



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN
SENSORIAL DE VARIEDADES DE CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) DE
YUCATÁN**

Tesis que presenta

Mary Jose Rozete Navarro

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México
2019

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Mary Jose Rozete Navarro titulado **CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN SENSORIAL DE VARIEDADES DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) DE YUCATÁN** fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Laboratorio 25, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Clelia De la Peña Seaman
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 09 de Abril de 2019

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Lic. Mary Jose Rozete Navarro

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota y forma parte del proyecto titulado “Phytochemical characterization and sensory evaluation of a collection of different cultivars of Habanero pepper of the Yucatan Peninsula” financiado por la Iniciativa Gobierno del Estado de Yucatán/Texas A&M University 2017.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, a la unidad de Biotecnología y la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por permitirme realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones, así como a CONACyT por la beca otorgada con número 814819.

Al proyecto “Phytochemical characterization and sensory evaluation of a collection of different cultivars of Habanero pepper of the Yucatan Peninsula” financiado por la Iniciativa Gobierno del Estado de Yucatán/Texas A&M University 2017.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Felipe Vázquez Flota por la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo. Muchas gracias doctor, de verdad lo admiro mucho, tanto por su amplio conocimiento como por su calidad humana. Gracias por toda su asesoría, amabilidad y paciencia durante mi proceso de aprendizaje. Sé que puedo ser bastante cabeza dura algunas veces, pero no hay palabras para describir lo agradecida que siempre estaré con usted.

De igual manera quiero agradecer al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar mi entrenamiento y parte del trabajo experimental de este proyecto.

A la Dra. Maira Segura Campos, quien siempre estuvo dispuesta a aclarar mis dudas y contribuyó de manera directa en la realización del análisis sensorial. Al Dr. Manuel Martínez Estévez, quien participó en todos mis seminarios de avance con una actitud de crítica constructiva y contribuyendo con ideas y sugerencias para mejorar el trabajo.

Así mismo quiero agradecer a la Dra. Nancy Santana Buzzy por su ayuda tanto en la adquisición de conocimiento acerca de las variedades registradas por CICY, como por formar parte de mi comité evaluador de tesis. De igual manera quiero agradecer a la Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez por su participación en la revisión del escrito de tesis.

Al Dr. Víctor Aguilar Hernández y la QBB. Ligia Brito Argáez por su apoyo en el análisis por HPLC-MS/MS. Y agradecer el apoyo del Ing. Eduardo Balam Uc y en especial al Ing. Fernando Contreras Martín por toda su ayuda para el cultivo de las plantas; a la M. en Ed. Fabiola Escalante Erosa por entrenarme y ayudarme en el uso del CG-MS; y al M. en C. Radamés Álvarez Zapata por su ayuda para el establecimiento del método de HPLC.

Gracias a la M. en C. Miriam Monforte González por todo su ayuda para la obtención de material y desarrollo de técnicas en el laboratorio 25 de la UBBMP. Y a la QBB. Karlina García Sosa por su apoyo técnico en diferentes actividades durante mi maestría.

Quiero agradecer a Ismael por acompañarme tantas noches de HPLC en el laboratorio e incluso darme asilo y comida cuando me sentía demasiado cansada como para manejar. Siempre hiciste más ameno el tiempo de trabajo amigo.

Gracias a mis compañeros, en especial a Mickel, Stephanie y Jimmy por todas esas veces que quizá los desesperé por no entender algo de química y aun así encontraban la manera de explicarme con lujo de detalle.

De igual manera quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio 25 de la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (Zurisdai, Neptis Lloyd, Nachito, Ángel y Karen) y de la unidad de Biotecnología (Augusto, Landy, Javier, Alejandrina, Carlos, Luis, Moni, Mercedes y Areli), y amigos de CICY (Rodrigo, Pedro, Hiram) porque gracias a ustedes esta etapa me dejó mucho más que sólo un grado académico.

DEDICATORIAS

A mi familia, porque cada paso que doy siempre está ahí para apoyarme y alentarme en el camino. Mi madre, María Antonia Navarro Benítez, quien me ha enseñado a seguir adelante sin importar lo difícil de la situación o lo que opinen los demás. Mis hermanas, Paola y Ale, porque no imagino mi vida sin esas dos locas siendo parte de ella. Mi padre, Edmundo Rozete Campos, quien, sin importar las circunstancias, siempre encuentra la manera de brindarme lo necesario para seguir adelante.

A Vincent Leblanc, quien se convirtió en mi compañero de vida y de incontables experiencias durante mi periodo en la maestría. Estos dos años y medio no habrían sido lo mismo sin ti a mi lado.

A mis amigos, Arni, Leito, Monse, Samuel, Yazmín, Gaby, Alfredo, Borre, Sabio, Emmanuelle, Ángeles, Elena, Ulli, Raül Liliana y Vincent Long, porque a pesar de la distancia, jamás me siento sola y sé que siempre están para escucharme, aconsejarme, apoyarme y/o regañarme y ayudarme a continuar.

Con todo mi cariño a Daniel Avelar†.

ÍNDICE

RESUMEN	5-2
ABSTRACT	3-4
INTRODUCCIÓN	5-7
CAPÍTULO I	8-32
ANTECEDENTES	8-19
1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS EN FRUTOS DE <i>CAPSICUM</i>	8-13
1.2 PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS EN CHILE HABANERO	13-16
1.2.1 CAPSAICINOIDES	13-14
1.2.2 CAROTENOIDES	14-15
1.2.3 COMPUESTOS FENÓLICOS	15-16
1.2.4 COMPONENTES VOLÁTILES.....	16
1.3 CHILE HABANERO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.....	16-17
1.4 NUEVAS VARIETADES DE CHILE HABANERO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	17-18
1.5 RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES	19
JUSTIFICACIÓN.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22-23

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24-32
CAPÍTULO II	33-
CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE SEIS VARIEDADES DE <i>C. CHINENSE</i> JACQ.....	33-55
2.1. INTRODUCCIÓN.....	33-35
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36-40
2.2.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	36
2.2.2 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS FRUTOS MADUROS	36-37
2.2.3 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS.....	37
2.2.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (CCD).....	37
2.2.5 CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	37-38
2.2.6 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES POR MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	38-39
2.2.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL (DPPH).....	39-40
2.2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41-
2.3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS FRUTOS.....	41-45
2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES.....	45-47
2.3.3 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	47-49
2.3.4 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS DE FRUTOS	49-52

2.4 CONCLUSIONES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.3
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.4-55
CAPÍTULO III	56-75
IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES Y COMPARACIÓN DE LOS PERFILES METABÓLICOS DE LAS VARIEDADES.....	56-73
3.1 INTRODUCCIÓN	56-58
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	59-61
3.2.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	59
3.2.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA DETECCIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES EN LOS EXTRACTOS DE FRUTOS COMPLETOS.....	59
3.2.3 CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES	59-60
3.2.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE PERFILES METABÓLICOS.....	60
3.2.5 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS	940
3.2.6 PRETRATAMIENTO DE DATOS PARA GENERACIÓN DE MATRICES MULTIVARIANTES ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.1	
3.2.7 USO DE ANÁLISIS MULTIVARIANTES PARA PARA LA COMPARACIÓN DE PERFILES METABÓLICOS.....	941
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62-72
3.3.1 IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTE VOLÁTILES EN LOS EXTRACTOS DE LAS VARIEDADES	942-64

3.3.2 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES EN LAS VARIEDADES	64-70
3.3.3 ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LOS PERFILES METABÓLICOS	70-72
3.4 CONCLUSIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74-75
CAPÍTULO IV	76-85
EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS VARIEDADES DE <i>C. CHINENSE</i> JACQ.	76-84
4.1 INTRODUCCIÓN	76-77
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	77-79
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80-84
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
CAPÍTULO V	86-
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	86-
5.1 DISCUSIÓN GENERAL	86-92
5.2 CONCLUSIONES GENERALES	93
PERSPECTIVAS.....	94
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95-96
APÉNDICE I	97-101

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de vainillilamida y capsaicinoides	8
Figura 1.2 Estructura molecular de precursores de la síntesis de carotenoides y ejemplos de carotenoides presentes en <i>Capsicum</i>	10
Figura 1.3 Estructura molecular de los componentes del grupo de la vitamina E y los grupos sustituyentes en los diferentes componentes que la integran.....	10
Figura 1.4 Estructura molecular de compuestos fenólicos encontrados en <i>Capsicum</i>	11
Figura 1.5 Compuestos volátiles reportados en <i>Capsicum</i>	13
Figura 1.6 Representación del grado de picor de variedades de <i>Capsicum annuum</i> y <i>Capsicum chinense</i> y su principal uso relacionado con su picor	14
Figura 1.7 Estructura molecular de los principales carotenoides reportados en <i>Capsicum chinense</i>	15
Figura 1.8 Polifenoles encontrados en <i>C. chinense</i> Jacq.....	16
Figura 1.9 Estructura molecular del posible componente volátil de <i>C. chinense</i> responsable del aroma frutal.....	16
Figura 1.10 Variedades registradas por el Centro de Investigación Científica de Yucatán	18
Figura 1.11 Diagrama de flujo de la estrategia experimental.....	23
Figura 2.1 Curvas de calibración de capsaicina y dihidrocapsaicina	38
Figura 2.2 Curva de calibración de ácido clorogénico	39
Figura 2.3 Estados de maduración de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	42
Figura 2.4 Contenido de carotenos en las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.	45
Figura 2.5 Contenido de capsaicinoides totales en las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.	47

Figura 2.6 Nivel de pungencia de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	47
Figura 2.7 Contenido de fenoles totales de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	48
Figura 2.8 Actividad antioxidante (Ec50) en ensayo de reducción del radical DPPH de los extractos de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	50
Figura 2.9 Comparación de la correlación entre encontrenido de fenoles totales y capsaicinoides con la actividad antioxidante de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.	51
Figura 2.10 Análisis cualitativo de reducción del radical DPPH en CCD impregnada con nitrato de plata.....	51
Figura 3.1 Perfiles cromatográficos sin alinear y alineados utilizando el logaritmo COW	57
Figura 3.2 Patrón de fragmentación de dihidrocapsaicina en extracto de <i>C. chinense</i> Jacq y comparación con Nonivamida en la base de datos NIST	62
Figura 3.4 Componentes volátiles en las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.	64
Figura 3.5 Perfiles metabólicos de los extractos de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq. 66	
Figura 3.6 Ampliación de los primeros 22 min de los perfiles metabólicos de los extractos de <i>C. chinense</i> Jacq.	68
Figura 3.7 Perfiles metabólicos por HPLC/MS/MS de los extractos de fruto completo de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	70
Figura 3.8 Análisis de agrupamiento jerárquico y análisis de componentes principales de los perfiles metabólicos de las seis variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	71
Figura 3.9 LoadingPlot de los perfiles metabólicos de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.	72
Figura 4.1 Sensograma. Herramienta utilizada para el análisis sensorial de un alimento	76
Figura 4.2 Panel de jueces realizando la evaluación sensorial de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	78

Figura 4.3 Evaluación sensorial de picor de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	80
Figura 4.4 Análisis de frecuencias de la percepción de picor de las variedades	81
Figura 4.5 Análisis de correlación entre el contenido de capsaicinoides y la percepción de picor	82
Figura 4.6 Evaluación sensorial de olor, sabor y color de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	83
Figura 4.7 Análisis de correlación entre el contenido de fenoles totales y el análisis sensorial de olor	83
Figura 4.8 Perfiles de compuestos volátiles de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq	84
Figura 5.1 Contenido y proporción de capsaicinoides en las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq. recolectadas en marzo-abril y septiembre-octubre	87
Figura 5.2 Comparación “estructura-actividad antioxidante” de estructuras 3,5,7,3',4'-pentahidroxifenólicas	88
Figura 5.3 Receptor de capsaicina en células de nervio trigémino.....	90
Figura 5.4 PCA de lotes de paprika secadas a través de tres métodos diferentes	92
Figura A.1 Comparación de perfiles por CCD de los extractos etanólicos y acetónicos de <i>C. chinense</i> Jacq	98
Figura A.2 Perfiles de CCD normales e impregnados con AgNO ₃ de <i>C. chinense</i> Jacq y otros metabolitos intermediarios de las síntesis de capsaicinoides	99
Figura A.3 Barrido espectrofotométrico y absorción máxima de los extractos de <i>C. chinense</i> Jacq.	99
Figura A.4 Absorbancia de los extractos de frutos de la variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.	100

Figura A.5 Contenido de capsaicinoides en los extractos de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.....	101
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Compuestos fenólicos y sus actividades biológicas reportadas encontrados en frutos de <i>Capsicum</i> spp	12
Cuadro 2.1 Características morfológicas de los frutos de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq. recolectadas en marzo y abril 2018	41
Cuadro 2.2 Características morfológicas de 30 frutos de las variedades de <i>C. chinense</i> Jacq. recolectadas en septiembre y octubre 2018	43
Cuadro 2.3 Miligramos de alfa y betacaroteno estimados en las variedades de chile habanero	44
Cuadro 2.4 Comparación de la pungencia reportada por Santana-Buzzy y la pungencia obtenida en el presente trabajo.....	46
Cuadro 3.1 Compuestos volátiles identificados por CG-MS	63
Cuadro 3.2 Compuestos identificados por HPLC-UV (230nm) en extractos de placentas y/o pericarpios de las en variedades de <i>C. chinense</i> Jacq.	65
Cuadro 3.3 Características de los metabolitos identificados por HPLC/MS/MS en los extractos de fruto completo de las variedades analizadas	69

ABREVIATURAS

EtOH= Etanol

CAPs= Capsaicinoides

CAP= Capsaicina

Vai=Vainillina

Ca= Ácido cafeico

Ci= Ácido cinámico

Cu= Ácido cumárico

Fe= Ácido ferúlico

Van= Ácido vanílico

DHCAP= Dihidrocapsaicina

DPPH= 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo.

EqAC= Equivalentes químicos de ácido clorogénico

EqT= Equivalentes químicos de Trolox.

SAGARPA= Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

SEMARNAT= Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

SNICS= Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas.

SHU= Unidades de picor, del inglés: Scoville Heat Units (Unidades de calor Scoville).

CCD= Cromatografía en capa delgada.

HPLC= Del inglés: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución).

DAD= Detector de arreglo de diodos.

CICY= Centro de Investigación Científica de Yucatán.

P53= Proteína supresora de tumores proveniente del gen P53.

RESUMEN

En México existen más de 60 variedades registradas de *Capsicum* (Solanaceae), entre las que destaca el chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq). Éste representa uno de los cultivos más importantes en la península de Yucatán y cuenta con una denominación de origen desde 2010. Este trabajo se basó en la caracterización fitoquímica y el análisis sensorial de 6 variedades de *C. chinense* Jacq. cultivadas en Yucatán de las cuales, cuatro han sido registradas por el CICY (Mayan Kisin, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac), una de ellas se encuentra en proceso de registro (MR8) y la última se trata de una variedad naranja de la compañía SEMINIS®.

La caracterización fitoquímica de las variedades constó de la cuantificación de capsaicinoides, carotenoides, fenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH). Además, se realizó la identificación de 12 metabolitos por comparación con estándares comerciales utilizando cromatografía de líquidos con detector UV (HPLC-UV) y cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas en tándem (HPLC-MS/MS). Los metabolitos identificados fueron: capsaicina, dihidrocapsaicina, vainillina, vainillilamina, ácido cafeico, ácido *trans*-cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido ascórbico, ácido gálico, catequina y quercetina. A excepción de catequina, que no fue detectada en los extractos de las variedades Mayan Kisin y Mayan Chan, todos los metabolitos estuvieron presentes en todas las variedades diferenciándose únicamente en la abundancia relativa de éstos en cada variedad.

Además, el análisis sensorial permitió integrar los datos analíticos de cuantificación de capsaicinoides y el grado de picor establecido por el panel de evaluadores, encontrando una relación directa entre ellas. A su vez, las variedades MR8 y Mayan Chac presentaron diferencias significativas en cuanto a la preferencia de los jueces con respecto a su olor, lo cual puede tener relación con la mayor abundancia relativa de compuestos volátiles en la variedad MR8 con respecto al resto de las variedades, en especial con Mayan Chac, quien presentó poca diversidad y abundancia de estos componentes. El análisis quimiométrico de los perfiles metabólicos de las seis variedades clasificó a éstas en cinco grupos, donde las variedades Mayan Ba'alché y Mayan Chan presentaron la mayor similitud en su composición, mientras que la variedad MR8 fue la que más segregó del resto de acuerdo principalmente a su mayor contenido de capsaicinoides.

El análisis fitoquímico, en conjunto con la evaluación sensorial de los frutos y su capacidad antioxidante indican que el chile habanero de la Península de Yucatán es una fuente rica en metabolitos bioactivos que pueden tener efectos benéficos en la salud y, por ende, constituye la base para promover el consumo de éste como alimento funcional.

ABSTRACT

In Mexico there are more than 60 registered *Capsicum* varieties. Among them, the habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq) stands out for its pungency. Habanero pepper represents one of the most important crops in the Yucatan Peninsula and it has had a denomination of origin since 2010. This study is based on the phytochemical characterization and sensorial analysis of six varieties of *C. chinense* Jacq. cultivated in Yucatan. Among them four have been registered by CICY (Mayan Kisin, Mayan Chan, Mayan Ba'alché and Mayan Chac), one is in the process of registration (MR8) and the last one is a variety Orange from the seed company SEMINIS®.

The phytochemical characterization of the varieties consisted of the quantification of capsaicinoids, carotenoids, total phenols and antioxidant capacity (DPPH). In addition, 12 metabolites were identified by comparison with standards using liquid chromatography with a UV detector (HPLC-UV) and liquid chromatography coupled to a tandem mass detector (HPLC-MS/MS). Identified metabolites were capsaicin, dihydrocapsaicin, vanillin, vanillylamine, caffeic acid, *trans*-cinnamic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, vanillic acid, ascorbic acid, gallic acid, catechin and quercetin. Each metabolite was present in all the varieties and differing only in their relative abundances. The only exception was catechin, which was not detected in the extracts of the Mayan Kisin and Mayan Chan varieties. In addition, the sensory analysis allowed the integration of the analytical data of quantification of capsaicinoids and the degree of pungency established by the panel of evaluators, finding a direct relationship between them. In turn, the varieties MR8 and Mayan Chac presented a significant difference in their smell, as detected by the judges, being the smell of former preferred. This preference may be related to the higher relative abundance of volatile compounds in the MR8 variety, with respect to the other varieties, especially the Mayan Chac, who presented little diversity and abundance of these components.

Chemometric analysis of the metabolic profiles of the six varieties, grouped them into five categories, with the Mayan Ba'alché and Mayan Chan varieties showing the most similarity in their composition. MR8 variety segregated from the rest of the varieties, mainly due to the higher content of capsaicinoids.

The phytochemical analysis, together with the sensorial evaluation of the fruits and their antioxidant capacity, indicate that the Habanero pepper from the Yucatan Peninsula is a rich source of bioactive metabolites that can have beneficial effects on health and, therefore, this study constitutes the basis to promote the consumption of this as a functional food.

INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de chile (plantas del género *Capsicum*, Familia *Solanaceae*) ocupa el tercer lugar por su importancia económica como producto de exportación agrícola, precedido únicamente por el tomate y aguacate (SAGARPA, 2017). Aunque existen más de 20 especies del género *Capsicum*, solamente cinco corresponden a especies domesticadas; *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, y *C. chinense*), con más de 60 variedades registradas y distribuidas a lo largo del país. La producción total de chile alcanza un promedio de 2.3 millones de toneladas, con un valor económico estimado alrededor de 22,500 millones de pesos al año. Entre las variedades de mayor importancia económica se encuentran el pimiento morrón, el chile serrano y el chile jalapeño, todas de la especie *C. annuum*. El chile habanero pertenece a la especie *C. chinense* y es de particular interés en la Península de Yucatán, donde su consumo se encuentra muy arraigado (Caro-Encalada *et al.*, 2013; SAGARPA, 2017; SEMARNAT, 2018).

El origen del género *Capsicum* se sitúa entre Bolivia, Paraguay y el norte de Argentina. Se estima que se dispersó hacia la región de Perú, Colombia y Venezuela, de donde cruzó hacia la región de las Antillas del Caribe por Puerto Rico, República Dominicana, Haití, Jamaica y Cuba. En lo que se refiere a *C. chinense*, existen reportes de que llegó a México directamente desde Cuba a través de la península de Yucatán. Por ello su nombre común como “chile habanero” (De Witt & Bosland, 1990; Long-Solís, 2004 & Ruíz-Lau *et al.*, 2011). A pesar de ser una especie introducida, el chile habanero ha adquirido importancia en la región del sureste de México debido a que se adaptó a las condiciones agroecológicas de la región. Su principal uso se encuentra en la gastronomía tradicional, debido a que los frutos poseen un sabor, aroma y grado de picor distintivos y que son el resultado de las características geográficas y ambientales de la península. Esto ha favorecido que su cultivo represente hoy en día una oportunidad de desarrollo económico importante para la región, puesto que su demanda internacional supera las 70 mil toneladas al año (González-Estrada *et al.*, 2018; SAGARPA, 2017). De hecho, a partir del 2010 y debido al interés internacional en el cultivo, el chile habanero cuenta con la denominación de origen “Chile Habanero de la Península de Yucatán”, la cual se encuentra dentro de la NOM-189-SCFI-2017. Esta norma establece políticas de protección, así como las especificaciones que el chile habanero cultivado en la región debe cumplir para aspirar a adquirir dicha denominación. La última actualización a la fecha se presenta en el “Proyecto de la Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM-189-SCFI-

2017), Chile Habanero de la Península de Yucatán (*Capsicum Chinense* Jacq.). Especificaciones y métodos de prueba”, publicada el 21 de febrero del 2018 (DOF 2018). Algunas de las principales características que se esperan para obtener la denominación de origen de “Chile habanero de la Península de Yucatán” incluyen:

1. **Trazabilidad e inocuidad de los cultivos.** Es decir, que se tenga una documentación detallada desde la obtención de la semilla (**a partir de cultivos locales**) hasta la cosecha de los frutos y que estos se encuentren libres de sustancias que puedan ser consideradas como nocivas para la salud humana.
2. **Forma acampanada o redonda.** Haciendo referencia a la morfología del fruto.
3. **Sin alteraciones visibles** resultado de malas condiciones de cultivo o ataque por microorganismos y/o plagas.
4. **Concentración superior a los 6.5 mg de capsaicinoides totales por gramo de peso seco (equivalente a 104 650 unidades Scoville) en un estado inmaduro, o superior a los 12.5 mg de capsaicinoides totales por gramo de peso seco (equivalentes a 201 000 unidades Scoville) cuando la fruta está madura.** Esta concentración debe ser obtenida a partir del análisis de los extractos de los frutos utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés).

Es interesante notar que, si bien la península de Yucatán no es centro de origen del chile habanero, se considera como un punto de diversificación genética, que ha dado origen a variedades con diferentes características morfológicas y propiedades agrícolas, entre las que destacan una mayor productividad, tolerancia a sequías y a las altas temperaturas distintivas de la región y resistencia a plagas (González-Estrada, et al., 2018). En ese mismo tono, además de su picor, los chiles cultivados en la península tienen aromas, colores y sabores propios que los distinguen de los provenientes de otras regiones. Estas características se deben a la presencia de diferentes metabolitos secundarios, que adicionalmente les pueden conferir propiedades biológicas beneficiosas.

A lo largo de varios años, el Centro de Investigación Científica de Yucatán ha trabajado para seleccionar y generar variedades de chile habanero obtenidas en diferentes puntos de Yucatán, con el fin de mantener y mejorar las características morfológicas, así como incrementar su potencial agrícola. La principal motivación para el desarrollo de esas variedades ha sido el nivel de pungencia (contenido de capsaicinoides), el color del fruto y el desempeño agronómico, entre otros (Santana-Buzzy et al., 2018). No obstante, las propiedades funcionales, como la actividad antioxidante y la posible relación que éstas puedan tener con el contenido de fenoles, entre otros compuestos, no ha sido analizada. El propósito de este trabajo es caracterizar fitoquímicamente cinco de estas variedades; cuatro de ellas que ya se encuentran registradas y una que se encuentra en proceso de registro. Como referencia, se incluyó a la variedad comercial PX 11459057® de color naranja (Semini, México).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS EN FRUTOS DE *CAPSICUM*

Los metabolitos secundarios son de gran interés porque son moléculas que más allá de ser productos especializados del metabolismo en plantas, pueden llegar a tener importantes aplicaciones agrícolas, industriales y farmacológicas. Entre los metabolitos secundarios del género *Capsicum* destacan los capsaicinoides (Baas-Espinola et al, 2016). Los capsaicinoides son el grupo de metabolitos secundarios responsables del picor. Todos los capsaicinoides comparten en su estructura un núcleo fenólico, derivado de vainillilamina, unido a una cadena lateral proveniente de la síntesis de ácidos grasos. Esta cadena puede variar de acuerdo con el número de unidades de carbono (C₈-C₁₃) y/o grado de insaturación (Figura 1.1) (Vázquez-Flota, 2007).

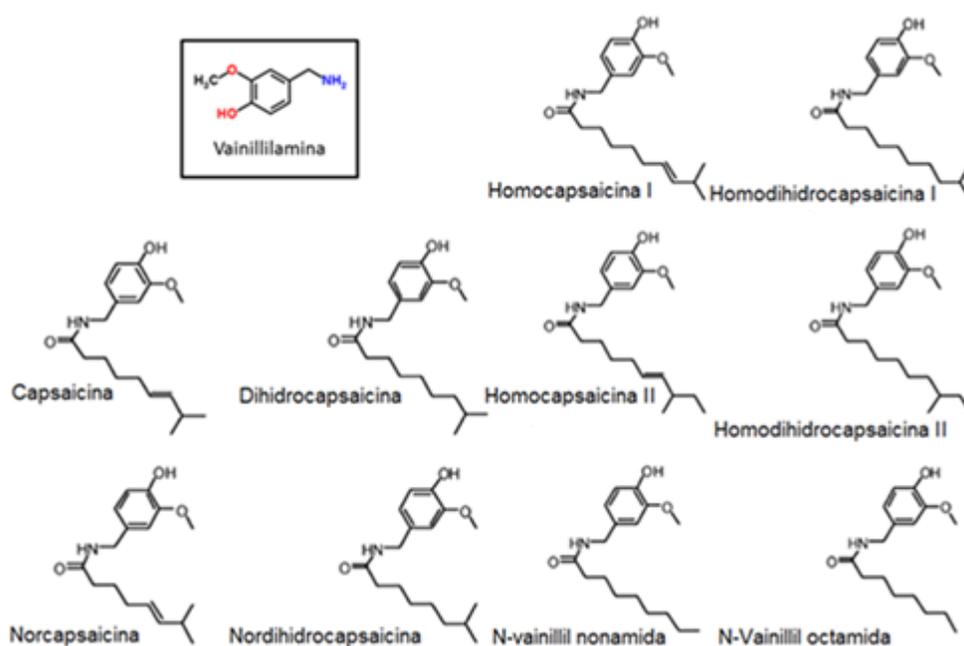


Figura 1.1 Estructura de vainillilamina y capsaicinoides (Modificado de Garcés-Claver, 2006).

Además de ser los responsables del picor, los capsaicinoides son de interés médico y comercial ya que se ha observado que tienen diferentes propiedades fisiológicas. Por ejemplo, la capsaicina tiene la capacidad de reactivar la función de P53, un represor de tumores que se encuentra silenciado en diferentes tipos de cáncer. Por otra parte,

capsaicina es el componente principal en el gas pimienta, así como el uso de oleorresinas con altas concentraciones de capsaicina es utilizado para barnizar los cables de aviones para protegerlos de roedores (Garufi et al., 2016 & Reddy et al., 2016).

A pesar de que los capsaicinoides son los metabolitos característicos del género, los frutos de *Capsicum* son una fuente importante de otros compuestos que pueden llegar a tener un papel importante como componentes bioactivos. Es decir, compuestos que aportan un beneficio a la salud adicional al nutricional cuando son consumidos como parte de la dieta diaria (Ananthan et al., 2018; Sosa-Moguel et al., 2017; Prado et al., 2018). Algunos de estos compuestos incluyen al ácido ascórbico, inicialmente aislado de extractos de paprika (*Capsicum*) por el bioquímico Albert Szent-Györgyi, y que debe su nombre a que su deficiencia provoca la enfermedad conocida como escorbuto, la cual resulta de la síntesis deficiente de colágeno y provoca problemas en el tejido conjuntivo. Hoy en día, el ácido ascórbico es considerado una vitamina (vitamina C) esencial debido a su importancia en el metabolismo y es ampliamente utilizado como control positivo para la evaluación de actividad antioxidante en diferentes modelos. Además, la comparación entre estudios que reportan la cantidad de ácido ascórbico en naranjas, fruto altamente reconocido por su contenido de vitamina C, y el ácido ascórbico en chile habanero nos permite observar que el chile habanero contiene cerca de 135 mg/ 100 g de fruto fresco, mientras que la naranja contiene menos de la mitad de esta cantidad (59.1mg/ 100 g de fruto fresco) (Antonelli, et al., 2018; Fallico et al., 2017).

Otros tipos de metabolitos con actividad biológica reportada y encontrados en los chiles son carotenoides, tocoferoles, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Segura-Campos, et al., 2013; Hernandez-Zerega, 2017).

