



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**SELECCIÓN DE VARIEDADES DE CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) CON
FINES INDUSTRIALES**

Tesis que presenta

Liliana Saraí Muñoz Ramírez

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología
Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Diciembre 2020

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 **LILIANA SARAI MUÑOZ RAMÍREZ** titulado **SELECCIÓN DE VARIEDADES DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) CON FINES INDUSTRIALES** fue realizado en la UNIDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, Laboratorio 09, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la **DRA. NANCY SANTANA BUZZY**, dentro de la opción de **BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dra. Cecilia Hernández Zepeda

Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Diciembre de 2020

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 periodo 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.

Firma: _____

Nombre: Liliana Sarai Muñoz Ramírez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Estudio sobre los factores bioquímicos, morfológicos y moleculares implicados en el desarrollo de la embriogénesis somática y su relación con la incapacidad del embrión somático del género *Capsicum* para su conversión en plantas *in vitro*”. Ciencia Básica. 602740001 en el que participe bajo la dirección de la Dra. NANCY SANTANA BUZZY.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. por todas las facilidades brindadas para la realización de este trabajo. En especial, a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular por facilitarme material, equipo y laboratorios, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No.422117 para realizar el doctorado en Ciencias Biológicas y por la beca de movilidad para la realización de una estancia en Sevilla, España.

Al proyecto titulado “Estudio sobre los factores bioquímicos, morfológicos y moleculares implicados en el desarrollo de la embriogénesis somática y su relación con la incapacidad del embrión somático del género *Capsicum* para su conversión en plantas *in vitro*”. Ciencia Básica. 602740001 a cargo de la Dra. Nancy Santana Buzzy.

Al Dr. Dámaso Hornero Méndez del grupo de Química y Bioquímica de Pigmentos perteneciente al Departamento de Fitoquímica del Instituto de la Grasa – CSIC en Sevilla, España, por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar una breve estancia, por su paciencia, por toda su asesoría y conocimiento de las técnicas, análisis de pimientos y uso del HPLC.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra. Nancy Santana Buzzy por permitirme trabajar con ella desde la licenciatura hasta el doctorado, por su apoyo, confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte invaluable, para el desarrollo de esta tesis.

A mi comité tutorial: Dr. Javier Mijangos por sus consejos, sugerencias y conocimientos aportados en la realización de este trabajo. A la Dra. Lourdes Iglesias Andreu por su asesoría, amabilidad, su paciencia, sus sugerencias y observaciones en la elaboración de esta tesis y por estar siempre dispuesta para los exámenes tutoriales.

A los técnicos M.C. Adriana Canto Flick, por sus consejos ayuda para el desarrollo de técnicas así como por brindar el material necesario para poder llevar acabo todos los experimentos. Al Dr. Adolfo Guzmán y al M.C. Eduardo Balam, por su apoyo en el cuidado de las plantas y el control de plagas.

A las Dras: Susana Avilés Viñas y Laura Peña por todo su apoyo en el laboratorio, por compartir sus conocimientos y por su grandiosa amistad.

A mis Amigos y Compañeros del laboratorio 09 y de la Unidad de Bioquímica: María Jose, Celeste, Irene, Carlos, Francisco, Javier, Estefano, Yannin, Jacobo, Felipe, Rafaela, Yariza, Gema y Argelys gracias por compartir conmigo sus conocimientos, las risas, cafés, reuniones y pláticas que han aligerado mi estancia aquí en Mérida, gracias por su amistad.

A todos mis viejos y nuevos amigos, gracias por su amistad que me han brindado desde que nos conocemos y por todos los momentos que hemos pasado juntos. De manera especial a Sergio porque a pesar de la distancia siempre estas para escucharme, apoyarme, aconsejarme y se que puedo contar contigo, gracias por tu apoyo incondicional, a ti Yasmin gracias por alentarme a hacer esto, esto fue por ti y porque a pesar de la distancia física, siempre me has apoyado, confiado en mí y ayudado a continuar.

A los integrantes de mi comité de evaluación: Dra. Nancy Santana Buzzy, Dra. Lourdes Iglesias Andreu, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Sara Elena Solis Pereira, Dr. Javier Mijangos Cortés, Dr. Manuel Martínez Estévez y Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell.

