrepo, G. M. (2006). Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicum esculentum*). *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 13(2), 44-53.
- Castro, K., Restrepo, M. L., Taborda, G., & Quintero, G. A. (2009). Intensity of basic tastes of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in six maturity stages. 7(1).
- Cestoni, F., De Jovel, G., & Urquilla, A. (2006). Perfil de negocios de tomate cherry o cereza hacia el mercado de los Estados Unidos (en línea). Obtenido de http://www.academia.edu/7215115/PERFIL_DE_NEGOCIOS_DEL_TOMATE_CHERRY
- Cohen, L. A. (2002). review of animal model studies of tomato carotenoides, lycopene, and cancer chemoprevention. *Biol. Med.*, 864-868.
- Collins, J. K., & Perkins-veazie, P. (2006). Lycopene: from plants to Humans. *Hort Science*, 41(5), 1135-1144.
- Cruz, R. M., González, J., & Sánchez, P. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 6-15.
- Dachtler, M., DKohler, K., & Albert, K. (1998). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic identification of lutein and zeaxanthin stereoisomers in bovine retina using a C30 bonded phase. *Journal of Chromatography B*, 720(1), 211-216.
- Díaz, V. (2014). *Perfil comercial tomate*. Guatemala . Obtenido de <http://web.maga.gob.gt/download/Perfil%20tomate.pdf>

- El Norte de Castilla. (2017). *El tomate, la fruta azteca*. Recuperado el 18 de Noviembre de 2018, de <http://www.ienva.org/el-tomate-una-despensa-de-minerales-y-vitaminas.pdf>
- Espitia, P. (2006). *Tesis de Lic en Ingeniería: Cuantificación del licopeno a partir de tomate (Lycopersicon esculentum mill) de desecho*.
- Fao. (2016). *exportación de tomate*. Obtenido de <http://www.fao.org/faostat/es/#data>
- FAOSTAT. (2017). *Datos sobre alimentación y agricultura*. Obtenido de producción de tomates: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>
- Ferrie, B., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C., & Rothstein, S. (1994). The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol*, 106(1), 109-118.
- Fundación Española de Nutrición. (2013). *Tablas de composición de alimentos: Tomate*. España. Recuperado el 18 de Noviembre de 2018, de http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/tomate.pdf?fbclid=IwAR3kWk-JcEMASPcQTSUxqh_5N53Du8nIMdECTaqI1FGGcmTy--95vtsVxgE
- Gardner, H. (1979). Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 220-229.
- Gil, H. Á. (2010). *Composición y calidad nutritiva de los alimentos* (Segunda ed.). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Gómez, P., & Camelo, A. (2002). Calidad Postcosecha de tomates almacenados en atmósferas controladas. *Horticultura Brasileña*, 20(1), 38-43.
- Gong, S., & Kenneth, A. (1994). Predicting steady-state oxygen concentrations in modified-atmosphere packages of tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(1), 546-550.

- Griffiths, A., Prestage, S., Linforth, R., Zhang, J., Taylor, A., & Grierson, D. (1999). Fruit-specific lipoxygenase suppression in antisense-transgenic tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 17(1), 163–173.
- Hart, D. J., & Scott, J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1), 101-111.
- Heuvelink, E. (2005). *Tomatoes*. Londres: CABI Publishing.
- Hobson, G., & Grierson, D. (1993). *Tomato*. London: Biochemistry of Fruit Ripening.
- ISAAA. (2017). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2017*. Obtenido de <http://www.isaaa.org/>
- Jenkins, J. A. (1948). The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 379-392.
- Karder, A., Stevens, M., Albright-Holton, M., Morris, L., & Algazi, M. (1977). Effect of fruit ripeness when picked on flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 102(1), 724-731.
- Khachick, F., Carvalho, L., Bernstein, S., Muir, G. J., Zhao, D., & Katz, N. B. (2002). *Química, distribución, y el metabolismo de los carotenoides del tomate y su impacto en la salud humana*. Exp Biol Med.
- Lambelet, P., Richelle, M., Bortlik, K., Franceschi, F., & Giorib, A. M. (2008). Improving the stability Z-isomers in isomerised tomato extracts. *Food Chemistry*, 156-161.
- León, E. (2017). *Efecto del silenciamiento de TomloxB sobre la maduración de frutos de tomate (Solanum lycopersicum)*. Veracruz: TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO Instituto Tecnológico de Veracruz .

