



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**



---

**Tema:** Extracción asistida por ultrasonido de licopenos provenientes de residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) con capacidad antioxidante.

---

Trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Jennifer Karolina Proaño Tapia  
**Tutor:** Lic. M.Sc. Danae Fernández Rivero

Ambato – Ecuador  
Enero - 2021

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

### **CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 26 de Noviembre del 2020

---

Lic. MSc. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9

TUTORA

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jennifer Karolina Proaño Tapia, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Jennifer Karolina Proaño Tapia

050415285-1

AUTORA

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Presidente del Tribunal

---

PhD. Dayana Cristina Morales Acosta

**CI:** 180413557-0

---

PhD. José Homero Vargas López

**CI:** 180197804-8

**Ambato, 07 de Enero del 2021**

## **DERECHOS DEL AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Jennifer Karolina Proaño Tapia

C.I. 050415285-1

**AUTORA**

## DEDICATORIA

*A mis padres Víctor y María por ser mis pilares y ejemplo a seguir en la vida, gracias por el apoyo brindado y por toda la confianza entregada en cada momento. Gracias por su sacrificio diario y sus eternas bendiciones.*

*A mi hermana Paulina por ser mi segunda madre y brindarme siempre cariño, afecto y consejos para seguir adelante en mi formación y lograr cada una de las metas propuestas a su tiempo.*

*A mis sobrinas Cámely y Nataly y de manera muy especial a mi adorada hija Isabella por cada día inspirarme a ser mejor y demostrarles que cada cosa llega a su tiempo y siguiendo cada uno de los pasos que existen. Gracias por llenar mi vida de alegría y sonrisas con cada una de sus travesuras y ocurrencias.*

*A mi abuelita Amadita y mi familia por siempre confiar en mí y apoyarme con cada una de sus palabras.*

*¡Mil gracias los amo!*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios por permitirme llegar hasta el final del camino y siempre darme la fortaleza para siempre continuar hasta el final*

*A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato y sus catedráticos por ayudarme en mi formación para ser una excelente profesional con ética y principios. Agradezco a todos por la paciencia, dedicación, esfuerzo y apoyo incondicional.*

*Un agradecimiento especial a mi tutora Lic. MSc. Danae Fernández Rivero que con su ayuda, paciencia, guía, conocimiento y enseñanza me permitió el desarrollo y finalización de este trabajo.*

*A mis calificadores PhD. Dayana Morales y PhD. Homero Vargas por la ayuda, las revisiones y sugerencias realizadas en la elaboración de este trabajo.*

*Al Dr. Orestes López mi profesor y amigo quien confió en mí y supo apoyarme en esta etapa universitaria; enriqueciéndome de conocimiento y de consejos para cada día ser mejor.*

*A mis amigas y amigos que siempre estuvieron presentes en cada una de las etapas por las que hemos pasado y siempre saliendo victoriosos de cada una. Le agradezco infinitamente.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

### PÁGINAS PRELIMINARES

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	iv
DERECHOS DEL AUTOR.....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii

### CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes investigativos .....	1
1.1.1. Introducción .....	1
1.1.2. Generalidades.....	3
1.1.3. Clasificación botánica .....	5
1.1.4. Descripción de <i>Solanum betaceum</i> Cav.....	6
1.1.5. Composición nutricional .....	6



1.1.6.	Actividad antioxidante del licopeno .....	7
1.1.7.	Capacidad antioxidante del tomate de árbol ( <i>Solanum betaceum</i> Cav.)	9
1.1.8.	Métodos de determinación para la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	9
1.1.9.	Métodos de determinación para la actividad antioxidante <i>in vivo</i> .....	10
1.1.10.	Los carotenoides en la dieta humana .....	11
1.1.11.	Extracción de carotenoides por ultrasonido .....	12
1.2.	Objetivos .....	14
1.2.1.	Objetivo general.....	14
1.2.2.	Objetivos específicos .....	14
1.3.	Hipótesis.....	14
1.3.1.	Hipótesis nula .....	14
1.3.2.	Hipótesis alternativa .....	14
1.4.	Señalamiento de las variables de la hipótesis.....	14
1.4.1.	Variables dependientes .....	14
1.4.2.	Variables independientes .....	15
CAPÍTULO II .....		16
METODOLOGÍA .....		16
2.1.	Materiales, equipos y reactivos .....	16
2.1.1.	Materiales.....	16
2.1.2.	Reactivos.....	16
2.1.3.	Equipos .....	17
2.2.	Métodos .....	17
2.2.1.	Tratamiento del material vegetal .....	17
2.2.2.	Obtención de los extractos vegetales .....	18
2.2.3.	Análisis de los extractos vegetales.....	18
2.2.3.1.	Determinación de sólidos soluble totales.....	18
2.2.3.2.	Determinación de la concentración de licopenos .....	18

2.2.3.3.	Determinación del porcentaje de eficiencia de la extracción .....	19
2.2.3.4.	Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	19
2.2.3.5.	Determinación de la actividad antioxidante <i>in vivo</i> .....	20
2.3.	Análisis estadístico .....	20
CAPÍTULO III .....		21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		21
3.1.	Obtención de los extractos vegetales.....	21
3.2.	Análisis de sólidos solubles totales y concentración de licopenos.....	25
3.3.	Determinación <i>in vitro</i> actividad antioxidante .....	25
3.4.	Determinación <i>in vivo</i> de la actividad antioxidante .....	26
3.5.	Verificación de la hipótesis .....	29
CAPÍTULO IV .....		30
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		30
4.1.	Conclusiones .....	30
4.2.	Recomendaciones .....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		32
ANEXOS .....		42

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación botánica del tomate de árbol .....	5
Tabla 2.	Perfil nutricional tomate de árbol.....	7
Tabla 3.	Análisis de varianza para el porcentaje de eficiencia de extracción .....	21
Tabla 4.	Optimización de los factores de estudio para las variables respuestas .....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Tomate de árbol ( <i>Solanum betaceum</i> Cav.).....	6
Figura 2.	Estructuras químicas de carotenoides .....	8

Figura 3. Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de eficiencia de la extracción.....	22
Figura 4. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de la eficiencia de extracción.....	23
Figura 5. Diagrama de Superficie de Respuesta estimada para el porcentaje de la eficiencia de la extracción.....	23
Figura 6. Actividad antioxidante del extracto rico en licopeno (Diluciones 1/2 y 1/3) <i>in vivo</i> con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Material fotográfico procedimiento .....	42
Anexo II. Material fotográfico determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> .	42
Anexo III. Material fotográfico determinación de la actividad antioxidante <i>in vivo</i> .	43
Anexo IV. Curva de calibración para calcular el porcentaje de inhibición utilizando Trolox.....	43
Anexo V. Curva de crecimiento experimental de la levadura .....	44

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la extracción de licopenos con capacidad antioxidante por medio de ultrasonido, utilizando los residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Se realizó la extracción a partir de residuo vegetal previamente seco y molido utilizando como solvente etanol y se aplicó un diseño experimental 3<sup>3</sup>, con el fin de desarrollar una tecnología por medio de ultrasonido para la extracción de licopenos. Se estudió la influencia de los factores relación material vegetal/volumen de disolvente (1/2.5; 1/5; 1/10), temperatura de extracción (20, 30 y 40 grados centígrados) y tiempo de extracción (15, 30 y 60 minutos) sobre los porcentajes de eficiencia de extracción. El proceso se optimizó con una relación de material vegetal/volumen de disolvente de 1:10, temperatura de extracción de 40 grados centígrados y un tiempo de extracción de 60 minutos. Con el fin de verificar la actividad antioxidante que tuvo el extracto rico en licopenos se realizaron pruebas *in vitro* a través de la técnica de DPPH (2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl) e *in vivo* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo. El extracto rico en licopenos presentó en la prueba *in vitro* un porcentaje de inhibición de radicales libres de 60,23 por ciento lo que equivale a 693,81 micromoles por litro de Trolox, se corroboró la actividad antioxidante *in vivo* evidenciando que la célula logró superar el estrés oxidativo al ser expuesta a una concentración de 3 milimoles de peróxido de hidrógeno presentando valores de crecimiento celular muy similares a los obtenidos con la vitamina C.

**Palabras claves:** licopeno, actividad antioxidante, ultrasonido, *Solanum betaceum*, DPPH, *Saccharomyces cerevisiae*.

## ABSTRACT

The objective of this research was the extraction of lycopene's with antioxidant capacity by ultrasound, using the agro-industrial residues of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). The extraction was carried out from previously dry and ground vegetable residue using ethanol as solvent and an experimental 3<sup>3</sup> design was applied in order to develop an ultrasound technology for the extraction of lycopene's. The influence of the factors plant material/solvent volume ratio (1/2.5; 1/5; 1/10), extraction temperature (20, 30 and 40 degrees Celsius) and extraction time (15, 30 and 60 minutes) on the extraction efficiency percentages. The process was optimized with a plant material/solvent volume ratio of 1:10, extraction temperature of 40 degrees Celsius and extraction time of 60 minutes. To verify the antioxidant activity of the lycopene-rich extract, in vitro tests were performed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl) technique and in vivo with *Saccharomyces cerevisiae* Cav. as model. The extract rich in lycopene's presented in the in vitro test a percentage of inhibition of free radicals of 60.23 percent, which is equivalent to 693.81 micromoles per liter of Trolox, the antioxidant activity in vivo was corroborated showing that the cell managed to overcome the oxidative stress when exposed to a concentration of 3 millimoles of hydrogen peroxide presenting cell growth values very similar to those obtained with vitamin C.

**Key words:** lycopene, antioxidant activity, ultrasound, *Solanum betaceum*, DPPH, *Saccharomyces cerevisiae*.



# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes investigativos

#### 1.1.1. Introducción

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) es una de las frutas con mayor interés comercial tanto nacional como internacional en países como España, Holanda, Suecia, Alemania y Francia. Por sus altos niveles de comercialización y sus excelentes características sensoriales es clasificado como un fruto de alta exportación. En Ecuador la mayor parte de cultivos se basan en los frutales andinos, tomando en cuenta que el más importante es el cultivo de tomate de árbol en las zonas con un clima frío-templado. Según los datos recabados por el **INEC, (1998)** la superficie total del país se encontraba ocupada en un 31% por actividades agropecuarias, mientras que en la información recopilada en el año 2004 dicha cifra varió a un 39,67% significando que el sector agropecuario incrementó su superficie de 8 millones a 12,3 millones de hectáreas. Por otra parte, se ha considerado a Colombia como el segundo país en producción agropecuaria de tomate de árbol para el 2012 se estableció 8,414 hectáreas, con una producción de 71,415 toneladas y rendimientos promedio de 15,6 t.ha<sup>-1</sup> (**Ministerio de agricultura y desarrollo rural, 2014**).