DEDICATORIAS

A mis padres: Rodolfo Muñoz y Margarita Ramírez por ser el pilar fundamental de todo lo que soy, quienes a lo largo de la vida han velado por mi educación y bienestar, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mis hermanos: Yuridia, Yazmin y Tomás, por siempre haberme dado fuerza, por su apoyo que me ha ayudado y llevado hasta donde estoy ahora.

A mis sobrinos: Diego, Andrea, Matías y Emiliano quienes me regalan su amor y cariño de forma incondicional y a quienes amo.

A Cristina Pech Jimenez: quien forma parte de este logro, por estar conmigo aún en los días difíciles, gracias por tu apoyo incondicional, tu confianza, paciencia, amor y cariño; por motivarme y alentarme cada día hasta cumplir la meta.

Reitero que me encanta tenerlos como referencia. Me encanta saber de dónde vengo y a dónde puedo volver siempre que lo necesite porque se que estarán ahí. ¡Muchas gracias!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 Origen y taxonomía del chile habanero (<i>C. chinense</i>)	3
1.2 Características botánicas.....	4
1.3 Producción de Capsicum	5
1.4 Mejoramiento genético de chile.....	7
1.5 Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos	9
1.6 Composición química de Capsicum	11
1.7 Capsaicinoides	12
1.8 Biosíntesis de los capsaicinoides	13
1.9 Extracción de capsaicinoides	15
1.10 Cuantificación de capsaicinoides	18
1.11 Aplicaciones de los capsaicinoides	20
JUSTIFICACIÓN.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
CAPÍTULO II	25
BEHAVIOR OF THE HOTTEST CHILLI PEPPERS OF THE WORLD CULTIVATED IN YUCATAN, MEXICO.....	25
2.1 ABSTRACT.....	26
2.2 INTRODUCTION	27
2.3 MATERIAL AND METHODS.....	28
2.4 RESULTS AND DISCUSSION.....	30
2.5 CONCLUSIONS.....	35
CAPÍTULO III	37
SELECTION OF HABANERO PEPPER F1 HYBRIDS (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.) AT THE PENINSULA OF YUCATAN, MEXICO WITH A HIGH POTENTIAL FOR DIFFERENT MARKETS	37
3.1 ABSTRACT.....	38

3.2 INTRODUCTION	39
3.3 MATERIALS AND METHODS	41
3.4 RESULTS	44
3.5 DISCUSSION	55
3.6 CONCLUSION.....	57
CAPÍTULO IV.....	65
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE LOS HÍBRIDOS F1 Y VARIEDADES DE CHILE HABANERO (<i>C. chinense</i>) POR LOS MÉTODOS DE COLLINS et al. (1995) Y ASTA 21.3	65
4.1 INTRODUCCIÓN.....	65
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	70
CAPÍTULO V.....	85
DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN HÍBRIDOS Y VARIEDADES DE CHILE HABANERO	85
5.1 INTRODUCCIÓN.....	85
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	86
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
CAPÍTULO VI.....	99
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	99
6.1 CONCLUSIONES	99
6.2 PERSPECTIVAS	101
BIBLIOGRAFÍA.....	103