Los carotenoides son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados a partir del isopreno que comparten una similitud estructural con el licopeno. Por ello, se les considera tetraterpenos (C_{40} ; Figura 1.2). Los carotenoides además de ser pigmentos han sido reconocidos por su actividad antagonista contra el síndrome metabólico, un conjunto de padecimientos que incrementan el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, diabetes y/o cáncer (Stange, 2016; Beydoun, et al., 2018).

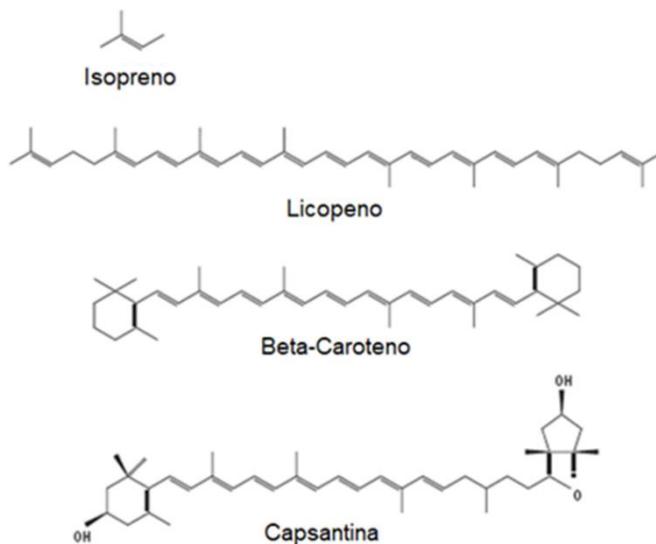


Figura 1.2 Estructura molecular de precursores de la síntesis de carotenoides (isopreno y licopeno) y ejemplos de carotenoides presentes en *Capsicum* (beta-caroteno y Capsantina).

Los tocoferoles, por otro lado, deben su importancia debido a que son parte del conjunto de metabolitos que componen la Vitamina E. Los tocoferolos y tocotrienoles son metabolitos con una estructura química similar entre ellos. Ambos grupos comparten un anillo de cromanol proveniente del ácido shikímico unido a una cadena lateral derivada del isopreno (Figura 1.3). La vitamina E es un complejo formado por tanto tocoferoles y tocotrienoles, y tiene una gran importancia debido a su actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, cardioprotectora e inmunoprotectora (Peh *et al.*, 2016).

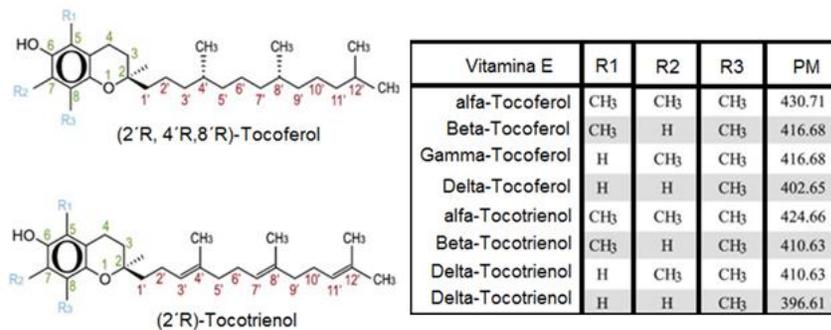


Figura 1.3 Estructura molecular de los componentes del grupo de la vitamina E (izquierda) y los grupos sustituyentes en los diferentes componentes que la integran.

Otro tipo de metabolitos de gran interés debido a sus funciones biológicas benéficas son los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se encuentran divididos en dos grandes grupos; los ácidos fenólicos y los polifenoles (Figura 1.4). Los ácidos fenólicos o fenilpropanoides son derivados de fenilalanina, mientras que los polifenoles pueden originarse de diferentes vías biosintéticas. Sin embargo, ambos grupos comparten la presencia de uno o más anillos fenólicos. Sricharoen y colaboradores (2017) mencionan que las oleorresinas de *Capsicum* tienen actividad antioxidante y antidiabética y que ésta se encuentra directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos. Además, destacan que la cantidad de catequina en la oleorresina es un factor que determina la actividad inhibitoria de la α -amilasa, enzima responsable de la reacción de hidrólisis de los enlaces alfa-glucosídicos del almidón y glucógeno originando el incremento de moléculas de maltosa y glucosa en mamíferos (Sricharoen *et al.*, 2017).

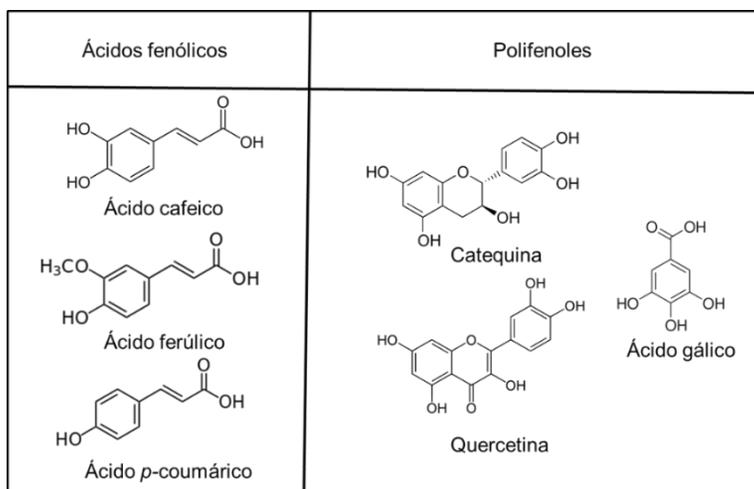
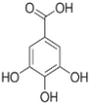
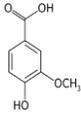
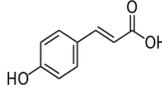
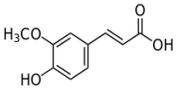
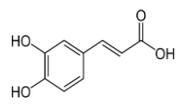
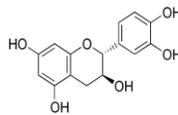
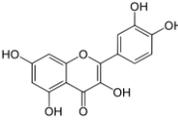


Figura 1.4 Estructura molecular de compuestos fenólicos encontrados en *Capsicum*.

Baenas y colaboradores (2019) realizaron una compilación de información disponible sobre los micronutrientes y metabolitos secundarios de *C. annuum* que pueden ser utilizados con fines industriales. Los cuales abarcan desde aditivos en alimentos para prolongar la conservación de éstos, hasta el desarrollo de nutraceuticos y productos cosméticos. Además, mencionan que es necesario elucidar los mecanismos de acción para los componentes de *Capsicum* para establecer su uso, así como desarrollar estudios que engloben estudios clínicos y epidemiológicos que puedan favorecer el uso de los frutos de *Capsicum* como fuente de componentes bioactivos y ayuden a promover su consumo (Baenas *et al.*, 2019). En el cuadro 1.1 se enlistan unos de los principales

compuestos fenólicos reportados en chiles y algunas de sus actividades biológicas reportadas.

Cuadro 1.1 Compuestos fenólicos y sus actividades biológicas reportadas encontrados en frutos de *Capsicum* spp.

Compuesto fenólico	Estructura	Actividades biológicas reportadas	Referencia
Ácido gálico		Antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, anticancerígena y antiviral.	*Ghasemnezhad <i>et al.</i> , 2011 *Limpisophon & Schleining, 2016
Ácido vanílico		Antioxidante, antimicrobiana.	*Tomás-Barberán & Clifford, 2000
Ácido <i>p</i> -coumárico		Antioxidante, antibacteriana, detoxificante.	*Reverón <i>et al.</i> , 2012
Ácido ferúlico		Antioxidante, citoprotectora.	*Mancuso & Santangelo, 2014
Ácido cafeico		Antioxidante, anti diabética, antiobesidad, antiinflamatoria, anticancerígena.	*Lutfi <i>et al.</i> , 2017
Catequina		Antioxidante, anti diabética, citoprotectora, antiinflamatoria, anticancerígena.	*Nagy <i>et al.</i> , 2015
Quercetina		Antioxidante, antiinflamatoria, citoprotectora, gastroprotectora.	*Rodríguez-Pérez <i>et al.</i> , 2017

Por otra parte, también se han estudiado los componentes que proporcionan características organolépticas favorables a los frutos, como son los reportados por Forero y colaboradores, quienes evaluaron metabolitos responsables del aroma en *Capsicum*, encontrando más de 100 componentes volátiles. Entre éstos, el hexil-isopentanoato, el hexil-isohexanoato, el isopentil isopentanoato, el 3-metilbutanoato de 4-metilpentilo y el (z)-3-hexenil isopentanoato fueron los más abundantes y su presencia dependió del estado de maduración del fruto, siendo mayor en los frutos inmaduros (Forero, *et al.*, 2009). Por otra parte, Koeda y colaboradores (2014) reportaron que el aroma de los frutos

de *Capsicum* puede estar relacionado principalmente con la presencia de 3-metilbutanoato de 4-metilpentilo y 3-metilbutanoato de hexilo (Figura 1.5; Koeda et al., 2014).

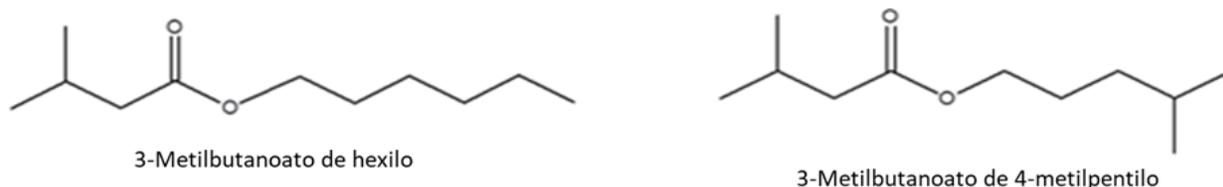


Figura 1.5 Compuestos volátiles reportados en *Capsicum*.

1.2 PRINCIPALES METABOLITOS SECUNDARIOS EN CHILE HABANERO.

1.2.1 Capsaicinoides

Se han encontrado al menos diez capsaicinoides en los frutos del chile, pero en el chile habanero capsaicina y dihidrocapsaicina representan más del 90% del total de éstos, seguido por nordihidrocapsaicina y homocapsaicina. En general, las variedades de la *C. chinense* se caracterizan por tener un alto contenido de capsaicinoides (superior a las demás especies domesticadas) (Garcés-Claver *et al.*, 2006; de Aguiar *et al.*, 2016).

Algunas variedades de *C. chinense* son mundialmente conocidas debido a que han sido galardonadas en diferentes tiempos como los chiles más picosos del mundo. Ejemplos de esas variedades son la variedad “Bhut Jolokia” (también conocido como “chile fantasma”); la variedad Trinidad Scorpion Butch T y la variedad Carolina Reaper. Sin embargo, su excesivo contenido de capsaicinoides las deja fuera del uso gastronómico (Figura 1.6), y son principalmente utilizadas con fines industriales en la elaboración de pinturas y aerosoles de uso militar (Bosland *et al.*, 2007; Jeeatid *et al.*, 2017; Sarpras *et al.*, 2016).

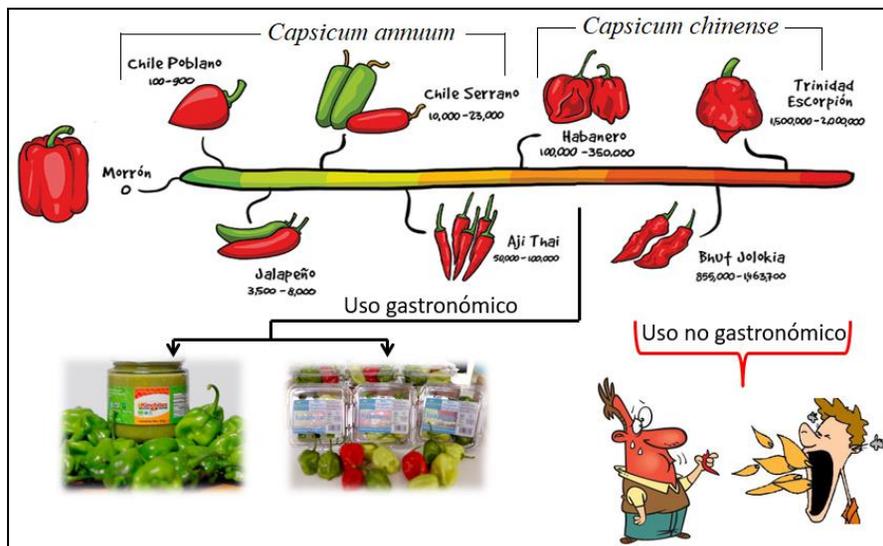


Figura 1.6 Representación del grado de picor de variedades de *Capsicum annuum* y *Capsicum chinense* y su principal relacionado con su picor (Imagen propia: Collage).

Para fines industriales, el grado de picor se determina en Unidades Scoville (SHU por sus siglas en inglés), el cual se encuentra directamente relacionado con el contenido de capsaicinoides. De este modo, existen formas, para convertir estos valores entre sí. Esto es a través de la conversión de los miligramos (mg) de capsaicinoides por gramo de fruto seco a partes por millón (ppm) y posteriormente multiplicado por 16.1 (factor de conversión estandarizado para capsaicina y dihidrocapsaicina) (Sganzerla *et al.*, 2014).

Asimismo, se ha reportado que el contenido de capsaicinoides puede ser altamente influenciado por diferentes factores externos al genotipo de la planta, entre los que se encuentran la cantidad de agua de riego, el estado de maduración del fruto, la fertilización del suelo, la temperatura y la precipitación atmosférica (Topuz *et al.* 2011; Canto-Flick *et al.*, 2008; Jeeatid *et al.*, 2018).

1.2.2 Carotenoides

Giuffrida y colaboradores caracterizaron doce cultivares de *Capsicum* incluyendo nueve cultivares de chile habanero y reportaron la presencia de cincuenta y dos diferentes carotenoides, siendo los compuestos con mayor prevalencia la capsantina, capsorubina, luteína, β -Caroteno y zeaxantina (Figura 1.7; Giuffrida *et al.*, 2013).

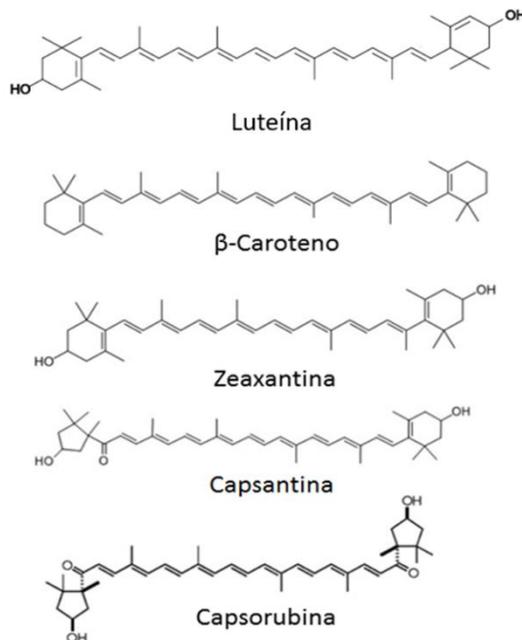


Figura 1.7 Estructura molecular de los principales carotenoides reportados en *Capsicum chinense*.

De igual manera, Zoccali y colaboradores (2017) implementaron el uso de nuevas metodologías de extracción (fluidos supercríticos) para la obtención y análisis de carotenoides presentes en una variedad de chile rojo de *Capsicum chinense*. Ellos mencionan que obtuvieron un perfil de los principales carotenoides similar a los reportados por Giuffrida y colaboradores en 2013 pero con un método de mayor rapidez (Zoccali *et al.*, 2017).

1.2.3 Compuestos fenólicos

La evaluación de siete genotipos de *Capsicum chinense* Jacq. realizado por Segura-Campos y colaboradores (2013) indica que el chile habanero es una fuente de metabolitos donde destacan los polifenoles, los cuales estuvieron en proporciones de 20.54 a 20.75 mgEqTrolox/100 g de muestra. Por otro lado, Bae y colaboradores (2012) reportó que los principales compuestos fenólicos presentes en *Capsicum chinense* Jacq. son quercetina, catequina, kaempferol y apigenina (Figura 1.8; Bae *et al.*, 2012 & Segura-Campos, 2013).

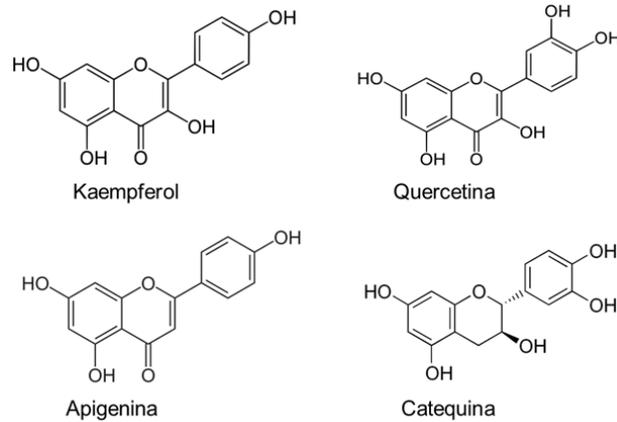


Figura 1.8 Polifenoles encontrados en *Capsicum chinense* Jacq.

1.2.4 Componentes volátiles

Mientras que Murakami y colaboradores reportaron que específicamente en *Capsicum chinense*, el principal componente volátil responsable del aroma del fruto es el 3-metilbutirato de 6-metil-(E)4-heptenilo (Figura 1.9). Además, Ananthan y colaboradores mencionan que los frutos de *Capsicum chinense* son un reservorio de ácidos grasos como los ácidos linoleico, palmítico, oleico y esteárico (Gahungu, *et al.*, 2011; Ananthan *et al.*, 2018 & Murakami, *et al.*, 2018).

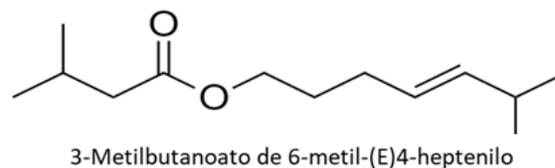


Figura 1.9 Estructura molecular del posible componente volátil de *C. chinense* Jacq. responsable del aroma frutal.

1.3 CHILE HABANERO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Los chiles de *Capsicum chinense* son cultivados en muchos países como India, Brasil, Dinamarca, Rumania, Italia, España y Estados Unidos. Sin embargo, las plantas de esta especie cultivadas en la península de Yucatán han encontrado un centro de diversificación en las condiciones climáticas de la región, favoreciendo no sólo la

supervivencia de las plantas debido a las altas temperaturas, plagas presentes y el tipo de suelo carente de materia orgánica, sino también se ha originado que los frutos de presenten diferentes colores, tamaños, olores y grados de picor que han servido como base para que hoy día el chile habanero represente un recurso de valor gastronómico y cultural invaluable en la península de Yucatán, la cual cuenta hoy en día con la denominación de origen “Chile Habanero de la Península de Yucatán” (Islama *et al.*, 2015; Ruiz-Lau *et al.*, 2011; Duelund & Mouritsen, 2017; Mena *et al.*, 2018; Stipcovich *et al.*, 2018 & Trujillo-Aguirre, 2018).

1.4 NUEVAS VARIEDADES DE CHILE HABANERO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

En México, el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) es la entidad encargada de verificar la calidad de las semillas y proteger los derechos de quien obtiene una nueva variedad vegetal. Así mismo, promueve la conservación y uso de los recursos fitogenéticos del país con el fin de utilizar los recursos de una manera sustentable y aprovecharlos en diferentes campos como alimentación, agricultura, medicina, vestido, ornato y/o combustibles (SAGARPA, 2018).

Algunas de las nuevas variedades de chile habanero actualmente registradas en el SNICS por el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) incluyen la Mayan IxChel®, Mayan Ek®, Mayan Kauil® y Mayan Ba´alche®, todas de frutos anaranjados; la Mayan K´iin®, de frutos amarillos; y la Mayan Chac®, Mayan Kisin® y Mayan Chan®, de frutos rojos (Fig. 1.10; Santana-Buzzy *et al.*, 2018). Las variedades de chile habanero registradas por el CICY presentan un grado de pungencia que puede adaptarse desde el uso gastronómico hasta el uso como materia prima para la extracción de capsaicinoides con fines industriales (Figura 1.10: CICY, 2016 & Santana-Buzzy *et al.*, 2018).

Variedad:									
Color del fruto maduro:	Naranja	Naranja	Naranja	Naranja	Rojo	Rojo	Rojo	Amarillo	Chocolate brillante
Color del fruto inmaduro:	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde tenue	Verde	Verde tenue	Verde	Verde
Peso de fruto (g):	11.80	11	13.81	10.30	12.82	11.80	13.81	18.50	10.40
No. de lóculos:	3 a 4	3 a 4	3 a 4	3 a 4	3	3 a 4	3 a 4	3	3 a 4
Rend. planta (kg):	5.21	4.43	5.14	4.77	4.90	4.66	3.67	5.73	2.5
Pungencia:	528,270	553,769	603,261	626,920	405,230	580,329	670,325	946,360	Pendiente (muy picante)
No. de registro SNICS:	2371-chl-025-080110/c	2371-chl-025-080110/c	2373-chl-026-080110/c	2370-chl-024-080110/c	2368-chl-022-080110/c	2369-chl-023-080110/c	2374-chl-028-080110/c	2373-chl-027-080110/c	C.P.-1132
Preferible para:									
Industria									
Exportación									

Figura 1.10 Variedades registradas por el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Imagen tomada de la ficha informativa de la unidad productora de semillas de chile habanero, 2016.

Los criterios de selección para la obtención de nuevas variedades por parte del CICY se basaron principalmente en la conservación de las características morfológicas, tales como el tamaño (largo x ancho), número de lóculos y peso del fruto, alto rendimiento por planta, y la capacidad de tolerancia a plagas y condiciones ambientales de la región. Todo esto durante cinco ciclos comprendidos entre los años 2003 y 2008 (Santana-Buzzy, *et al.*, 2016; 2018). Además, es importante resaltar que se ha obtenido el mejoramiento genético de variedades de chile habanero a través de metodologías de cultivo de tejidos. Lo cual ha generado que hoy día se cuente con variedades que pueden presentar grados de pungencia cercanas a un millón de unidades Scoville (Variedad K'iin) y/o alta productividad (Variedad Mayan Kisin). Posicionando al chile habanero de la Península de Yucatán como una alternativa viable tanto para la obtención de capsaicina para fines industriales, como para incrementar el rendimiento por hectárea del productor agrícola. Sin embargo, es importante pensar en el chile habanero no únicamente como una fuente de capsaicinoides, sino reconocer que son un reservorio de productos naturales importantes que pueden brindar un beneficio al consumidor y, por tanto, proporcionar un valor agregado a las variedades.

1.5 RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES

Con base en lo expuesto anteriormente, se puede observar que el cultivo del chile habanero en el estado de Yucatán es una actividad económicamente importante, en parte debido a las propiedades del producto. Por ello, a lo largo de varios años, el Centro de Investigación Científica de Yucatán ha trabajado para seleccionar y desarrollar nuevas variedades de chile habanero a partir de materiales locales. Esto se ha hecho teniendo como meta mantener y mejorar las características morfológicas e incrementar la productividad, tanto mediante la mejora de rendimientos, como por la reducción de pérdidas por plagas y manejo agronómico. Por otro lado, el nivel de pungencia (contenido de capsaicinoides), el color del fruto y el desempeño agronómico, entre otros han sido las guías en estos trabajos (Santana-Buzzy et al., 2018). No obstante, las propiedades funcionales, como la actividad antioxidante y la posible relación que éstas puedan tener con el contenido de fenoles, entre otros compuestos, no ha sido analizada. El propósito de este trabajo es caracterizar fitoquímicamente cinco de estas variedades; cuatro de ellas que ya se encuentran registradas y una que se encuentra en proceso de registro. Como referencia, se incluyó a la variedad comercial PX 11459057® de color naranja (Semini, México).

JUSTIFICACIÓN

El Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) ha desarrollado variedades de chile habanero que se diferencian principalmente debido a su alta productividad y tolerancia a condiciones ecológicas de la región. Por lo que ampliar el conocimiento fitoquímico de variedades registradas por CICY puede proporcionar las bases para el establecimiento de un control de calidad en la identificación de éstas. Por otra parte, la evaluación sensorial y actividad antioxidante ayudan a proporcionar un valor agregado a las nuevas variedades.

OBJETIVOS

- **GENERAL**

Caracterizar seis variedades de *Capsicum chinense* Jacq con base en sus componentes fitoquímicos y evaluación sensorial.

- **PARTICULARES**

- Relacionar la actividad antioxidante, el contenido de capsaicinoides y la cantidad de fenoles totales en los extractos de seis variedades de *C. chinense*.
- Identificar y comparar metabolitos presentes en los perfiles metabólicos de seis variedades de *C. chinense*.
- Evaluar el contenido de capsaicinoides y el grado de picor de variedades de *C. chinense* obtenido por un análisis sensorial.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en cultivar cinco de las variedades de chile habanero desarrolladas en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY); cuatro con registro (Mayan Kisin, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac) y una en proceso (MR8), así como una variedad de referencia (Seminis PX 11459057®) de color naranja para caracterizar las propiedades fitoquímicas de interés en los frutos maduros. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero y las propiedades fitoquímicas analizadas incluyeron la cuantificación de capsaicinoides, fenoles totales y actividad antioxidante de las variedades.

De manera breve, las semillas fueron germinadas y mantenidas durante su desarrollo en condiciones de invernadero. Cuatro de las variedades utilizadas presentan frutos maduros color rojo (MR8, Mayan Kisin, Mayan Chan, Mayan Chac) y dos de ellas presentan frutos maduros naranja (Seminis y Mayan Ba'alché). Se recolectaron 15 frutos maduros, los cuales fueron caracterizados morfológicamente de acuerdo con el número de lóculos, longitud pedúnculo-ápice y peso húmedo. Diez de los frutos fueron disectados, separando el tejido placentario del pericarpio. Las muestras fueron congeladas para posteriormente ser liofilizadas y así obtener el contenido de humedad. Una vez secas, las muestras fueron trituradas y homogeneizadas. Se obtuvieron tres muestras de fruto completo, placenta y pericarpio de cada variedad. Las muestras de frutos completos fueron utilizadas para realizar la cuantificación de capsaicinoides, fenoles totales y actividad antioxidante de las variedades (Capítulo II). Mientras que las muestras de placenta y pericarpio favorecieron la detección de algunos metabolitos secundarios identificados a través de estándares comerciales utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detector UV (HPLC-DAD) y la presunta identificación de algunos componentes volátiles utilizando cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (CG-MS) (Capítulo III). Los resultados obtenidos a partir de los perfiles metabólicos de las variedades fueron comparados entre sí utilizando análisis multivariantes de conglomerados y componentes principales (HCA y PCA: Capítulo III). Por último, se realizó la evaluación sensorial de las variedades con el fin de determinar la correlación entre la preferencia al olor, sabor y percepción de picor que las variedades originan en un panel de 30 jueces con los datos obtenidos por química analítica (Capítulo IV).

