

Cuantificación de antioxidantes en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L. Mill) enriquecida con selenio

R. Foroughbakhch-Pournavab^{1*}, R. Castillo-Godina², A. Benavides-Mendoza² y J.A. Villarreal-Graza¹

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Cd. Universitaria San Nicolás de los Garza, N.L. México e-mail: rahim.forough@gmail.com. ²Univ. Autónoma Agraria Antonio Narro, departamento de horticultura, email: abemen@uaaan.mx.

RESUMEN: Con el propósito de analizar la capacidad del selenito de sodio para incrementar la concentración de Selenio y modificar la actividad antioxidante en plantas de tomate. Se aplicaron tres tratamientos de selenito de sodio utilizando como vehículo el agua de riego. Se llevaron a cabo tres muestreos 40, 80 y 120 días después del trasplante y cuantificaron la acumulación de selenio en frutos. Se obtuvo una cuantificación del potencial de oxidación-reducción y de la actividad de antioxidante como la catalasa, glutatión peroxidasa, el ácido ascórbico y licopeno. Para cada variable se llevó a cabo un análisis de varianza. Los resultados mostraron un incremento en la acumulación de selenio, hasta un 53.1% con el tratamiento 5 mg L⁻¹ en comparación con el testigo. Los valores del potencial de oxidación-reducción se redujeron desde -41.4 mV para el testigo y hasta -68.0 mV con el mayor tratamiento. La concentración de Se influyó en los parámetros de calidad incluyendo el ácido ascórbico hasta un 50% de aumento y el licopeno (66.9%). La actividad de las enzimas antioxidantes aumentó notablemente en el fruto con el tratamiento 5 mg L⁻¹ de selenito encontrándose 60.9% de aumento para CAT, 33.4% para GPX y 26.0% para SOD.

Palabras clave: Antioxidante, selenio, tomate.

ABSTRACT: The purpose of this research was to test the ability of sodium selenite to increase the concentration of selenium and change the antioxidant activity in tomato plants. Hybrid plants and three treatments of sodium selenite were used. There were conducted three samples 40, 80 and 120 days after transplantation and quantification of selenium accumulation in fruits as well as its impact on fruit production were registered. Quantification of oxide reduction potential and antioxidant activity such as catalase, glutathione peroxidase, ascorbic acid and lycopene was obtained, for each variable an analysis of variance was conducted. The results showed an increased accumulation, being up to 53.1% more in concentration in the fruits under treatment 5 mg L⁻¹ than in the control. The values of the redox potential were reduced on the average, ranging from -41.4 mV with the control to -68.0 mV with further treatment. Meanwhile, the Selenium concentration positively influenced the quality parameters including ascorbic acid (with an increase up to 50%) and lycopene concentration (66.9% of increase with further treatment). The activity of antioxidant enzymes increased significantly with 5 mg L⁻¹ of sodium selenite, it was found an increase of 50.8% for CAT, 29.1% for GPX and 26.0% for SOD.

Keywords: Antioxidant, selenium, tomato.

Área: Frutas y hortalizas

INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos saludables con alto contenido de nutrientes antioxidantes contribuye a la protección de las células del daño oxidativo y a la prevención de diversas enfermedades (Broadley *et al.*, 2006). Los radicales libres provocan reacciones oxidativas en cadena que son eliminados por la acción del sistema antioxidante de defensa (Sahnoun *et al.*, 1997), incluyendo enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), de esta manera, al activarse este sistema antioxidante de defensa, puede proporcionarle a las plantas una mayor tolerancia frente al estrés ambiental por consiguiente la generación de frutos de calidad. Las enzimas antioxidantes generalmente usan elementos traza tales como selenio (Se) así mismo cofactores, como es el caso de la GPX (Arthur 2003). Se piensa que el selenio es un elemento asociado con el

metabolismo antioxidante (Lin *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013) a través de su papel como cofactor de seleno-enzimas (Combs 2001); su deficiencia podría inducir daños en el balance celular redox. La ingesta recomendada por el National Research Council (1989) de los EUA es de 70 $\mu\text{g día}^{-1}$ para hombres y 55 $\mu\text{g día}^{-1}$ para mujeres, esto con la finalidad de reducir el riesgo de diversas enfermedades como el cáncer. Referente a la biodisponibilidad del Se, generalmente las plantas cultivadas que crecen en suelos no-seleníferos tienen bajas concentraciones de Se. Con base en lo anterior se ha planteado como estrategia para la mejora de la ingesta de selenio el enriquecimiento de los cultivos alimenticios con este elemento.