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Características morfológicas del chile habanero (<i>C. chinense</i>).	5
Figura 1.2 Producción nacional de chile habanero en los estados de la región sureste.	7
Figura 1.3 Estructura química de algunos capsaicinoides.....	12
Figura 1.4 Corte transversal de un fruto de chile habanero.....	13
Figura 1.5 Biosíntesis de capsaicinoides.....	15
Figura 1.6 Escala de pungencia de Scoville (Modificado de Theresa Chiechi. © The Spruce, 2019).	19
Figura 1.7 Ecuación reportada por el método ASTA 21.3: ppm, para calcular las unidades SHU.....	20
Figura 1.8 Principales aplicaciones de la capsaicina en la industria.....	21
Figure 2.1 Varieties evaluated: a) 'Bhut Jolokia', b) 'Trinidad Moruga Scorpion' and c) 'Carolina Reaper'.	31
Figure 2.2 HPLC Chromatograms of capsaicin (1) and dihydrocapsaicin (2); a) standard; b) sample of 'Trinidad Moruga Scorpion'.....	32
Figure 2.3 Pungency (SHU) of the varieties analyzed in this study compared to those reported by • (PuckerButt Pepper Company, 2013); •• Bosland, Coon, and Reeves (2012); ••• Bosland and Baral (2007).....	34
Figure 3.1 Evaluated F1 lines and the progenitors of habanero peppers. (Numbers H1 – H29 correspond to F1 lines and numbers P30 – P41 correspond to progenitors).....	41
Figure 3.2 Distribution of the assessed F1 lines and progenitors, as well as the modalities of the main traits contributing to the axes 1 and 2, observed from the multiple correspondence analyses (MCA). ACN: Anthocyanin coloration of nodes, FS: Fruit shape, FSA: Fruit shape of apex, FST: Fruit surface texture, FUS: Fruit undulation in cross section, LBM: Leaf blade margin, LP: Leaf position, MC: Margin of calyx.	46
Figure 3.3 Pearson correlation matrix for the 18 quantitative traits of the 29 F1 lines and the 11 progenitors of habanero pepper. FL: Fruit length, FPL: Fruit pedicel length, G: Germination, SL: Stem length, PH: Plant height, CC: Capsaicin content, FTP: Thickness the pedicel of the fruit, NSF: Number of seeds per fruit, FWT: Fruit wall thickness, FWI: Fruit width, FW: Fruit weight, DFR: Days to fruiting, LLP: Leaf length of petiole, LLB: Leaf length of blade, LWB: Leaf width of blade, DFL: Days to flowering, SD: Stem diameter, FYP: Fruit yield/plant.....	52

Figure 3.4 Dimensional representation of the distribution of F1 lines and progenitors of evaluated habanero peppers in the first two principal components. (Numbers 1 – 29 correspond to F1 lines H1-H29 and numbers 30 – 41 correspond to progenitors P30 – P41).....	54
Figure 3.5 Dendrogram of the hierarchical cluster analysis showing the clusters of the 29 F1 lines and 11 progenitors habanero pepper based on the traits with greater contribution to the PCA.	55
Figure 3.6 F1 hybrids a) H14, b) H7, c) H20 and d) H27 were selected because of their high productivity potential and high hotness.....	58
Figura 4.1 Diversidad morfológica de 29 híbridos (H1-H29) y nueve variedades de chile habanero (<i>C. chinense</i>) (P30-P41) cultivadas en Yucatán, México.....	71
Figura 4.2 Cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución mediante el método de Collins (HPLC por sus siglas en inglés) de los estándares capsaicina y dihidrocapsaicina (a) y el cromatograma del híbrido H5 (b), se ilustra la separación de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2).	72
Figura 4.3 Curva de calibración del estándar de capsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 338 nm.	73
Figura 4.4 Curva de calibración del estándar de dihidrocapsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 338 nm.	73
Figura 4.5 Cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución mediante el método ASTA (HPLC por sus siglas en inglés) del estándar capsaicina (a) y cormatograma del extracto etanólico del híbrido H2 (b). Se ilustra la separación de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2).	75
Figura 4.6 Comparación en el contenido de capsaicinoides totales (mg g ⁻¹ PS) mediante los dos métodos analizados. Los valores son el promedio de tres muestras ± DE de la media.....	80
Figura 4.7 Análisis de los híbridos con mayor pungencia, de acuerdo a las unidades de picor Scoville (SHU), contrastando los dos métodos.....	81
Figura 4.8 Híbridos F1 seleccionados por destacar en la mayoría de los caracteres evaluados.	83
Figura 5.1 Curva de calibración del estándar de capsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 325 nm.	88

Figura 5.2 Curva de calibración del estándar de dihidrocapsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 325 nm.....	88
Figura 5.3 Cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) de los estándares capsaicina y dihidrocapsaicina (a) y del híbrido H25 (b). Se ilustra la separación de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2).	89
Figura 5.4 Comparación en el contenido de capsaicinoides totales (mg g ⁻¹ PS) mediante los dos métodos analizados. Los valores son el promedio de tres muestras ± DE de la media.....	95
Figura 5.5 Evaluación de los híbridos con mayor contenido de unidades de picor Scoville (SHU), de acuerdo al método Muñoz-Santana y a la técnica de ASTA.....	96