El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) es una excelente fuente de sustancias nutricionales y fitoquímicos que presentan actividad antioxidante como pro-vitamina A, vitamina B6, vitamina E, ácido ascórbico, licopenos, y flavonoides, entre otros. Además, presenta baja concentración en carbohidratos de alto peso molecular (**Ordóñez et al., 2005**). Es un fruto que crece a temperatura que pueden oscilar entre 14 y 20 grados y entre los 600 y 3 300 metros sobre el nivel del mar (**El Comercio, 2011**). Se lo consume de manera tradicional en jugos y mermeladas y a su vez se ha

detectado que en el procesamiento de dichos derivados se generan desechos entre cáscaras y semillas alcanzando un 5% de los mismos (**Silva, Brooks, et al., 2018**).

El caroteno es uno de los compuestos de mayor interés que se encuentra presente en la cáscara del tomate de árbol como un antioxidante. El término caroteno fue propuesto por **Wachenroder, (1831)** con el fin de nombrar a un pigmento hidrocarbonado en cual se cree que cristalizó a partir de la zanahoria. Poco después **Berzelius, (1845)** denominó “xantofilas” a un extracto más polar de pigmentos de color amarillo procedente de hojas (en otoño). **Tswett, (1830)** separó muchos de estos pigmentos cromatográficamente y denominó al grupo carotenoides. Estos se componen de varias moléculas tetraterpénicas que se forman por cadenas de 8 unidades isoprénicas, que son solubles en solventes apolares y de coloraciones que oscilan entre el amarillo como es el caso del  $\beta$ -caroteno y el rojo como el licopeno (**Martínez, 2003**).

El licopeno se considera como un pigmento vegetal que se encuentra en el grupo de los carotenoides con alta actividad antioxidante. El tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) contiene un 82% de licopeno en su composición. Presenta propiedades que son desconocidas por la población lo cual hace que la piel del tomate sea descartada como abonos en terrenos, desechos orgánicos o como materia prima para la elaboración de bioles (**Yamaguchi, 2010**).

La capacidad antioxidante de un alimento depende de la naturaleza y concentración de los antioxidantes naturales que presenta (**Cao y col., 1995; Pieri y col., 1994**). La actividad antioxidante es la capacidad que tiene una sustancia o compuesto para captar los radicales libres que se generan en el metabolismo celular concentrándose en el interior de la célula y de esta manera lograr inhibir la degradación oxidativa que se produce (**Londoño, 2012**). Según **Aràndiga y Díaz, (2008)**, se evidenció que estos pueden ser eliminados al torrente sanguíneo y provocar algunas enfermedades no transmisibles como arterioesclerosis y diabetes.



Para determinar la actividad antioxidante del extracto rico en licopenos obtenido del proceso se realizaron métodos *in vitro* e *in vivo*. Para el método *in vitro* se utilizó el método del radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl) que se considera como una prueba colorimétrica la cual ayuda a determinar el porcentaje de actividad antioxidante la cual se expresa en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de Trolox por cada gramo de muestra (Horiz, 2015).

Otro método utilizado para determinar la capacidad antioxidante *in vivo* fue el desarrollado por Peláez, (2016) donde somete a estrés a una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) para determinar su crecimiento.

### 1.1.2. Generalidades

En Ecuador la producción agrícola es uno de los pilares fundamentales para avanzar con el progreso de sus provincias, en varias de las comunidades se considera a la agricultura como una fuente principal de trabajo (La Hora, 2017). Se ha considerado que los ingresos obtenidos por el cultivo del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) alcanzan los 20000 dólares al año considerando que la inversión para el mantenimiento de una hectárea se encuentra alrededor de 2000 dólares y para la compra de semilla, preparación de suelo, terreno y abono en 8000 dólares (Maita, 2011).

Entre las provincias donde se cultiva este fruto se encuentran: Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay y Loja. En el país se cultivan 14748 hectáreas; siendo Tungurahua con 8300 hectáreas la provincia más productiva en este campo (Ramirez, 2009). Las principales áreas de cultivo son: Los Andes, Patate, Pelileo, Montalvo, Baños y Totoras (Albornoz, 1992).

El tomate de árbol se caracteriza por ser un producto con una fuente importante de - caroteno (provitamina A), vitamina B6, vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E hierro. Este fruto contiene además potasio, magnesio y fósforo (El Productor, 2017).

El licopeno también presente en este fruto, es uno de los carotenoides importantes en la dieta humana y ayuda en la prevención de enfermedades como: el cáncer de próstata, enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon, leucemia mieloide y linfoma **(Erdman, Ford y Lindshield, 2009)** por su gran capacidad antioxidante, es decir, la capacidad de retardar o prevenir la oxidación de moléculas.

Este fruto se utiliza para la fabricación de pulpas, jugos, conservas y mermeladas, existiendo una generación de residuos agroindustriales que se convierten en un problema de contaminación ambiental al momento de ser desechados en los rellenos sanitarios, desaprovechando una fuente elemental de compuestos bioactivos **(Erhardt, Meisner, Bode y Bode, 2003)**.

A lo largo del tiempo se han realizado un sinnúmero de procesos para la extracción de compuestos bioactivos en especial del licopeno que se encuentra presente en mayor cantidad en la cáscara del tomate de árbol que es desechada sin tener ninguna utilidad, por esta razón se ha realizado algunos estudios en los que se puede extraer gran cantidad de carotenoides ( $36,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) en los residuos secos de tomate de árbol al momento de utilizar solventes como etilo – hexano y con etanol como solvente lograron tener  $6,1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  **(Strati y Oreopoulou, 2011)**.

En el país existe una gran variedad de cultivos que son propios de cada región lo que lo convierte en un nicho para las industrias. Se debe considerar que los desechos generados por las industrias son de 2,074 toneladas por día representando solo un 53,81% de origen orgánico **(INEC, 2018)**.

Los polifenoles y los antioxidantes tienen una gran importancia biológica por lo que se han propuesto varios métodos para su extracción de las diversas fuentes vegetales. Por tal motivo se ha evidenciado que las tecnologías de extracción han innovado para poder obtener altos rendimientos en los procesos, abaratar costos, minimizar el tiempo

de proceso y reutilizar los residuos generados industrialmente (**Soria y Villamiel, 2010**).

Una de las técnicas de extracción eficiente, de fácil manejo, segura, económica, reproducible y sustentable, con una inversión moderada de energía y solvente es la extracción asistida por ultrasonido. La extracción requiere de solventes líquidos y a su vez con el uso de sonicación es posible regular temperaturas de funcionamiento permitiendo extraer componentes que son altamente sensibles a la temperatura (**Wang et al., 2006**). La ventaja que tiene el proceso es la influencia que se puede ejercer en los parámetros: amplitud de onda, temperatura, presión, tiempo y viscosidad, asegurando la optimización de los mismos (**Hielscher, 2019**).

Los residuos que se obtienen de los procesos industriales son una gran fuente de licopenos, estos se encuentran en cantidades de 600-800 µg de carotenos/100 g de cáscara en el tomate de árbol (**Yamaguchi, 2010**). Por tal motivo, en esta investigación se plantea la extracción del licopeno como una alternativa para aprovechar los residuos agroindustriales producidos en la industria alimentaria.

### 1.1.3. Clasificación botánica

Según **Bohs, (1995)** el tomate de árbol tiene la siguiente clasificación taxonómica (Tabla 1):

**Tabla 1.** Clasificación botánica del tomate de árbol

Reino	<i>Plantae</i>
División	Fanerógamas
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Subclase	Metaclamideas o simpétalas
Familia	<i>Solanáceas</i>
Género	<i>Cyphomandra</i>

Especie	<i>Solanum betaceum</i>
Nombre común	Tomate de árbol
Nombre comercial	Tamarillo, tomate lima, tomate dulce

#### 1.1.4. Descripción de *Solanum betaceum* Cav.

El tomate de árbol es originario de América del Sur (Ecuador, Colombia, Perú). Como cultivo en Ecuador se desarrolla entre 600 - 3300 msnm, donde la temperatura óptima está entre los 14 – 20 °C, requiere de un pH entre 6 - 6.5 y precipitaciones de 1500 - 2000 mm/año. Es un árbol que alcanza 3 m de altura, con hojas cordiformes y su fruto posee una piel lisa y brillante, de color variable (Figura 1). La pulpa es anaranjada, jugosa, agridulce y de agradable sabor (**Ramirez, 2009**).



**Figura 1.** Tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) (**Steakley, 2014**).

A nivel de Sudamérica, Colombia y Ecuador cuentan con un producto de calidad y en cantidades para la exportación, el producto colombiano lidera la producción, continuado por Ecuador que aún necesita un progreso agrícola para que lo convierta en un producto más competitivo dentro del comercio exterior (**Osorio, 2013**).

#### 1.1.5. Composición nutricional

Según **Torres, (2012)**, el tomate de árbol cuenta con una composición rica en minerales y vitaminas A y C, gran cantidad de energía, grasas totales y fibra que lo convierten en un producto saludable y beneficioso para la salud.

A continuación, se presenta en la Tabla 2 el perfil nutricional de este fruto por cada 100 gramos según **Funiber, (2017)**:

**Tabla 2.** Perfil nutricional tomate de árbol

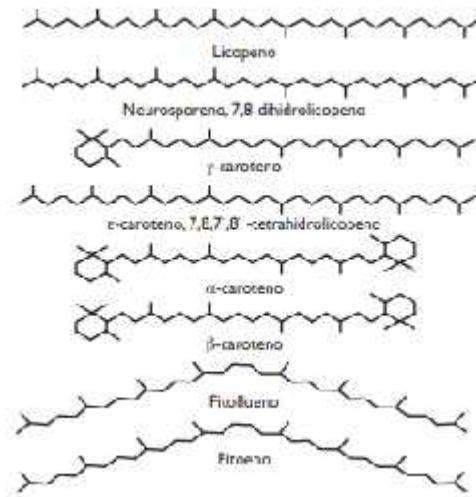
<b>Nutrientes</b>	<b>Cantidad</b>
Energía (cal)	48
Grasa Total (g)	0,60
Fibra (g)	2
Calcio (mg)	9
Hierro (mg)	9
Vitamina A (mg)	76,67
Vitamina C (mg)	29

#### **1.1.6. Actividad antioxidante del licopeno**

La actividad antioxidante de los alimentos depende de su naturaleza y la concentración de antioxidantes naturales presentes en ellos (**Jiménez, 2016**) y se define como la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa, gracias a la facilidad que posee para reaccionar con radicales libres (**Londoño, 2015**).