Vitamina C. El ácido ascórbico es un inhibidor de la oxidación de lípidos, regenera α -tocoferol y ofrece protección contra todo tipo de cáncer; es un elemento indispensable en los procesos metabólicos del cuerpo humano (Shekelle *et al.*, 2003). Este antioxidante está presente en las frutas y verduras en forma de ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico (Johnson 2001). El tomate tiene altos contenidos de ácido ascórbico lo cual desempeña un papel importante en la prevención de enfermedades degenerativas, cáncer, desórdenes neurológicos y de la vista, ayuda al desarrollo huesos, crecimiento, reparación del tejido conectivo normal.

Licopeno. En general, los carotenoides han cobrado gran importancia debido a que son antioxidantes que neutralizan los radicales libres que dañan a las células, y de ellos, el licopeno es el que tiene las propiedades más sobresalientes. El tomate es una fuente importante de licopeno además de otros carotenoides como el β caroteno (Madhavi y Salunkhe 1998).

Catalasa. Esta enzima forma parte del sistema antioxidante, está involucrada en la destrucción del H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato. En la reacción peroxidativa la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído (Havir y McHale 1989).

MATERIALES Y MÉTODOS

De las muestras colectadas, se determinó el contenido de selenio utilizando un espectrómetro de Inducción de Plasma (ICP) marca THERMO JARELL ASH, Modelo IRIS Advantage, siguiendo el procedimiento 984.27 de la AOAC (2000).

La actividad específica catalasa se analizó de acuerdo al protocolo modificado de Lubinsky y Bewley (1979) por medio de espectrofotometría (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) UV-visible a una longitud de onda de 275 nm y fueron hechas en una celdilla de cuarzo (10x10mm). Se realizó una curva estándar de H_2O_2 como referencias (0, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 100 mM). Una Unidad de catalasa se define como 1 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ mL}^{-1}\text{min}^{-1}$.

La actividad específica glutatión peroxidasa, se cuantificó por el método de Xue *et al.* (2001) modificado. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Genesys 10S). Se obtuvo una curva estándar con la enzima pura obtenida comercialmente del kit Glutathione Peroxidase (GPx, Assay Science Cell Research Laboratories). Una Unidad de glutatión peroxidasa se define como 1 mU de GSH-Px $\text{mL}^{-1}\text{min}^{-1}$.

El licopeno se cuantificó usando una modificación del método de Bunghez *et al.*, (2011). La fase orgánica se diluyó con acetona en un volumen 1:1 y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 502 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis).

Otras medidas. La proteína total se midió por el método de Kjeldahl, el contenido de ácido ascórbico se determinó por cromatografía líquida de alta resolución.

Análisis estadístico. Para las variables de calidad (acumulación de selenio, de frutos) y antioxidantes específicos, se realizó un análisis de varianza con el software Statistical Analysis System (SAS 9.1.3).

RESULTADOS

Cuantificación de selenio. La concentración de Se en los diferentes componentes de la planta analizando hojas, tallos y frutos y expresada en $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 1), indicó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos; sin embargo, en los frutos, la única diferencia fue entre el tratamiento 5 mg L^{-1} de Se con un valor de $35.8 \mu\text{g g}^{-1}$ en comparación con el control.

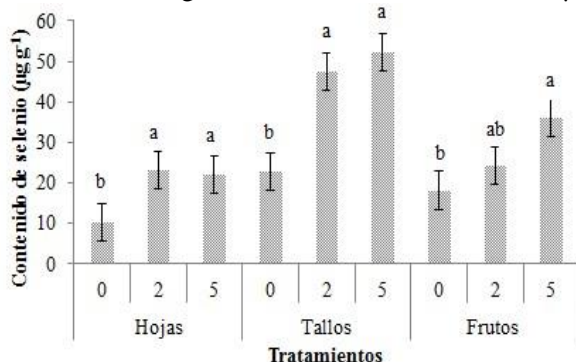


Figura 1. Concentración de selenio (\pm D.E) en plantas de tomate con aplicaciones de Se en solución nutritiva.

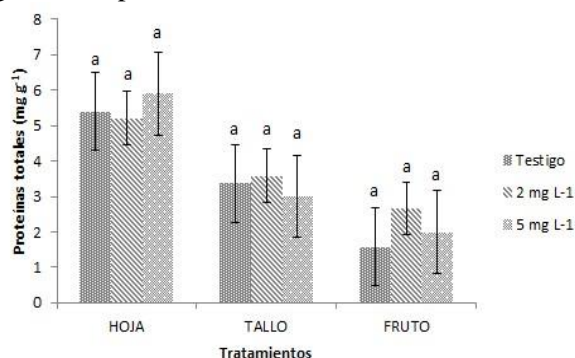


Figura 2. Proteínas totales en plantas de tomate en función de tratamiento de Se.