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Descripción taxonómica de <i>C. chinense</i> (USDA, 2011)	4
Tabla 1.2 Principales países productores de <i>Capsicum</i> spp. a nivel mundial.	6
Table 2.1 Morphoagronomic characteristics of the three varieties evaluated.	30
Table 2.2 Concentration of capsaicinoids analyzed in mg g-1 of dry weight and pungency of the chilli varieties investigated.....	33
Table 3.1 Qualitative and quantitative traits used to evaluate F1 lines and progenitors of habanero peppers, according to the IPGRI Manual (1995) and the SNICS Manual (2015)	42
Table 3.2 Percentage of distribution of the 22 qualitative traits in F1 lines and progenitors of habanero peppers.....	44
Table 3.3 Results of the multiple correspondence analysis (MCA) carried out from the qualitative and quantitative traits of the assessed F1 lines and progenitors of habanero pepper.	45
Table 3.4 Analysis of variance (ANOVA) of the quantitative traits of the evaluated genotypes of habanero pepper.	47
Table 3.5 Variation in the morphoagronomic traits evaluated in F1 lines and progenitors of habanero pepper.	47
Table 3.6 Variation in the quantitative traits evaluated in F1 lines and progenitors of habanero pepper.	50
Table 3.7 Principal components, own values, self-values, and percentage of explained total variance.	53
Tabla 3.8 Mean values of the evaluated qualitative and quantitative traits for each of the groups established by cluster analysis.....	55
Tabla 4.1 Contenido de capsaicinoides de híbridos y variedades de chile habanero (<i>C. chinense</i>) cultivadas en Yucatán analizadas por dos métodos.	77
Tabla 5.1 Contenido de capsaicinoides de híbridos y variedades de chile habanero (<i>C. chinense</i>) cultivadas en Yucatán	91
Tabla 5.2 Resumen de las características de los métodos de extracción desarrollados.	92

ABREVIATURAS

HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
SHU	Scoville Heat Units
PS	Peso seco
C	Capsaicina
DHC	Dihidrocapsaicina
Ton	Toneladas
CICY	Centro de Investigación Científica de Yucatán
UPS	Unidad Productora de Semillas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
SNICS	Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas
IPGRI	International Plant Genetic Resources Institute
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
ACP	Análisis de componentes principales
CVG	Coeficiente de variación genotípica
CVF	Coeficiente de variación fenotípica
CVA	Coeficiente de variación ambiental

RESUMEN

La península de Yucatán es reconocida como el centro de diversidad genética de los chiles habaneros (*Capsicum chinense* Jacq.), que se distinguen de los cultivados en otras regiones del mundo por su aroma, sabor y sobre todo por su pungencia, siendo este uno de los cultivos más importantes de la región que además cuenta con la denominación de origen desde el 2010. El chile habanero tiene una gran importancia a nivel mundial por ser una fuente de compuestos fitoquímicos, en beneficio de la salud humana, tales como los capsaicinoides. Esta investigación evaluó 29 líneas F1 y 11 variedades de *C. chinense* utilizados en el programa de cruzamientos, desarrollado por el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Se emplearon un total de 22 descriptores cualitativos y 18 cuantitativos establecidos en los manuales del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) y del Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). El rasgo que más contribuyó a la variabilidad cualitativa identificada fue la presencia de antocianinas en el nudo. El análisis de componentes principales mostró que el contenido de capsaicina y el grosor del pericarpio del fruto fueron los principales contribuyentes a la variación registrada. Con base en los resultados del análisis de los rasgos cualitativos y cuantitativos, se seleccionaron cuatro híbridos (H7, H14, H20 y H27) por sus características prometedoras para los diferentes mercados, es decir, alto potencial productivo y / o alta pungencia. Los resultados de este estudio además, corroboraron que la pungencia se ve muy afectada por el ambiente, al cultivar y evaluar tres variedades comerciales de chiles consideradas las más picantes del mundo: "Bhut Jolokia", "Trinidad Moruga Scorpion" y "Carolina Reaper" en Yucatán, su contenido de capsaicinoides aumentó notablemente. El método de Collins resultó promisorio para un proceso de extracción y cuantificación de capsaicinoides, por obtener altas cantidades de capsaicinoides totales para la mayoría de los genotipos evaluados. Este trabajo a su vez, permitió desarrollar un método de extracción y cuantificación de capsaicinoides el cual es rápido, confiable, exacto así pues se logró reducir el tiempo de extracción, cantidad de solventes y el tamaño de muestra.