El licopeno es un carotenoide que brinda la coloración roja al tomate de árbol, brindándole la capacidad de absorber la luz durante la fotosíntesis, protegiendo a la planta contra la fotosensibilización. Es el carotenoide más abundante en el tomate; comprende del 80 al 90% de los pigmentos presentes. **Tonucci y colaboradores, (1995)**, reportaron que el contenido de licopeno en toda la fruta es mayor a 9,27 mg/100 g. Algunas variedades rojas contienen más de 15 mg/100 g, mientras que las variedades amarillas contienen solo cerca de 0,5 mg/100 g. **Heinonen y colaboradores, (1989)**, demostraron que la concentración de licopeno en tomates es mayor en verano y menor en invierno. **Lampe y Watada, (1971)**, indicaron que el contenido de licopeno puede variar de acuerdo con las técnicas de fertilización, tiempo de cosecha y variedad seleccionada.

El licopeno posee una cadena alifática con cuarenta átomos de carbono; carece de anillos cíclicos con un gran número de dobles enlaces conjugados (Figura 2); actúa protegiendo a las células humanas del estrés oxidativo por la acción de los radicales libres. Modula las moléculas responsables de la regulación del ciclo celular, produciendo una regresión de ciertas lesiones cancerosas y de próstata (**Waliszewsky, 2010**).



**Figura 2.** Estructuras químicas de carotenoides (**Khachick, 2002**).

La capacidad antioxidante de la fruta depende de la concentración y tipo de compuesto fenólico, carotenoide y vitamina C, que es directamente proporcional con el índice de madurez. Esta capacidad antioxidante depende del poder regulador ligado a los niveles de carotenoides que produce la ruptura de las cadenas y atracción de los radicales libres por la donación de las moléculas de hidrógeno (**Lara, 2016**).

Se ha demostrado que las personas que consumen tomates tienen menor riesgo de contraer cáncer, aunque esta relación ha sido considerada insuficiente de evidencia para su aprobación de "declaración de propiedades saludables" por la FDA (**Perera, 2007**).

### **1.1.7. Capacidad antioxidante del tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.)**

La actividad antioxidante de una fruta depende de la concentración y tipo de compuesto fenólico, carotenoide y vitamina C, que a su vez es directamente proporcional al índice de madurez. La capacidad antioxidante depende del poder reductor ligado a los niveles de fenoles que producen la ruptura de las cadenas y atracción de los radicales libres por donación de moléculas de hidrógeno (**Guija, Inocente, Ponce y Zarzosa, 2015**).

Se considera que la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos tienen una relación por su estructura química debido a que potencian su actividad debido al doble enlace que existe entre los carbonos dos y tres a su vez con el grupo hidroxilo desapareado; por esta razón son considerados como secuestradores de radicales libres y presentan características quelantes de hierro (**Zavaleta, Muñoz, Blanco, Alvarado y Loja, 2005**).

Este estudio se utilizó la cáscara del tomate de árbol que posee la mayor cantidad de antioxidantes en comparación con la pulpa. **Espín et al., (2015)** realizó estudios de ABTS en variedades amarillas – anaranjadas en los que detectaron 22  $\mu\text{M}$  TEAC/g de cáscara de tomate. Además de comparar con el método FRAP según **Espín et al., (2015)** la cáscara de tomate de árbol para variedades amarillas es de 17  $\mu\text{M}$  TEAC/g que es bajo con respecto al valor obtenido por **Lara, (2016)** que es de 34  $\mu\text{M}$  TEAC/g. Se comparó la capacidad antioxidante de otras frutas como son la guayaba con un 22  $\mu\text{M}$  TEAC/g, los arándanos 63,4  $\mu\text{M}$  TEAC/g y el kiwi posee 8  $\mu\text{M}$  TEAC/g basados en método FRAP (**Lister, Morrison, Kerkhofs y Wright, 2005**).

### **1.1.8. Métodos de determinación para la actividad antioxidante *in vitro***

Ante las necesidades existentes para determinar la actividad antioxidante en laboratorios se han creado diversos métodos como por ejemplo en el tomate de árbol **Jayapra -Kasha y col., (2001)** utilizaron la capacidad de eliminación de oxirradical

total (TOSC), parámetro antioxidante captador de radicales totales, capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y la inhibición de lipoproteínas de baja densidad. **Kuskoski et al., (2005)** aplicaron métodos que se basan en la reacción de transferencia de electrones como capacidad antioxidante equivalente de trolox, captación del radical del ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), método de Folin-Ciocalteu y ensayo de captación del ión férrico y su reducción.

El método de captación de radicales DPPH se fundamenta en la reducción del radical libre con la ayuda de un antioxidante. El DPPH es uno de los pocos radicales orgánicos estables, por lo tanto, puede ser observado con una coloración violeta fuerte, se lo puede conseguir fácilmente en el mercado y no debe ser generado de manera *in situ* como el radical ABTS. Este ensayo se basa en la medición de la capacidad que tiene el antioxidante para estabilizar el radical DPPH determinándose espectrofotométricamente siguiendo el descenso de la absorbancia a 517 nm. (**Brand-Williams, 1997**). Por esta razón el radical mostró un punto máximo de absorción a 515 nm y este se transforma en un compuesto incoloro luego de su reducción (**Munné-Bosch, 2012**).

Este método es ampliamente utilizado gracias a su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; por otro lado, también se considera la dificultad al momento de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical (**Londoño, 2012**).

#### **1.1.9. Métodos de determinación para la actividad antioxidante *in vivo***

Se ha evidenciado la necesidad que existe entre las personas que trabajan en laboratorios de diseñar métodos *in vivo* utilizando microorganismos por lo que se ha optado el empleo de *Saccharomyces cerevisiae* que es una levadura que forma el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad (**Hernández, 1999**). Se utiliza como modelo para la experimentación por las características similares que comparten con el organismo humano en los procesos



de señalización celular y las reacciones metabólicas (**Madigan, 2006**). Incluyendo sus innumerables ventajas puesto que es fácil para el manejo en laboratorio, consta de periodos de crecimiento rápidos, procesos de replicación de ADN, plegamiento de proteínas, metabolismo, transporte intracelular y recombinación que son características exactas de organismos eucariotas (**Mager y Winderickx, 2005**). Posee un genoma secuenciado en su totalidad lo que hace más fácil compararlo con el genoma humano.

La levadura puede ser sometida a estrés de temperatura, por ser muy versátil ha desarrollado mecanismos para adaptarse a los cambios y continuar con su crecimiento y reproducción, logrando disminuir el gasto energético conduciendo a una disminución en la tasa de crecimiento y desarrollando mecanismos de protección (**Otero, 2012**).

#### **1.1.10. Los carotenoides en la dieta humana**

Según **Quintana y colaboradores, (2018)** los beneficios que presentan los carotenoides en la salud humana; se asocian primeramente con la prevención de enfermedades debido a sus propiedades antioxidantes. También se han considerado que los antioxidantes neutralizan diversas sustancias químicas que pueden dañar las membranas celulares y el material genético, lo que conlleva a la preexistencia de algunos tipos de cáncer y otras enfermedades como alzheimer, parkinson, diabetes, artritis reumatoide, neurodegeneración y enfermedades cardiovasculares (**Tanaka y cols., 1995**). El aporte elevado de carotenoides se ha observado que reduce el riesgo de contraer algunos tipos de cáncer como se ha visto con el  $\beta$ -caroteno que puede ser capaz de reducir o suprimir el desarrollo de lesiones precursoras de cáncer en el intestino e incluso disminuir la aparición de cáncer de boca, garganta, esófago y de mama (**Omenn y cols., 1996**).

Los carotenoides más investigados son el  $\beta$ -caroteno, el licopeno, la luteína, la zeaxantina y la astaxantina; se puede decir que estos pigmentos no se encuentran presentes para el consumo humano en estado natural o crudo, pero si se los puede

obtener de la preparación de alimentos (**Quintana, Hurtado, Hernández y Palacios, 2018**). Por esta razón se ha considerado que la mayoría de ellos como la astaxantina mejora la respuesta del sistema inmunológico ya que estimula la producción de glóbulos blancos en la sangre, es considerado como el pigmento con mayor propiedad antioxidante que se encuentra en vegetales, algunas especies de microalgas de agua dulce, truchas, salmónidos, camarones y algunas especies de mejillones (**Granda, 2015**). Además, se la considera como un poderoso antiinflamatorio que ayuda en la prevención de los niveles crónicos de inflamación, como son la artritis, dolores musculares, enfermedades cardiovasculares y alzheimer (**Fiedor y Burda, 2014**).

El licopeno es otro de los pigmentos con gran capacidad antioxidante y es uno de los suplementos esenciales para la protección ante la aparición y el desarrollo de células malignas o cancerígenas en la próstata (**Rowles y cols., 2017**). La luteína y la zeaxantina como pigmentos carotenoides actúan en la retina, protegen el ojo contra daños causados por la luz ultravioleta, previenen la degradación de lípidos y reducen la degeneración macular relacionada con la edad o las cataratas seniles (**Fernández, et al., 2017**).

El consumo frecuente de frutas, verduras y productos marinos reduce el riesgo de contraer diversas enfermedades. Se considera que el aporte dietético de carotenoides funciona como una medida económica para la prevención primaria y secundaria de las enfermedades relacionadas al ser humano (**Cruz, 2013**).

#### **1.1.11. Extracción de carotenoides por ultrasonido**

La extracción por ultrasonido es una de las técnicas más conocidas debido a la alta capacidad que tiene con las sustancias de bajo peso, compuestos bioactivos y funcionales de las plantas para extraer todos sus metabolitos en beneficio de la salud humana. Esta técnica se basa en la cavitación que genera alterando las células vegetales y mejorando la transferencia de masa de modo que el material intracelular esté disponible. De esta manera se consigue una extracción con mayor eficiencia, es decir,

que su rendimiento de extracción aumenta significativamente y a consecuencia se reduce el tiempo de procesamiento de las muestras (**Janiszewska y Sakowski, 2013**).