Antioxidantes proteicos. La cantidad de proteínas totales en los extractos de los diferentes tejidos de la planta de tomate se observan en la Figura 2. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos con aplicaciones de selenio y el testigo.

La actividad específica de la enzima catalasa mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) aplicando 5 mg L^{-1} de Se, únicamente en los frutos (Figura 3). De manera similar a la catalasa, la actividad glutatión peroxidasa mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) con el tratamiento 5 mg L^{-1} en los frutos pero no así para hojas ni tallos (Figura 3). Mientras tanto, la actividad de la enzima superóxido dismutasa se encontró similar para hojas y tallos aunque en frutos aumentó significativamente con ambos tratamientos de aplicación de Se (2 y 5 mg L^{-1}) como indica la figura 4.

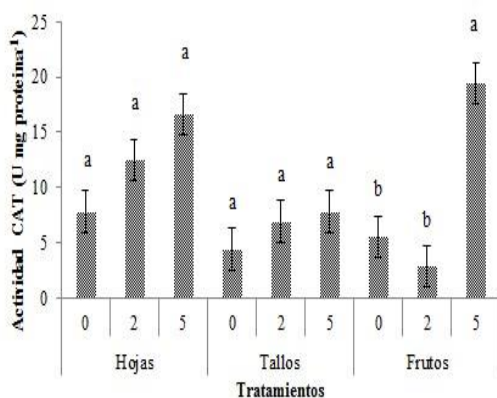


Figura 3-A

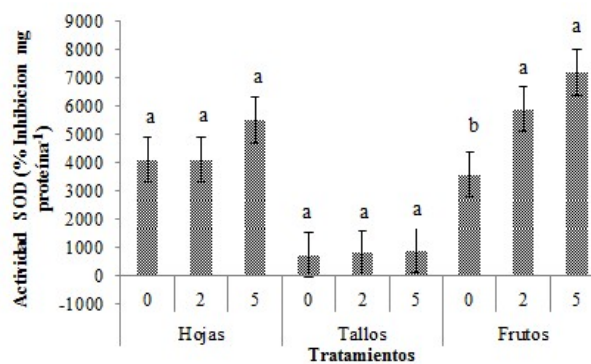


Figura 3-B

Actividad de catalasa (Fig. 3-A) y actividad superóxido dismutasa (Fig. 3-B) en plantas de tomate en función de tratamientos con el Selenio.

Antioxidantes no proteicos *Ácido ascórbico y licopeno*

En los frutos se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la variable ácido ascórbico además del aumento en los SST. Estos cambios positivos en la calidad se vieron acompañados por un aumento en la concentración de licopeno al aplicar 5 mg L^{-1} de Se (Tabla 1).

Tabla 1. Características químicas de los frutos de tomate con aplicación de selenio en la solución nutritiva.

Tratamiento	Ascórbico (mg AA 10g ⁻¹)	Licopeno (μg g ⁻¹)
0 mg L ⁻¹	1.20±0.20 ^b	13.81±2.4 ^b
2 mg L ⁻¹	2.82±0.09 ^a	20.34±5.1 ^b
5 mg L ⁻¹	2.41±0.10 ^a	41.71±6.2 ^a

Las medias seguidas de la misma literal no son diferentes según Tukey (p> 0.05).

DISCUSIÓN

El aumento en la capacidad de óxido-reducción posiblemente tiene relación con una mayor actividad enzimática, la cual se tiene conocimiento, aumenta con ciertas concentraciones de selenio (Freeman *et al.*, 2010). De acuerdo con Hawrylak-Nowak (2008), el selenio en baja concentración en las plantas da lugar a un aumento de la capacidad antioxidante, mientras que en mayor concentración causa el efecto contrario. Por tanto, en los resultados obtenidos en este estudio indican que la aplicación de selenio a bajas concentraciones induce un aumento en la capacidad antioxidante total del fruto.

Se ha demostrado que el Se está asociado con una mayor capacidad antioxidante en las plantas sujetas a varios tipos de estrés (Djanaguiraman *et al.*, 2005). La aplicación de Se en el trigo da lugar a mayor actividad de enzimas óxido reductasas en especial de la catalasa (Nowak *et al.*, 2004) así como del ascorbato peroxidasa y el glutatión reductasa, que se sabe son enzimas involucradas en el ciclo Halliwell-Asada y que de igual forma que la catalasa disocia el H₂O₂.

Ácido ascórbico y licopeno La inducción de antioxidantes no enzimáticos fue reportada también en la lechuga al aplicar selenato de sodio (Ríos *et al.*, 2009) y en el tomate por Lee *et al.*, (2007) y Pezzarossa *et al.*, (2013) coincidiendo para estos dos últimos, con el aumento en el licopeno del fruto. Por otra parte, el AA se deriva de la glucosa y es uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes, reportándose que el Se y algunos reguladores del crecimiento modifican positivamente su concentración.