ABSTRACT

ABSTRACT

The Yucatan peninsula is recognized as the center of genetic diversity for habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.), which are distinguished from those grown in other regions of the world for their aroma, flavor and above all for their pungency, this being one of the most important crops in the region that also have a designation of origin since 2010. The habanero pepper is of great importance worldwide because it is a source of phytochemical compounds that benefit human health, such as capsaicinoids. This research evaluated 29 F1 lines and 11 varieties of *C. chinense* used in the crossbreeding program developed by the Yucatan Center for Scientific Research. A total of 22 qualitative and 18 quantitative descriptors established in the manuals of the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and National Service for Seed Inspection and Certification (SNICS) were used. The trait that contributed the most to the qualitative variability identified was the presence of anthocyanins in the node. Principal component analysis showed that the capsaicin content and fruit pericarp thickness were the major contributors to the variation recorded. Based on the results of the analysis of the qualitative and quantitative traits, four hybrids (H7, H14, H20 and H27) were selected for their promising characteristics for the different markets, that is, high productive potential and / or high pungency. The results of this study corroborate that pungency is greatly affected by the environment. We evaluated three commercial varieties of chili peppers reported as being the hottest in the world: 'Bhut Jolokia', 'Trinidad Moruga Scorpion', and 'Carolina Reaper'. When these varieties were planted in Yucatán, their capsaicinoid content increased remarkably. The Collins method was promising for a capsaicinoid extraction and quantification process, as it obtained high amounts of total capsaicinoids for most of the genotypes evaluated. This work, in turn, allowed the development of a method for the extraction and quantification of capsaicinoids which is fast, reliable, and exact, thus reducing the extraction time, the amount of solvents and the sample size.

INTRODUCCIÓN

Todos los chiles pertenecen al género *Capsicum*, el cual comprende alrededor de 38 especies descritas con una amplia diversidad morfológica, principalmente en diferentes formas, colores, tamaños y atributos sensoriales de sus frutos (Barboza *et al.*, 2019). Entre estas especies solo cinco han sido domesticadas y cultivadas las cuales son *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens* y *C. chinense* Jacq. (Adebola y Morakinyo, 2006). Las especies de *Capsicum* son muy importantes en México debido a factores económicos y culturales, el país es un centro de diversidad para este género. La identificación de especies, la caracterización y evaluación de las accesiones mantenidas en los bancos de germoplasma son de fundamental importancia, además; la correcta clasificación de especies botánicas es esencial, una identificación errónea de las especies mantenidas en un banco de germoplasma generaría perdidas al entregar un material genético mal identificado a otras instituciones (Branca *et al.*, 2018; Bonilla-Barrientos *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2008).

La caracterización del germoplasma consiste en la obtención planeada y meticulosa de datos con base en la evaluación de aquellas características que detallan y diferencian accesiones ya existentes (de Almeida *et al.*, 2005). Esta caracterización por lo tanto se centra básicamente en la morfología y en aspectos fenológicos observados en las accesiones y su comparación con listas de características descriptivas (descriptores). Para una mejor utilización de los recursos filogenéticos en programas de mejoramiento es de vital importancia la caracterización de estas accesiones, así como para evitar la duplicación de material en los bancos de germoplasma (Silva *et al.*, 2013). La identificación de especies en *Capsicum* se ha llevado a cabo tradicionalmente utilizando los descriptores morfológicos; sin embargo, otros descriptores se consideran esenciales para una mayor caracterización precisa del germoplasma, como las indicadas por el International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, 1995) para *Capsicum* y por el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2015) en particular para chile habanero.

El cultivo del chile habanero (*Capsicum chinense*) en Yucatán, es una fuente de trabajo durante todo el año para los productores dedicados al cultivo. Existe además una gran

INTRODUCCIÓN

demandas permanentes de fruto fresco, para satisfacer el mercado regional y extranjero, ya que su consumo es de diversas y muy variadas formas (fresco, salsa, curtidos, seco, molido en pasta) (Wahyuni *et al.*, 2013). Durante los últimos 10 años, se ha intensificado la demanda nacional e internacional de chile habanero. La característica más apreciada de esta especie es la pungencia, lo cual lo ha convertido en un producto agrícola con alta demanda mundial (Trujillo *et al.*, 2004).