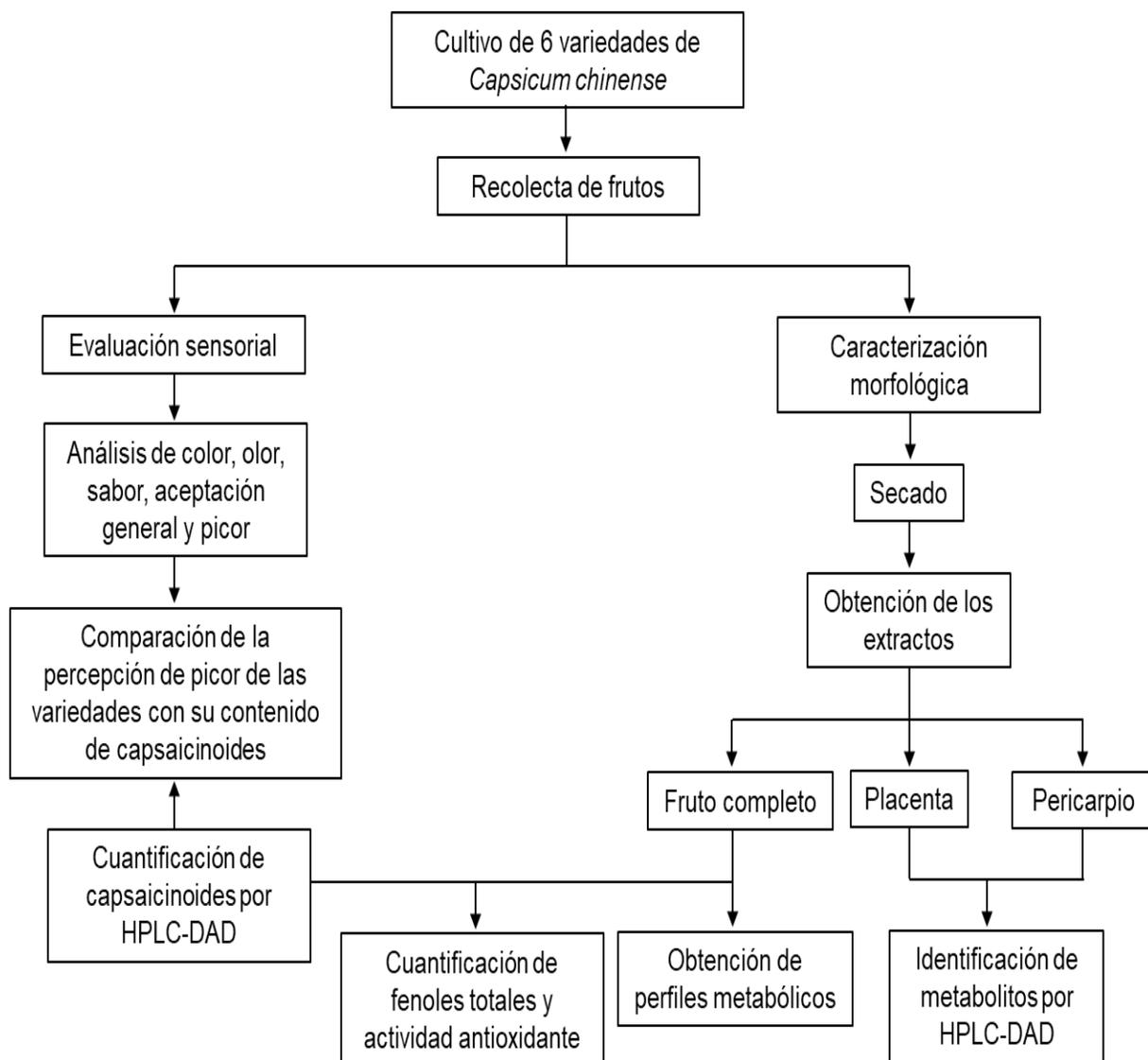


Figura 1.11 Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

REFERENCIAS

- Ananthan R., Subhash K. & Longvah T. (2018). Capsaicinoids, amino acid and fatty acid profiles in different fruit components of the world hottest Naga king chilli (*Capsicum chinense* Jacq). *Food Chemistry*, 238, 51-57.
- Antonelli M, Burzo M.L., Pecorini G., Massi G., Landolfi R., Flex A. (2018). Scurvy as cause of purpura in the XXI century: a review on this “ancient” disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22, 4355-4358.
- Baas-Espinola F.M., Castro-Concha L.A., Vázquez-Flota F.A. & Miranda-Ham M.L. (2016). Capsaicin Synthesis Requires in Situ Phenylalanine and Valine Formation in *in Vitro* Maintained Placentas from *Capsicum chinense*. *Molecules*, 21, 799.
- Bae H., Jayaprakasha G.K., Jifon J. & Patil B.S. (2012). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry*, 130, 751-758.
- Baenas N., Belović M., Ilic N., Moreno D.A. & García-Viguera C. (2019). Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: Technological benefits and biological advantages. *Food Chemistry*, 274, 872-885.
- Beydoun M.A., Chen X., Jha K.H., Beydoun A., Zonderman A.B., Canas J.A. (2018). Carotenoids, vitamin A, and their association with the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 044.
- Bosland, P. W., & Baral, J. B. (2007). ‘Bhut Jolokia’ – The world’s hottest known Chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *Horticulture Science*, 42, 222–224.
- Canto-Flick A., Iglesias-Andreu L.G., Balam-Uc E., Bello-Bello J.J., Lecona-Guzmán C.A., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas, Gómez-Uc E., López-Puc G. & Santana-Buzzy N. (2008). Capsaicinoids Content in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest Known Cultivars. *Horticulture Science*, 43: 1344-1349.

- Caro-Encalada M., Leyva-Morales C. & Ríos-Santana J. (2013). Competitividad mundial de la producción de chile verde de México. *Revista de Economía*. 31, 95-128.
- CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán). (2016). Ficha Informativa Unidad Productora de Semilla de Chile Habanero. Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Gahungu, A., Ruganintwali, E., Karangwa, E., Zhang, X., & Mukunzi, D. (2011). Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum Chinense*) scotch bonnet variety at red stage. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3, 211–218.
- de Aguiar A.C., Pereira J.C., Barbero F.G., Godoy H.T.& Martínez J. (2016). Comparative Study of Capsaicinoid Composition in Capsicum Peppers Grown in Brazil. *International Journal of Food Properties*, 19, 1292-1302.
- Gallon M.E., Monge M., Casoti R. Batista Da Costa F., Semir J. & Gobbo-Neto L. (2018). Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernonieae (Asteraceae). *Phytochemistry*, 150, 93-105.
- Hernandez-Zerega L.C. (2017). Compositional and phytochemical characterization of four improved varieties of Puerto Rico sweet chili pepper (*Capsicum chinense*). College of Agricultural Sciences: Department of Food Science and Technology. 7,14-16.
- Jeeatid N., Suriharn B., Techawongstien S., Chanthai S, Bosland P.W. & Techawongstien S. (2018). Evaluation of the effect of genotype-by-environment interaction on capsaicinoid production in hot pepper hybrids (*Capsicum chinense* Jacq.) under controlled environment. *Scientia Horticulturae*, 235, 334–339.
- Jeeatid N., Techawongstien S., Suriharn B, Chanthai S., Bosland P.W.& Techawongstien S. (2018). Influence of water stresses on capsaicinoid production in hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars with different pungency levels. *Food Chemistry*, 245, 792-797.

- Koeda S., Sato K., Tomi K., Tanaka Y., Takisawa R., Hosokawa M., Kitajima A. (2014). Analysis of Non-pungency, Aroma, and Origin of a *Capsicum chinense* Cultivar from a Caribbean Island. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 83, 244–251.
- Kuna A., Sahoo M.R., Sowmya M., Mayengbam P.D., Dasgupta M., Sreedhar M. & Tholemfhuang S. (2018). Nutrient and Antioxidant Properties of Value Added King Chilli (*Capsicum chinense*) Products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 2319-7706.
- Limpisophon K. & Schleining G. (2016). Use of Gallic Acid to Enhance the Antioxidant and Mechanical Properties of Active Fish Gelatin Film. *Journal of Food Science*, 82, 80-89.
- Lutfi E., Babin P.J., Gutierrez J., Capilla E. & Navarro I. (2017). Caffeic acid and hydroxytyrosol have anti-obesogenic properties in zebrafish and rainbow trout models. *PLOS ONE*, 12, 21pp.
- Menichini F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G., De Cindio B., Houghton P.J. & Menichini F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, 114, 553–560.
- Mishra K. Ojha H. & Chaudhury N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
- DeWitt, D. & Bosland, P. (1990). *The whole chili pepper book*. Little, Brown & Co., Boston.
- Diario Oficial de la Federación. (2018). Norma Oficial Mexicana NOM-189-SCFI-2017, Chile habanero de la Península de Yucatán (*Capsicum chinense* Jacq.)–Especificaciones y métodos de prueba. (21-Feb-2018). Estados Unidos Mexicanos- Secretaría de Economía- Dirección General de Normas.
- Duelund L. & Mouritsen O.G. (2017). Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark. *Food Chemistry*, 221, 913–918.

-
- Fallico B., Ballistreri G., Arena E., Brighina S., Rapisarda P. (2017). Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis*(L.) Osbeck): Leveland intake. Food Chemistry, 215, 67-75.
- Feher I., Magdas D.A. & Puşcaş R. (2018). Optimized and validated method for simultaneous extraction, identification and quantification of flavonoids and capsaicin, along with isotopic composition, in hot peppers from different regions. Food Chemistry, 267, 255-262.
- Forero M.D., Quijano C.E. & Pino J.A. (2009). Volatile compounds of chile pepper (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*) at two ripening stages. Flavour and Fragrance Journal, 24, 25-30.
- Garcés-Claver A., Arnedo-Andrés M.S., Abadía J., Gil-Ortega R. & Álvarez-Fernández A. (2006). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruits by Liquid Chromatography–Electrospray/Time-of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 9303–9311.
- Garufi A., Pistritto G., Cirone M. & D’Orazi G. (2016). Reactivation of mutant p53 by capsaicin, the major constituent of peppers. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 35, 136.
- Giuffrida D., Dugob P., Torre G., Bignardid C., Cavazza A., Corradinid C. & Dugo G. (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. Food Chemistry, 140, 794-803.
- Ghasemnezhad M., Sherafati M. & AliPayvast G. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annum*) fruits at two different harvest times. Journal of Functional Foods, 3, 44-49.
- González-Estrada T.A., Guitierrez-Pacheco L.C. & Contreras-Martín F.A. (2018). El chile habanero en la cultura peninsular. En Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán (17-23). Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.

- Islama M.A., Sharma S.S., Sinha P., Negia M.S., Neog B. & Tripathi S.B. (2015). Variability in capsaicinoid content in different landraces of *Capsicum* cultivated in North-Eastern India. *Scientia Horticulturae*, 183, 66–71.
- Long-Solís J. (2004). La ruta del chile habanero. *Cuadernos de Nutrición*. 27:77-81.
- Mancuso C. & Santangelo R. (2014). Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 185-195.
- Mena E., Warade S.D., Ansari M.T. & Ramjan M.D. (2018). Evaluation of capsaicin, Ascorbic acid, α -Carotene and β -Carotene in Bhut Jolokia (*Capsicum chinense* Jacq.) genotypes from North East India. *The Pharma Innovation Journal*, 7, 93-97.
- Menichini F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G., De Cindio B., Houghton P.J. & Menichini F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, 114, 553–560.
- Murakami Y., Iwabuchi H., Horikawa M., Mori S., Ohba Y. & Fukami H. (2018). Isolation and Identification of a Volatile Compound in Habanero Pepper (*Capsicum chinense*). *Journal of Oleo Science*, 67(10), 1219-1225.
- Nagy Z., Daood H., Ambrózy Z. & Helyes L. (2015). Determination of Polyphenols, Capsaicinoids, and Vitamin C in New Hybrids of Chili Peppers. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2015, 10 pp.
- Peh H.Y., Tan W.S.D., Liao W., Wong W.S.F. (2016). Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. *Pharmacology & Therapeutics*, 162, 152-169.
- Pérez-Ambrocio A., Guerrero-Beltrán J.A., Aparicio-Fernández X., Ávila-Sosa R., Hernández-Carranza P., Cid-Pérez S. & Ochoa-Velasco C.E. (2018). Effect of blue and ultraviolet-C light irradiation on bioactive compounds and antioxidant capacity of habanero pepper (*Capsicum chinense*) during refrigeration storage. *Postharvest Biology and Technology*, 135, 19-26.

- Pino J., González M., Ceballos L., Centurión-Yah A.R., Trujillo-Aguirre J., Latournerie-Moreno L. & Sauri-Duch E. (2007). Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry*, 104, 1682-1686.
- Prado D.Z., Capoville B.L., Delgado C.H.O, Heliodoro J.C.A., Pivetta M.R., Pereira M.S., Zanutto M.R., Novelli P.K., Valesca C.B. & Fleuri F.L.F. (2018). Nutraceutical Food: Composition, Biosynthesis, Therapeutic Properties, and Applications. En: *Alternative and Replacement Foods* (95-140). United Kingdom: Elsevier.
- Reddy C.M., Sanketi B.D. & Kumar N. (2016). Corrosion inhibition of mild steel by *Capsicum annuum* fruit paste. *Perspectives in Science*, 8, 603-605.
- Reverón I., de las Rivas B., Muñoz R., Félix-López F. (2012). Genome-wide transcriptomic responses of a human isolate of *Lactobacillus plantarum* exposed to p-coumaric acid stress. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56, 1848–1859.
- Rice-evans C.A., Miller N.J. & Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Rodríguez-Pérez C., Segura-Carretero A. & Contreras M.M. (2017). Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18 pp.
- Ruíz-Lau N., Medina-Lara F. & Martínez-Estévez M. (2011). El chile habanero: Su origen y uso. *Ciencia*, Julio-septiembre, 70-77.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). En línea: www.sagarpa.gob.mx/sagarpa (19-Agosto-2018).
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E. & Alvarez-Gil M. (2016). 'Mayan Kisin', a High-yielding, Red-fruited, Habanero-type Hot Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Cultivar. *HortScience*. 51, 604-605.

-
- Sharma J., Sharma P., Sharma B. & Chaudhary P. (2017). Estimation of Proximate Composition of Selected Species of Capsicum (*Capsicum annuum* and *Capsicum chinense*) Grown in India. International of Journal of Pure and Applied Bioscience. 5, 369-372.
- Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Balam-Uc E., Avilés-Viñas S., Zetina-Rosado G., Montalvo-Peniche M.C., Valle-Gough R., Bello-Bello J., Lecona-Guzmán C. Solís-Marroquín D., Gómez-Uc E., Muñoz-Ramírez L., Peña-Yam L., Pérez-Pastrana J. & Guzmán-Antonio A. (2018). Mejoramiento genético de chile habanero: Selección y registro de variedades mejoradas. En: Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán (67-75). Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Sarpras M., Gaur R., Sharma V., Chhapekar S. S., Das J., Kumar A., Ramchiary N. (2016). Comparative analysis of fruit metabolites and pungency candidate genes expression between Bhut jolokia and other *Capsicum* species. PLoS ONE, 11, 1–19.
- Segura-Campos M.R., Ramírez-Gómez K., Moguel-Ordoñez Y., Betancur-Ancona D. (2013). Polyphenols, Ascorbic Acid and Carotenoids Contents and Antioxidant Properties of Habanero Pepper (*Capsicum chinense*) Fruit. Food and Nutrition Sciences, 4, 47-54.
- Sganzerla M., Coutinho J. P., Melo A. M. T., & Godoy H. T. (2014). Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. Food Research International, 64, 718–725.
- Shiow-Ying C., Jih-Min S., Po-Wei H. & Sheng-Dun L. (2017). Antioxidant, Antidiabetic, and Antihypertensive Properties of *Echinacea purpurea* Flower Extract and Caffeic Acid Derivatives Using *In Vitro* Models. Journal of Medicinal. 20, 171-179.
- Solovchenko A. & Schmitz-Eiberger M. (2003) Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. Journal of Experimental Botany. 54. 1977–1984

- Sosa-Moguel O., Pino J.A., Ayora-Talavera G., Duch E.S. & Cuevas-Glory L. (2017) Biological activities of volatile extracts from two varieties of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), International Journal of Food Properties, 20, 3042-3051.
- Sricharoen P., Lamaiphan N. Patthawaro P., Limchoowong N., Techawongstien S., Chanthai S. (2017). Phytochemicals in *Capsicum* oleoresin from different varieties of hot chilli peppers with their antidiabetic and antioxidant activities due to some phenolic compounds. Ultrasonics Sonochemistry, 38, 629-639
- Stange, C. (2016). Carotenoids in Nature: Biosynthesis, Regulation and Function. Switzerland: Springer International Publishing.
- Stipcovich T., Barbero G.F., Ferreiro-González M., Palma M. & Barroso C.G. (2018). Fast analysis of capsaicinoids in Naga Jolokia extracts (*Capsicum chinense*) by high-performance liquid chromatography using fused core columns. Food Chemistry, 239, 217-224.
- Tomás-Barberán F.A. & Clifford M.N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80, 1024-1032
- Topuz, A., Dincer, C., Zdemir, K. S., Feng, H., & Kushad, M. (2011). Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv.; Jalapeno). Food Chemistry, 129, 860–865.
- Trujillo-Aguirre J.J.G. (2018). Caracterización de los recursos genéticos de *Capsicum chinense* Jacq. en la Península de Yucatán. En Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán (37-43). Mérida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Vázquez-Flota F.A., Miranda-Ham M.L., Monforte-González M., Gutiérrez-Carbajal G., Velázquez-García C. & Nieto-Pelayo Y. (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. Fitotecnia Mexicana, 30, 353-360.

Zoccalli M., Giuffrida D., Dugo P. & Mondello L. (2017). Direct online extraction and determination by supercritical fluid extraction with chromatography and mass spectrometry of targeted carotenoids from red Habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of Separation Science*, 40, 3905–3913.

CAPÍTULO II.

CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE SEIS VARIEDADES DE *C. chinense* Jacq.

2.1 INTRODUCCIÓN

Cuando se habla de chile habanero es inevitable no pensar en su picor debido a su alto contenido de capsaicinoides. Por ello, como parte de la caracterización fitoquímica de nuevos cultivares de chile se debe considerar la evaluación del contenido de estos metabolitos. Los capsaicinoides son amidas aromáticas ácidas formadas por un núcleo fenólico, proveniente de la vainillina, y de una cadena lateral acilo, proveniente del ácido 8-metil-nonanoico (Vázquez-Flota et al., 2007).

Estos compuestos se forman únicamente en el tejido placentario de variedades de chiles picantes. El núcleo fenólico de vainillina se forma a partir de la fenilalanina, a través de la ruta de los fenilpropanoides, mientras que la cadena lateral proviene de la desaminación oxidativa de los aminoácidos ramificados valina o isoleucina y la posterior elongación del cetoácido resultante mediante reacciones similares a la formación de ácidos grasos (Vázquez-Flota et al., 2007). De este modo, la síntesis de capsaicina comparte intermediarios comunes con la formación de otros compuestos fenólicos.

Por otra parte, el método analítico utilizado para la determinación del contenido de capsaicinoides en frutos de *Capsicum* o sus subproductos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). El uso de HPLC permite conocer el contenido total en unidades de masas (mg) por unidad de referencia (generalmente, peso seco). Sin embargo, las unidades establecidas para medir y referirse al grado de picor de los chiles son las “unidades de calor Scoville” (SHU, por sus siglas en inglés; DOF, 2018). Estas unidades deben su nombre a Wilbur L. Scoville, un químico-farmacólogo que propuso un método indirecto para la cuantificación de capsaicina en 1912 (Scoville, 1912).

El método de Scoville es una prueba organoléptica que se basa en las diluciones necesarias en una solución azucarada para neutralizar la sensación de ardor en la boca originada por el consumo de los chiles (Scoville, 1912). A pesar de que por convención se siguen utilizando las unidades Scoville para hacer referencia al grado de picor o pungencia de los chiles, hoy en día las unidades Scoville se obtienen a partir de la conversión del contenido de capsaicinoides obtenido por métodos analíticos, utilizando la siguiente relación:

SHU = Contenido de capsaicinoides (ppm) X 16.1

El factor de conversión 16.1 corresponde a las unidades Scoville establecidas para capsaicina y dihidrocapsaicina. También se han establecido los factores de conversión para Nordihidrocapsaicina y homocapsaicina, los cuales son 9.3 y 8.6, respectivamente (Giuffrida *et al.*, 2013). Sin embargo, como ya se ha mencionado los frutos de *Capsicum* son un reservorio de diferentes metabolitos entre los que destacan los compuestos fenólicos debido a su actividad biológica.

Un método ampliamente utilizado para realizar la cuantificación de fenoles totales en alimentos y bebidas es el de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo con el mismo nombre (Folin-Ciocalteu). La reacción se lleva a cabo en pH básico, dando lugar a una coloración azul que puede ser medida espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido de fenoles totales presentes en una muestra (Huang *et al.*, 2005).

Parte de la importancia de los capsaicinoides y los compuestos fenólicos está relacionada con su capacidad antioxidante a través de la estabilización de radicales libres. A pesar de que la formación de radicales libres está siempre presente durante el metabolismo celular durante la catálisis de moléculas para la obtención de energía, cuando existe un exceso de radicales libres ocasionado por múltiples factores (ambiente, problemas en la mitocondria, entre otros) aparece el estrés oxidativo, el cual se encuentra relacionado con diferentes padecimientos entre los que destacan las enfermedades cardiovasculares, el envejecimiento prematuro, la aterosclerosis y la carcinogénesis (Ansari 1996).

Además, algunos compuestos fenólicos han presentado la capacidad de quelar metales pesados, lo cual favorece un efecto antitumoral debido a la inhibición de la angiogénesis favorecida por cobre en un modelo murino (Zhang *et al.* 2016). Es por ello, que terapias y dietas ricas en antioxidantes son recomendables para disminuir el efecto del estrés oxidativo (Umesh *et al.*, 2016).

Un modelo ampliamente utilizado para la determinación de la actividad antioxidante de los alimentos es la prueba de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH; Paz *et al.*, 2015). El DPPH es un radical orgánico de nitrógeno que presenta una intensa coloración morada. La prueba se basa en la capacidad reductora de los componentes presentes en una muestra para estabilizar el radical. La estabilización del radical genera el cambio de coloración de morado a amarillo y por ende puede ser medido a través de un análisis espectrofotométrico a 515 nm (máxima absorbancia del radical DPPH). La reacción del radical DPPH y el compuesto antioxidante puede ser representada de la siguiente manera:



Como parte de los objetivos de este trabajo, se planteó la cuantificación de fenoles totales y capsaicinoides, así como determinar la capacidad antioxidante de seis variedades de chile habanero desarrolladas en el CICY con el fin analizar su potencial como alimento funcional y así poder otorgarles un valor agregado adicional. También se estimaron los contenidos de carotenoides totales por métodos espectrofotométricos como parte de la caracterización morfológica de los chiles analizados, ya que estos compuestos son los principales responsables del color de los frutos (Giuffrida *et al.*, 2013).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Obtención de las muestras

Bajo condiciones similares de invernadero, se cultivaron en total seis variedades de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Cuatro de ellas desarrolladas en el CICY y con registro ante el SNICS: Mayan Kisin®, Mayan Chan®, Mayan Chac®, y Mayan Ba'alché®, las cuales provienen de cinco ciclos de recolecta y selección a partir de cultivos en Chicxulub, Yucatán (Santana-Buzzy *et al.*, 2018). Se incluyeron en este análisis la variedad MR8 (por Muna Rojo 8) que se encuentra en el proceso de desarrollo para su registro y la variedad PX 11459057®. La variedad MR8 es originaria del municipio de Muna, Yucatán, mientras que la variedad PX 11459057 fue desarrollada por la casa Seminis a partir de diversas colectas de germoplasma.

Se recolectaron 10 frutos maduros de tres plantas de cada variedad. Los frutos fueron limpiados, se tomaron registros de sus características morfológicas como color, número de lóculos y longitud de la base hacia el ápice, y se calculó el porcentaje de humedad. Los frutos fueron lavados, rebanados, congelados y liofilizados durante 48 horas. Se utilizaron frutos provenientes de dos siembras diferentes; la primera entre marzo y abril de 2018 y la segunda entre septiembre y octubre de 2018.

2.2.2 Caracterización morfológica de los frutos maduros

Para la caracterización morfológica de los frutos maduros se incluyeron como parámetros el tamaño del fruto, el número de lóculos, el contenido de humedad y el color. El tamaño se estimó como la longitud desde la base del pedúnculo hasta el ápice del fruto y se obtuvo en centímetros con una regla escolar. El número de lóculos se observó directamente como los espacios interplacentarios después de realizar un corte transversal al fruto. El peso seco de los frutos se obtuvo después por liofilización utilizando el equipo Labconco FreeZone™ durante 48 horas. Una vez secos los frutos, se calculó el porcentaje de humedad como el cociente del peso húmedo y peso seco. El color de los frutos se determinó por análisis colorimétrico de una pasta utilizando un espectrofotómetro portátil para colores sólidos Color-guide (BYK-Gardner; Geretsried Alemania). Este aparato refleja un haz de luz que incide sobre la superficie analizada en tres ejes o coordenadas; **a*** (+rojo/-verde), **b*** (+amarillo/-azul) y **L*** (luminosidad).

Para la preparación de las pastas, se trituraron 100 g de frutos fresco de cada variedad en 200 ml de agua y se registró la lectura del color por triplicado haciendo incidir el haz de luz de manera directa sobre una superficie plana cubierta de pasta de chile.

2.2.3 Extracción de metabolitos

Los frutos secos de cada variedad se trituraron utilizando un molino de cocina (Nutribullet). Se realizó una comparación en el método de extracción utilizando acetona y etanol como disolventes. En ambos casos se utilizó una proporción 1:20 (M: V) de chiles y disolvente. Los matraces con el tejido molido fueron colocados en agitación a 100 rpm durante cinco horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se incubaron en un baño de ultrasonido (Branson) durante una hora y posteriormente fueron filtrados con círculos de papel filtro Whatman 1 (90mm de diámetro), secados y mantenidos a -20°C para su uso en posteriores análisis. No se detectó diferencias significativas en los perfiles metabólicos y rendimientos de extracción de los dos disolventes utilizados (Apéndice I: Cuadro A.1).

2.2.4 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se utilizó cromatografía en capa delgada (CCD) para el análisis rápido de los perfiles cromatográficos de los extractos etanólicos y acetónicos (Apéndice I: Figura A.1). El sistema de elución se basó en lo reportado por Monforte-González y colaboradores con modificaciones (Monforte-González et al., 2007). Se empleó una mezcla de hexano: cloroformo: ácido acético [7: 2: 1] como fase móvil y se realizó una doble elución de la placa cromatográfica. Con el fin de incrementar la resolución entre capsaicina y dihidrocapsaicina, se implementó la impregnación de la placa cromatográfica con una solución al 5% de nitrato de plata (AgNO_3) en acetonitrilo (Apéndice 1: Figura A.2).

2.2.5 Cuantificación de capsaicinoides por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

La cuantificación de capsaicinoides en los extractos se realizó después de una separación cromatográfica por HPLC-UV utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 230 nm siguiendo el método de Sganzerla y colaboradores (Sganzerla *et al.*, 2014) con algunas modificaciones. Se utilizó una columna Eclipse XDB-C18 5µm, 4.6 X 250 mm (Zorbax) y la fase móvil consistió en una mezcla de agua (A) y

acetonitrilo (B) con un sistema en gradiente (A: B) de 55: 45, 49: 51, 20:80 y 55: 45 durante 2, 20, 25 y 28 minutos, respectivamente.

Se establecieron curvas de calibración (por triplicado) de 1, 5, 10, 15, 20 y 25 μg para capsaicina, y 1, 5, 10, 15 y 20 μg para dihidrocapsaicina utilizando estándares comerciales (Sigma-Aldrich). Se obtuvieron las ecuaciones lineales y los coeficientes de determinación (R^2) de $R^2= 0.9968$ y $R^2= 0.9986$, respectivamente para capsaicina y dihidrocapsaicina (Figura 2.1).

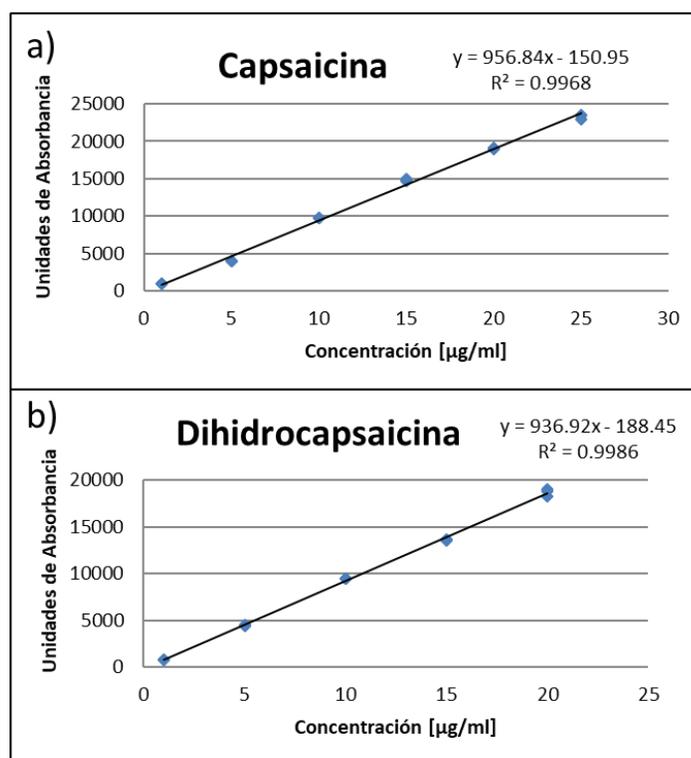


Figura 2.1. Curvas de calibración por triplicado para **a)** capsaicina y **b)** dihidrocapsaicina, sus respectivas ecuaciones lineales y coeficientes de determinación (R^2).

2.2.6 Cuantificación de fenoles totales por método espectrofotométrico

Los fenoles totales se cuantificaron por espectrofotometría en los extractos. Se preparó una curva de calibración (por triplicado) utilizando el ácido clorogénico como referencia. Para ello, se utilizó una solución inicial 1% [10 mg/ml] de este compuesto, de la cual se tomaron 50 μl para llevar a un volumen final de 1 ml, utilizando 950 μl de etanol (EtOH) grado analítico y obtener una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (solución 1). Se tomaron 160, 120, 80, 40, 20, 16, 12 y 8 μl de la solución 1, y se agregó etanol para lograr un volumen

final de 200 μl , correspondiente a las concentraciones 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30 y 20 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se utilizaron tubos de ensaye de 10 ml para mezclar 3 ml de agua, 250 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu y 50 μl de cada concentración (20-500 $\mu\text{g/ml}$).

Las mezclas fueron agitadas utilizando un vórtex y se dejaron reposar en oscuridad durante 5 minutos. Una vez transcurridos, se agregaron 750 μl de una solución 20% de carbonato de sodio (NaCO_3) en agua y la mezcla se homogeneizó, se dejó reposar 60 min en oscuridad y posteriormente se realizó la lectura de absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro Cytation 3™ (BioTek, USA). Se obtuvo la ecuación lineal con una $R^2=0.9989$ (Figura 2.2).