CONCLUSIONES

La adición de selenio en la solución nutritiva incrementó la concentración de este elemento en los diferentes órganos de la planta; el tratamiento 5 mg L⁻¹ permitió hasta el doble de la concentración de este elemento en frutos comparado con el tratamiento control. Además, el Se resultó en un incremento en la actividad enzimática de catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en frutos con el mayor tratamiento aplicado. Los frutos bajo ambos tratamientos de Se mostraron mayor acumulación de ácido ascórbico respecto al testigo.

BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. 1990. Association of Official Analytical Chemists 15th ed. (pp. 829-830). Washington, D.C. USA.
- Arthur JR. 2003. Selenium Supplementation: Does Soil Supplementation Help and Why? Proc. Nutr. Soc. 62:393-397.
- Broadley MR, White PJ, Bryson RJ, Meacham MC, Bowen HC, Johnson SE, Hawkes ford MJ, Mc Grath SP, Zhao FJ, Breward N, Harriman M, Tucker M. 2006. Biofortification of UK Food Crops with Selenium. Proc. Nutr. Soc. 65:169-181.
- Combs, G. F. Jr. 2001. Selenium in Global Food Systems. British Journal of Nutrition, 85: 517-547.
- Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba A, Bangarusamy U. 2005. Selenium- an antioxidative protectant in soybean during senescence. Plant Soil 272:77-86.
- Feng R, Chaoyang W, Tu S. 2013. The Roles of Selenium in Protecting Plants Against Abiotic Stresses. Environ. Exp. Bot. 87:58-68.

Freeman JL, Tamaoki M, Stushnoff C, Colin F, Cappa D, Sirine F, Matthew M, McGrath S, Doug Van H, Pilon-Smits EAH. 2010. Molecular mechanism of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. *J. Plant Physiology* 153:1630-1652.

Havir AE, Mc Hale NA. 1989. Enhanced peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiol* 91:812-815.

Hawrylak-Nowak, B. 2008. Effects of selenium on selected macronutrients in Maize plants. University of Life Science in Lublin. *J. Chair of Physiology* 13:513-519.

Johnson IT. 2001. Antioxidants and Antitumour Properties. In: *Antioxidants in Food*, Pokorny, J., N. Yanishlieva and M. Gordon (Eds.). Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, pp:100-123.

Lee GJ, Kang BK, Kim TI, Kim TJ, Kim JH. 2007. Effects of different selenium concentrations of the nutrient solution on the growth and quality of tomato fruit in hydroponics. *Acta Horticulturae* 761:443-448.

Lin L, Zhou W, Dai H, Cao F, Zhang G, Wu F. 2012. Selenium Reduces Cadmium Uptake and Mitigates Cadmium Toxicity in Rice. *J. Hazard. Mater* 235:343-351.

Lubinsky S, Bewley GC. 1979. Genetics of Catalase in *Drosophila melanogaster*: Rates of Synthesis and Degradation of the Enzyme in Flies Aneuploid and Euploid for the Structural Gene. *Genetics* 91:723-742.

Madhavi DL, Salunkhe DK. 1998. Tomato. *Food science and technology-New York- Marcel Dekker En : Handbook of vegetable science and technology. Production, storage and processing*, (D.K. Salunkhe y S. S. Kadam, eds.), pp.171-201. Marcel Dekker. EUA.

National Research Council (US). 1989. Committee on Dietary Allowances, Food and Nutrition Board. *Recommended Dietary Allowances*, 10th ed., Washington D.C.

Nowak J, kaklewski K, Ligocki M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology and Biochemistry* 36:1553-1558.

Pezzarossa B, Rosellini I, Malorgio F, Borghesi E, Tonutti P. 2013. Effects of selenium enrichment of tomato plants on ripe fruit metabolism and composition. *Acta Horticulturae*, 1012:247-251.

Ríos JJ, Blasco B, Cervilla LM, Rosales MA, Sanchez-Rodriguez E, Romero L, Ruiz JM. 2009. Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology* 154:107-116.

Sahnoun Z, Jamoussie K, Zegal KM. 1997. Free Radicals and Antioxidants: Human Physiology and Therapeutic Aspects. *Therapie* 52:251-70.

Shekelle P, Hardy ML, Coulter I, Udani J, Spar M, Oda K. 2003. Effect of the supplemental use of antioxidants vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 for the prevention and treatment of cancer. *Evid Rep Technol Assess (Summ)* 75:1-3.

Xue T, Hartikainen H, Piironen V. 2001. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. *Plant Soil* 27:55-61.