- López, L. M. (2016). *Manual técnico de cultivo del tomate Solanum lycopersicum*. San José, Costa Rica: INTA. Obtenido de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf>
- Martí, G., & Díaz, S. (2008). *Estudio del licopeno del tomate como colorante natural desde la perspectiva analítica e industrial*.
- Martínez, M., Balois, R., Alia, I., Cortes, M., Palomino, Y., & López, G. (2017). Postharvest fruits: maturation and biochemical changes. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19(1), 4075-4087.
- Mehta, R., Cassol, T., Li, N., Ali, N., Handa, A., & Mattoo, A. (2002). Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature Biotechnology*, 20(6), 613–618 .
- Meng, C., Yang, D., Ma, X., Zhao, W., Liang, X., Ma, N., & Meng, Q. (2016). Suppression of tomato SINAC1 transcription factor delays fruit ripening. *Journal of Plant Physiology*, 193(1), 88–96.
- Mínguez-Mosquera, M. (1997). *Clorofilas y Carotenoides en Tecnología de Alimentos*. España: Secretariado de publicaciones Universidad de Sevilla.
- Montes, C., Campos, J., Pons, A., & Heredia, F. J. (2004). Instrumental factors influencing absorption measurements for fluid food color determination. *Journal of AOAC International*, 87(1), 632-638.
- Murray, M., Birdsall, T., Pizzorno, J., & Reilly, P. (2004). *La curación del cáncer métodos naturales*. Barcelona: Ediciones Robinbook.
- Núñez, N., García, N., Medina, M., Miranda, R., Rodríguez, A., & Hernández, E. (2006). *Efecto sobre el contenido de licopeno del tomate (Lycopersicon esculentum var. gironda) sembrados en invernaderos bajo diferentes sistemas de cultivos con y sin injertos*.
- Ordóñez, A. L., Balanza, M. E., Martín, F. R., & Flores, C. A. (2009). Estabilidad del Carotenoide Licopeno en Tomates en conserva. Obtenido de Estabilidad del

Carotenoide Licopeno en Tomates en conserva:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v20n4/art05.pdf>

- Ordóñez, A., Balanza, M., Martín, F., & Flores, C. (2009). Estabilidad del carotenoide licopeno en tomates en conserva. *Información Tecnológica*, 20(4), 31-37.
- Parker, R. S. (1996). Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J*, 542-551.
- Periago, M. J., & Ros, G. (2001). Propiedades químicas, biológicas y valor nutritivo del licopeno. *AN. VET.*, 17(1), 51-66.
- Periago, M., Martínez-Valverde, I., Ros, G., & López, G. (2001). Propiedades químicas, biológicas y valor nutritiva del licopeno. *An. Vet*, 17(1), 51-66.
- Pinhero, R., Paliyath, G., Yada, R., & Murr, R. (1998). Modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 36(3), 213-224.
- Pirrung, C. (1986). Mechanism of a lipoxygenase model for ethylene biosynthesis. *Biochemistry*, 25, 114 –119.
- Porta , H., & Rocha , M. (2002). Plant Lipoxygenases. Physiological and Molecular Features. *Plant Physiol*, 15-21.
- QCom.es. (2018). *El tomate, el rey del huerto*. Recuperado el 18 de Noviembre de 2018, de http://www.qcom.es/alimentacion/sabias-q/el-tomate--el-rey-del-huerto_22980_4_23862_0_1_in.html?fbclid=IwAR0UJuP9bzo1SqdnCmuw_bqRUReF1x6uWPhW4CNL5zYV0smgtgz6oT4b4E8
- Ramón, D., & Calvo, M. D. (2001). Debate en torno a la comercialización de los alimentos transgénicos. *Arbor CLXVIII*, 661(1), 171-186.
- Rao , A. V., & Agarwal , S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. *Nutr. Res.*, 305-323.

- Rao , A. V., & Agarwal , S. (1998). Bioavaibility and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr. Cancer*, 199-203.
- Rao, A., Ray, M., & Rao, L. (2006). Lycopene. *Advances in Food and Nutrition Research*, 51(1), 99-164.
- Rodríguez et. al., Z. R.-R.-M.-H. (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *CENIC Ciencias Químicas*, 45(1), 139-147.
- Römer , S., Fraser, P., Kiano, J., Shipton, C., Misawa, N., Schuch, W., & Bramley, P. (2000). Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nature Biotechnology*, 18(1), 666–669.
- Saker, M., Salama, H., Salama, M., A., E.-B., & Abdel Ghany, N. (2011). Production of transgenic tomato plants expressingCry 2Ab gene for the control of some lepidopterousinsects endemic in Egypt. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 9(1), 149-155.
- Sander, L. C., Epler , K., Craft, N., & Wise , S. (1994). Development of Engineered Stationary Phases for the Separation of Carotenoid Isomers. *Anal. Chem*, 66(1), 1667-1674.
- Sander, L., Sharpless, K., & Pursch, M. (2000). C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 880(1), 189-202.
- Sandman, G. (2001). Carotenoid biosythesis and biotechnological application. *Biochem. Biophys*, 4-12.
- Sanz, L., Pérez, A., & Olías, J. (1992). La lipoxigenasa en el reino vegetal. H. Funciones fisiológicas asignadas. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 43, 287-290.