Durante la cavitación se produce la destrucción de la pared celular, reducción del tamaño de partícula y mejora de la transferencia a través de la membrana celular debido al efecto que causa el colapso de las burbujas que se forman. Dicha extracción se considera como una tecnología emergente para la conservación de alimentos por medio de la inactivación de sus enzimas, mejorando la calidad sensorial y aumentando la vida de anaquel en los productos (**Zou y Jiang, 2016**). Finalmente se debe considerar el poco estudio o aplicación del efecto que causa la extracción asistida por ultrasonido en el contenido de los carotenoides en los alimentos (**Zou y Jiang, 2016**).

Se ha empleado la extracción asistida por ultrasonido para diferentes estudios puesto que es considerado como un método eficaz para la extracción de varios compuestos por su capacidad al momento de maximizar el rendimiento y reducir el tiempo de los procesos. Según el estudio realizado por **Wang et al., 2011** muestra que si se cuenta con ultrasonidos de alta potencia tiene mayor eficiencia en la extracción de aromas de café (4-tridecanona y 2-metoxi-3-metilpirazina). **Xia et al., 2005** mostraron que el contenido de polifenoles del té, aminoácidos y cafeína en infusiones de té tratadas por ultrasonidos fueron más altos gracias al empleo de ultrasonido. En la extracción de la fracción apolar en hojas de *Mangifera indica L.* (árbol del mango) se muestra que gracias a la eficiencia al momento de aplicar una extracción con ultrasonido se tienen rendimientos que oscilan entre 21,81 mg/g hasta 27,52 mg/g dependiendo del volumen que se utilice (**Acosta, Salomón, Sevilla y Nuevas, 2016**). **Athanasios et al., 2004** encontró que la extracción por ultrasonido tuvo mejores resultados en cuanto a la cantidad de los componentes deseables en el aceite esencial de ajo con un 33,6%. Según los estudios expuestos se consideró que la extracción asistida por ultrasonido es eficiente, de gran ayuda y a su vez al optimizar las variables como temperatura, solvente, volumen de solvente, tiempo de extracción, poder de ultrasonido y duración del ciclo aplicado se logra tener la mejor de las técnicas de extracción no convencional y con excelentes porcentajes de eficiencia (**Palma y Borroso, 2002**).

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

- Extraer licopenos con capacidad antioxidante por medio de ultrasonido, utilizando los residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Desarrollar una tecnología por medio de ultrasonido para la extracción de licopenos, a partir de los residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto rico en licopenos, aplicando el método químico de DPPH.
- Determinar la capacidad antioxidante del extracto rico en licopenos con ensayo *in vivo*, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo.

## **1.3. Hipótesis**

### **1.3.1. Hipótesis nula**

No se extraerán licopenos con capacidad antioxidante por medio de ultrasonido, utilizando los residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

### **1.3.2. Hipótesis alternativa**

Se extraerán licopenos con capacidad antioxidante por medio de ultrasonido, utilizando los residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

## **1.4. Señalamiento de las variables de la hipótesis**

### **1.4.1. Variables dependientes**

- Porcentaje de eficiencia de la extracción (%E.E)

#### **1.4.2. Variables independientes**

- Temperatura de extracción (20, 30 y 40 °C)
- Tiempo de extracción (15, 20 y 60 min)
- Relación material vegetal/volumen de disolvente (1/2.5; 1/5; 1/10)

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Materiales, equipos y reactivos

##### 2.1.1. Materiales

- Residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).
- Material de vidrio marca GLASSCO y PYREX.
- Termómetro de mercurio marca Amarell.
- Papel aluminio marca Alumina.
- Papel filtro marca Vifas.
- Toallas de papel marca Scott.
- Pinzas para matraces con barra libre marca Equipmen.
- Soportes universales de laboratorio marca Equipmen.

##### 2.1.2. Reactivos

- Etanol al 96% de pureza marca Scharlau.
- Agua destilada marca Scharlau.
- Metanol al 96% de pureza marca Scharlau.
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) marca Sigma-Aldrich.
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) marca Sigma-Aldrich.
- Peróxido de hidrógeno marca Ecuaquímica, Ecuador.
- Medio PDA marca Merck, Alemania.
- Medio YPD marca Merck, Alemania.
- PBS marca Thermo Fisher Scientific.
- Vitamina C inyectable marca Life, Ecuador.
- Levadura marca Levapan, Ecuador.

### **2.1.3. Equipos**

- Baño ultrasónico Branson 2800.
- Balanza analítica Adventurer Pro.
- Balanza de humedad Citizen MB 50.
- Espectrofotómetro UV-VIS Multiskan GO (Thermo Scientific, Dinamarca).
- Destilador de agua QUIMIS.
- Computadora HP 14 con sistema operativo Windows 10.
- Refrigerador Indurama.
- Pipeta automática.
- Horno de convección GANDER MTN.
- Molino de cuchillas INOX-EQUIP.
- Software de análisis de datos estadísticos y gráfico Statgraphics Centurion XVI.I.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Tratamiento del material vegetal**

Los residuos agroindustriales del tomate de árbol se recolectaron de la planta Hortifrutícola Ambato Compañía Anónima (Planhofa C.A), y posteriormente se trasladaron a los laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB), de la Universidad Técnica de Ambato; en donde se pre-trataron para la extracción de licopenos presentes en los residuos, los cuales son considerados como compuestos bioactivos.

El material vegetal recolectado fue sometido a un proceso de secado por 24 horas a una temperatura de 50 °C en el horno de convección marca GANDER MTN, consiguiendo un material libre de agua para la aplicación del método de extracción no convencional con baño ultrasónico marca BRANSON 2800. Para aplicar este método de extracción el material seco que se obtuvo del proceso de secado fue triturado en un

molino de cuchillas marca INOX-EQUIP, obteniendo residuos vegetales secos y pulverizados (Cardona, 2006).

### 2.2.2. Obtención de los extractos vegetales

Al obtener los residuos pulverizados fueron sometidos a una extracción con un método no convencional utilizando un baño ultrasónico y como solvente orgánico etanol al 96% de pureza. Se analizaron tres factores de estudio, entre los que se encuentran: temperatura (20, 30 y 40 °C), tiempo de extracción (15, 20 y 60 min) y relación material vegetal/volumen de disolvente (1/2.5; 1/5; 1/10) con tres réplicas cada uno. De esta manera se logró determinar la influencia que ejercen dichos factores sobre la variable respuesta: porcentaje de eficiencia de la extracción (%E/E). (Anexo I)

### 2.2.3. Análisis de los extractos vegetales

#### 2.2.3.1. Determinación de sólidos soluble totales

Se determinó la humedad residual colocando 5 g de extracto vegetal en la balanza de humedad Citizen MB 50, obteniendo el porcentaje de humedad con el que se calculó el porcentaje de sólidos solubles totales extraídos (%SST), mediante la siguiente ecuación: (Anexo I)

$$\%SST = 100 \% - \% \text{ Humedad obtenido } Ec. 1$$

#### 2.2.3.2. Determinación de la concentración de licopenos

Se midió la absorbancia de cada extracto (A) con la ayuda del espectrofotómetro UV-VIS Multiskan GO (Thermo Scientific, Dinamarca), utilizando una longitud de onda de 471 nm (Rodríguez, 2001) procediendo con el cálculo de la concentración de licopenos obtenidos (C) mediante la Ec. 2, con una absortividad para el etanol de 3450 (E) (Strati y Oreopoulou, 2011).

$$C = \frac{A \cdot 10^4}{E} \quad Ec. 2$$



### 2.2.3.3. Determinación del porcentaje de eficiencia de la extracción

La eficiencia de la extracción se determinó en porcentaje, a través de la relación entre la masa de licopenos extraídos (ML) y el material vegetal (MV) utilizado para la extracción (Ec. 3)

$$\%E.E = \frac{ML}{MV} * 100 \quad Ec. 3$$

### 2.2.3.4. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* con el método del radical 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl (DPPH)

El método se emplea para determinar la capacidad antioxidante que poseen algunos alimentos y compuestos sintéticos. Se considera que los compuestos antioxidantes donan sus átomos de hidrógeno a los radicales libres existentes y de esta manera lograr estabilizarlos (Guija, Ponce y Zarzosa, 2015).

En la investigación se determinó la capacidad que tienen los extractos obtenidos para capturar radicales libres utilizando el método de DPPH en una placa de 96 pocillos, de acuerdo con el método reportado por Bobo-García et al., (2015).

Se colocó 20 µl del extracto obtenido con la mejor variante de los tres factores analizados, diluidos a diferentes concentraciones en una solución estándar de 180 µl de DPPH (Sigma-Aldrich, USA), disueltos en metanol-agua (80:20) con una concentración de 150 µmol/L y agitación por 60 segundos. Se incubó la placa durante 40 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y posteriormente se determinó la absorbancia a 515 nm con una temperatura de 25 °C en el lector multiplaca (Fisher Scientific, Finlandia). (Anexo II)

Se preparó una curva de calibración con soluciones estándar de trolox (Sigma Aldrich, Alemania), con concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µmol/L.

Esta actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición (% de inhibición DPPH), que correspondió a la cantidad de radical DPPH neutralizado por los licopenos presentes en el extracto; de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{de inhibición DPPH} = 1 - \frac{Abs_{muestra} - Abs_{control}}{Abs_{control}} * 100 \quad Ec. 4$$

Donde:

$Abs_{muestra}$ : absorbancia de la muestra analizada.

$Abs_{control}$ : absorbancia de la muestra control.

### 2.2.3.5. Determinación de la actividad antioxidante *in vivo* con *Saccharomyces cerevisiae*

Según el método propuesto por **Peláez, (2016)**, para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos bioactivos presentes en los extractos vegetales, propuso el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuando es sometida a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno y con el extracto de estudio. Se utilizaron levaduras de un sobre comercial de panadería (Levapan, Ecuador), las cuales se aislaron mediante estría compuesta en medio PDA, con incubación a 28 °C por 72 horas y posteriormente conservadas en refrigeración a 4 °C.

Se determinó el crecimiento de la levadura en el medio, así como con peróxido de hidrógeno y vitamina C como antioxidante para comparar con el extracto rico de licopenos. (Anexo III)

### 2.3. Análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI.I. Se elaboró un diseño factorial  $3^3$  para determinar la influencia de los factores temperatura, tiempo de extracción, y relación material vegetal/volumen de disolvente en tres niveles cada uno, así como sus interacciones sobre la variable respuesta: porcentaje de eficiencia de la extracción (%E.E). Se consideraron diferencias significativas un valor-p < 0,05.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Obtención de los extractos vegetales

Se ha desarrollado la tecnología asistida por ultrasonido para la extracción de licopenos provenientes de residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) para lo cual se estudiaron la influencia que ejercen los factores: relación material vegetal/volumen de disolvente, temperatura de extracción y tiempo de extracción sobre el porcentaje de eficiencia de la extracción a través de un diseño experimental  $3^3$ , con un nivel de confianza del 95%.