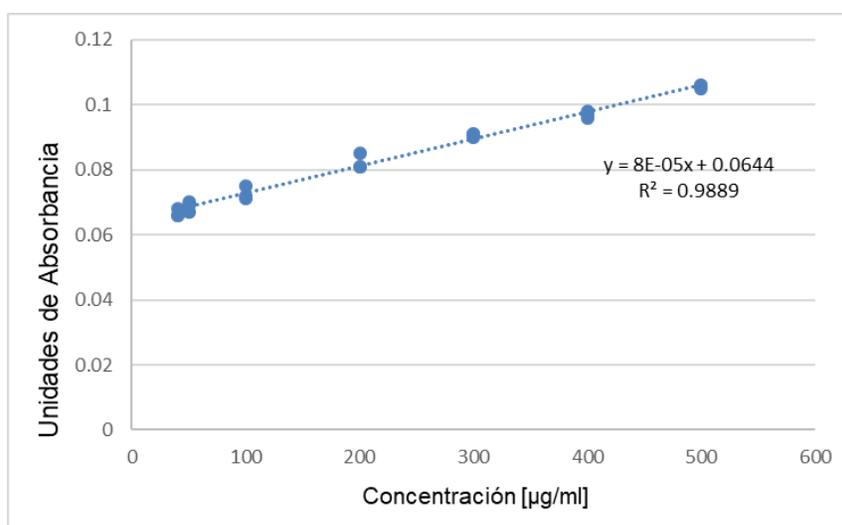


Figura 2.2. Curva de calibración de ácido clorogénico. Se presenta la ecuación lineal y coeficiente de determinación (R^2).

Para la preparación de las muestras a evaluar, se tomaron 4.5 mg del extracto seco de frutos completos de cada variedad, se colocaron en un matraz aforado de 10 ml y se agregaron 5 ml de etanol para homogeneizar por agitación manual. Posteriormente se aforó a la marca del matraz (10 ml) y se realizó la metodología descrita previamente con el reactivo de Folin-Ciocalteu para la curva de calibración, con la variación de que los 50 μl correspondientes a las diferentes concentraciones (en la curva de calibración) fueron intercambiados por 50 μl de la muestra a evaluar. Se realizaron triplicados para cada variedad.

2.2.8 Determinación de la actividad antioxidante por el método de reducción del 2,2-difenil-1 picrilhidrazilo (DPPH)

La actividad antioxidante se determinó en los extractos etanólicos. En paralelo, se preparó una solución estándar disolviendo 10 mg de ácido ascórbico, que se empleó como referencia, en 1 ml de etanol grado HPLC. Se realizaron diluciones 1:9 para obtener concentraciones de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mg/ml. Para la evaluación de las muestras, los extractos secos se resuspendieron en etanol para tener una concentración de 1 mg/ml y se continuó con diluciones 1:9 para obtener soluciones de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mg/ml. Se utilizaron placas de ELISA con 96 pozos para realizar las lecturas espectrofotométricas en un equipo iMark® (BioRad). Para ello, se colocaron 180 µl de solución 25 µM de DPPH en etanol y 20 µl de cada dilución (por triplicado) y se midió la absorbancia a 517 nm para a partir de esta obtener la ecuación lineal y el porcentaje de decoloración utilizando la fórmula de Prior y colaboradores (Prior et al., 2005):

$$1/(A_{517x}/A_{517DPPHt_0}) \times 100$$

En donde: A_{517x} es el valor promedio de la absorbancia de la muestra problema a 517nm, y $A_{517DPPHt_0}$ es valor de la absorbancia del DPPH sin decolorar (control negativo).

Para cada variedad analizada, se graficó el contenido de extracto en mg (x) contra el porcentaje de decoloración (y) para obtener la ecuación lineal y posteriormente calcular la concentración efectiva media (Ec_{50}). Para ello, se obtiene el valor de x correspondiente a $y = 50$ y éste se multiplica por 1000 (Prior et al., 2005).

2.2.9 Análisis estadístico

Se utilizaron los programas GraphPad Prism versión 5.0.1 y Minitab 17 para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos a través de ANOVA de un factor, comparación de Fisher y postprueba de Bonferroni utilizando valores de $p < 0.05$ para establecer diferencias significativas.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Características morfológicas de los frutos.

Se analizaron cuatro variedades de frutos rojos (MR8, Mayan Kisin, Mayan Chan y Mayan Chac), y dos de frutos anaranjados (Mayan Ba'alché y Seminis). Con el fin de confirmar que las variedades en estudio mantenían sus características fenotípicas en las condiciones de cultivo utilizadas, se analizaron algunos de los atributos más representativos de los frutos en estado maduro, como son el tamaño (longitud base-ápice), el número de lóculos, el porcentaje de humedad y su coloración (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Características morfológicas de los frutos de las variedades de *C. chinense* Jacq. recolectadas en marzo y abril 2018. Promedio de 30 frutos y desviación estándar.

						
Variiedad	MR8	Mayan Chac	Mayan Chan	Mayan Ba'alché	Mayan Kisin	Seminis
Color del fruto inmaduro	Verde tenue	Verde tenue	Verde	Verde	Verde tenue	Verde
Color del fruto maduro	Rojo	Rojo	Rojo	Naranja	Rojo	Naranja
Porcentaje de humedad del fruto	79.98 ± 3.86	80.85 ± 2.57	83.86 ± 4.69	85.41 ± 4.97	80.28 ± 3.42	86.12 ± 4.73
Número de lóculos	2 a 3	3 a 4	3 a 4	2 a 4	3 a 4	3 a 4
Longitud del fruto (cm)	6 ± 0.3	5.5 ± 0.2	4.4 ± 0.7	5 ± 0.3	5.1 ± 0.4	4.7 ± 0.3

El proceso de maduración de los frutos de las variedades se monitoreó diariamente durante 90 días con el fin de establecer el criterio de selección para su recolección (Cuadro 2.2). A pesar de existir diferencias entre los tiempos de maduración de cada variedad, se catalogaron y recolectaron frutos maduros, definiéndolo como aquéllos que recién habían obtenido por completo la coloración característica de cada variedad; naranja o roja (Figura 2.4.).



Figura 2.3. Estados de maduración de las variedades de *C. chinense* Jacq.

Todos los frutos oscilaron en un tamaño entre 3 y 6 cm, y su proceso de maduración abarca entre 30 y 40 días en la mayoría de las variedades, exceptuando la variedad Mayan Chac, donde el proceso de maduración tarda más de 60 días. No se observaron variaciones significativas en cuanto al porcentaje de humedad, número de lóculos y longitud base-ápice de los frutos maduros entre las diferentes variedades (Cuadro 2.2). De acuerdo con lo descrito en la NOM-189-SCFI-2017, el chile habanero de la Península de Yucatán posee de 2 a 4 lóculos y una longitud que puede variar entre chiles pequeños (menores a 2 cm) y chiles grandes (mayores a 4 cm), lo cual concuerda con los descriptores de las variedades registradas por CICY (Figuras 1.10; Santana-Buzzy *et al.*, 2016).

El análisis de coloración del fruto maduro permitió diferenciar de manera cuantitativa la coloración de las variedades. Por una parte, la variedad Mayan Chac obtuvo los valores de rojo más altos (a^* 23.52), seguida de las variedades Mayan Chan (23.37), Mayan Kisin (21.97) y MR8 (21.93). Como se esperaba por su coloración naranja, los valores de rojo para las variedades Seminis y Mayan Ba'alché fueron significativamente menores (10.07 y 12.23, respectivamente). Por otra parte, los valores de amarillo más altos se registraron en la variedad Mayan Ba'alché (b^* 28.14), seguidos de los registrados para las variedades Mayan Chac y Seminis (26.39 y 26.37, respectivamente). Esto resulta

interesante ya que los frutos de la variedad Chac se tornan rojos en la madurez, por lo cual no se habría esperado que presentara un valor de amarillo comparable a la variedad Seminis, de frutos naranja (Cuadro 2.2). Es por ello, que se estableció evaluar de manera más fina la coloración de las variedades utilizando un método de espectrofotometría basado en la máxima absorción de luz visible de los extractos, en el rango 350-700 nm (Apéndice I: Figura A.3).

Cuadro 2.2 Características morfológicas de 30 frutos de las variedades de *C. chinense* Jacq. recolectadas en septiembre y octubre 2018.

Variedad	MR8	Mayan Kisin	Seminis	Mayan Chan	Mayan Ba'alché	Mayan Chac
Rojo (a*)	21.93	21.97	10.07	23.37	12.23	23.52
Amarillo (b*)	21.06	24.45	26.37	20.27	28.14	26.39
Porcentaje de humedad	86.5 ± 0.79	85.4 ± 1.80	84.6 ± 2.66	85.6 ± 1.87	83.1 ± 2.35	86.7 ± 1.59
Número de lóculos	2 a 4	3 a 4	3 a 4	3 a 4	2 a 3	3 a 4
Longitud del fruto (cm)	4.5 ± 1.5	4 ± 1.3	3.9 ± 1.7	3 ± 1.6	4.2 ± 0.8	4.5 ± 1.5
Días postantesis para recolecta	30-40	28-35	35-45	35-45	35-45	50-65

El análisis de barrido espectrofotométrico entre 350 y 700 nm de los extractos de las variedades indicó que todas ellas presentaban dos picos de absorción máxima a 450 y 470nm (Apéndice I: Figura A.4). Esto corresponde a la longitud de onda de absorción de los carotenoides y concuerda con lo previamente reportado por Giuffrida y colaboradores (Giuffrida et al., 2013), quienes indican que el chile habanero es un fruto carotenogénico, es decir, que debe su color a la presencia de carotenoides.

Por otro lado, Mena y colaboradores realizaron un estudio para comparar el contenido de carotenoides en la variedad Bhut Jolokia de *C. chinense* a partir de un método espectrofotométrico (Mena et al., 2018). El método consiste en la absorptividad específica del α - y β -caroteno (mg/L) y la aplicación de la fórmula reportada por Nagata y colaboradores para la cuantificación de carotenoides en extractos de zanahoria (Nagata et al., 2008).

En este trabajo se utilizó una metodología similar a la reportada por Mena y colaboradores para la estimación del contenido de carotenoides totales, con ligeras modificaciones. Para ello, se maceró 1 g de peso seco en 10 ml de acetona (80%) durante 1 h. La mezcla fue centrifugada a 7,000 rpm durante 15 minutos y se tomaron 2 ml de sobrenadante para realizar lecturas de absorbancia a 443, 475 y 492 nm. Se utilizó acetona 80% como blanco y la cantidad de α y β -caroteno fue calculada utilizando las fórmulas:

$$\alpha\text{-Caroteno (mg/L)} = 0.984(A_{443}) + 3.091(A_{475}) - 2.758(A_{492}) - 0.299$$

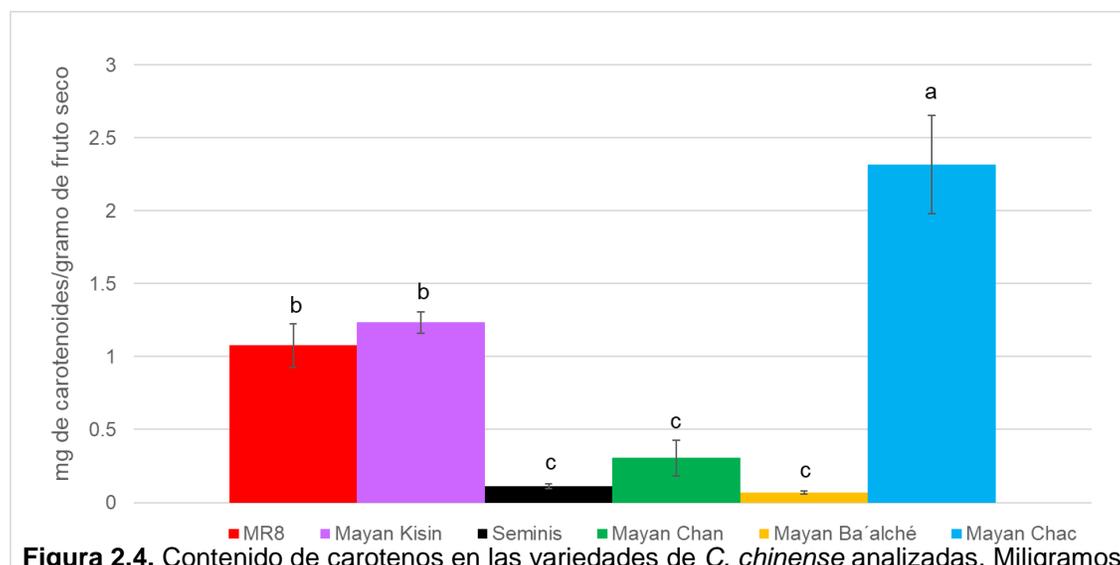
$$\beta\text{-Caroteno (mg/L)} = 1.292(A_{443}) + 3.698(A_{492}) + 0.131$$

Cuadro 2.3. Miligramos de alfa y betacaroteno estimados en las variedades de chile habanero.

	MR8	Mayan Kisin	Génesis	Mayan Chan	Mayan Ba'alché	Mayan Chac
Alfa caroteno mg/L	28.66	32.23	3.2	7.15	1.85	57.95
Beta caroteno mg/L	78.98	91.1	8	23.38	4.98	173.82

Los contenidos de alfa y betacaroteno obtenidos en este trabajo varían entre 1.85 y 173.82 mg/L (Cuadro 2.3) y difieren bastante de los reportados por Mena para diferentes genotipos de la variedad Bhut Jolokia (0.97 y 5.26 mg/L; Mena *et al*, 2018). No obstante, estos trabajos no son del todo comparables debido a que en dicho trabajo no se hace referencia al volumen de disolvente utilizado en la extracción y es de notar que el uso de un extracto más concentrado puede generar variaciones en las lecturas de absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas (Schmidt, 2001). Es por ello, que la concentración de carotenoides obtenida a partir del resultado en mg por litro de solución fue ajustado al volumen de disolvente utilizado en la extracción (10 ml). Esto permitió estimar el contenido de carotenoides por cada gramo de fruto seco, debido a que se partió de ese total de tejido (mg Eq de carotenoides/g de fruto seco) (Figura 2.4).

Con base en la sumatoria del contenido de los carotenoides estimados, se puede agrupar a las variedades en tres categorías, donde la variedad Mayan Chac contiene el mayor contenido con 2.31 (± 0.33) mg/g de fruto seco. Una segunda categoría compuesta por las variedades Mayan Kisin y MR8 con 1.23(± 0.07) y 1.07(± 0.14) mg/g de fruto seco, respectivamente. Por último, las variedades Mayan Chan, Seminis y Mayan Ba'alché (con 0.30 (± 0.12); 0.11 (± 0.01) y 0.06 (± 0.01) mg/g, respectivamente), que presentaron las menores cantidades de carotenoides equivalentes de alfa y betacaroteno (Figura 2.3).



equivalentes a α - y β -caroteno por gramo de peso seco de las seis variedades. Se presentan los promedios de tres repeticiones y su desviación estándar. Letras compartidas indica que no hay diferencia significativa entre los valores.

2.3.2 Cuantificación de capsaicinoides

El mayor contenido de capsaicinoides se observó en la variedad MR8, con valores de 13.42 (± 1.25) mg/g. Le siguieron las variedades Mayan Kisin, Seminis, Mayan Ba'alché, Mayan Chan y Mayan Chac, con 9.58 (± 0.76); 9.35 (± 0.94); 9.32 (± 1.09); 7.85 (1.04) y 4.44 (± 0.78) mg/g, respectivamente (Figura 2.5). La conversión a unidades Scoville (SHU) a partir de esos valores se obtuvo convirtiendo a partes por millón (ppm) y posteriormente multiplicando por el factor de conversión (16.1) establecido en la NOM-189-scfi-2018.

Se puede observar que las variedades analizadas se encuentran entre las 220 000 y 70 000 SHU (Figura 2.6). Lo cual se encuentra por debajo de lo reportado para las mismas variedades (Santana-Buzzy et al., 2018). Previamente, se encontraron valores en la variedad Mayan Kisin, Mayan Ba'alché, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac entre 650 000 y 400 000 SHU siendo la variedad Mayan Kisin la de mayor pungencia y la variedad Mayan Chac la que menor pungencia presentó (Cuadro 2.3). Sin embargo, es importante subrayar que independientemente de los valores menores obtenidos en este estudio, la tendencia en cuanto al orden de las variedades de acuerdo con sus niveles de pungencia resultó similar a lo reportado, donde Mayan Kisin y Mayan Ba'alché presentaron mayores niveles en comparación con las variedades Mayan Chan, y Mayan Chac (Santana Buzzy et al., 2018; Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Comparación de la pungencia reportada por Santana-Buzzy y la pungencia obtenida en el presente trabajo.

Variedad	MR8	Mayan Kisin	Seminis	Mayan Chan	Mayan Ba'alché	Mayan Chac
Pungencia (SHU) reportada por Santa-Buzzy <i>et al.</i> 2018	-	670,325	-	580,329	553,769	405,230
Pungencia (SHU) obtenida en este trabajo	216,115	154,226	150,509	126,405	150,125	71,478

Estos resultados confirman que la diferencia en la acumulación de capsaicinoides entre las variedades se deben a diferencias genotípicas y sugiere que los efectos ambientales de las condiciones de cultivo impactaron en la misma medida a las variedades.

Es bien conocido que el contenido de capsaicinoides puede variar dependiendo de múltiples factores externos al genotipo de las plantas, entre los principales factores se encuentran la cantidad de agua de riego, el nivel de fertilización del suelo, la variación en la temperatura y humedad ambiental, entre otras. Por ejemplo, diferentes genotipos de *C. chinense* bajo distintas condiciones de estrés hídrico (alto, mediano y bajo estrés hídrico) produjeron frutos de mayor longitud que las plantas bien irrigadas, con mayores contenidos de capsaicinoides en respuesta a alto estrés hídrico. Sin embargo, en algunos de los genotipos evaluados el contenido de capsaicinoides se vio afectado cuando las plantas fueron sometidas a estrés hídrico. De ese modo, la respuesta que las plantas de *C. chinense* respecto a la síntesis de capsaicinoides en condiciones de estrés hídrico puede variar ya sea para la acumulación de estos metabolitos o disminuir su síntesis de acuerdo con el genotipo evaluado (Jeeatid *et al.* 2018).

Por otra parte, la exposición a luz azul y luz ultravioleta incrementa significativamente el contenido de capsaicinoides en chile habanero (Pérez-Ambrosio *et al.* 2018). De este modo, entre las diferencias en los contenidos de capsaicinoides en las variedades estudiadas, respecto a los reportes previos pueden estar directamente relacionado con el cambio en las condiciones de cultivo como lo es la cantidad de agua y el período de recolecta de los frutos. Esto se apoya con los resultados obtenidos en recolectas previas (recolecta de marzo-abril), donde en comparación con la última recolecta (septiembre-octubre) los contenidos de capsaicinoides mostraron cambios a pesar de evaluar los frutos de las mismas plantas de las variedades (Apéndice I: Figura A.5). Sin embargo, la tendencia entre las variedades con mayor y menor contenido se mantuvo constante.

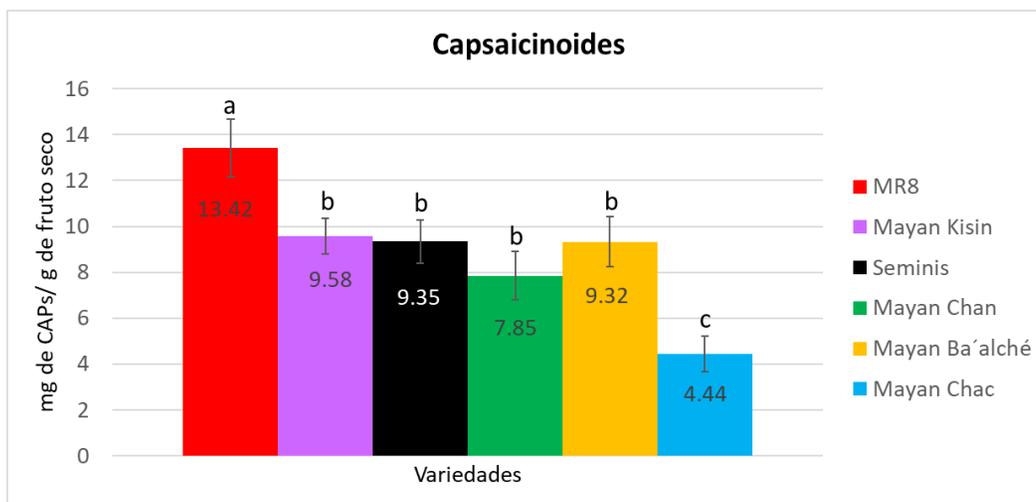


Figura 2.5 Contenido de capsaicinoides totales en miligramos por gramo de fruto seco. Promedio de tres repeticiones con desviación estándar; letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre los valores.

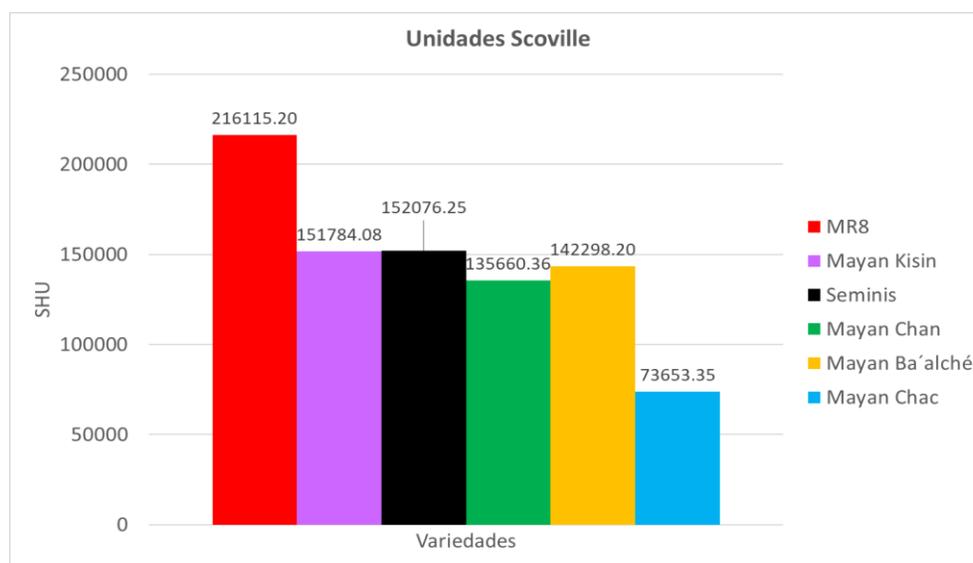


Figura 2.6 Nivel de pungencia de las variedades de *C. chinense* Jacq expresado en unidades Scoville (SHU). Las unidades Scoville se calcularon a partir de la concentración de capsaicinoides totales en ppm multiplicado por el factor de conversión 16.1 reportado en PROY-NOM-189-SCFI-2017.

2.3.3 Cuantificación de fenoles totales

En canto al contenido de fenoles totales, las variedades Mayan Kisin y Seminis presentaron los mayores valores, siendo de 257.5 (± 8.33) y 251.94 (± 41.94) μg equivalentes de ácido clorogénico por gramo de peso seco (μg EqAC/g PS), respectivamente. Las variedades MR8 y Mayan Ba'alché se ubican a continuación con valores de 171.3 (± 15.77) y 153.3 (± 23.19) μg EqAC/g, respectivamente, y finalmente las variedades Mayan Chan y Mayan Chac con contenidos de 88.5 (± 21.38) y 57.5 (± 11.02) μg EqAC/g, respectivamente (Figura 2.7). Esto es comparable con los datos reportados por Segura-Campos y colaboradores, quienes mencionan que el chile habanero de la Península de Yucatán puede ser una buena fuente de metabolitos bioactivos, como lo son los fenoles totales, ya que contiene cantidades cercanas a los 20 mg equivalentes de Trolox (EqT) por cada 100 g de peso seco (Segura-Campos *et al.*, 2013). Los valores aquí obtenidos al ser convertidos a miligramos por gramo de peso seco indican que las variedades analizadas no difieren de manera significativa con respecto a la cantidad de fenoles totales reportadas para otros genotipos de chile habanero de la Península de Yucatán (20 mg/100 g de PS=200 μg /g de PS) a pesar de no haber utilizado Trolox para realizar la curva de calibración.

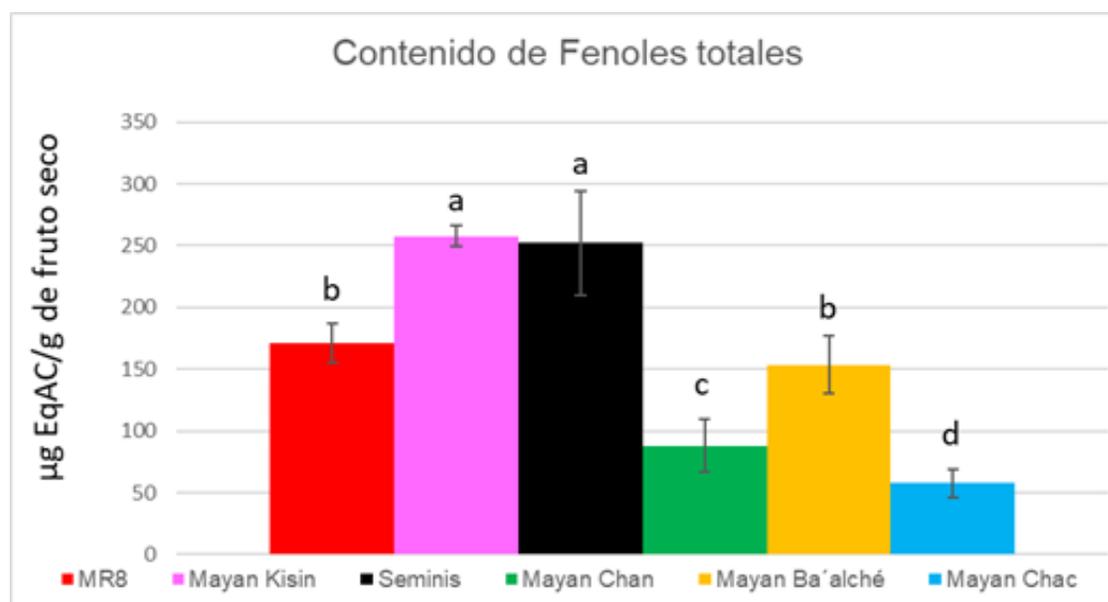


Figura 2.7 Contenido de fenoles totales de las variedades de *C. chinense* Jacq. Promedio de tres repeticiones con desviación estándar; letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre los valores.

Por otro lado, Castro-Concha y colaboradores realizaron la evaluación del contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de dos variedades de chile habanero de la Península de Yucatán, incluyendo la variedad MR8 (Castro-Concha *et al.*, 2004). Sin embargo, dicho estudio se centró en la discriminación entre pericarpio y placenta de frutos frescos, encontrando que el mayor contenido de fenoles totales correspondió a la placenta de los frutos de MR8, donde reportan valores hasta tres veces mayores que lo encontrado en el pericarpio y mencionan que el alto contenido de compuestos fenólicos de la placenta puede estar relacionado tanto a los capsaicinoides como a otros intermediarios de éstos, entre los que mencionan al ácido cumárico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico (Castro-Concha *et al.* 2014).

2.3.4 Actividad antioxidante de los extractos de frutos.

La actividad antioxidante se evaluó por el método de reducción del radical DPPH, estimando la concentración efectiva media (Ec50) de los extractos de frutos completos de las diferentes variedades. La Ec50 de un compuesto corresponde al valor de la concentración de un agente que produce una respuesta del 50% de la máxima posible, en un tiempo determinado (Sebaugh 2011). De este modo, valores menores de Ec50 representan mayores actividades antioxidantes. Las variedades Mayan Kisin (350.34 ± 11.82), MR8 (351.26 ± 15.91), Mayan Chan (394.16 ± 10.78) y Seminis (434.61 ± 149.16) presentaron la mayor actividad antioxidante, seguidas por la variedad Mayan Ba'alché (498.47 ± 73.1), y la variedad Mayan Chac (642.49 ± 111.15) presentó la menor actividad antioxidante (Figura 2.8). La comparación de la Ec50 de las variedades con respecto al control positivo (ácido ascórbico) indican que ninguna de las variedades presentó una actividad antioxidante igual o mejor a este (54.21 ± 5.67). Sin embargo, esto puede deberse a que en los extractos hay una combinación de diferentes componentes que no interactúan de manera homogénea con el radical DPPH (Mishra *et al.*, 2012).

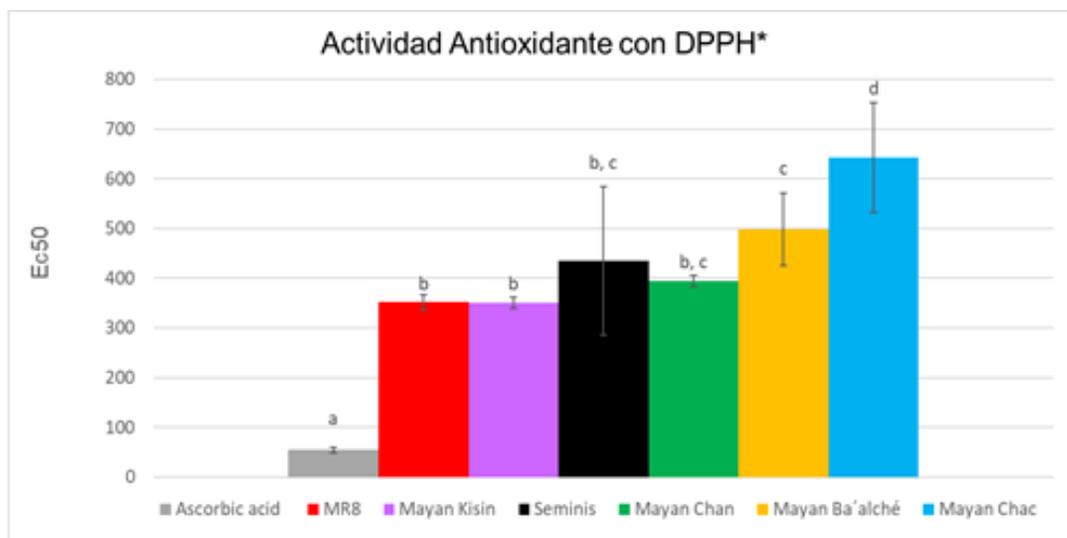


Figura 2.8 Actividad antioxidante (Ec50) en ensayo de reducción del radical DPPH. Promedio de tres repeticiones con desviación estándar; letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre los valores.