- Schwarz, S., Obermüller-Jevic, U., Hellmis, E., Koch, W., Jacobi, G., & Biesalski, H. K. (2008). Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. *The Journal of Nutrition*, 138, 49-53.
- Sheehy, R., Kramer, M., & Hiatt, W. (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *PNAS*, 85(23), 8805-8809.
- Sheng, J., Luo, Y., & Wainwright, H. (1999). Studies on lipoxygenase and the formation of ethylene in tomato. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(1), 69-71.
- Sthal, W., & Sies, H. (1996). Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Biochem Biophys*, 1-9.
- Sun, L., Yuan, B., Zhang, M., Wang, L., Cui, M., Wang, Q., & Leng, P. (2012). Fruit-specific RNAi-mediated suppression of SINCED1 increases both lycopene and β -carotene contents in tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 3097–3108.
- Takayama, M., Matsukura, C., & AriizumiHiro, T. (2017). Activating glutamate decarboxylase activity by removing the autoinhibitory domain leads to hyper γ -aminobutyric acid (GABA) accumulation in tomato fruit. *Plant Cell*, 36(1), 103–116.
- Tang, Y., Parmakhtiar, B., Simoneau, A. R., Xie, J., Fruehauf, J., Lilly, M., & Zi, X. (2011). Lycopene enhances docetaxel's effect in castration resistant prostate cancer associated with insulin-like growth factor I receptor levels. *Neoplasia*, 13, 108-119.
- THM. (05 de Septiembre de 2013). *Tecnología de Horticultura Mediterránea*. Obtenido de Tecnología de Horticultura Mediterránea: <http://www.horticulturablog.com>
- Valero, M. A., Vidal, A., Burgos, R., Calvo, F. L., Martínez, C., Luengo, L., & Cuerda, C. (2011). Meta-análisis del papel del licopeno en la diabetes mellitus tipo 2.

Nutrición Hospitalaria, 26(6), 236-1241. Obtenido de http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v26n6/07_revision_04.pdf

Velázquez , A., Medina, J., García, H., Vela, G., Torres, C., & León, G. (2020). Lipoxygenase and Its Relationship with Ethylene During Ripening of Genetically Modified Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 223-229.

Vergani, R. J. (2002). *Una breve historia del tomate*. Obtenido de <http://www.horticom.com/pd/imagenes/50/956/50956.pdf>

Waliszewski, K. N., & Blasco, G. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. *Salud Publica Mex*, 52(1), 254-265. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v52n3/10.pdf>

Yang, S., & Hoffman, N. (1984). "Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Plant Physiol*, 35, 155-189.

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS Y NO PLAGIO

En la Ciudad de Veracruz, Veracruz a los 20 días del mes enero de 2021. El que suscribe Irving Celestino Romero Lascurain por mi propio derecho y en calidad de autor de la tesis titulada: PRODUCCIÓN DE LICOPENO EN DIFERENTES ESTADIOS DE MADURACIÓN DE TOMATES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (*Solanum lycopersicum* TA234) (en lo sucesivo la "TESIS") manifiesto que cedo a título gratuito la totalidad de los derechos patrimoniales de autor que sobre ella me corresponden, a favor del Tecnológico Nacional de México (en lo sucesivo el "TecNM"). Lo anterior en términos de los antecedentes y consideraciones siguientes:

- I. Que la presente cesión de derechos de la "TESIS" se transfiere en virtud de lo estipulado en los establecido en los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, sin reservarme acción legal de ningún tipo.
- II. Manifiesto bajo protesta de decir verdad, que la "TESIS" es original, inédita y propia, no existiendo impedimento de ninguna naturaleza para la cesión de derechos que se está haciendo, respondiendo además por cualquier acción de reivindicación, plagio u otra clase de reclamación que al respecto pudiera sobrevenir.
- III. Que la titularidad de derechos de autor de la "TESIS" en términos del artículo 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor (reproducción, en todas sus modalidades, transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de explotación que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer, son propiedad única y exclusiva del "TecNM", adquiriendo el derecho de reproducción en todas sus modalidades, el derecho de transformación o adaptación, comunicación pública, distribución y en general cualquier tipo de uso que de la "TESIS" se pueda realizar por cualquier medio conocido o por conocer. La cesión de derechos se realiza con carácter permanente e irrevocable.
- IV. El TecNM podrá exhibir la "TESIS" a través de cualquier medio, en cualquier parte del mundo, incluso ser modificada, comprendida, traducida y de cualquier forma explotada en su totalidad o parcialidad.
- V. Que no he otorgado, ni otorgaré por ningún motivo, consentimiento alguno para la utilización de la "TESIS" por cualquier medio y su materialización en productos o servicios de cualquier naturaleza; a favor de ninguna persona física o moral, distinta a el "TecNM".
- VI. Estoy enterado del contenido y alcance legal de la presente cesión de derechos, firmando al final del presente documento para su certificación.

Señalo como correo electrónico para recibir futuras notificaciones: ibq.lascurain_irving@hotmail.com.



Irving Celestino Romero Lascurain

EL AUTOR