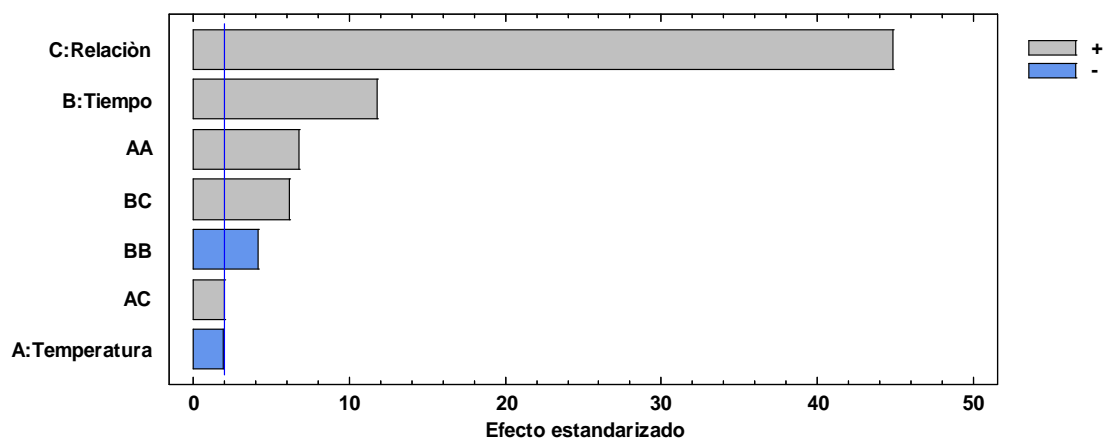
Se realizó un análisis de varianzas para la determinación del porcentaje de eficiencia de la extracción evidenciando diferencias significativas para el tiempo de extracción y la relación material vegetal/volumen de disolvente (Tabla 3).

**Tabla 3.** Análisis de varianza para el porcentaje de eficiencia de extracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura	3.67868E-7	1	3.67868E-7	3.92	0.0517
B:Tiempo	0.0000130557	1	0.0000130557	139.01	0.0000
C:Relación	0.000188643	1	0.000188643	2008.51	0.0000
AA	0.00000436387	1	0.00000436387	46.46	0.0000
AC	3.77815E-7	1	3.77815E-7	4.02	0.0488
BB	0.00000164781	1	0.00000164781	17.54	0.0001
BC	0.0000035526	1	0.0000035526	37.82	0.0000
Bloques	4.82367E-9	2	2.41183E-9	0.03	0.9747
Error total	0.00000657455	70	9.39222E-8		
Total (corr.)	0.000219559	79			

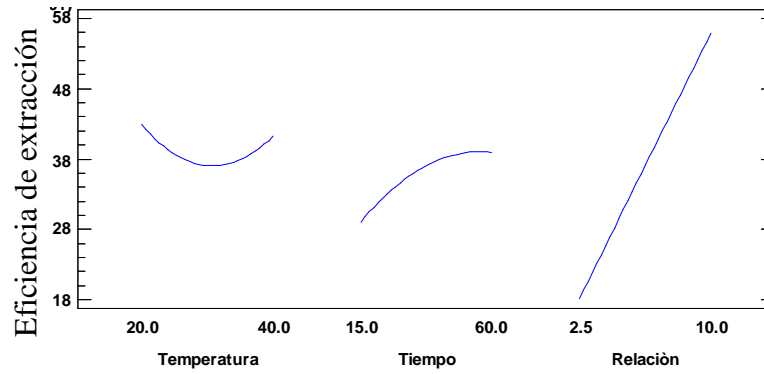
Se determinó que la interacción cuadrática de la temperatura de extracción (AA), la interacción cuadrática del tiempo de extracción (BB) y la interacción cuadrática entre el tiempo y la relación entre el material vegetal/volumen de disolvente (BC) tienen influencia significativa sobre el porcentaje de eficiencia de extracción puesto que se encuentra por debajo del valor de significancia ( $0,05$ ). A diferencia de la interacción cuadrática entre la temperatura de extracción y la relación material vegetal/volumen de extracción (AC) presentó un valor muy cercano a  $0,05$ , que afectó al momento de la extracción de licopeno por lo que se puede constatar que estos dos factores tuvieron gran influencia en el porcentaje de eficiencia de extracción de licopeno al emplear ultrasonido (Cardona et al., 2016). Hay que tomar en cuenta que cuando se realiza una extracción de licopenos de la cáscara de tomate de árbol al exponerla a altas temperaturas esta pierde los principios activos que presenta en la matriz debido a que se degradan en pequeñas cantidades (Paar, 2016).

En el diagrama de Pareto (Figura 3), se evidenció que la relación cuadrática del tiempo de extracción influye de manera negativa sobre el porcentaje de eficiencia de la extracción. La relación material vegetal/volumen de disolvente ha influido de manera positiva; indicando que mientras mayor sea la relación material vegetal/volumen de disolvente el porcentaje de extracción fue mayor puesto que la masa de material vegetal que se utilizó se disminuye sin que el etanol se sature e influya en el proceso.



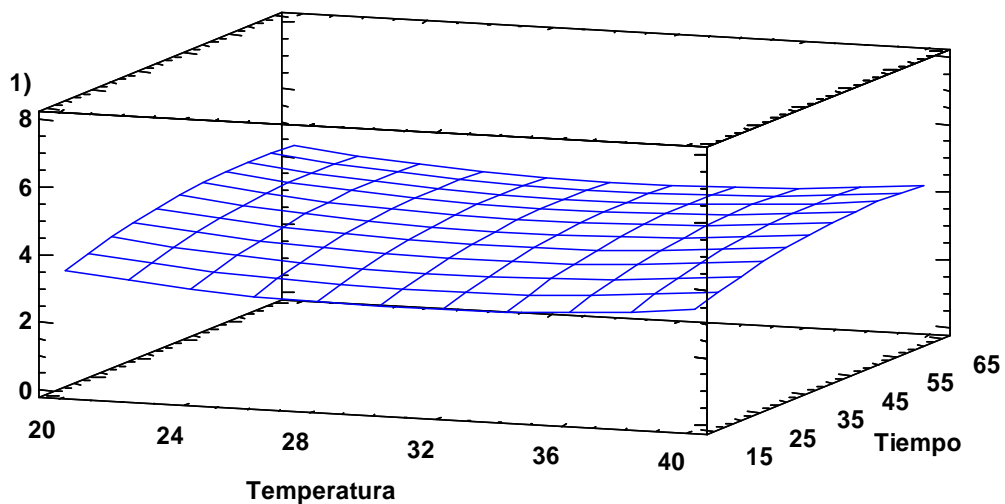
**Figura 3.** Diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de eficiencia de la extracción.

En el gráfico de efectos principales (Figura 4) se corroboró que a medida que aumenta el tiempo de extracción y la relación material vegetal/volumen de disolvente aumenta el porcentaje de eficiencia de extracción mientras que al aumentar la temperatura disminuía este y después se observó un ascenso.



**Figura 4.** Gráfica de efectos principales para el porcentaje de la eficiencia de extracción.

En la Figura 5 del Diagrama de Superficie de Respuesta estimada para los porcentajes de la eficiencia de extracción se muestra que este presenta su punto máximo en relación con la temperatura de extracción de 40 °C y un tiempo de extracción de 60 minutos con la relación 1:10.



**Figura 5.** Diagrama de Superficie de Respuesta estimada para el porcentaje de la eficiencia de la extracción.

Optimizando estos factores de estudio para la variable respuesta (Tabla 4) se obtiene que con una relación material vegetal/volumen de disolvente 1:10, una temperatura de 40 °C y un tiempo de extracción de 60 minutos los compuestos bioactivos que posee el tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) van a ser liberados de la membrana celular maximizando el porcentaje de eficiencia de extracción a un valor de 0,00076%. Este valor representa 220,22 mg de licopeno en 100 gramos de sólido extraídos, comparándolos con estudios previamente realizados por **Fernández, López y Pérez, (2018)** con una extracción con solventes orgánicos obtuvieron una masa de licopenos en cien gramos de sólidos extraídos de 121,3 mg por lo tanto se determina que el proceso de extracción de manera no tradicional con ultrasonido utilizado en el estudio tuvo mayor eficiencia al momento de obtener licopeno de las cáscaras de tomate de árbol previamente tratadas. Según **Rubashvili, 2018** se logró identificar que el contenido de licopenos en 1 g de material de desecho agroindustrial seco para la cáscara de tomate de árbol aplicando el método de ultrasonido está entre 165,11 – 179,56 µg; comparándolo con el estudio realizado a través de la misma técnica se logró tener 763,33 µg de licopenos en 1 g de material obteniendo un porcentaje de eficiencia de la extracción de 0,00076% lo que evidencia que con la tecnología aplicada se pudo extraer aproximadamente el 24% de los licopenos reportados y a su vez este tuvo una mayor presencia de los mismos. Según **Torres, (2013)** reporta que un método no tradicional tiene una alta eficiencia al momento de extraer compuestos bioactivos según las técnicas utilizadas para el tratamiento de la muestra.

**Tabla 4.** Optimización de los factores de estudio para las variables respuestas

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	20.0	40.0	40.0
Tiempo	15.0	60.0	60.0
Relación	2.5	10.0	10.0

### 3.2. Análisis de sólidos solubles totales y concentración de licopenos

El estudio determinó que el extracto rico en licopenos posee 0,40% de sólidos solubles totales que fue calculado con la ayuda de la humedad residual contenida en el extracto (99,60%). Se debe considerar que dichos sólidos solubles aumentan por la degradación de polímeros de fructanos con moléculas de azúcares simples o por la pérdida de agua en la composición del fruto cuando se encuentre maduro. Los sólidos solubles tienen como principales elementos la cantidad de azúcares del fruto, ácido y constituyentes minerales característicos como son cenizas y vitamina C (**Fernández, Pitre, Lobregat y Rondón, 2007**). Finalmente se requirió la concentración de licopenos existentes en el extracto que fue de  $8,77 \text{ mg.L}^{-1}$  para determinar los miligramos que se lograron extraer para el volumen final obtenido con la técnica de ultrasonido.