Por último, con el fin de conocer la relación entre el contenido de capsaicinoides, el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante, se realizó un análisis de correlación de Pearson. El mayor coeficiente de correlación se encontró entre el contenido de capsaicinoides y la actividad antioxidante ($r = -0.8219$; $p = 0.04$). Por otra parte, el contenido de fenoles totales no presentó correlación significativa con la actividad antioxidante con el método utilizado (DPPH) ($r = -0.6001$; $p = 0.21$) (Figura 2.9). Esto es apreciable en el análisis cualitativo de la actividad antioxidante utilizando los perfiles de CCD, donde se observó que la reducción del radical DPPH está principalmente influida por capsaicina y dihidrocapsaicina, así como por algunos componentes de mayor polaridad entre los que podrían estar presentes el ácido ascórbico, catequina y quercetina (Figura 2.10).

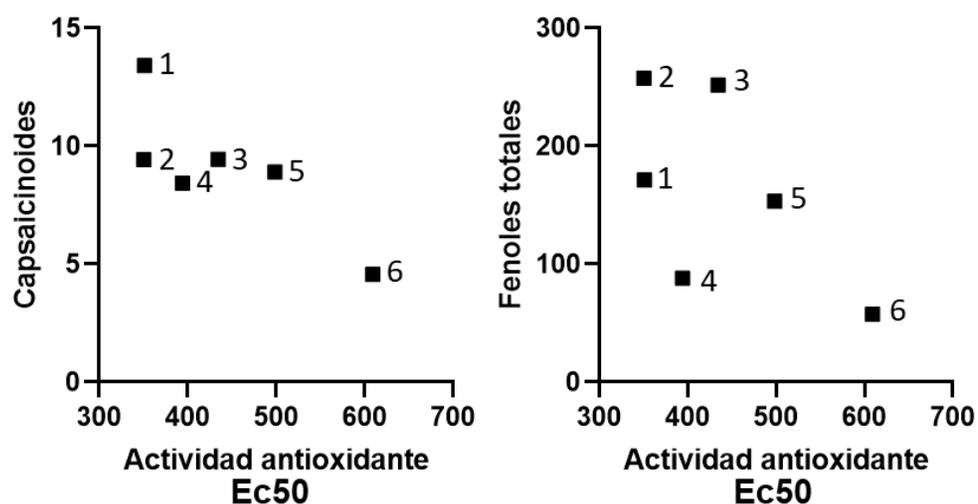


Figura 2.9 Comparación de la correlación entre el contenido de fenoles totales y capsaicinoides con la actividad antioxidante de las variedades. Los números representan las variedades: 1= MR8, 2= Mayan Kisin, 3= Seminis, 4= Mayan Chan, 5= Mayan Ba'alché y 6= Mayan Chac.

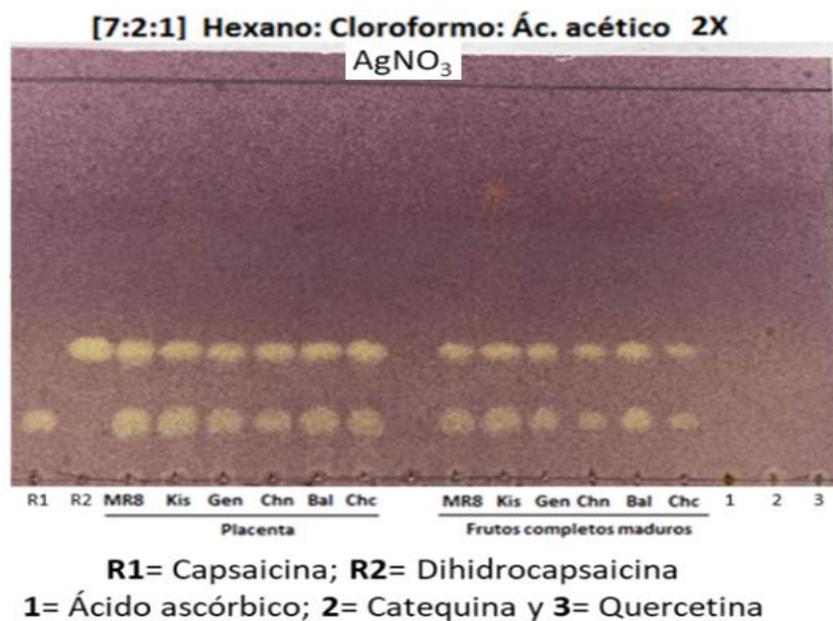


Figura 2.10 Análisis cualitativo de reducción del radical DPPH en CCD impregnada con nitrato de plata (AgNO₃) de placenta y frutos maduros completos. Muestras en carriles de izquierda a derecha; Capsaicina, dihidrocapsaicina, MR8, Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché, Mayan Chac, Ácido ascórbico, catequina y quercetina en placenta y frutos completo.

Nuestros resultados contrastan con lo reportado por Menichini y colaboradores, quienes mencionan que la concentración de fenoles totales está directamente relacionada con la actividad antioxidante en el modelo de DPPH (Menchini et al., 2009). Así mismo, Kuna y colaboradores reportan que en otras variedades de *C. chinense* Jacq. existe una alta correlación ($p < 0.005$) entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante (Kuna et al., 2018). Sin embargo, nuestros datos indican que la actividad antioxidante correlaciona únicamente con el contenido de capsaicinoides, lo cual puede explicarse de acuerdo a lo reportado por Castro-Concha y colaboradores, quienes mencionan que la actividad antioxidante de dos variedades de chile habanero de la Península de Yucatán puede estar relacionada al contenido de capsaicinoides, ya que éstos mismos forman parte importante del contenido de fenoles totales de los frutos (Castro-Concha et al., 2004). Sin embargo, en las figuras 2.5 y 2.7 se puede observar que existe una ligera diferencia entre las variedades con mayor contenido de fenoles totales (Mayan Kisin) y la variedad con mayor contenido de capsaicinoides (MR8). Sin embargo, las variedades Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac se mantuvieron constantes en cuanto a la concentración tanto de capsaicinoides como de fenoles totales en comparación entre ellas, siendo la variedad Mayan Chac la que menor contenido presentó en ambos casos. Por esto, sería interesante realizar mayor número de repeticiones y realizar la cuantificación de fenoles totales, así como determinar la actividad antioxidante el mismo día que se prepare el extracto, esto con el fin de disminuir la probabilidad de alteración de la muestra por la oxidación y/o degradación de sus componentes.

2.4 CONCLUSIONES

Estos resultados confirman que la diferencia en la acumulación de capsaicinoides entre las variedades deben estar influida por diferencias genóticas que podrían ser afectadas de manera similar por las condiciones ambientales y/o de cultivo.

La actividad antioxidante mostró una relación significativa ($p < 0.05$) con el contenido de capsaicinoides totales. La mayor AO se encontró en la variedad MR8 mientras que la menor ocurrió en la variedad Mayan Chac. El contenido de fenoles no mostró relación significativa con la AO.

CAPÍTULO II: REFERENCIAS

- Giuffrida D., Dugob P., Torre G., Bignardid C., Cavazza A., Corradinid C. & Dugo G. (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry*, 140, 794-803.
- Jeeatid N., Techawongstien S., Suriharn B, Chanthai S., Bosland P.W.& Techawongstien S. (2018). Influence of water stresses on capsaicinoid production in hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars with different pungency levels. *Food Chemistry*, 245, 792-797.
- Huang D, Ou B, Prior RL (2005) The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841–1856.
- Pérez-Ambrocio A., Guerrero-Beltrán J.A., Aparicio-Fernández X., Ávila-Sosa R., Hernández-Carranza P., Cid-Pérez S. & Ochoa-Velasco C.E. (2018). Effect of blue and ultraviolet-C light irradiation on bioactive compounds and antioxidant capacity of habanero pepper (*Capsicum chinense*) during refrigeration storage. *Postharvest. Biology and Technology*, 135, 19-26.
- Mishra K. Ojha H. & Chaudhury N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043.
- Monforte-González M., Medina-Lara F., Gutiérrez-Carbajal G. & Vázquez-Flota F. (2007). Capsaicinoid Quantitation by *In Situ* Densitometry of Thin Layer Chromatography Plates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30, 1697 — 1704.
- Paz M., Gullón P., Barroso M.F., Carvalho A.P., Domínguez V.F. Gómez A.M, Becker H., Longhinotti E. & Delerue-Matos C. (2015). Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 172: 462-468.
- Sánchez-Mata M.C., Cabrera Loera R.D., Morales P. (2012). Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. *Genetic Resources Crops Evolution*. 59: 431–443.

- Schmidt, F. (2001). Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry. Encyclopedia of life sciences. Macmillan Publishers Ltd. Nature Publishing Group, 1-4.
- Sebaugh, J.L. (2011). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. Pharmaceutical Statistics. 10, 128-134.
- Umesh C. S., Yadav V.R., Gagan D., Rakesh K.S. & Komaraiah P. (2016). "Oxidative Stress in Metabolic Disorders: Pathogenesis, Prevention, and Therapeutics". Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 3 pp.
- Zhang W., Chen C., Shi H., Yang M., Liu Y., Ji P., Chen H., Tiang R.X. & Li E. (2016). Curcumin is a biologically active copper chelator with antitumor activity. Phytomedicine, 23,1-8.

CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRESENTES Y COMPARACIÓN DE LOS PERFILES METABÓLICOS DE LAS VARIEDADES

3.1 INTRODUCCIÓN

Las aplicaciones de las bibliotecas virtuales para la identificación de compuestos a partir de cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-MS) presenta algunas limitantes relacionadas con la intensidad de las señales obtenidas en los espectros de masas que, a su vez, se deben a las posibles variaciones en la energía del haz de electrones que incide sobre la muestra, la localización de ésta respecto al haz electrónico, la presión de vapor de la muestra y la temperatura de la fuente de iones, entre otras. Esto puede originar variaciones significativas en la abundancia relativa de los iones para espectros del mismo compuesto, obtenidos en diferentes laboratorios y en diferentes condiciones. Se considera que cuando un espectro de masas presenta una similitud superior al 85% con las referencias depositadas en las bibliotecas es muy probable que sea el mismo compuesto, o algún derivado de éste. (Howard *et al.*, 2013). Sin embargo, siempre es recomendable utilizar estándares comerciales o previamente identificados por métodos espectroscópicos para realizar la comparación tanto del tiempo de retención como del patrón de fragmentación obtenido y poder asegurar la identificación del componente. Además, el uso de cromatografía de gases acoplado a está generalmente limitado a la identificación de compuestos volátiles y/o de bajo peso molecular (Hübschmann, 2015). Por ello, el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica preferida para la caracterización de extractos de plantas, donde el objetivo principal no radica en la composición de componentes volátiles (Brenner 1981).

HPLC es una técnica capaz separar componentes de una manera automatizada, lo cual incrementa su reproducibilidad. Sin embargo, los resultados obtenidos para una misma muestra pueden tener variaciones, debido al procesamiento de esta y diferentes condiciones exógenas a su composición (e.j. estado de la columna utilizada, pH de los disolventes, fluctuaciones en el flujo de la fase móvil, entre otras). Es por ello, que para realizar una comparación adecuada de los perfiles cromatográficos de extractos obtenidos por HPLC es importante realizar una corrección de los datos a través del uso de logaritmos que permiten eliminar la variabilidad ocasionada por factores externos a la

composición del extracto analizado, los cuales pueden influir sobre los tiempos de retención de los componentes y la línea base del perfil (Zhang *et al.*, 2010). Jiang y colaboradores realizaron una comparación de cinco métodos de alineamiento de picos (Tiempo de deformación dinámica, tiempo de deformación paramétrica, penalización variable de deformación dinámica, alineamiento recursivo por transformada rápida de Fourier y correlación optimizada de deformación) (Jiang *et al.*, 2013). Ellos mencionan que la comparación de los métodos de alineamiento, utilizando como modelo el alineamiento de 30 extractos de raíz de Kudzuvine, resulta en que el método de correlación optimizada de deformación (COW, por sus siglas en inglés) tiene ventajas sobre otros métodos como el de tiempo de deformación dinámica y el de tiempo de deformación paramétrica, ya que mantiene la forma y altura de los picos, lo cual favorece la comparación de los perfiles cromatográficos evitando factores de distorsión de los picos provocados por el alineamiento (Jiang *et al.*, 2013).

COW es un método de alineamiento que alinea los cromatogramas por estiramiento y compresión lineal en unidades de segmento. El procedimiento de alineación de COW consta principalmente de tres pasos: el primero es el corte del cromatograma en segmentos; luego extiende linealmente los picos y los desplaza a lo largo del eje del tiempo y, por último, calcula el coeficiente de correlación entre el cromatograma alineado y el de referencia (Nielsen *et al.*, 1998) (Figura 3.1). La importancia de poder tener perfiles cromatográficos alineados radica principalmente cuando se quiere hacer la identificación y comparación de metabolitos que pueden tener similitud en sus estructuras y, por ende, en su tiempo de retención. Puesto que la alineación de los componentes permite disminuir la variación en tiempos de retención ocasionada por factores externos a la muestra y una vez que se tienen perfiles alineados, éstos se pueden comparar con mayor facilidad de acuerdo con sus componentes.

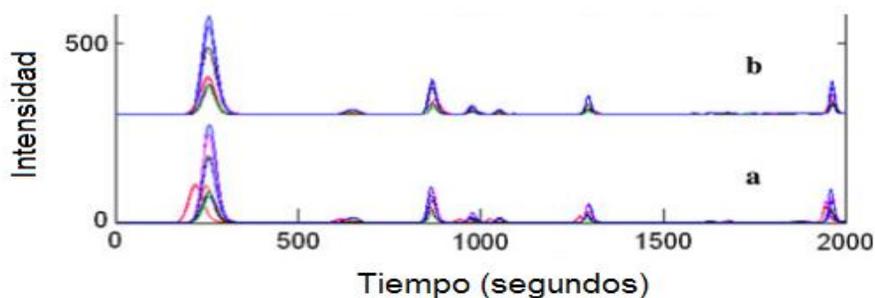


Figura 3.1 Perfiles cromatográficos sin modificar (a) y utilizando el algoritmo COW (b) para el alineamiento de los componentes (Modificado de Jian *et al.*, 2013).

Además, se han desarrollado nuevas metodologías para el análisis, integración y comparación de datos numéricos obtenidos a partir de perfiles cromatográficos. Una de estas herramientas es la quimiometría (Kumar *et al.*, 2014). La quimiometría es la rama de la química que utiliza métodos matemáticos y de estadística multivariante utilizada en el análisis de perfiles cromatográficos con el fin de reducir la dimensión de los datos obtenidos a partir de un cromatograma en un conjunto menor, clasificar las muestras analizadas en grupos definidos de acuerdo con la similitud de sus componentes y/o variables analizadas (Bennett, 2005). Esto permite comparar si existe o no similitud entre las muestras analizadas (Gallon *et al.*, 2018).

Entre los métodos de análisis multivariantes más utilizados en quimiometría se encuentran el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y el análisis de conglomerados jerárquicos (HCA, por sus siglas en inglés) (Álvarez-Zapata 2015). Ambos métodos permiten agrupar los datos de acuerdo con la similitud de sus componentes e identificar las observaciones que se encuentran más y menos relacionadas entre sí. Así, el uso de análisis quimiométricos permite hacer la comparación de los datos con base en un significado químico y/o biológico, por ejemplo, la clasificación de especies de acuerdo a la similitud de sus componentes químicos (quimiotaxonomía) o la categorización de extractos de acuerdo a su origen biológico o alguna propiedad biológica característica (Araujo *et al.*, 2012).

Con el fin de comparar la similitud/variación de los perfiles metabólicos de las seis variedades analizadas, se realizó la identificación de algunos metabolitos presentes utilizando estándares externos de capsaicinoides, intermediarios de la síntesis de capsaicinoides, ácido ascórbico y otros compuestos fenólicos ampliamente reportados en Chile *C. chinense*. Para ello, se planteó el uso técnicas cromatográficas (CG-MS y HPLC-DAD) para la separación e identificación de los componentes de los extractos crudos de frutos maduros completos, así como herramientas de estadística multivariada utilizadas en quimiometría (PCA y HCA).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Preparación de los extractos.

Los extractos de fruto completo se obtuvieron como se describe en el punto 2.2.3. Sin embargo, con el fin de mejorar la detección de los componentes minoritarios, se realizaron disecciones de los frutos para obtener extractos de pericarpio y placenta por separado. Para ello, 10 frutos fueron disectados separando los diferentes tejidos. Los tejidos fueron secados por liofilización durante 48 horas. Para el extracto de pericarpio se utilizaron 200 mg de tejido seco, mientras que para el extracto de placenta se emplearon 100 mg de tejido seco. Ambos tejidos fueron extraídos en 10 ml de acetona durante 5 h en agitación de 100 rpm. Se tomó 1 ml del extracto y se filtró con filtros de 0.20 μm (Millex® FG; Japan) y se colocó en frascos viales “Waters certificated” para proceder con su análisis por HPLC-UV.

3.2.2 Cromatografía de gases para detección de componentes volátiles en los extractos de frutos completos

Se analizaron los extractos de las diferentes variedades, resuspendiendo en acetona al 1% (10 mg/ml). Se estandarizó el método de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de flama (CG-FID, por sus siglas en inglés) (Varian 450, SpectraLab). Se utilizó el método de Cisneros-Pineda (2007) con algunas modificaciones para la separación de capsaicina, dihidrocapsaicina, vainillina y los ácidos: cafeico, *trans*-cinámico, *p*-cumárico, ferúlico y vanílico. Se utilizó una columna HP-5MS (Agilent Technologies) de 30 m X 0.32 mm X 0.5 μm , y el método consistió en inyectar 2 μl de extracto utilizando un split de 50% y una temperatura de 290° en el puerto de inyección, un flujo constante de nitrógeno de 1 ml/min, temperatura inicial de 150°C (2min). Se inició con un incremento de 8 °C/min hasta 170°C (5 min), un segundo incremento de 8 °C/min hasta alcanzar los 200 °C y un último incremento en la temperatura de 15 °C/min hasta 280 °C, el cual fue mantenido durante 10 min. El detector FID se mantuvo a 290 °C y se realizaron tres inyecciones para cada extracto analizado (tres extractos por variedad).

3.2.3 Cromatografía de gases para la identificación de componentes volátiles

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas con ionización por impacto electrónico (CG-MS) marca Agilent Technologies (6890 N) y la base de datos

NIST (Chem Station G1701DA) para el análisis e identificación tentativa de los componentes presentes en los extractos de las variedades. Los extractos fueron corridos como se describió anteriormente (apartado 3.2.1) utilizando el mismo modelo de columna. Para la estandarización del porcentaje de similitud de los espectros obtenidos en comparación con la base de datos NIST, se inyectaron 2 µl de soluciones 0.1% (1 mg/ml) de los estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina. Las comparaciones de los patrones de fragmentación, obtenidos a partir de un detector másico de ionización de impacto electrónico para capsaicina y dihidrocapsaicina, resultaron de 94% y 93% de similitud, respectivamente. Con esto, se estableció 93% como el mínimo porcentaje de similitud para la identificación tentativa de metabolitos en los extractos a partir del uso de la base de datos.

3.2.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución para la obtención de perfiles metabólicos

Se estableció un método capaz de resolver la mayoría de los componentes de los extractos de las variedades utilizando HPLC-UV (230nm). El método consta de un sistema en gradiente con una fase móvil de agua: acetonitrilo 95:5; 85:15; 55:45; 40:60; y 96:5 durante 0, 5, 25, 50 y 53-65 min a un flujo constante de 1 ml/min. Se inyectaron 10 µl de extracto en concentración de 1 mg/ml.

3.2.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución para la identificación de metabolitos

Se inyectaron estándares comerciales de capsaicina y dihidrocapsaicina como se describió en el punto 3.2.3. Se incluyeron en este análisis de intermediarios fenólicos de biosíntesis de capsaicinoides; vainillilamina, vainillina y los ácidos: cafeico, *trans*-cinámico, *p*-cumárico, ferúlico, y vanílico, así como otros compuestos reconocidos por su actividad biológica; como el ácido ascórbico, el ácido gálico, catequina y quercetina. Se determinaron los tiempos de retención, así como los espectros UV en el rango de 210 a 280 nm y se compararon con las señales detectadas en los extractos de las variedades para determinar su presencia en las mismas.

3.2.6 Pretratamiento de datos para generación de matrices multivariantes

Se obtuvieron los datos crudos de los cromatogramas de los extractos de frutos completos de todas las variedades para la generación de la matriz correspondientes. Se obtuvieron 10 lecturas de absorbancia (variables), por segundo al tiempo de retención (Tr) definido. Esto es 39,000 variables correspondientes a los 65 min de elución del método. Los datos se agruparon en una matriz donde las columnas representan a cada una de las lecturas, de acuerdo con el Tr (variables) y las filas correspondían a las observaciones (muestras) a comparar (Figura 3.2).

-Matriz X-		
Observación 1 (MR8)	Variable 1 (UA al Rt 0.001666667)	Variable 2, 3, 4 ... X
Observación 2 (Kisin)		
Observación 3 (Génesis)		
Observación 4 (Chan) ... n		

Figura 3.2 Representación de la matriz de datos originada a partir de los perfiles metabólicos.

Para la normalización de la matriz, se corrigió la línea base con el algoritmo de airPLS 2.0 (Zhang *et al.*, 2010). Las señales (picos) se alinearon por el método COW con el programa MATLAB R2015. La importancia de este pretratamiento se debe a que se disminuye la influencia que la variación provocada por diferentes factores externos a la muestra sobre estos parámetros; línea base y el Tr.

3.2.7 Uso de análisis multivariantes para para la comparación de perfiles metabólicos

Para clasificar las seis variedades analizadas de acuerdo a la similitud/diferencia en la composición de los extractos se utilizó el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) y el análisis de agrupamiento jerárquico (HCA, por sus siglas en inglés). Se empleó la versión de prueba del programa de quimiometría SIMCA 15 (Umetrics), analizando la matriz de datos normalizados, como se describió en el punto 3.2.6.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Identificación de componentes volátiles en los extractos de las variedades

El análisis comparativo con la base de datos arrojó la presencia de nonivamida, con un tiempo de retención (Tr) de 17.18 y una certeza del 93% en todas las variedades (Cuadro 3.1). Sin embargo, el patrón de fragmentación resultó idéntico al estándar de dihidrocapsaicina (Figura 3.3). Con base en esto, se infiere que los compuestos en los Tr de 16.493 y 16.735 min, asignados como nonivamida con 94% de certeza, corresponden en realidad a otros capsaicinoides. Estos compuestos comparten el pico base de 137 m/z, característico de la fragmentación y el cual corresponde al anillo de vainillilamina, estructura núcleo común en todos los capsacinoides (Figura 3.3). De acuerdo con lo reportado por Giuffrida y colaboradores, los capsaicinoides más abundantes en Chile habanero son capsaicina y dihidrocapsaicina, los cuales corresponden a más del 90% de la abundancia total de capsacinoides, seguidos de nordihidrocapsaicina y homocapsaicina (Giuffrida *et al.*, 2014). Sin embargo, dado que no se dispone de estándares para comparar los patrones de fragmentación de los metabolitos con Tr de 16.493 y 16.735 minutos, sería necesario aislarlos e identificar su estructura química para identificarlos plenamente.

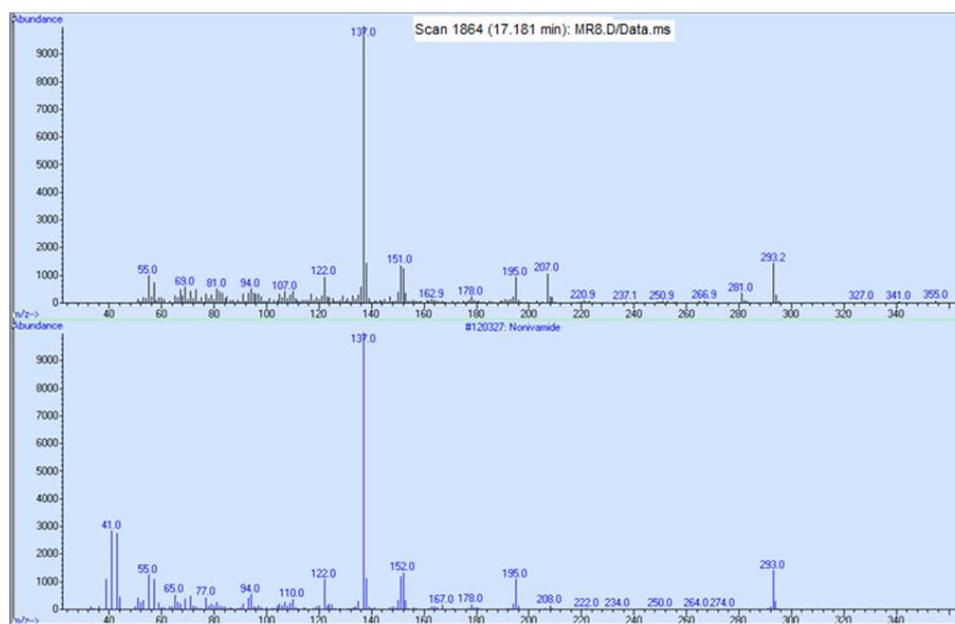
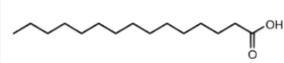
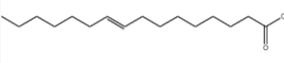
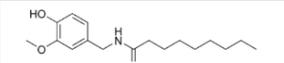
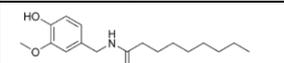
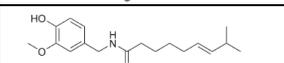
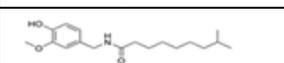
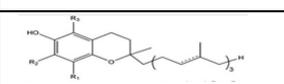
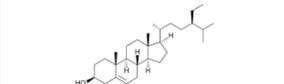


Figura 3.3 Patrón de fragmentación de dihidrocapsaicina en la muestra (arriba) y Nonivamide en la base de datos NIST (abajo).

En el cuadro 3.1 se enlistan los componentes volátiles identificados tentativamente de acuerdo con la base de datos NIST en las diferentes variedades analizadas. Se observa la presencia de ácido pentadecanoico y ácido 9-hexadecenoico, los cuales ya han sido previamente reportados en chile habanero por Pino y colaboradores (2007) (Pino *et al.*, 2007). De igual manera, se observó la presencia de vitamina E y *beta*-sitosterol.

Cuadro 3.1 Compuestos volátiles identificados por CG-MS

Nombre	Estructura	Rt	Masa molecular	% Similitud	Variedad en que se detectó
Ácido pentadecanoico		9.691	242	98	Todas
Ácido 9-Hexadecenoico		11.838	254	94	Todas
Nonivamida		16.493	293	94	Todas
Nonivamida		16.735	293	94	Todas
Capsaicina		17.006	305.1	94	Todas
Nonivamida (Dhcap)		17.138	293 (307)	93	Todas
Vitamina E		21.956	430	95	Todas
<i>Beta</i> -Sitosterol		36.546	414	94	Todas

A pesar de que los componentes volátiles fueron encontrados en todas las variedades, se observó una diferencia en la intensidad de los picos correspondientes entre las variedades. Por ejemplo, la intensidad de la señal con un Tr de 9.691 (ácido pentadecanoico) fue mayor en la variedad MR8, seguida por Mayan Kisin y Mayan Chan, y siendo mucho menos abundante en el resto de las variedades (Seminis, Mayan Ba'alché y Mayan Chac; Figura 3.4b), La abundancia del ácido 9-hexadecenoico es similar a lo descrito para el ácido pentadecanoico. A su vez, el contenido relativo de vitamina E parece ser ligeramente mayor en MR8 que en el resto de las variedades (Figura 3.4b), mientras que el *beta*-sitosterol parece ser un componente volátil minoritario presente en proporciones similares en todas las variedades (Figura 3.4c).

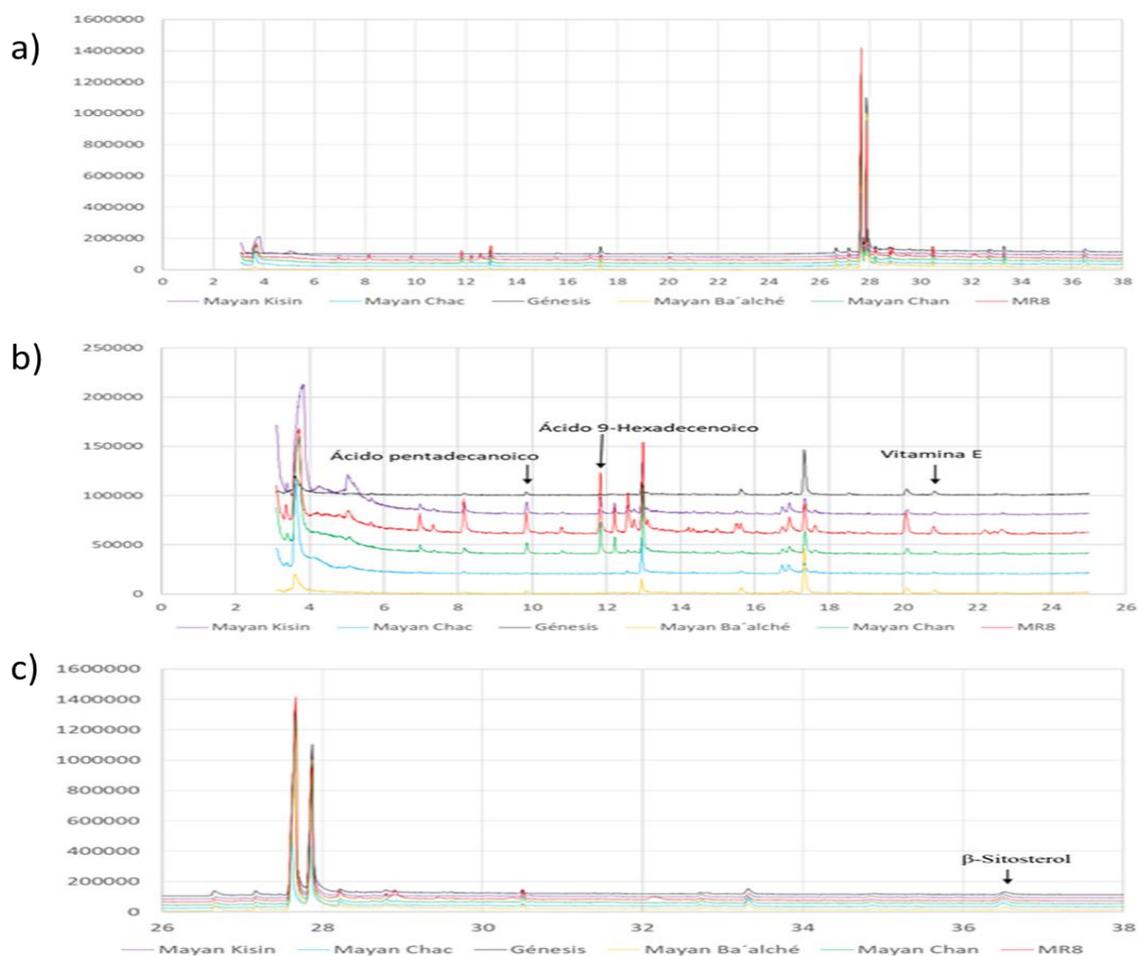


Figura 3.4 Componentes volátiles en las variedades de *C. chinense* Jacq. a) Perfiles cromatográficos completos; b) Ampliación de los primeros 26 min; c) Ampliación del intervalo 26-38 min.

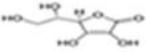
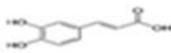
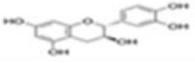
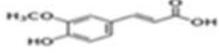
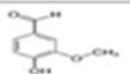
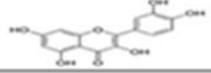
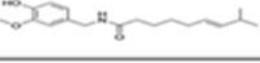
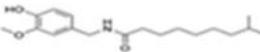
En general, el perfil cromatográfico de componentes volátiles de la variedad MR8 presento mayor contenido de ácidos grasos y otros componentes no identificados, lo cual contrasta con lo observado en los perfiles de las variedades Mayan Chac, Mayan Ba'alché y Seminis, los cuales presentaron pocos componentes volátiles y en menos abundancia en comparación con las demás variedades (Figura 3.4).

3.3.2 Identificación de metabolitos presentes en las variedades

Además del análisis por CG-MS, se obtuvieron perfiles metabólicos de los extractos de fruto completo de las seis variedades por HPLC-UV en una longitud de onda de 230 nm. En paralelo, se corrieron estándares de capsaicinoides (CAP y DHCAP), intermediarios en de su biosíntesis (ácidos *trans*-cinámico, *p*-coumárico, cafeico, ferúlico, vainillina y

vainillilamina), otros compuestos fenólicos relacionados con estos (catequina, quercetina y los ácidos gálico y vanílico). Además, se incluyó también el ácido ascórbico debido a sus propiedades antioxidantes y su presencia en chile habanero reportada (Sharma *et al.*, 2017). En el cuadro 3.2 se muestran los estándares comerciales detectados por HPLC-UV en los extractos de frutos completos, placenta o pericarpio de las variedades.

Cuadro 3.2 Compuestos identificados por HPLC-UV (230nm) en extractos de placentas y/o pericarpios de las en variedades de *C. chinense* Jacq.

Nombre	Tiempo de retención (min)	Absorción UV (nm)	Estructura	Variiedad en la que se detectó
Ácido ascórbico	2.657	191, 257		Todas
Vainillilamina	2.735	207, 2287, 278		Todas
Ácido gálico	4.916	220.3, 267.7		Seminis y Mayan Chan
Ácido cafeico	6.056	190.9, 285.5, 309.4		Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac
Ácido vanílico	9.44	205, 255.8, 289.1		Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac
Catequina	9.654	205, 278		Mayan Chac
Ácido ferúlico	10.6	190.9, 215, 286.7		Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac
Ácido transcinámico	13.415	190.9, 268.9		Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac
Vainillina	13.833	190.9, 285.5, 309.4		Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac
Quercetina	21.246	202.7, 254.6, 364.2		Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac
Capsaicina	35.348	201.5, 230, 280		Todas
Dihidrocapsaicina	39.963	192.1, 200, 230, 279		Todas

La abundancia de capsaicina y dihidrocapsaicina en los extractos de fruto completo impidió visualizar apropiadamente los demás componentes (Figura 3.5a). Sin embargo, se detectó la presencia de ácido ascórbico en todas las variedades, así como catequina y ácido *trans*-cinámico en la variedad Mayan Chac (Figura 3.6a). Por otra parte, el análisis de los extractos de placenta y pericarpio de las variedades permitieron no sólo la detección de capsaicina, dihidrocapsaicina, sino facilitaron la detección de un mayor número de metabolitos, como los ácidos: ascórbico, cafeico, *trans*-cinámico, ferúlico, *p*-coumárico, vanílico y gálico, así como catequina, quercetina, vainillina y vainillilamina (Figura 3.6).

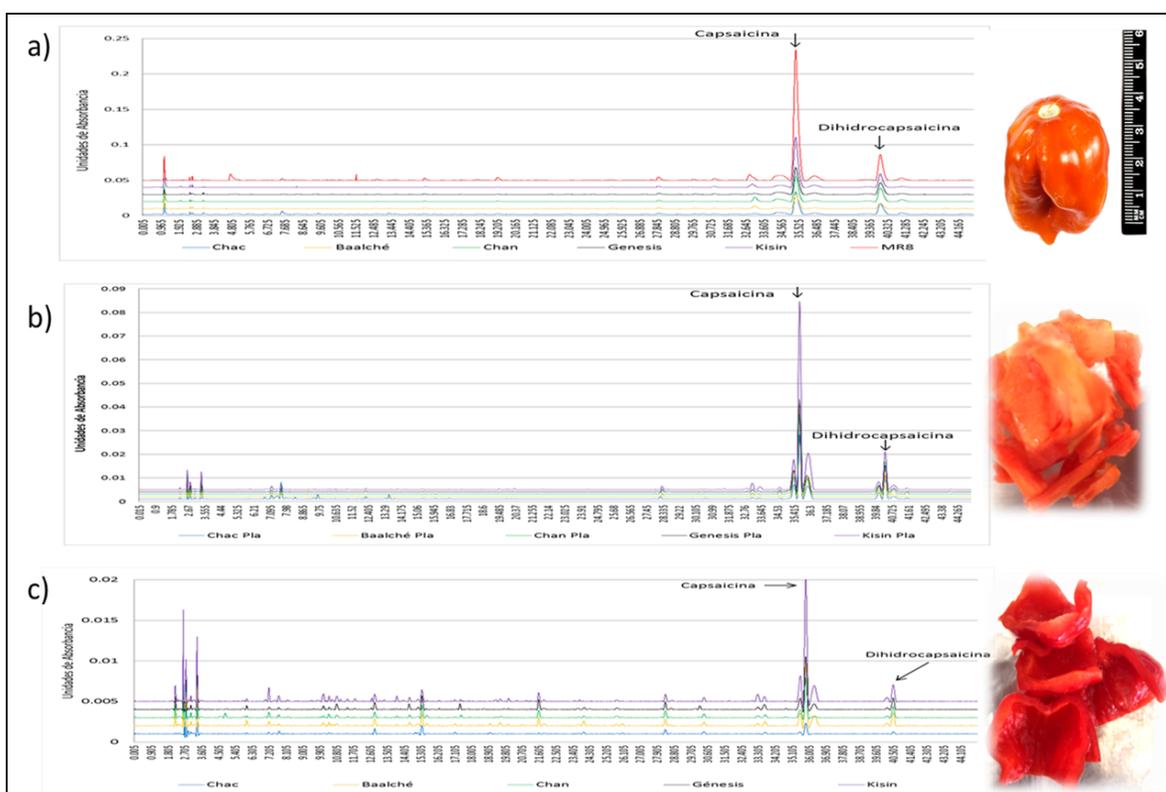


Figura 3.5 a) Perfiles metabólicos de los extractos de fruto completo de las seis variedades analizadas; b) Perfiles metabólicos de los extractos de placenta; y c) Perfiles metabólicos de los extractos de pericarpio.

Se realizó un acercamiento de los primeros 22 minutos de los cromatogramas con base en los tiempos de retención obtenidos para los estándares comerciales (Figura 3.6), exceptuando capsaicina y dihidrocapsaicina (Cuadro 3.2). Los cromatogramas de los extractos de tanto placenta y pericarpio de las variedades Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac indicaron la presencia de vainillilamina y, los

ácidos: cafeico, ferúlico y vanílico en ambos tejidos de todas estas variedades. La abundancia relativa de acuerdo con la intensidad del pico correspondiente a cada metabolito resultó similar en casi todas las variedades, a excepción del ácido ascórbico, el cual tuvo una abundancia relativamente menor en los extractos de placenta y pericarpio de la variedad Mayan Chac (Figura 3.6b y 3.6c).

Los ácidos cafeico y *trans*-cinámico, los cuales son intermediarios tempranos de la síntesis de capsaicinoides (Vázquez-Flota *et al.*, 2007) se encontraron en mayor proporción en los extractos de pericarpio que en los de placenta. Sin embargo, estos compuestos están involucrados en la síntesis de una gran diversidad de derivados fenilpropanoides, algunos de los cuales dan lugar a compuestos aromáticos (Dewick, 2009). Por otro lado, otros intermediarios, como el ácido ferúlico y vainillina, más avanzados en la vía biosintética de capsaicina, fueron principalmente detectados en los perfiles de los extractos de placenta, sitio donde se lleva a cabo este proceso (Figura 3.6b y 3.6c).

Por su parte, la detección de flavonoides en las variedades resultó interesante. La quercetina fue abundante en los pericarpios en la mayoría de las variedades, exceptuando Mayan Chac, donde apenas fue visible (Figura 3.6c). En contraste, esta variedad (Mayan Chac), mostró mayor abundancia de catequina que el resto de las variedades. Sin embargo, a diferencia de la quercetina detectada en pericarpio, la catequina se detectada en los extractos de placenta (Figura 3.6b).

Los compuestos fenólicos que se han encontrado en mayor abundancia en frutos de *C. chinense* son el kaempferol, apigenina, quercetina y catequina (Bae *et al.*, 2012). Entre las variedades analizadas en el presente trabajo se observa que la quercetina (en las variedades Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan y Mayan Ba'alché) y catequina (en la variedad Mayan Chac), corresponden a compuestos fenólicos mayoritarios en comparación con el resto de los metabolitos identificados, incluyendo ácido cafeico, ácido ferúlico, vainillina, ácido vanílico, ácido *trans*-cinámico, ácido *p*-coumárico, y vainillilamina (Figura 3.6b y 3.6c).

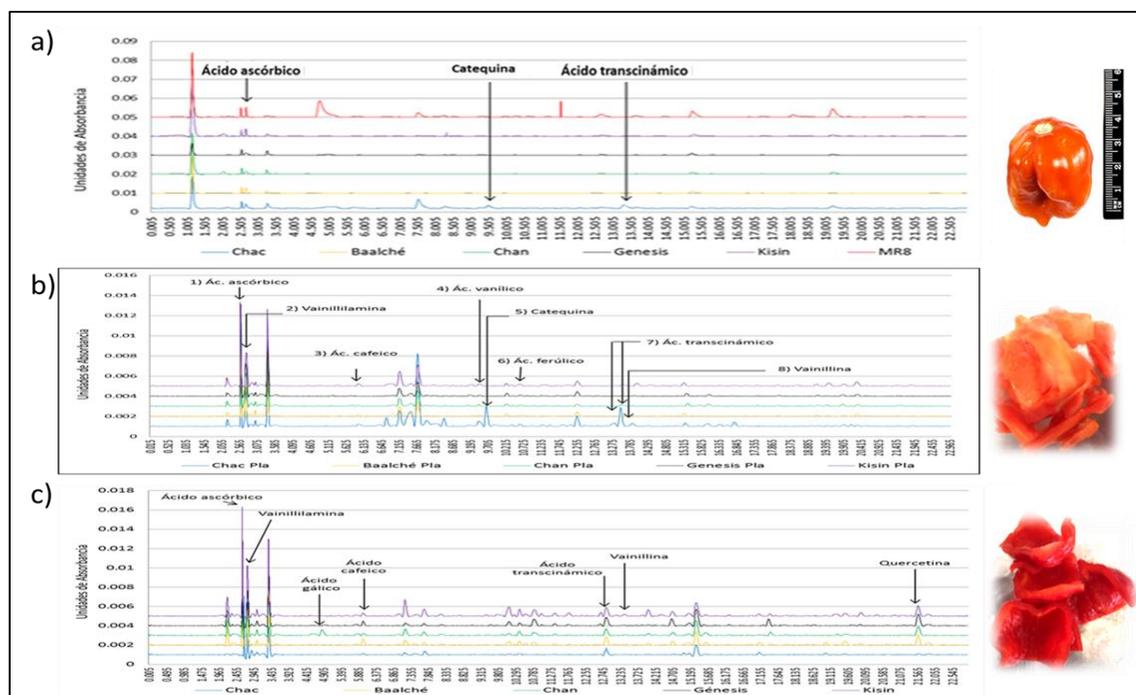
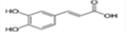
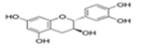
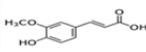
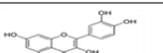
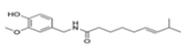
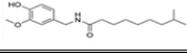


Figura 3.6 Ampliación de los primeros 22 min de los perfiles metabólicos de los extractos de: a) fruto completo; b) placenta; y c) pericarpio de las variedades de *C. chinense* Jacq analizadas.

La comparación de los perfiles de las diferentes variedades reveló, en términos generales muchas similitudes entre ellos (Figura. 3.6). Sin embargo, los metabolitos de placenta mostraron una mayor variación, en comparación con los del pericarpio. Por ejemplo, la cantidad de capsaicinoides en placenta es más de 7 veces mayor a la abundancia relativa de estos en pericarpio (Figura 3.5). Esto, podría relacionarse con la función biológica de estos metabolitos en los diferentes tejidos, ya sea en la defensa y/o protección del fruto. Otro ejemplo son los flavonoides, los cuales se ha reportado que se encuentran principalmente contenidos en las cáscaras de los frutos, en donde pueden prevenir la oxidación de partes internas, como es el caso de las cáscaras de manzana, las cuales son ricas en flavonoides que se infiere evitan la oxidación del almidón del mesocarpio (Solovchenko y Schmitz-Eiberger, 2003). Esto se puede relacionar con la abundancia relativa de quercetina, la cual se detectó en mayor cantidad en el pericarpio de las variedades aquí analizadas (Figura 3.6), y podría estar funcionando de manera similar como protector de la oxidación el fruto.

Por último, se incrementó la sensibilidad del análisis mediante cromatografía de líquidos acoplado a un doble detector másico (HPLC-MS/MS), logrado incluir compuestos presentes en el orden de 1 µg/ml, lo que representa una sensibilidad u orden de magnitud superior al detector UV/visible, el cual es dependiente de la absorción de UV de la estructura del metabolito a evaluar (Wade, 2013). Esto con el fin de confirmar la presencia de los metabolitos identificados en los análisis previos. Para ello, se utilizó el equipo LTO Orbitrap Elite (HPLC-MS/MS) con una columna ZORBAX Eclipse XDB C18. Como sistema de elución se utilizó una mezcla de 0.1% ácido fórmico en agua (A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B) y se empleó un gradiente de 5 a 80 % de B en A los primeros 20 min, a 100% en los siguientes 2 min y de regreso a 5% un minuto después, manteniéndose así por 6 min adicionales (tiempo tota de corrida, 30 min). Se inyectaron 2 µl de los extractos al 1% (10 mg de peso seco/ml). La identificación de los estándares fue a partir de los tiempos de retención y sus patrones de fragmentación, determinado con las energías de colisión presentadas en el cuadro 3.3. Los perfiles metabólicos de las variedades obtenidos por HPLC/MS/MS se muestran en la figura 3.7.

Cuadro 3.3 Características de los metabolitos identificados por HPLC/MS/MS en los extractos de fruto completo de las variedades analizadas

Nombre	Estructura	Tiempo de retención HPLC/MS/MS (min)	Ión molecular (MH ⁻)/ pico base (MH ⁻)	Energía de colisión (V)	Variedad en la que se detectó
Ácido gálico		10.28 ± 0.07	169 / 136	25	Todas
Ácido cafeico		14.16 ± 0.06	179 / 135	26	Todas
Ácido vanílico		14.39 ± 0.06	167 / 123	26	Todas
Catequina		13.05 ± 0.05	289 / 245	25	MR8, Seminis, Mayan Ba'alché y Mayan Chac
Ácido ferúlico		16.15 ± 0.05	193 / 149	27	Todas
Ácido transcinámico		19.81 ± 0.09	147 / 103	26	Todas
Vainillina		16.35 ± 0.06	151 / 135.9	26	Todas
Quercetina		18.64 ± 0.06	301 / 178.9	30	Todas
Capsaicina		24.76 ± 0.05	304 / 168.1	23	Todas
Dihidrocapsaicina		26.24 ± 0.06	306.2 / 170.1	23	Todas

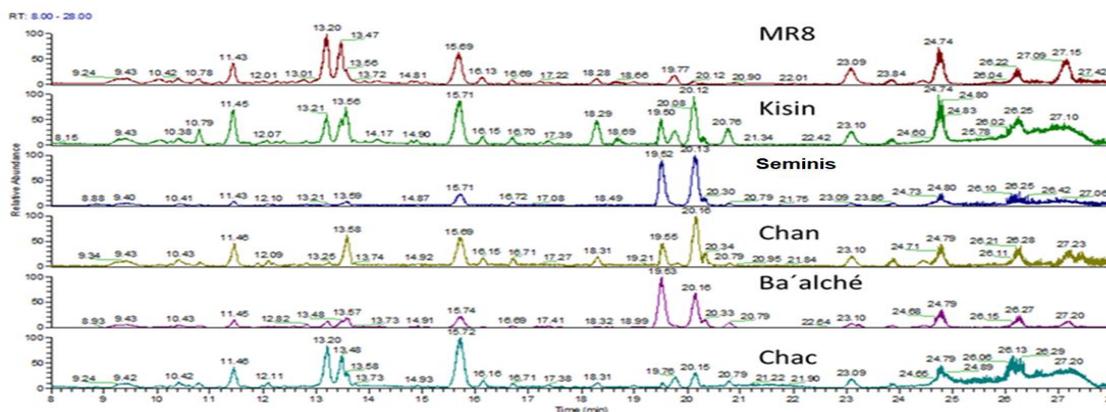


Figura 3.7 Perfiles metabólicos de los extractos de fruto completo de las variedades obtenidos por HPLC/MS/MS.

3.3.3 Análisis quimiométrico de los perfiles metabólicos

Para clasificar las diferentes variedades de acuerdo con la similitud/diferencia de sus perfiles cromatográficos se emplearon los análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) y de componentes principales (PCA). Estos análisis se realizaron para los extractos de frutos completos (Ver apartados 3.2.5 al 3.2.7). Los resultados indican que cuatro variedades; MR8, Mayan Kisin, Seminis y Mayan Chac segregaron individualmente mientras que las variedades Mayan Chan y Mayan Ba'alché coincidieron como un sólo grupo. Sin embargo, MR8 mostró una mayor distancia respecto a los demás grupos, es decir, presenta mayor variación en cuanto a los componentes presentes en su perfil cromatográfico (Figura 3.8b).

Es interesante notar que las variedades seleccionadas en el programa del CICY (Mayan Kisin, Mayan Ba'alché, Mayan Chan y Mayan Chac, Santana-Buzzy 2016), y registradas en el SNICS, con las claves 2374-chi-028-080110/c, 2371-chi-025-080110/c, 2369-chi-023-080110/c y 2368-chi-022-080110/c respectivamente, provienen de recolectas de Chicxulub, Yucatán, mientras que MR8 tiene su origen en Muna, Yucatán (González-Estrada, 2018). Esta última variedad, fue seleccionada por su tolerancia a la infección por virus y se ha depurado siguiendo atributos morfológicos del fruto, como el aspecto trilobular y el color rojo intenso (González-Estrada, 2018). Por otra parte, no se tiene información sobre el origen de la variedad Seminis. Es por ello, que el agrupamiento entre las variedades Mayan Ba'alché y Mayan Chan podría estar altamente relacionado con el origen de sus semillas a partir del mismo sitio de recolecta.

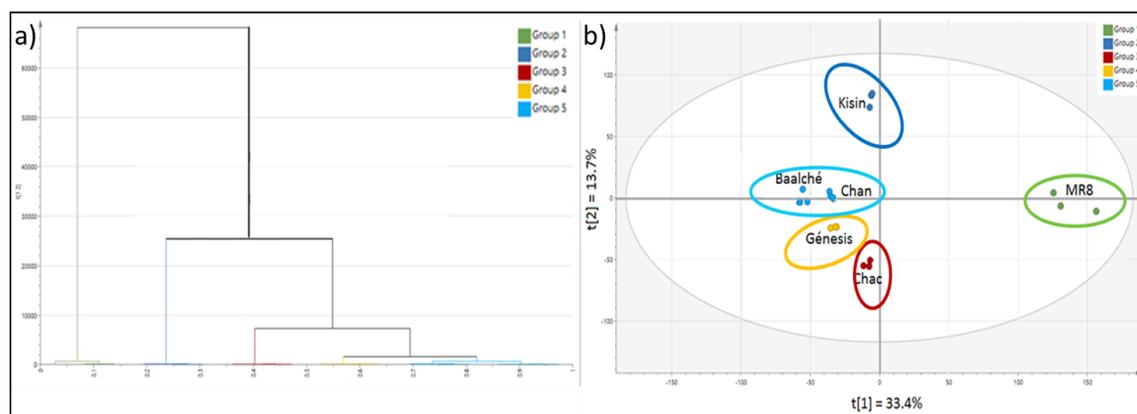


Figura 3.8 Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) y análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles metabólicos de las seis variedades de *C. chinense* Jacq.

El análisis de componentes principales (PCA) es uno de los análisis multivariantes más utilizados en quimiometría para el reconocimiento de patrones donde el principal objetivo radica en la identificación y clasificación de las muestras de acuerdo con sus propiedades. En este estudio, se utilizó el PCA de tres componentes principales, el cual permitió obtener un coeficiente de determinación (reproducibilidad del modelo) de $R^2=0.057$, que resulta medianamente aceptable ($R^2>0.5$). Sin embargo, es recomendable incrementar el número de perfiles analizados de cada variedad y así poder aspirar a obtener un coeficiente de predictibilidad mayor a $Q^2=0.5$.

De acuerdo con el coeficiente de predictibilidad obtenido en este estudio ($Q^2=0.318$), no contamos con la cantidad de perfiles cromatográficos suficientes para mencionar que la probabilidad de que un perfil metabólico (cromatográfico) de un extracto de cualquiera de las variedades, analizado bajo las mismas condiciones, vuelva a agruparse dentro de la variedad adecuada. Por ello, resulta importante incrementar el número de repeticiones biológicas analizadas con el fin de alimentar el modelo con variabilidad intrínseca (entre los perfiles de la misma variedad), así como el establecimiento de tendencias estadísticas (diferencias entre variedades) dentro de la matriz de datos elaborada para la comparación y correcta categorización de los perfiles metabólicos (Gad *et al.*, 2013).

Los metabolitos responsables de la segregación entre los perfiles metabólicos de las variedades son los componentes con Tr entre 35.51 y 35.64 min (Figura 3.9), los cuales originaron la separación de la variedad MR8 del resto de las variedades (Figura 3.8) y con base en su Tr y perfil UV, se trata de algún capsaicinoide o derivado de éstos.

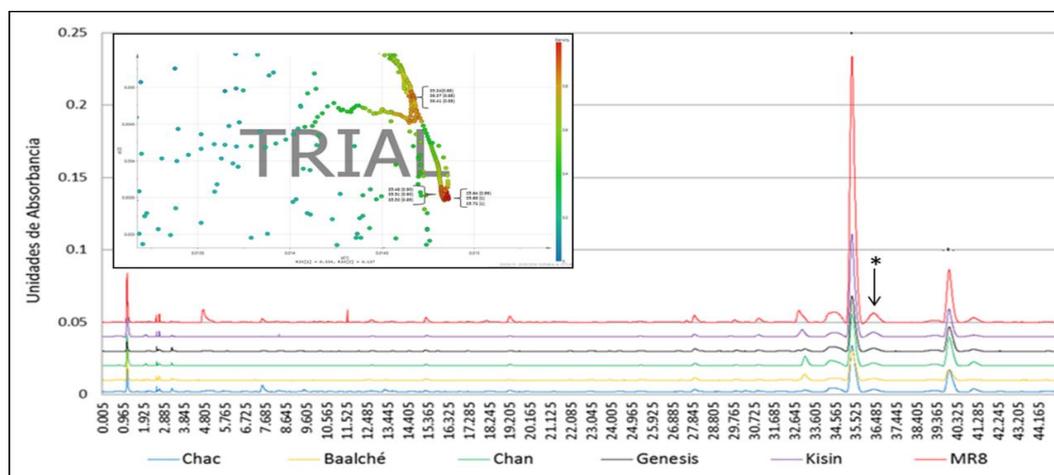


Figura 3.9 LoadingPlot de los perfiles metabólicos de las variedades de *C. chinense*. Se indica la variable responsable de la varianza (Rt 35.51- 35.64).

3.4 CONCLUSIONES

Se identificaron tentativamente 4 compuestos volátiles (ácido pentadecanoico, ácido 9-hexadecenoico, vitamina E y *beta*-sitosterol) con base en la base de datos NIST, presentes en todas las variedades. El *beta*-sitosterol se encontró en proporciones similares en todas las variedades mientras que los demás fueron más abundantes en la variedad MR8.

Se identificaron 12 metabolitos (capsaicina, dihidrocapsaicina, vainillilamina, vainillina, catequina, quercetina y los ácidos: cafeico, *trans*-cinámico, *p*-coumárico, ferúlico, gálico y vanílico) utilizando HPLC-DAD y se confirmó la presencia de éstos en los extractos de las variedades por LC-MS/MS. A excepción de Catequina, ausente en las variedades Mayan Kisin y Mayan Chan, todos los metabolitos identificados fueron detectados en todas las variedades

La comparación de los perfiles metabólicos de las variedades utilizando estadística multivariante indica que la variedad MR8 segrega de las otras cinco variedades basado principalmente en el contenido de CAPs totales. Además, la categorización de las variedades en cinco grupos puede estar relacionada con origen de las plantas seleccionadas de cada variedad.

CAPÍTULO III: REFERENCIAS

- Álvarez-Zapata R.J. (2015). Aplicación de métodos quimiométricos para la detección de metabolitos con actividad leishmanicida en el extracto de la raíz de *Columbrina greggii* var yucatenensis. México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Bae H., Jayaprakasha G.K., Jifon J. & Patil B.S. (2012). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry*, 130, 751-758.
- Brenner, M.L. (1981). Modern methods for plant growth substance analysis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 511–538.
- Dewick P.M. (2009). The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. En *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (156). University of Nottingham, UK.
- Gad H.A, El-Ahmady S.H., Abou-Shoer M.I. & Al-Azizi M.M. (2013). Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: a review. *Phytochemical Analysis*, 24, 1-24.
- Gallon M.E., Monge M., Casoti R. Batista Da Costa F., Semir J. & Gobbo-Neto L. (2018). Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernonieae (Asteraceae). *Phytochemistry*, 150, 93-105.
- Giuffrida D., Dugo P., Torre G., Bignardi C., Cavazza A., Corradini C. & Dugo G. (2014). Evaluation of carotenoid and capsaicinoid contents in poder chili peppers during one year of storage. *Food Research International*.65, 163-170.
- Jiang W., Zhang Z.M., Yun Y.H., Zhan D.J., Zheng Y.B., Liang Y.Z., Yang Z.Y & Yu L. (2013). Comparisons of Five Algorithms for Chromatogram Alignment. *Chromatographia*, 76, 1067–1078.
- Howard A.S., Little J.L., Cleven C.D. (2013). Identifying "Known Unknowns" in Commercial Products by Mass Spectrometry. *LCGS North America*. 31, 114-125.
- Hübschmann H.J. (2015). *Handbook of GC-MS: Fundamentals and applications*. Wiley VCH: Third Edition. 845pp.