### 3.3. Determinación *in vitro* actividad antioxidante por el método del radical 2,2-diphenil-1-1-picrylhydrazil (DPPH)

En el Anexo IV se muestra la curva de calibración estándar con Trolox, obteniendo la ecuación de la recta:  $y = 0,1983x - 3,3764$  y un coeficiente de determinación ajustado de  $R^2 = 0,9992$ , en la ecuación se consideró como “x” a la concentración de Trolox e “y” como el porcentaje de inhibición.

El extracto obtenido con los factores optimizados presentó un valor de inhibición de 60,23%, en la dilución 1/2 del extracto rico en licopenos lo que equivale a una concentración de  $693,81 \text{ } \mu\text{mol}$  de Trolox.  $\text{L}^{-1}$ ; lo que representa  $207,11 \text{ } \mu\text{mol}$  de Trolox/g de muestra. En estudios realizados en aguacate de variedad Hass se obtuvo un valor de  $189,80 \pm 10,80 \text{ } \mu\text{mol}$  trolox/g de muestra (**Moreno, 2014**) al igual que en el extracto de nogal (*Juglans Neotropica*) con un valor de  $1019,10 \text{ } \mu\text{mol}$  trolox/g muestra (**Hurtado, 2015**), fueron menores en el extracto de licopenos con los factores optimizados. De forma similar comparado con los datos de **Repo y Encina, (2008)** en la tuna anaranjada ( $41,65 \text{ } \mu\text{mol}$  trolox/g muestra) y tuna verde ( $34,20 \text{ } \mu\text{mol}$  trolox/g muestra) mostraron valores menores a este extracto de licopeno; al igual que con los valores obtenidos por **Encina, (2008)** para la naranjilla ( $62,45 \pm 13,22 \text{ } \mu\text{mol}$  trolox/g muestra) y el taxo ( $55,47 \pm 7,42 \text{ } \mu\text{mol}$  trolox/g muestra).

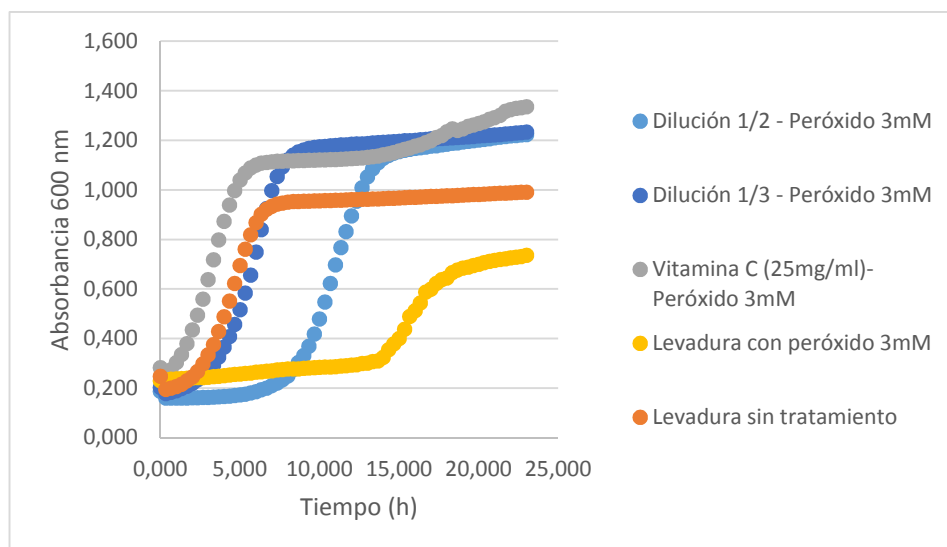
### 3.4. Determinación *in vivo* de la actividad antioxidante con *Saccharomyces cerevisiae*

En el Anexo II se muestra el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* obtenido a partir de los valores de absorbancia contra el tiempo utilizando medio YPD, evidenciando una fase de latencia por 2 horas.

La célula para asegurar su supervivencia en el medio ha desarrollado la capacidad para adaptarse a las alteraciones que se presentan en el exterior y responder de manera efectiva a los mismos. Las alteraciones que pueden existir en la célula o el estrés que se produce son muy importantes en los microorganismos ya que el medio externo que poseen es muy variable y algunas condiciones como temperatura, osmolaridad o nutrientes no siempre pueden ser constantes (Storz et al., 1987). Un estrés oxidativo se genera cuando un organismo está expuesto a oxígeno u otras moléculas altamente oxidantes que pueden ser producidas por el propio metabolismo (Halliwell y Gutteridge, 1984). Por estas razones la levadura más conocida como lo es *Saccharomyces cerevisiae* ha desarrollado algunos tipos de respuesta a dicho estrés oxidativo y para de esta manera facilitar su estudio y poder comprender los mecanismos de defensa que desarrolla. Se ha evidenciado que la levadura al ser expuesta a cualquier factor esta conserva su estructura y funcionalidad a lo largo de la evolución que ha tenido (Kaino y Takagi, 2008). Es de importancia evaluar los daños que se producen por el estrés oxidativo los cuales se encuentran relacionados con enfermedades neurodegenerativas, procesos de envejecimiento o cáncer (Aruoma y Halliwell, 1989).

Para el análisis *in vivo*, se utilizó *Saccharomyces cerevisiae*, para comprobar la actividad antioxidante del extracto de licopenos después de ser expuesta la célula a peróxido de hidrogeno como agente oxidante. En la Figura 6, se utilizó como control positivo la levadura junto a la vitamina C a una concentración de 25 mg.  $ml^{-1}$  ya que es conocida por su alto poder antioxidante y como control negativo la levadura con peróxido 3 mM.





**Figura 6.** Actividad antioxidante del extracto rico en licopeno (Diluciones 1/2 y 1/3) *in vivo* con *Saccharomyces cerevisiae*.

Bioquímicamente se ha demostrado que la vitamina C ayuda a combatir los radicales libres que son provocados por efectos oxidativos que pueden ocurrir en el organismo (National Institutes of Health, 2012).

En las cinco curvas de crecimiento obtenidas en la Figura 6, se observa que la curva de control negativo (Levadura con peróxido 3 mM) fue la que menor crecimiento obtuvo como consecuencia de la oxidación a la que fue expuesta, tuvo una fase de latencia de alrededor de 14 horas que comparado con la curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo V) se lo considera largo al momento de que la levadura comience con su fase de crecimiento, esto se debió a la concentración de peróxido de hidrógeno a la que fue expuesta por lo que se requirió de una mayor capacidad de la célula para adaptarse al medio. El peróxido de hidrógeno es conocido por formar especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual expone a las células a un considerable estrés (Shuai y Yong, 2006). Es considerado como un agente oxidante altamente reactivo. Produce radicales libres de oxígeno que son muy reactivos y se adhieren con rapidez a los componentes celulares (Fonn, 2002). Cuando este agente es aplicado a levaduras es considerado como un tóxico por lo que reacciona con las macromoléculas del microorganismo para modificar la función y estructura y producir desbalance en la célula ocasionando el conocido estrés oxidativo conllevando a la muerte de la levadura (Folch, Garay, Lledías y Covarrubias, 2004). La biomasa del

caldo de cultivo se relaciona con la turbidez que se evidencia en el medio por esta razón se determinó su crecimiento máximo con un valor de absorbancia de 0,736 por **Camacho y Sáenz, (2010)** en medio YPD comparado con el valor de estudio de 0,991, este fue superior.

La fase de latencia de la curva de control positivo (Vitamina C (25mg/ml) - Peróxido 3mM) fue de 4 horas aproximadamente por la presencia de la vitamina C que es considerada como un antioxidante altamente efectivo que contrarresta los efectos que produce el peróxido de hidrógeno en la levadura (**Rodríguez y Martínez, 2002**). Se considera como un antioxidante a un elemento que tiene la capacidad de donar electrones al radical libre inestable para evitar la oxidación de otros compuestos. Si el antioxidante dona los electrones deja de ser un radical libre perdiendo su capacidad de ser reactivo. Por esta razón se considera que la vitamina C tiene la capacidad de donar un electrón; convirtiéndola en un radical ascorbilo (o ácido semidehidroascórbico), que es estable y poco reactivo (**Katz, 2003**).

La levadura sin tratamiento tuvo su punto máximo en la curva de crecimiento en una absorbancia de 0,991; se evidenció que la fase de adaptación de la curva fue de 22 horas en comparación con la curva de crecimiento que presentó el control positivo (Vitamina C (25mg/ml) - Peróxido 3mM) fue más larga. Esto sucede por el metabolismo que posee la levadura al producir agentes oxidantes los que provocan la activación de los mecanismos de defensa que utilizan catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas que evitan que se dé un daño oxidativo al aumentar la etapa de adaptación que requiere la levadura para su desarrollo y de esta manera evitar lo que ocurrió con el control positivo que tuvo la influencia del agente antioxidante que favoreció en el metabolismo al reducir los efectos que dichos agentes provoca (**Katsube et al., 2003**).

Para el tratamiento de las diluciones 1/2 (Dilución 1/2 - Peróxido 3mM) y 1/3 (Dilución 1/3 - Peróxido 3mM) del extracto rico en licopenos de las cáscaras de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) las fases de latencia duraron 7 y 2 horas respectivamente. Se evidenció que estos valores fueron mayores que el control positivo, pero mucho menores que el control negativo lo que indica que el extracto rico en licopenos obtenido en la experimentación tuvo resultados satisfactorios al momento de considerar su efecto antioxidante. Hay que observar que los valores de

absorbancia con las diluciones 1/2 y 1/3 del extracto a las 23 horas son mayores que los obtenidos de la curva de crecimiento de levadura sin tratamientos con absorbancias de 1,224 y 1,223 respectivamente. Se logró comprobar que los dos tratamientos realizados tuvieron una capacidad antioxidante efectiva puesto que pudieron llegar a las condiciones de estrés establecidas ya que dichos microorganismos lograron superar o redujeron los efectos que causa en su estructura celular su exposición al peróxido de hidrógeno.

### **3.5. Verificación de la hipótesis**

Después de los datos obtenidos en los ensayos realizados *in vitro* e *in vivo* se determinó que:

H<sub>0</sub> Se rechaza la hipótesis nula

Ha = La hipótesis alternativa se acepta puesto que se concluye que la extracción de licopenos con capacidad antioxidante se puede dar utilizando ultrasonido con los residuos agroindustriales provenientes de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

Se extrajeron licopenos con capacidad antioxidante por medio de ultrasonido, utilizando los residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.).

Se desarrolló una tecnología por medio de ultrasonido para la extracción de licopenos, a partir de los residuos agroindustriales de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) optimizando el proceso en un tiempo de 60 minutos, temperatura de 40 °C y relación de material vegetal/volumen de disolvente de 1:10 para un porcentaje de eficiencia de extracción de 0,00076 %.

Se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto rico en licopenos, aplicando el método químico de DPPH en el cual se observó un porcentaje de inhibición del 60.23 %, lo que equivale a una concentración equivalente Trolox de 693.81  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Se determinó la capacidad antioxidante *in vivo* del extracto rico en licopenos utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo, evidenciando que la célula logró superar el estrés oxidativo al ser expuesta a una concentración de 3 mM de peróxido de hidrógeno presentando valores de crecimiento celular muy similares a los obtenidos con la vitamina C.

## 4.2. Recomendaciones

Caracterizar de forma química y física el extracto rico en licopenos obtenido.

Identificar y cuantificar todos los tipos de carotenoides que se obtuvieron en el extracto de licopenos.

Realizar formulaciones con el extracto rico en licopenos para su uso en alimentos funcionales.

Determinar la estabilidad del extracto rico en licopenos y de la formulación obtenida.

Utilizar otros oxidantes para la realización de las pruebas *in vivo* con *Saccharomyces cerevisiae*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, J. Salomón, S. Sevilla, I. y Nuevas, L. (2016). Use of ultrasound for extraction of the apolar fraction in leaves of *Mangifera indica* L. (mango tree). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 21(3). Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v21n3/pla02316.pdf>
- Albornoz, Guillermo. (1992). El tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* Sendt) en el Ecuador, Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Fundación para el Desarrollo Agropecuario. Recuperado de: [https://books.google.com.ec/books/about/El\\_tomate\\_de\\_%C3%A1rbol\\_Cyphomandra\\_betacea.html?id=LTg6AAAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.ec/books/about/El_tomate_de_%C3%A1rbol_Cyphomandra_betacea.html?id=LTg6AAAACAAJ&redir_esc=y)
- Aràndiga, Gemma & Díaz Sonia. (2008). Estudio del licopeno del tomate como colorante natural desde la perspectiva analítica e industrial. Recuperado de: <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/5544/Resum.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Aruoma, O. Halliwell, B. (1998). The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. Department of Biochemistry, University of London King's College Strand Campus, London WC2R 2LS, U.K. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90066-X)
- Berzelius, J.J. (1837). *Ann der Pharm* 21: 257-262.
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírveda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bohs, L. (1995). Transfer of *Cyphomandra* (*Solanaceae*) and its species to *Solanum*. *Taxon* 44: 583-587.

- Brand-Williams, W. Cuvelier, M.E. Berset, C. (1997). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.
- Cao y col., (1995); Pieri y col., (1994). Estudio de los componentes antioxidantes y actividad antioxidante en tomates. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/145/14503507.pdf>
- Camacho, L. N., y Sáenz, R. T. (2010). Implementación de diferentes técnicas analíticas para determinación de biomasa bacteriana de cepas *Pseudomonas putida* biodegradadoras de fenol, 41–46. Recuperado de: <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistaion/article/view/954/1317>
- Cardona, E. (2006). Extracción del carotenoide licopeno del tomate chonto (*Lycopersicum esculentum*).
- Cardona E.M. and Ríos L.A. 2006. Extraction of the carotenoid lycopene from chonto tomato. *Vitae*. 13(2):44-53.
- Cruz, R., & González, J. (2013). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutr Hosp*, 28(1), 6–15. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6302>
- El Comercio. (2011). Todo el año hay tomate de árbol. Recuperado de: <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/ano-hay-tomate-de-arbol.html>.
- El Productor. (2017). Cultivo de tomate de árbol. Recuperado de: <http://elproductor.com/articulos-tecnicos/articulos-tecnicos-agricolas/cultivo-de-tomate-de-arbol/#>
- Encina, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú* (Vol. 74). Sociedad Química del Perú. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2008000200004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2008000200004)

- Erdman, J., Ford, N. y Lindshield, B. (2009). ¿Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 483. 229- 235.
- Erhardt, J., Meisner, C., Bode, J. y Bode, C. (2003). Lycopene, -carotene, and colorectal adenomas. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 78. 1219-1224.
- Espín, S., González, S., Taco, V., Poveda, C., Ayuda, B., González, A. y Santos, C. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of yellow and purple-red Ecuadorian cultivars of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.). *Food chemistry*. 194, 1073-1080. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.131>
- Estévez Santiago, R. (2016). Biomarcadores de luteína, zeaxantina y otros carotenoides en la relación dieta y salud ocular humana. Tesis Doctoral. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; Facultad de Farmacia. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15172/1/T-UCE-0008-Q020-2018.pdf>
- Fernández, A. Giaquinta, A. Laudo, C. Rojo, A. (2017). Los antioxidantes en el proceso de patologías oculares. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6002287>
- Fernández, D. López, O.D. and Pérez, C.F. (2018). Preliminary Study of Lycopene Extraction from *Solanum Betaceum* Residuals. Technical University of Ambato, Ecuador. CICABI 2018. 1<sup>st</sup> International Congress of Food Science and Biotechnology.
- Fernández C., Pitre, A., Llobregat, M. y Rondón, Y. (2007). Evaluación del Contenido de Licopeno en Pastas de Tomate Comerciales. Universidad de Carabobo, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química, Centro de Investigaciones Químicas. Vol 18(3), 31-38. Recuperado de: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v18n3/art05.pdf>
- Fiedor, J. y Burda, K. (2014). Review Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 6: 466-488.



- Folch-Mallol, J., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Covarrubias Robles, A. A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* MICROBIOLOGÍA. Argentina. Recuperado de: [http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1\\_2d.pdf](http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2004/mi04-1_2d.pdf)
- Guija, E., Inocente, M., Ponce, J., Zarzosa, E., (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. 15 (1): 57-60.
- Guija, P., Ponce, J., y Zarzosa, N. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante, 2(1), 0-3. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf>
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine, 2da edic., Oxford, London: Clarendon Press. Recuperado de: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=742827&pid=S0718-0462200600020001000006&lng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=742827&pid=S0718-0462200600020001000006&lng=es)
- Hielscher Ultrasound Technology, (2019). Tecnología de ultrasonido de Hielscher. Recuperado de: <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-homogenizers-for-liquid-processing-3.htm>
- Heber HN, Lu Q-L. (2002). Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exper Biol Med.* 227:920-923.
- Heinonen MI, Ollilainen V, Linkola EK, Varo PT, Koivistoinen PE. (1989). Carotenoids in finnish foods, vegetables, fruits, and berries. *J Agric Food Chem.* 37:655-659.
- Hernandez, C. E. (1999). Direct lipase-catalyzed lipophilization of chlorogenic acid from coffee pulp in supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products*, 30(3), 359-365. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.07.004>
- Horiz Med. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. 15 (1): 57-60.
- Hurtado, P. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans Neotropica* Diels (nogal

- peruano). Revista de la Sociedad Química del Perú (Vol. 81). Sociedad Química del Perú. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2015000300010](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2015000300010)
- INEC. (2018). Encuesta de superficie y producción agropecuaria 2018. Recuperado el 7 de agosto del 2016 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/>
- Instituto ecuatoriano de normas técnicas. (1998). Icontec. NTC – 4105p.
- Janiszewska, E. y Sakowski, P. (2013). Effect of the ultrasound on the carrot juices freezing process. *Inzynieria Rolnicza*. 4(148): 49-57.
- Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sacariah K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chem* 73: 285-290. Recuperado de: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:wpak6mCrNLcJ:190.169.94.12/ojs/index.php/rev\\_ff/article/download/430/389+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:wpak6mCrNLcJ:190.169.94.12/ojs/index.php/rev_ff/article/download/430/389+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=ec).
- Jiménez, et. al. (2016). Actividad antioxidante y contenido de licopeno de tres variedades de tomate cultivados con varios métodos de fertilización. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1-5.
- Kaino, T. y Takagi, H. (2008). Gene expression profiles and intracellular contents of stress protectants in *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol and sorbitol stresses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2): 273-283
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., y Kobori, M. (2003). Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins, 68–75. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502387>
- Kuskoski, E. Asuero, A. Troncoso, A. Mancini-Filho, J. Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de

frutos. Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.25 no.4. Recuperado de:  
<https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>

La Hora. (2017). Pelileo pionero en la producción de tomate de árbol. Recuperado de:  
Diario digital La Hora: <https://lahora.com.ec/noticia/1102091907/pelileo-pionero-en-la-produccion-de-tomate-de-arbol>

Lampe C, Watada AE. (1971). Postharvest quality of high pigment and crimson tomato fruit. J Amer Soc Hort Sci. 96(4):534-535

Lister, C., Morrison, S., Kerkhofs, N., y Wright K. (2005). The nutritional composition and health benefits of New Zealand tamarillos. Crop & Food Research Confidential Report. (1281), 29 Recuperado de:  
[https://www.researchgate.net/profile/Misnun\\_Nababan/publication/215550666\\_The\\_nutritional\\_composition\\_and\\_health\\_benefits\\_of\\_New\\_Zealand\\_tamarillos/links/0e0a5a3d22f5adc6d5a41b1b.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Misnun_Nababan/publication/215550666_The_nutritional_composition_and_health_benefits_of_New_Zealand_tamarillos/links/0e0a5a3d22f5adc6d5a41b1b.pdf)

Londoño, J. (2015). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad.

Londoño, M.; Sepúlveda, J.; Hernández, A.; Parra, J. (2012). Bebida Fermentada de Suero de Queso Fresco Inoculada con *Lactobacillus casei*. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 61(1):4409-4421.

Madigan, Martinko, P. (2006). Biología De Los Microorganismos 10a Ed - Brock.pdf (Decima). Madrid.

Mager, W.H., Winderickx J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. Trends in Pharmacological Sciences 26(5):265-73. Recuperado de:  
[https://www.researchgate.net/publication/7878467\\_Mager\\_WH\\_Winderickx\\_J\\_Yeast\\_as\\_a\\_model\\_for\\_medical\\_and\\_medicinal\\_research\\_Trends\\_Pharmacol\\_Sci\\_26\\_265-273](https://www.researchgate.net/publication/7878467_Mager_WH_Winderickx_J_Yeast_as_a_model_for_medical_and_medicinal_research_Trends_Pharmacol_Sci_26_265-273).