- Pino J., González M., Ceballos L., Centurión-Yah A.R., Trujillo-Aguirre J., Latournerie-Moreno L. & Sauri-Duch E. (2007). Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry*, 104, 1682-1686.
- Sharma J., Sharma P., Sharma B. & Chaudhary P. (2017). Estimation of Proximate Composition of Selected Species of Capsicum (*Capsicum annum* and *Capsicum chinense*) Grown in India. *International of Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5, 369-372.
- Kuna A., Sahoo M.R., Sowmya M., Mayengbam P.D., Dasgupta M., Sreedhar M. & Tholemfhuang S. (2018). Nutrient and Antioxidant Properties of Value Added King Chilli (*Capsicum chinense*) Products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 2319-7706.
- Nielsen, N.P.V. (1998). Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography*, 805, 17-35.
- Solovchenko A. & Schmitz-Eiberger M. (2003) Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *Journal of Experimental Botany*. 54, 1977–1984.
- Vázquez-Flota F.A., Miranda-Ham M.L., Monforte-González M., Gutiérrez-Carbajal G., Velázquez-García C. & Nieto-Pelayo Y. (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Fitotecnia Mexicana*, 30, 353-360.
- Wade L.G.Jr. (2013). *Química Orgánica*. Whitman College: PEARSON.
- Zhang Z.M., Chen S. & Liang Y.Z. (2010). Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst*, 135, 1138-1146.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS VARIEDADES DE *C. chinense* Jacq.

4.1 INTRODUCCIÓN

Para 1912 ya se conocía que la capsaicina es el principal componente responsable del picor característico de los frutos del género *Capsicum*. Sin embargo, los métodos analíticos desarrollados para esa época no eran lo suficientemente precisos para cuantificarla. Fue así como el químico-farmacólogo Wilbur L. Scoville propuso un método de cuantificación indirecta a través del uso de una prueba organoléptica basada en la cuantificación de la concentración de azúcar necesaria para inhibir la sensación de calor característica de extractos etanólicos de *Capsicum* en un grupo de cinco personas (Scoville, 1912).

La prueba organoléptica de Scoville se continúa utilizándose para el establecimiento de las unidades de picor, las cuales son nombradas unidades de calor de Scoville (SHU, por sus siglas en inglés). Sin embargo, hoy en día existen métodos de evaluación sensorial que tienen como objetivo la medición y evaluación de determinadas propiedades de los alimentos, a través de uno o más de los sentidos humanos (Figura 4.1) (Tilgner, 1971).

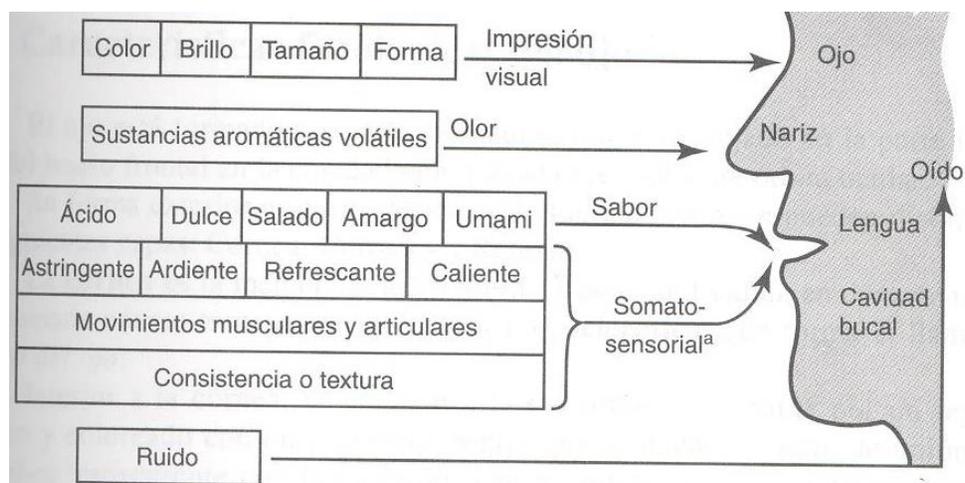


Figura 4.1. Sensograma. Herramienta utilizada para el análisis sensorial a un alimento (Tomado de Tilgner, 1971).

Un análisis sensorial se realiza mediante pruebas basadas en una serie de procedimientos concordantes con objetivos perfectamente definidos. Una de las principales aplicaciones del análisis sensorial son los estudios de aceptabilidad, donde se evalúa principalmente la aceptación de los alimentos por parte de los consumidores. Desde este punto de vista es una importante herramienta en el desarrollo de nuevos productos (Lawless & Heymann, 1998).

De manera general, los análisis sensoriales se pueden clasificar en tres tipos:

1. Afectivos
2. Discriminativos
3. Descriptivos

En las pruebas afectivas y discriminativas, el evaluador o juez debe realizar una comparación directa entre los productos evaluados (Watts *et al.*, 2013). Por ejemplo, **A** me gusta más que **B**, o **A** vale +3 y **B** -1. Es decir, califica de manera numéricas y directa el producto de acuerdo con su percepción y preferencia. Sin embargo, en las pruebas descriptivas se pueden utilizar escalas que contienen intervalos intermedios definidos, donde el juez debe elegir uno para cada muestra y dicho intervalo puede repetirse entre dos o más productos evaluados (Meilgaard *et al.*, 1999). Un ejemplo de esto es precisamente el uso de escalas para evaluación de pungencia.

Con base en lo anterior, se preparó una prueba descriptiva de calificación por medio de escalas de intervalo para realizar el análisis sensorial de los frutos de las variedades de *C. chinense*. Donde además de evaluar la pungencia de los frutos, se consideraron otras propiedades organolépticas como el olor, sabor, color y la aceptación general de los jueces consumidores.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas se realizaron con salsas preparadas con 100 g de fruto fresco, 200 ml de agua y 3 g de sal. Las salsas de cada variedad fueron repartidas en seis contenedores tipo pocillo (Figura 4.2 derecha). Las evaluaciones se llevaron a cabo en el laboratorio de análisis sensorial de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), bajo la supervisión de la Dra. Maira Segura Campos.

La evaluación contó con dos etapas: La primera consistió en conocer si la persona a actuar como evaluador era consumidor habitual de chile habanero. Para ello se le realizaron tres preguntas básicas:

1.- ¿Consume chile habanero?

Si o No

2.- ¿Con qué frecuencia consume chile habanero?

1-2 veces por semana, 2-3 veces por semana, 4-5 veces por semana o Todos los días

3.- ¿En qué presentación consume regularmente chile habanero?

Fruto, Salsa casera o Salsa comercial.

La segunda etapa consistió en colocar a la persona en el panel de evaluación, frente contenedores con salsas de cada variedad, un vaso con agua, una paleta de agradecimiento, la hoja de evaluación y lápiz (Figura 4.2).



Figura 4.2. Panel de jueces realizando la evaluación sensorial de las variedades de *C. chinense* Jacq.

El análisis sensorial consistió en un panel de 30 jueces a los cuales se les pidió que calificaran utilizando una prueba de ordenamiento descriptivo para el picor, color, olor, sabor y aceptación general de la salsa preparada de cada variedad. Para ello, se le solicitó que marcaran la opción que mejor representara su opinión sobre cada salsa a evaluar. Cada variedad contó con un código aleatorio de 3 dígitos para su evaluación. A continuación, se presenta la hoja de evaluación proporcionada a los jueces:

Muestra: _____

Atributo/Escala	Me disgusta mucho	Me disgusta	Ni me gusta ni me disgusta	Me gusta	Me gusta mucho
Color					
Olor					
Sabor					
Aceptación general					
	Sin picor	Poco picor	Picante	Muy picante	Extremadamente picante
Picor					

Los valores fueron traducidos a una matriz numérica siguiendo la siguiente conversión:

<p>Me disgusta mucho = 1 Me disgusta = 2 Ni me gusta ni me disgusta = 3 Me gusta = 4 Me gusta mucho = 5</p>

<p>Sin picor = 1 Poco picor = 2 Picante = 3 Muy picante = 4 Extremadamente picante = 5</p>

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación sensorial se realizó para conocer si existían diferencia en la percepción de picor que provoca cada una de las variedades y observar así una posible correlación de los datos analíticos de la cuantificación de capsaicinoides con la percepción de picor detectada por los evaluadores. Se obtuvo el promedio de los resultados del análisis de la percepción de picor a través de la conversión de los datos cualitativos a una matriz de datos cuantitativos para poder realizar una comparación numérica de los resultados, donde se puede destacar que en general se distinguieron con base en su picor, donde la variedad MR8 fue la variedad con mayor picor reportada por los jueces (3.7 ± 0.87) y la variedad Mayan Chac fue la categorizada como menos picosa (2.4 ± 0.93) (Figura 4.3).

En la figura 4.4 se puede presenta el análisis de frecuencias de respuestas, el cual tiene como finalidad presentar el porcentaje de evaluadores que clasificaron a cada variedad dentro de cada categoría enmarcada en la prueba de ordenamiento descriptivo (sin picor, poco picor, picante, muy picante, extremadamente picante). Se aprecia que la variedad MR8 fue catalogada como muy picante por más del 45% de los evaluadores y no hubo ningún juez (0%) que clasificara a MR8 como “sin picor”; mientras que para la variedad Mayan Chac más del 15% de los evaluadores respondieron que no detectaban picor en esta variedad y ningún juez calificó a esta variedad como “extremadamente picante” (Figuras 4.4).

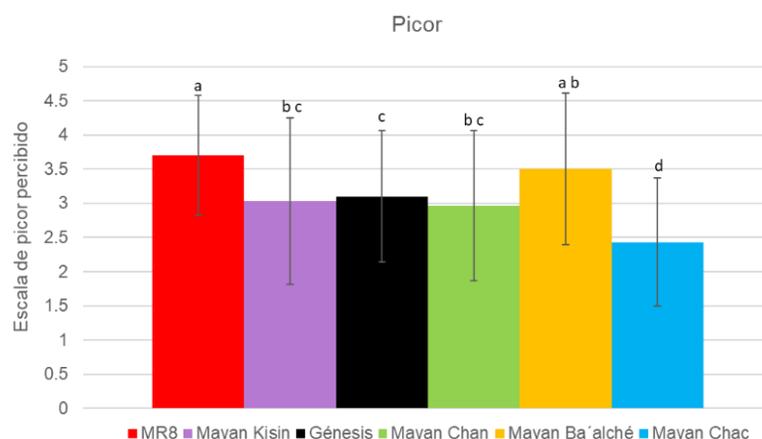


Figura 4.3 Evaluación sensorial de picor de las variedades de *C. chinense* Jacq. Se muestra el promedio 30 repeticiones y desviación estándar.

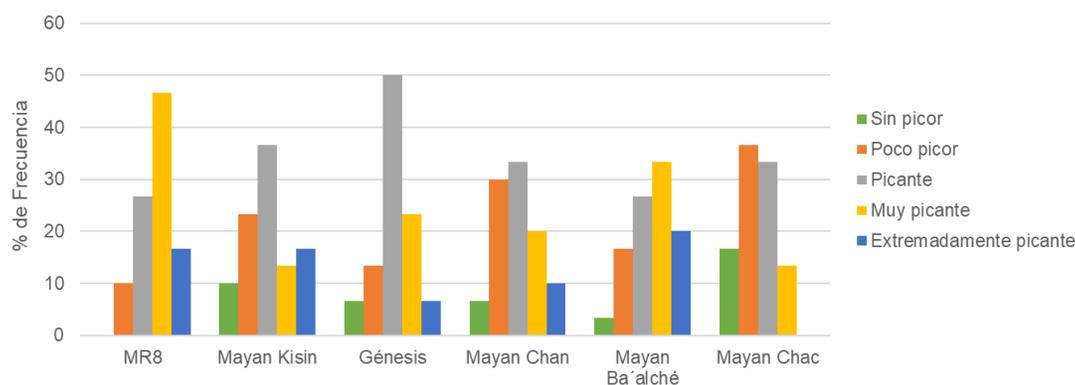


Figura 4.4. Análisis de frecuencias de la percepción de picor de las variedades. Se muestran los porcentajes de respuesta de 30 evaluadores para clasificar cada variedad en las categorías: sin picor, poco picor, picante, muy picante o extremadamente picante.

Se realizó un análisis de correlación entre el promedio del contenido de capsaicinoides obtenido en el Capítulo II para cada variedad y el picor obtenido del análisis sensorial encontrando una relación directa entre ambos parámetros ($r=0.8956$). (Figura 4.5). Esto era de esperarse puesto que ya se conoce que los capsaicinoides son los responsables directos de la percepción de picor distintiva de los frutos de *C. chinense* (Scoville, 1912 & Sganzerla *et al.*, 2014). Además, cabe resaltar que en comparación con lo reportado por Kyung-Hyun y colaboradores, quienes realizaron un análisis sensorial de chiles koreanos utilizando un panel de jueces previamente entrenados. Ellos obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson (r) entre 0.84 y 0.93. En este estudio se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson (r) de 0.8956 ($R^2=0.8020$ y $p=0.0158$) a pesar de que el panel de jueces no había recibido un entrenamiento previo, el criterio de selección a través de las preguntas iniciales sobre el consumo habitual de chile habanero resultó eficiente.

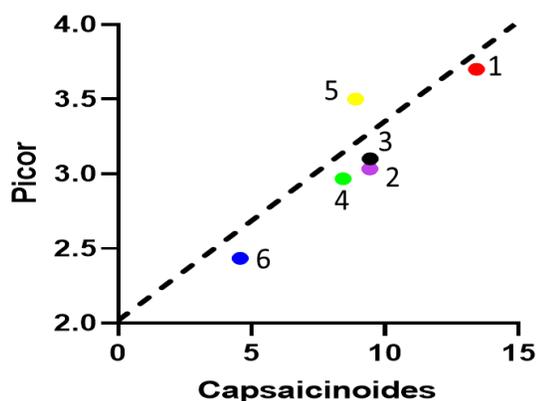


Figura 4.5 Análisis de correlación entre el contenido de capsaicinoides obtenido por HPLC-DAD y la percepción de picor obtenida a través del análisis sensorial con evaluadores ($R^2=0.8020$; $p=0.0158$). Los números corresponden a las variedades: 1=MR8, 2=Mayan Kisin, 3=Seminis, 4=Mayan Chan, 5=Mayan Ba'alché y 6=Mayan Chac.

Además, la evaluación sensorial de sabor, olor y color permitió conocer que no existe diferencia en cuanto a la aceptación por parte de los consumidores para estas características, teniendo en general una buena aceptación ya que las seis variedades fueron evaluadas de manera similar. La única diferencia significativa mencionada por los consumidores se encontró relacionada al olor entre las variedades MR8, la cual presentó mayor preferencia por parte de los consumidores; y la variedad Mayan Chac, la cual fue la que menos cautivó el olfato de los evaluadores (Figura 4.6).

El aroma de los frutos de *Capsicum* se ha reportado principalmente relacionado con la presencia de ésteres de bajo peso molecular, fenoles, aldehídos, furanos y otros compuestos volátiles (Muñoz *et al.*, 1992). Por lo que se realizó un análisis de correlación entre los fenoles totales (cuantificados en el Capítulo II) y el análisis sensorial de olor. Sin embargo, no se encontró una relación significativa entre los parámetros analizados (Figura 4.7).

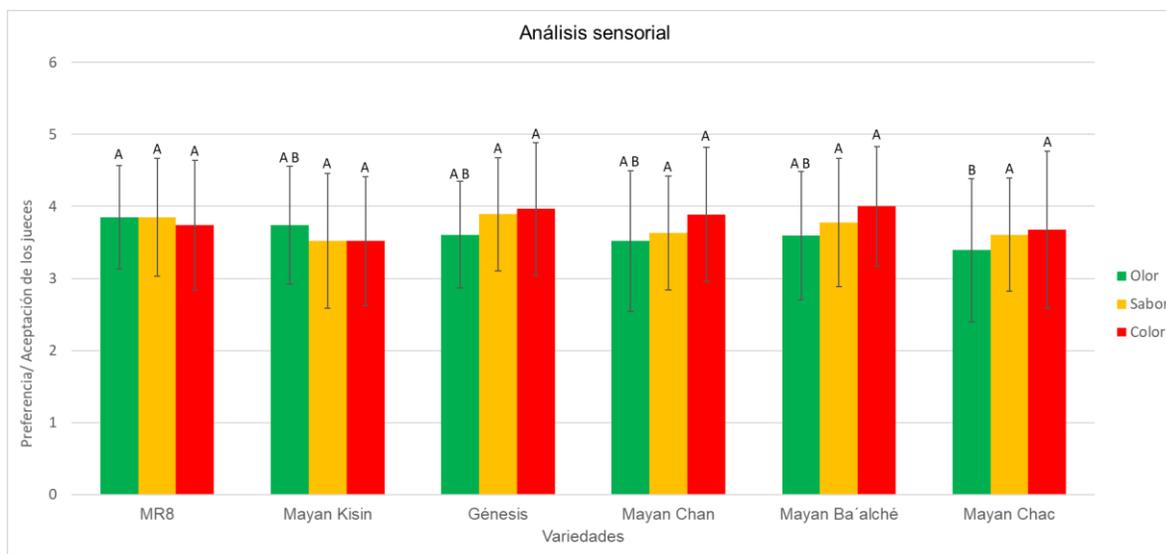


Figura 4.6 Evaluación sensorial de olor, sabor y color de las variedades. Se obtuvo la media y desviación estándar de la percepción de 30 jueces. Letras iguales indican que no hay diferencia entre las muestras en cuanto a la característica evaluada.

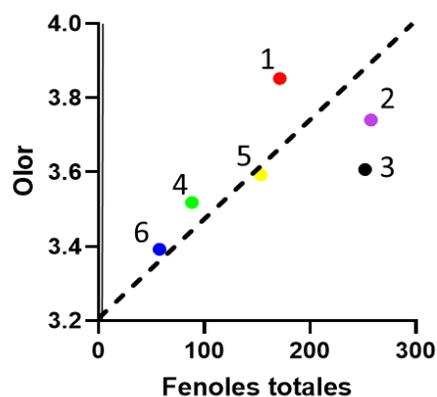


Figura 4.7 Análisis de correlación entre el contenido de fenoles totales y el análisis sensorial del olor de las variedades ($r = 0.4385$ y $p = 0.1519$). Cada número representa una variedad: 1=MR8, 2=Mayan Kisin, 3=Seminis, 4=Mayan Chan, 5=Mayan Ba'alché y 6=Mayan Chac.

Se puede destacar que la variedad MR8 resulta interesante debido a que a pesar de no contener mayor contenido de fenoles totales que la variedad Mayan Kisin y Seminis, su aroma resultó más atractivo para los evaluadores. Por ello, se analizó el perfil cromatográfico de compuestos volátiles (CG-MS; Capítulo III) de las variedades con el fin de evaluar si existe diferencia entre el número, o la abundancia relativa, poniendo particular atención en las variedades MR8 y Mayan Chac, y se logró identificar la

diferencia entre la abundancia relativa de los compuestos volátiles entre dichas variedades (Figura 4.8).

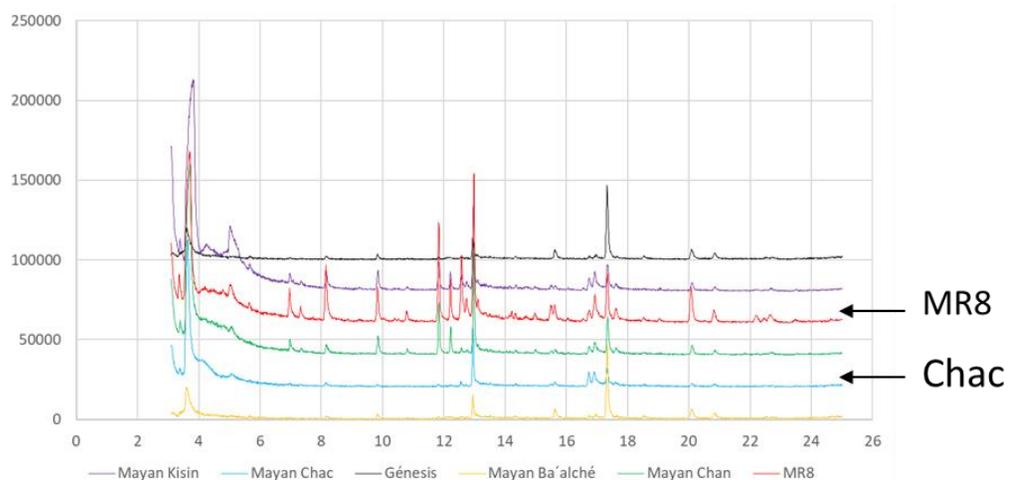


Figura 4.8 Perfiles de compuestos volátiles de las variedades.

En la figura 8 se puede apreciar la diferencia entre los perfiles obtenidos por cromatografía de gases, donde MR8 presenta mayor cantidad de compuestos volátiles que el resto de las variedades y Mayan Chac por su parte, tienen menor diversidad y cantidad de éstos. Esto puede relacionarse con lo reportado por Martín y colaboradores (2017), quienes mencionan que un mayor número de componentes volátiles en lotes de paprika resultan en mejor aceptación por parte de los consumidores (Martín *et al.*, 2017).

CAPÍTULO IV: REFERENCIAS

- Kyung-Hyung K., Kyung-A L. & Jae-Bok P. (2012). Physicochemical Properties and Sensory Evaluation for the Heat Level (Hot Taste) of Korean Red Pepper Powder. *Prev Nutr Food Sci*, 17, 29-35.
- Lawless, H. T. & Heymann, H. (1998). *Sensory evaluation of food*. New York: Chapman & Hall. International Thomson Publishing.
- Martín A., Hernández A., Aranda E., Casquete R., Velázquez R., Bartolomé T. & Córdoba M.G. (2017). Impact of volatile composition on the sensorial attributes of dried paprikas. *Food Research International*, 100, 691-697.
- Meilgaard, M., Civille, G. V. & Carr B. T. (1999). *Sensory Evaluation Techniques*. (3rd edition). Boca Raton. Florida: CRC Press.
- Muñoz, A. M., Civille G.V. & Carr, B. T. (1992). *Sensory evaluation in quality control*. New York: Van Nostrand Reinhold
- Watts B.M., Ylimaki G.L., Jeffery L.E. & Elías L.G. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. International Development Research Centre (Canada) 170 pp.

CAPÍTULO V

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

La cuantificación de capsaicinoides y fenoles totales de las seis variedades analizadas en este estudio (MR8, Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan, Mayan Ba'alché y Mayan Chac) permitió encontrar diferencias significativas entre las variedades. La variedad MR8 presentó mayor cantidad de ambos tipos de metabolitos, las variedades Mayan Kisin, Seminis, Mayan Chan y Mayan Ba'alché presentaron contenidos similares tanto de capsaicinoides como de fenoles totales entre ellas, mientras que la variedad Mayan Chac presentó el menor contenido de estos metabolitos. Sin embargo, esta variedad presentó el mayor contenido de carotenoides (pigmentos), lo cual puede ser un referente característico de esta variedad (Capítulo II). Además, se observó que el contenido de capsaicinoides puede cambiar de acuerdo con diferentes factores externos al genotipo de la planta. En este caso, se encontraron diferencias en los contenidos de capsaicinoides de las variedades al evaluar frutos recolectados en marzo-abril, temporada de baja humedad, y compararlas con frutos recolectados en septiembre-octubre, cuando la humedad atmosférica es mayor. Debido a que las plantas se mantuvieron en invernadero, se considera que la humedad atmosférica pudo haber sido el factor con mayor variación entre las dos recolectas.

De acuerdo con lo descrito por Jeeatid y colaboradores (2018), diferentes genotipos de *C. chinense* pueden responder de distinta manera a las condiciones ambientales (Jeeatid *et al.*, 2018). Esto puede explicar porque no todas las variedades se vieron afectadas de manera similar ante la diferencia en la humedad atmosférica entre estaciones. Sin embargo, cabe mencionar que la variedad MR8 no presentó diferencia significativa en su contenido promedio de capsaicinoides en las dos fechas analizadas, sugiriendo que esta variedad presenta mayor homogeneidad en su contenido fitoquímico independientemente del cambio en las condiciones atmosféricas. Entre los factores ambientales y/o de cultivo que afectan la acumulación y/o síntesis de los capsaicinoides se encuentran la temperatura, el estrés hídrico, la disponibilidad de nutrientes en el sustrato y la cantidad e intensidad de luz (Jeeatid *et al.* 2018, Pérez-Ambrosio *et al.* 2018, Topuz *et al.* 2011).

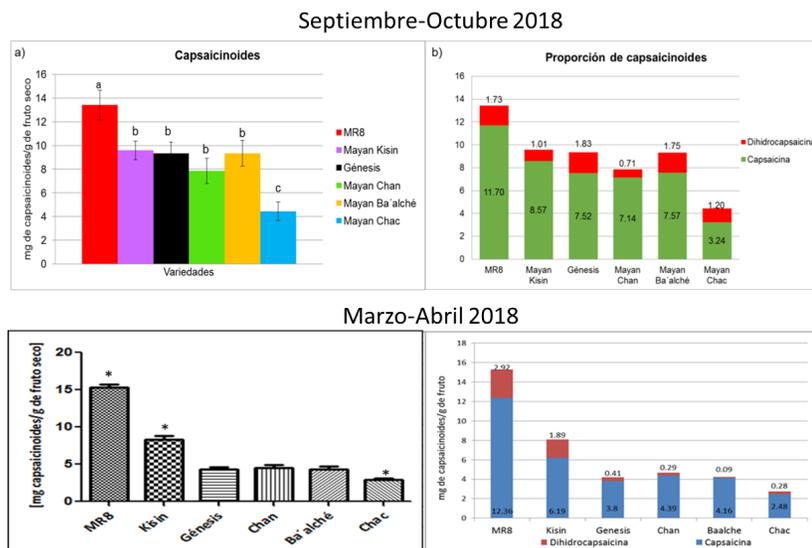


Figura 5.1 Contenido y proporción de capsaicinoides en las variedades de *C. chinense* recolectadas en marzo-abril y septiembre-octubre del 2018. Se grafican los promedios con desviación estándar de tres repeticiones.

Además de capsaicinoides, el chile habanero es una fuente rica en metabolitos bioactivos, es decir, metabolitos que pueden ejercer algún beneficio, e incluso han sido propuestos como una alternativa de alimento funcional para la obtención de antioxidantes (Segura-campos *et al.*, 2013 & Baenas *et al.*, 2019). Con base en ello, se evaluó la actividad antioxidante de los extractos de chile habanero utilizando el método de reducción del radical DPPH (Capítulo II). Los resultados indican que la actividad antioxidante, en el método analizado, está directamente relacionado con el contenido de capsaicinoides. Lo cual contrasta un poco con lo reportado por Menichini y colaboradores (2009). Ellos mencionan que la concentración de fenoles totales está directamente relacionada con la actividad antioxidante en el modelo de DPPH (Menichini *et al.*, 2009). Sin embargo, la cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante no presentaron correlación en los datos obtenidos a partir de las variedades de chile habanero analizadas (Capítulo II).

Además, la cuantificación de fenoles totales no es suficiente para caracterizar el contenido fitoquímico de las variedades, ya que representa un grupo de metabolitos muy variado estructural y funcionalmente. Por ejemplo, se ha reportado que entre los compuestos fenólicos existe diferencia en cuanto a su capacidad antioxidante dependiendo su estructura. Tal es el caso de la diferencia en la actividad antioxidante entre catequina y

quercetina, las cuales a pesar de poseer una estructura similar en cuanto a la cantidad de grupos hidroxilo y las posiciones de éstos. Quercetina posee un carbonilo en el anillo C, el cual origina que la capacidad antioxidante de ésta sea al doble que la de catequina (Figura 5.2; Rice-Evans *et al.* 1996).

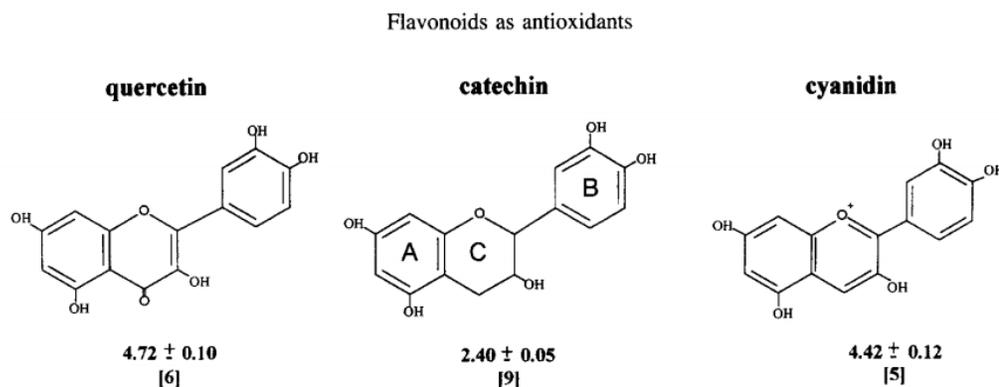


Figura 5.2 Comparación “estructura-actividad antioxidante” de estructuras 3,5,7,3',4'-pentahidroxifenólicas (Tomada de Rice-Evans *et al.*, 1996).

Con base en esto, resulta importante conocer no únicamente el contenido de fenoles totales, sino poder diferenciar entre los fenoles presentes en los frutos de las variedades, y así poder evaluar si existe variación en cuanto a la presencia de metabolitos específicos. Para ello, se llevó a cabo la identificación de los principales capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina), de moléculas intermediarias en la síntesis de éstos (vainillilamina, vainillina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *trans*-cinámico, ácido *p*-cummárico) y de otros metabolitos previamente reportados en frutos de *Capsicum* o relacionados estructuralmente (catequina, quercetina, ácido gálico, ácido ascórbico y ácido vanílico) (Capítulo III: Figura 3.6).

Se identificaron 12 metabolitos (capsaicina, dihidrocapsaicina, vainillilamina, vainillina, catequina, quercetina y los ácidos: cafeico, *trans*-cinámico, *p*-cummárico, ferúlico, gálico y vanílico). A excepción de Catequina, la cual no fue detectada en las variedades Mayan Kisin y Mayan Chan, todos los metabolitos identificados fueron detectados en todas las variedades (Capítulo III: Cuadro 3.3). Hay diferentes trabajos que realizan la identificación de uno o dos compuestos fenólicos con el objetivo de relacionar la abundancia de estos con la actividad antioxidante de los frutos y/o sus derivados en *C. chinense*. Un ejemplo de ello es el estudio descriptivo de Mena y colaboradores, quienes realizaron la

cuantificación de capsaicina, alfa y betacaroteno y ácido ascórbico para 16 genotipos de la variedad Bhut Jolokia encontrando que diferentes genotipos presentaron el mayor contenido en cada cuantificación, es decir, un genotipo presentó el mayor contenido de capsaicinoides, otro genotipo el mayor contenido de alfa-caroteno, un tercer genotipo presentó la mayor cantidad de betacaroteno y un cuarto genotipo presentó los niveles más altos de ácido ascórbico, lo cual mencionan puede estar relacionado a la diversidad e identidad de cada variedad (Mena *et al.*, 2018). Esto resulta interesante al observar que la variedad MR8 presentó un contenido de capsaicinoides mayor que el resto de las variedades (Capítulo II: Figura 2.5), mientras que las variedades Mayan Kisin y Seminis presentaron niveles de fenoles totales por encima del resto de las variedades (Capítulo II: Figura 2.7). Y, por último, la cuantificación relativa de carotenoides indicó que la variedad Mayan Chac es la que mayor acumulación de estos metabolitos contiene (Capítulo II: Figura 2.4).

Es interesante como el contenido de capsaicinoides, fenoles totales y carotenoides otorgan a las variedades analizadas cierta identidad que ayuda a diferenciarlas entre el resto de las variedades. Además, hoy en día existe la quimiometría, la cual es una rama de la química analítica que permite clasificar y/o identificar muestras de acuerdo con sus propiedades químicas (Gallon *et al.*, 2018).

La quimiometría utiliza estadística multivariante para determinar la similitud/diferencia entre dos o más muestras analizadas. Se realizó comparación de los perfiles metabólicos de las variedades observando que la categorización de las variedades en 5 grupos se puede relacionar con lo observado a través de la cuantificación de capsaicinoides, fenoles totales y carotenoides, puesto que, por un lado, la variedad MR8 segrega de las otras cinco variedades basado principalmente en el contenido de CAPs totales; las variedades Mayan Kisin, Seminis y Mayan Chac se mantuvieron como grupos independientes, y, por último, las variedades Mayan Chan y Mayan Ba'alché se unieron en un solo grupo, lo cual también podría estar relacionado al origen geográfico de selección de las variedades, puesto que ambas variedades fueron obtenidas a partir de plantas seleccionadas en Chicxulub, Yucatán (Capítulo II: Figura 3.8).

El análisis sensorial de las variedades permitió comparar los datos analíticos con la percepción de los jueces respecto al picor y olor de las variedades. De acuerdo con

Caterina y colaboradores (1997), la sensación de picor originada por los chiles se define como una sensación de ligero dolor acompañada con un incremento en la temperatura, esto se debe a que los capsaicinoides pueden unirse a nociceptores (receptores de dolor) TRPV1 (Transient Receptor Potential Cation Channel) situados en mayor proporción en el nervio trigémino. Los TRPV1 son canales catiónicos capaces de transmitir la señal directamente al sistema nervioso central (Caterina et al., 1997). Sin embargo, los receptores TRPV1 no son específicos para los capsaicinoides y pueden generar una reacción sinérgica cuando el estímulo se encuentra acompañado de otros factores como calor, alta concentración de iones hidronio (pH ácido) o grasas (Figura 5.3; Anand & Bley, 2011).

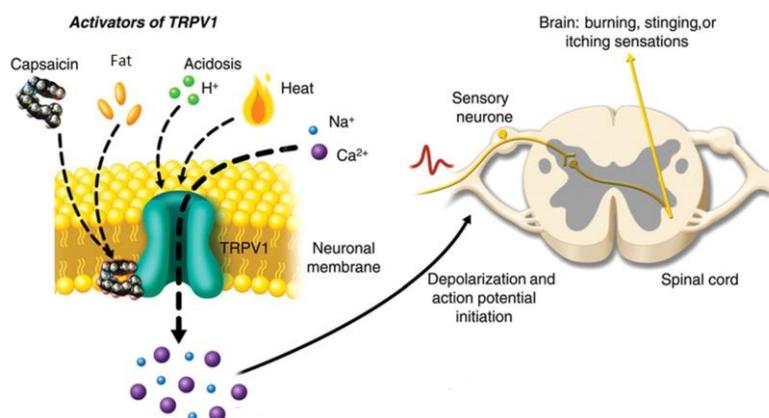


Figura 5.3. Receptor de capsaicina en células de nervio trigémino (Modificado de Anand & Bley 2011).

El análisis sensorial propuesto en este trabajo evitó colocar variables que pudieran afectar la percepción de picor de manera externa a la variedad a evaluar. Sin embargo, el análisis de componentes volátiles (Capítulo III: Figura 3.4) indica que la variedad MR8, la cual a su vez fue la variedad clasificada con mayor picor entre los evaluadores, presenta mayor abundancia relativa de ácidos grasos (ácido pentadecanoico y ácido 9-Hexadecenoico) (Capítulo III: Figura 3.4), los cuales sumados al alto contenido de capsaicinoides característico de la variedad (Capítulo II: Figura 2.5), explican por qué el 100% de los evaluadores identificaran a esta variedad como “picante”, “muy picante” o “extremadamente picante”. Caso contrario a lo observado para la variedad Chac, la cual carece de diversidad y abundancia de compuestos volátiles (Capítulo II: Figura 2.5) y fue clasificada como “sin picor” por el 17% de los evaluadores (Capítulo IV: Figura 4.4).

En relación con otras características sensoriales evaluadas, el olor fue el único parámetro que presentó diferencia significativa. Una vez más las variedades MR8 y Mayan Chac resultaron ser diferentes. Y, a pesar de que se consideró que los compuestos fenólicos podrían influir sobre el aroma de los frutos, no se encontró relación entre el contenido de fenoles totales y la preferencia de los jueces sobre el aroma de las variedades (Capítulo IV: Figura 4.7). Sin embargo, si se observa una relación directa entre mayor abundancia de componentes volátiles y la preferencia de los consumidores entre estas variedades (Capítulo IV: Figura 4.8). Esto es comparable con el estudio de la evaluación sensorial y caracterización de componentes volátiles reportado por Martín y colaboradores. Quienes realizaron la identificación tentativa de más de 50 componentes volátiles en paprikas (fruto seco y pulverizado generalmente de *Capsicum annuum*) secadas utilizando tres procedimientos diferentes: 1) a través de horno, 2) asoleadas y 3) ahumadas en fuego de roble. Posteriormente, realizaron la compararon del análisis sensorial y el contenido de compuestos volátiles encontrando que las paprikas ahumadas resultaron tener mejor aceptación por el panel de evaluadores, seguido de las paprikas secadas en horno, quienes fueron distinguidas por presentar mayor aroma frutal (aroma al fruto fresco). Por otra parte, la paprika secada al a sol resultó ser la que menos aceptación tuvo por parte de los consumidores, los cuales mencionaron que presentaba un aroma a paja. Por último, realizaron un análisis de componentes principales para relacionar los datos obtenidos a través del análisis sensorial y la caracterización de compuestos volátiles reportando una relación directa. Sin embargo, el incremento en los componentes volátiles encontrado en la paprika ahumada puede estar relacionada a su interacción con los componentes volátiles y/o productos de degradación de metabolitos presentes en la madera de roble (Figura 5.4).

En general, las variedades presentaron similitud en cuanto a los metabolitos presentes en ellas, diferenciándose principalmente en la abundancia de éstos en cada variedad. Además, la comparación de la EC50 obtenida de los extractos de las variedades de *C. chinense* analizadas en este trabajo están por debajo de las reportadas para extractos de plantas reconocidas por su gran actividad antioxidante. Tal es el caso de los extractos de orégano, menta, mostaza, laurel, jengibre, hinojo y bálsamo de limón reportados por Fernández y colaboradores, quienes realizaron el análisis de fenoles totales y la evaluación de actividad antioxidante de 13 extractos de plantas reconocidos por su capacidad antioxidante, y remarcan que la mejor actividad correspondió al extracto de

hinojo con una EC50 de 0.50 g EqT/100 g de peso seco (Fernández *et al.*, 2016) (equivalente a 5000µg/g de peso seco). Lo cual nos permite reiterar lo antes mencionado por Segura-Campos y colaboradores (Segura-Campos *et al.*, 2013) sobre la excelente alternativa que el chile habanero de la Península de Yucatán representa no únicamente como sazónador o condimento de alimentos, sino como un alimento que contiene metabolitos bioactivos (ácido ascórbico, catequina, quercetina, ácido cafeico) que pueden generar un beneficio adicional a la nutrición por su consumo habitual.

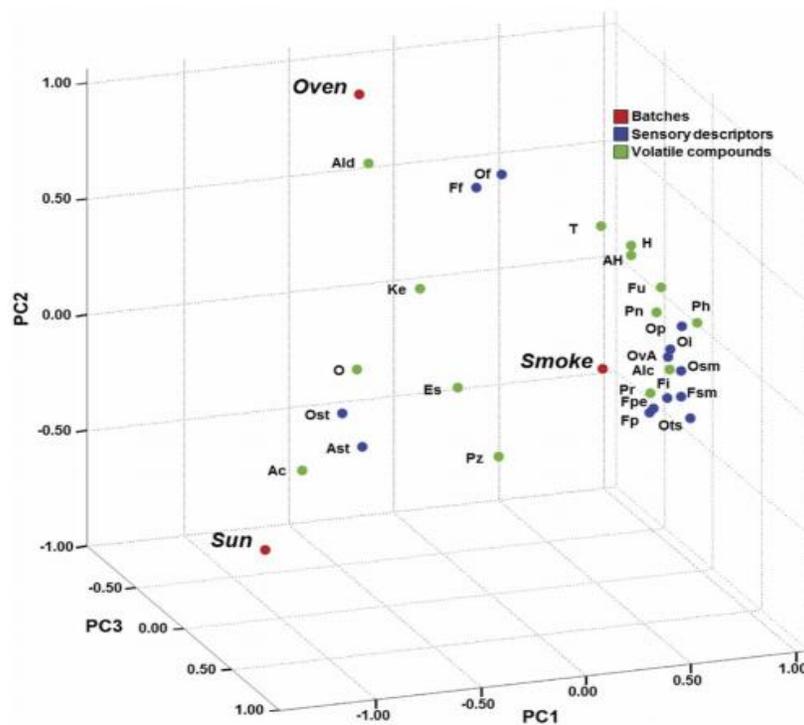


Figura 5.4 PCA de lotes de paprika secadas a través de tres métodos: horno, bajo el sol y ahumado (Tomada de Martín *et al.*, 2017).

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

La actividad antioxidante mostró una relación significativa ($p > 0.05$) con el contenido de capsaicinoides totales. La mayor AO se encontró en la variedad MR8 mientras que la menor ocurrió en la variedad Mayan Chac, lo cual se relaciona directamente con sus contenidos de capsaicinoides. El contenido de fenoles no mostró relación significativa con la AO.

El contenido de capsaicinoides mostró una tendencia constante entre las diferentes variedades independientemente de la cantidad obtenida en diferentes estaciones.

Se identificaron 16 metabolitos distribuidos en las seis variedades. 12 de ellos fueron identificados por LC y 4 por CG-MS.

La comparación de los perfiles metabólicos de las variedades utilizando estadística multivariante indica que la variedad MR8 segrega de las otras cinco variedades basado principalmente en el contenido de capsaicinoides. Por otra parte, la cuantificación de carotenoides totales indica que la variedad Mayan Chac se caracteriza por presentar mayor proporción de estos metabolitos, contrario con lo observado para el contenido de capsaicinoides y compuestos fenólicos.

Las seis variedades fueron aceptadas satisfactoriamente por los consumidores, quienes distinguieron de acuerdo con su percepción de picor cuatro categorías (1:MR8; 2: Mayan Ba'alché; 3: Mayan Chan, Mayan Kisin y Seminis, y 4: Mayan Chac) que correlacionaron de acuerdo con el contenido de capsaicinoides ($r = 0.8956$). Por último, se detectaron diferencias aromáticas entre las variedades, siendo MR8 la variedad de mayor preferencia entre los evaluadores y lo cual puede estar relacionado con un mayor contenido de componentes volátiles.

El chile habanero de la Península de Yucatán es una fuente de metabolitos bioactivos que pueden proporcionar beneficios al ser consumidos habitualmente.

5.3 PERSPECTIVAS

Es deseable incrementar las muestras para comparar un mayor número de perfiles metabólicos e incrementar la predictibilidad y el coeficiente de determinación del modelo de PCA.

Realizar la caracterización fitoquímica en diferentes estados de maduración de las variedades.

Evaluar el contenido de fenoles totales y componentes volátiles de las salsas liofilizadas utilizadas para el análisis sensorial.

Cultivar las plantas de las variedades en diferentes condiciones controladas (agua de riego, nutrimentos en sustrato y/o temperaturas) para conocer la reacción de cada variedad ante las diferentes condiciones evaluadas.

Realizar el análisis de una tercera colecta para poder realizar la comparación estadística entre los resultados obtenidos en las colectas de marzo-abril y septiembre-octubre.

REFERENCIAS

- Fernández R. P. P., Trindade M.A., Tonin F.G., Lima C.G., Pugine S.M.P., Munekata P.E.S., Lorenzo J.M. & de Melo M.P. (2016). Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 451–460.
- Gallon M.E., Monge M., Casoti R. Batista Da Costa F., Semir J. & Gobbo-Neto L. (2018). Metabolomic analysis applied to chemosystematics and evolution of megadiverse Brazilian Vernoniae (Asteraceae). *Phytochemistry*, 150, 93-105.
- Jeeatid N., Suriharn B., Techawongstien S., Chanthai S, Bosland P.W. & Techawongstien S. (2018). Evaluation of the effect of genotype-by-environment interaction on capsaicinoid production in hot pepper hybrids (*Capsicum chinense* Jacq.) under controlled environment. *Scientia Horticulturae*, 235, 334–339.
- Jeeatid N., Techawongstien S., Suriharn B, Chanthai S., Bosland P.W. & Techawongstien S. (2018). Influence of water stresses on capsaicinoid production in hot pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) cultivars with different pungency levels. *Food Chemistry*, 245, 792-797.
- Martín A., Hernández A., Aranda E., Casquete R., Velázquez R., Bartolomé T. & Córdoba M.G. (2017). Impact of volatile composition on the sensorial attributes of dried paprikas. *Food Research International*, 100, 691-697.
- Menichini F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G., De Cindio B., Houghton P.J. & Menichini F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, 114, 553–560.
- Pérez-Ambrocio A, Guerrero-Beltrán J.A., Aparicio-Fernández X., Ávila-Sosa R., Hernández-Carranza P., Cid-Pérez S. & Ochoa-Velasco C.E. (2018). Effect of blue and ultraviolet-C light irradiation on bioactive compounds and antioxidant capacity of habanero pepper (*Capsicum chinense*) during refrigeration storage. *Postharvest Biology and Technology*, 135, 19-26.

Rice-Evans C.A., Miller N.J. & Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.

Topuz, A., Dincer, C., Zdemir, K. S., Feng, H., & Kushad, M. (2011). Influence of different drying methods on carotenoids and capsaicinoids of paprika (Cv.; Jalapeno). *Food Chemistry*, 129, 860–865.

APÉNDICE I

2.2.3 Comparación de la extracción de metabolitos con acetona y etanol.

Se comparó el rendimiento de extracción utilizando dos disolventes (etanol y acetona) en tres de las variedades de chile habanero (MR8, Mayan Kisin y Mayan Chac) (Cuadro A.1). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa, por lo que se determinó que el uso de acetona o etanol no mejoraba la cantidad de metabolitos totales extraídos.

Posteriormente, se evaluó si los extractos acetónicos y etanólicos de las variedades presentaban diferencia en su composición. Para ello, se compararon los perfiles cromatográficos por CCD de los extractos etanólicos y acetónicos de una misma variedad. Se utilizó el sistema de elución hexano:cloroformo:ácido acético en proporción 7:2:1 respectivamente. Como se muestra en la figura A.1, los perfiles por CCD de la variedad de *C. chinense* Jacq. Obtenidos por extracción con etanol o acetona no presentaron diferencia significativa en su composición, lo que nos permite inferir que ambos disolventes están extrayendo de manera similar los metabolitos presentes en los frutos.

Cuadro A.1 Rendimientos de extracción de tres variedades de *C. chinense* Jacq.

Variedad	Longitud promedio (cm)	% de humedad	Rendimiento de extracción con Etanol	Rendimiento de extracción con Acetona
MR8	6 ±0.3	80.48±0.7	21.42 %	22.08%
Mayan Chac	5.5 ±0.2	80.85±0.8	17.01 %	16.48%
Mayan Kisin	5.3 ±0.3	81.04±0.9	17.82 %	18.37%

2.2.4 Impregnación con Nitrato de Plata para incrementar resolución en los perfiles de CCD.

Además de realizar la comparación entre el disolvente utilizado para la extracción, se realizó la impregnación de la placa de sílica gel utilizada para CCD con nitrato de plata 5% en acetonitrilo. Se prepararon 10ml de solución de nitrato de plata para eluir la placa a utilizar en una cuba cubierta con papel aluminio (debido a que el AgNO_3 es fotosensible). Una vez que la placa se encontraba totalmente impregnada, se secó (en oscuridad) y se colocaron los extractos o soluciones estándar a evaluar para proseguir con la elución de éstos de manera habitual utilizando el sistema descrito con anterioridad.

En la figura A.1 se puede apreciar la diferencia entre los extractos eluidos, tanto etanólicos como acetónicos, cuando la placa cromatográfica es impregnada con nitrato de plata. Esta diferencia tiene su fundamento en la formación de complejos compuestos por el nitrato de plata y metabolitos que presenten una estructura hidrocarbonada con la presencia de dobles enlaces (Williams & Mander, 2001). Con base en esto, se planteó la hipótesis de que el nitrato de plata favorecería la separación de capsaicina y dihidrocapsaicina, puesto que su única diferencia estructural radica en el doble enlace en la posición 6 de la cadena lateral de capsaicina.

En la Figura A.2 se muestra la elución del extracto de una de las variedades de *C. chinense*, así como de capsaicina, dihidrocapsaicina y otros metabolitos intermediarios en la biosíntesis de éstos (vainillina, ácido cafeico, ácido *trans*-cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico y ácido vanílico). En la placa de la izquierda se presenta la placa sin impregnar y en la placa de la derecha se muestra la placa impregnada con AgNO_3 .

La impregnación con nitrato de plata en general disminuyó el tiempo de retención de los metabolitos. Sin embargo, el Tr de capsaicina tuvo una reducción mayor al 50%, puesto que pasó de de 0.30 a 0.125, mientras que el Tr de dihidrocapsaicina se redujo de 0.32 a 0.25.

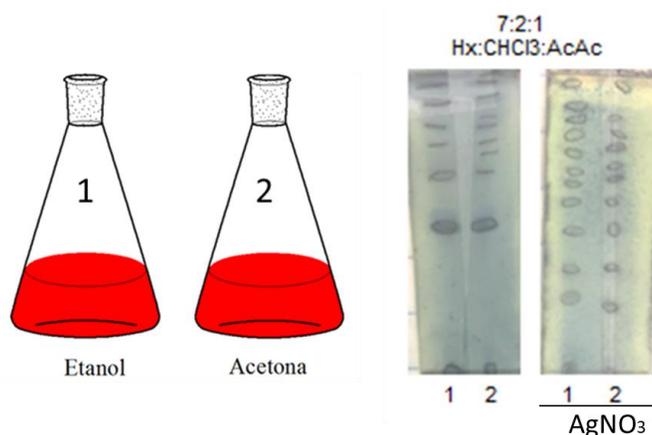


Figura A.1 Comparación de perfiles por CCD de los extractos etanólicos y acetónicos de *C. chinense* Jacq.

Hexano: Cloroformo: Ácido acético
[7:2:1] (X2)

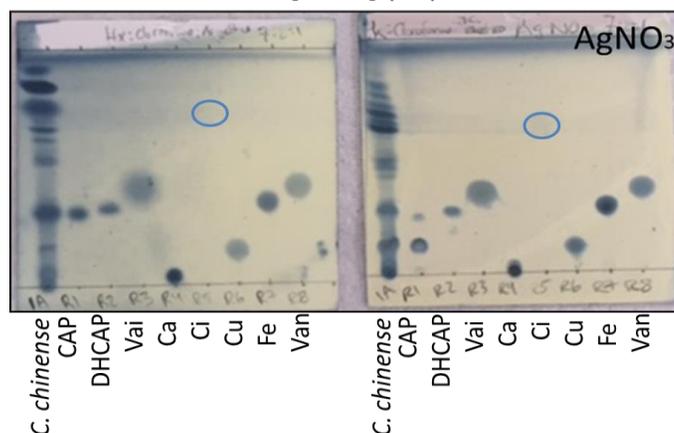


Figura A.2 Perfiles de CCD normales e impregnados con AgNO_3 de *C. chinense*, CAP=capsaicina, DHCAP= dihidrocapsaicina, Vai= vainillina, Ca= ácido cafeico, Ci= ácido *trans*-cinámico, Cu= ácido cumárico, Fe= ácido ferúlico y Van= ácido vanílico.

2.3.1 Análisis espectrofotométrico de los extractos de *C. chinense* Jacq.

Se realizó un análisis de color utilizando un espectrofotómetro DU800. Inicialmente, se llevó a cabo la exploración de la longitud onda de máxima absorción de los extractos correspondiente a luz visible (350-700 nm). Se obtuvo que todos los extractos presentaban dos picos de máxima absorción (450 y 470 nm) (Figura A.3). Se seleccionó la longitud de onda de 450 nm para realizar la comparación de las unidades de absorbancia bajo la curva de los extractos de las variedades. Para ello, se prepararon extractos al 1% en etanol para la lectura de su absorbancia a 450 nm (por triplicado) en el Lector de placas iMark® de BioRad. Se realizó la comparación del área bajo la curva entre las variedades (Figura A.4).

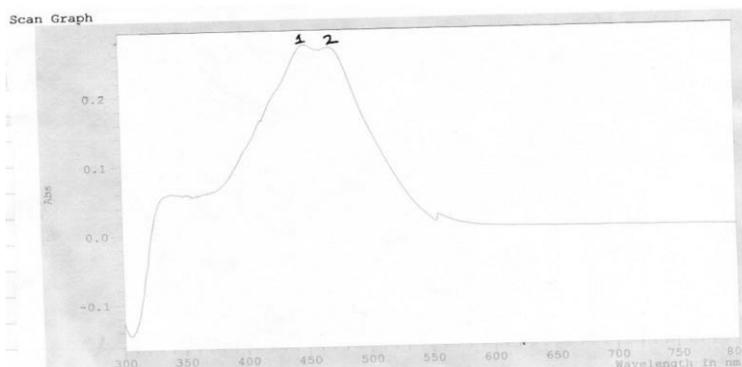


Figura A.3 Barrido espectrofotométrico y absorción máxima de los extractos de *C. chinense*. Se obtuvieron 2 picos máximos de absorción a 250 (1) y 270 (2) nanómetros.

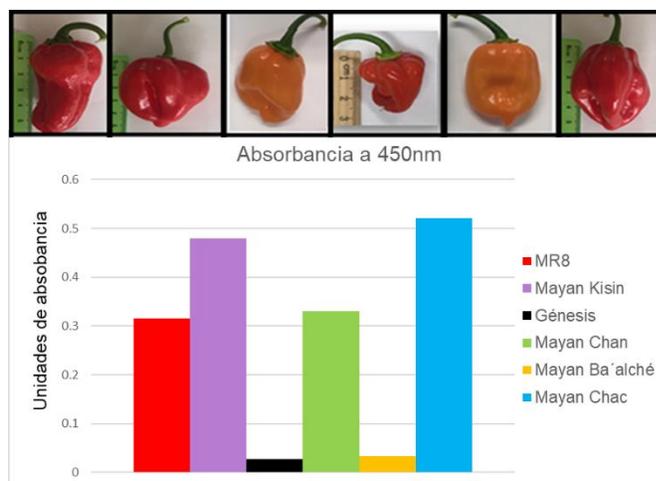
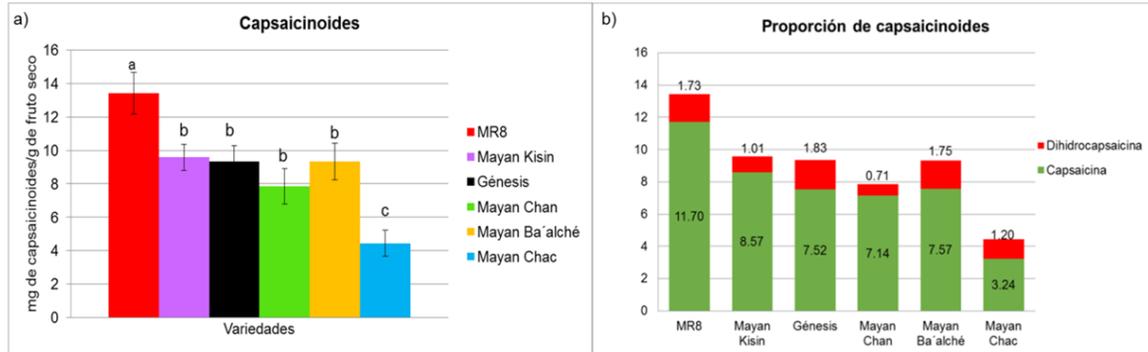


Figura A.4 Absorbancia de los extractos de frutos maduros de las variedades de *C. chinense* Jacq.

2.3.2 Cuantificación de capsaicinoides de los frutos de *C. chinense* Jacq en diferentes estaciones (marzo-abril y septiembre-octubre)

Las variedades fueron germinadas en diciembre del 2017 y mantenidas en condiciones similares de invernadero durante su desarrollo. Entre el periodo de marzo y abril de realizaron recolectas de frutos para su caracterización morfológica y cuantificación de capsaicinoides. Posteriormente, las plantas presentaron dificultades en su desarrollo y comenzaron a abortar las flores, por lo que se sometieron a un proceso de poda en donde todas las hojas fueron removidas (metodología realizada por el ingeniero Fernando Marín, responsable del invernadero del CICY). Las plantas comenzaron a florear nuevamente en Julio y se pudo realizar una segunda recolecta de los frutos en el periodo septiembre-octubre. Se realizó nuevamente la caracterización morfológica de los frutos y la cuantificación de capsaicinoides (Figura A.5)

Septiembre-October 2018



Marzo-Abril 2018

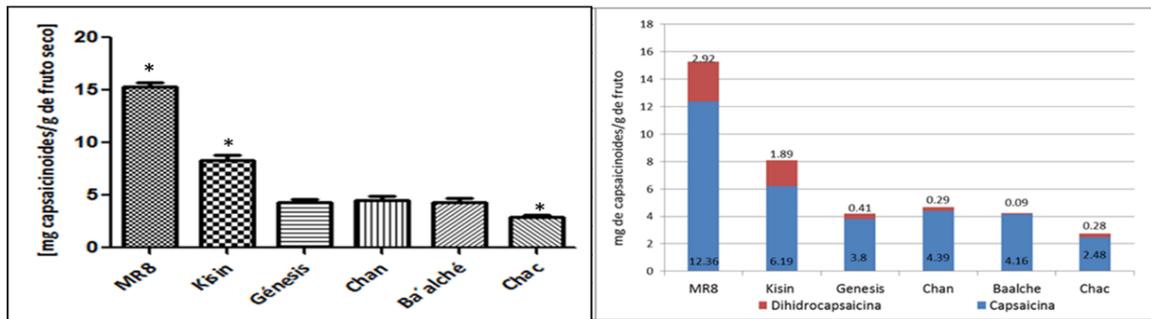


Figura A.5 Contenido de capsaicinoides en los extractos de las variedades de *C. chinense* Jacq. Se presenta la media y desviación estándar de 3 repeticiones.