Maita, S. (2011). Todo el año hay tomate de árbol. Recuperado de: Diario digital El Comercio: <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/ano-hay-tomate-de-arbol.html>

- Martínez, A. (2003). Carotenoides. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia. Recuperado de: <https://docplayer.es/12880486-Universidad-de-antioquia-carotenoides-profesor-alejandro-martinez-martinez-facultad-de-quimica-farmaceutica-email-amart-muiscas-udea-edu.html>
- Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Bogotá, D.C. 2014.
- Munné-Bosch, S. (2012). Phenolic Acids: Composition, Applications and Health Benefits. New York. Recuperado de: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/utaebbooks/reader.action?docID=3017830&query=DPPH>
- National Institutes of Health. (2012). Vitamina C. Recuperado de: <https://ods.od.nih.gov/pdf/factsheets/VitaminC-DatosEnEspañol.pdf>
- Omenn, G. S. et al. (1996), “Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease”, *New England Journal of Medicine*, 334:1150-1155.
- Ordóñez A, Balanza M, Martín F, Flores C. (2009). Estabilidad del carotenoide licopeno en tomates en conserva. *Inform Tecnol*; 20: 31-37. Recuperado de: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=3561581&pid=S0212-1611201300010000200047&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=3561581&pid=S0212-1611201300010000200047&lng=es)
- Osorio, G. (2013). Proyecto de factibilidad para la exportación de pulpa de tomate de árbol a México, período 2012-2026. Quito.
- Otero, Miguel; Guerrero, I. (2012). Las levaduras, 88–90. Recuperado de: [http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS\\_TECNICAS/032/New/Documentación/Parte I/Referencias/Libros y monografías/Las Levaduras y sus productos derivados.pdf](http://karin.fq.uh.cu/acc/2016/CIENCIAS_TECNICAS/032/New/Documentación/Parte I/Referencias/Libros y monografías/Las Levaduras y sus productos derivados.pdf)
- Paar, A. (2016). Extracción de solventes asistida por microondas, 2–3. Recuperado de: <https://www.antonpaar.com/?eID=documentsDownload&document=57570&L=1>

- Palma, M. y Barroso, C.G. (2001). "Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products". *Analytica Chimica Acta*. N° 458: 119-130.
- Peláez, A. (2016). Validación funcional de extractos polifenólicos de cacao mediante ensayos in vivo con organismos modelo. Valencia. Retrieved from [http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/56209/Tesis Ana Peláez Soto.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/56209/Tesis%20Ana%20Peláez%20Soto.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Perera CO, Mei Yen G. (2007). Functional properties of carotenoides in human health. *International J Food Proper*. 10:201-230.
- Quintana, A. Hurtado, M. Hernández, C. y Palacios, E. (2018). Carotenoides. ¿Qué son y para qué se usan? *Ciencia: volumen 69 número 4*. Recuperado de: [https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/69\\_4/PDF/10\\_69\\_4\\_1106\\_Carotenoides\\_L.pdf](https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/69_4/PDF/10_69_4_1106_Carotenoides_L.pdf)
- Ramírez, T. (2009). Perfil de tomate de árbol. Ibarra: Centro de Información e Inteligencia Comercial.
- Repo, R. y Encina, C. 2008. Determinación de la actividad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Rev. Soc. Quim. Perú* 74:108-124.
- Rodríguez Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in food. *A Guide to carotenoid analysis in foods*.
- Rodríguez J, Martínez M. (2002). Extracción por ultrasonido de los polifenoles de la fruta *Punica granatum* (granada). *Rev Cubana de Farm*. 48(2):469-476. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=760901&pid=S1810-634X201900020001200014&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=760901&pid=S1810-634X201900020001200014&lng=es)
- Rubashvili, Imeda. (2018). Extraction and Analysis of the Major Carotenoids of Agro-Industrial Waste Materials Using Sequential Extraction Techniques and High Performance Liquid Chromatography. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 13(2):em06

- Soria AC, Villamiel M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci Technol* (21):323-331.
- Shuai, Y. Yong, J. (2006). Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. Department of Applied Biology and Chemical Technology, the Hong Kong Polytechnic University, Hung Hom, Kowloon, Hong Kong. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.031>
- Storz, G. Christman, M. Sies, H. y Ames, B. (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. RESEARCH ARTICLE 84 (24) 8917-892. Recuperado de: <https://www.pnas.org/content/pnas/84/24/8917.full.pdf>
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry*, 129(3), 747–752. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.015>
- Rowles, J. L. et al. (2017), “Increased dietary and circulating lycopene are associated with reduced prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis”, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 20(4):361-377.
- Tanaka, T. et al. (1995), “Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin”, *Cancer Research*, 55: 4059-4064.
- Tonucci LH., Holden JM., Beecher GR., Khachik F., Davis C., Mulokozi G., (1995). Carotenoid content of thermally processed tomato-based food products. *J Agric Food Chem*. 43:579-586.
- Torres, A. (2012) Caracterización física, química y compuestos bioactivos de pulpa madura de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) (Cav) Sendtn. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 62(4), 381-388. Recuperado de: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222012000400010](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222012000400010)

- Torres, A. (2013) Caracterización física, química y compuestos bioactivos de pulpa madura de tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) (Cav) Sendtn. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 62(4), 381-388. Recuperado de: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222012000400010](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222012000400010)
- Tswett, M. (1830). Ber Deutsch Botan Ges 24: 384-393.
- Wackenroder, H.W. F. (1831). Geigers Magazin der Pharmazie 33: 144-172.
- Waliszewsky, K. (2010). Propiedades nutraceuticas del licopeno. Artículo de revisión salud pública de México / vol. 52, no. 3
- Waliszewski, K. N., y Blasco, G. (2010). Nutraceutical properties of lycopene. Salud Pública de México, 52(3), 254–265. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20485889>
- Wang, S., Meckling, K., Marcone, M., Kakuda, Y. y Tsao R. (2011). ¿Can phytochemical antioxidant rich foods act as anti-cancer agents?. Food Research International. 44. 2545-2554.
- Wang, X., Constantinou, A., Sapuntzakis, M., Bowen, P. y van Breemen, R. (2006). Solubilization and stabilization of carotenoids using micelles: delivery of lycopene to cells in culture. Lipids. 34. 1031–1036.
- Xia et al., (2005). Extracción ultrasónica de la cafeína. Recuperado de: <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-extraction-of-caffeine-and-other-active-compounds.htm>
- Yamaguchi, M. (2010). Carotenoids: propieties, effects and diseases. New York: Nova Science, Inc. Recuperado de: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/utaebbooks/reader.action?docID=3021582&query=lycopene>
- Zou, J. y Jiang, C. (2016). Natural antimicrobial agent use in the preservation of fruits and vegetable. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

## ANEXOS

### Anexo I. Material fotográfico procedimiento



**Figura 1.** Equipo de ultrasonido



**Figura 2.** Muestras de material vegetal sometido a las variables de estudio



**Figura 3.** Filtración de las muestras para obtener el extracto rico en licopenos.



**Figura 4.** Determinación de sólidos solubles en el extracto rico en licopenos.

### Anexo II. Material fotográfico determinación de la actividad antioxidante *in vitro*



**Figura 5.** Muestras del extracto rico en licopenos sometidas a determinación de actividad antioxidante con DPPH.



**Figura 6.** Absorbancias obtenidas de actividad antioxidante con DPPH en el espectrofotómetro.



**Anexo III.** Material fotográfico determinación de la actividad antioxidante *in vivo*

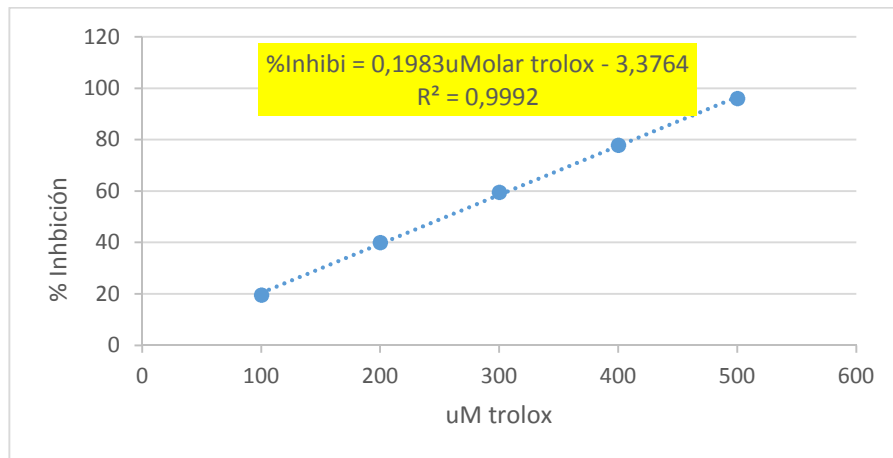


**Figura 7.** Muestras del extracto rico en licopenos para ser sometidas a determinación de actividad antioxidante *in vivo*.



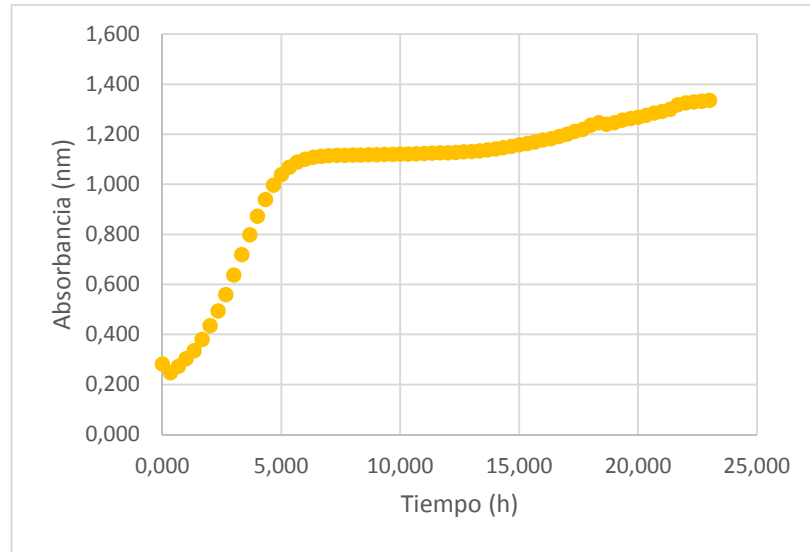
**Figura 8.** Muestras del extracto rico en licopenos sometidas a determinación de actividad antioxidante *in vivo*.

**Anexo IV.** Curva de calibración para calcular el porcentaje de inhibición utilizando Trolox



**Figura 9.** Actividad antioxidante del extracto rico en licopeno determinada con DPPH.

**Anexo V.** Curva de crecimiento experimental de la levadura



**Figura 10.** Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD por 23 horas.