La especie *C. chinense* (chile habanero) ha adquirido una importancia considerable, debido al alto nivel de pungencia de sus frutos, lo que lo hace muy codiciado en muchos países del mundo. Un grupo de alcaloides llamados capsaicinoides son los que les confieren el sabor picante a los chiles, la capsaicina y la dihidrocapsaicina son los responsables de más del 90% del picor (Manirakiza, 2003). La capsaicina posee propiedades analgésicas, anti-inflamatorias, antioxidantes e incluso anti-cáncerígenas, al inhibir el crecimiento de células cancerígenas de seno, colon, adenocarcinoma gástrico y de próstata (Djamgoz y Isbilen, 2006). El potencial de especies de *Capsicum* como fuente de capsaicina en la industria farmacéutica ha promovido su estudio fitoquímico (Morán-Bañuelos *et al.*, 2008).

El chile habanero es considerada una de las especies más picantes del mundo y se diferencia del resto por su olor, sabor y pungencia, razón por la cual obtuvo la denominación de origen en el 2010 en el Diario Oficial de la Federación (DOF, 2010); y posteriormente la resolución del “PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-189-SCFI-2012” (DOF, 2012). El aporte principal de este proyecto, es caracterizar por medio de descriptores morfológicos una colección de 29 híbridos y 11 variedades de chile habanero (*C. chinense* Jacq.); así como la cuantificación del contenido de capsaicinoides mediante varios métodos, con el fin de seleccionar genotipos de chile habanero que sean de interés para su uso industrial.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Origen y taxonomía del chile habanero (*C. chinense*)

En México se utiliza la palabra chile, proveniente del náhuatl *chilli*, para referirse a todo fruto clasificado dentro del género *Capsicum*. Fue uno de los primeros cultivos domesticados en Mesoamérica y ahora se ha convertido en un ingrediente esencial de la gastronomía mexicana. México, es el país que presenta la mayor variedad genética de *Capsicum* en cuanto a, la gran variedad de formas y colores del fruto, su riqueza genética se debe en gran parte a la diversidad de climas y suelos presentes en el país (Latournerie *et al.*, 2002).

Todos los chiles pertenecen al género *Capsicum*, donde se encuentran alrededor de 38 especies, de éstas, solo cinco han sido domesticadas y cultivadas: *C. baccatum* L., *C. pubescens* L., *C. frutescens* L., *C. annuum* L. y *C. chinense* Jacq. (Carrizo García *et al.*, 2016). *C. annuum* agrupa la mayor diversidad de chiles, ya sean cultivados o silvestres, entre los más populares, destacan el guajillo o mirasol, piquín, de árbol, serrano, jalapeño y poblano. El centro de diversidad de las formas cultivadas de *C. annuum* incluye a México y Centroamérica. Existen centros secundarios en el centro y sureste de Europa, África, Asia y América Latina. Se indican como centros de origen de *C. frutescens* y *C. chinense* a Bolivia, Perú, sureste de Brasil, Los Andes y Colombia, aunque algunos tipos también se pueden encontrar en África y el sureste de Asia, ya que fueron introducidos por los portugueses en la época Colonial (Tun-Dzul, 2001).

El chile habanero (*C. chinense*) y el manzano (*C. pubescens*) se cree que son originarios de Sudamérica, pero en México son ampliamente conocidos y cultivados en Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco (Ramírez-Malagón y Ochoa-Alejo, 1996). *C. chinense*, es llamado “chile habanero” debido a que una de las hipótesis sustenta que fue introducido vía Cuba. Esta especie fue colocada por el taxónomo Nikolaus von Jacquin en el Caribe, pero no se sabe por qué se le dio el nombre de *chinense* (Smith y Heiser, 1957). A continuación, se muestra la clasificación taxonómica de *C. chinense*: (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Descripción taxonómica de *C. chinense* (USDA, 2011)

<i>Reino</i>	<i>Plantae</i>
<i>Subreino</i>	<i>Tracheblionta</i>
<i>Superdivisión</i>	<i>Spermatophyta</i>
<i>División</i>	<i>Magnoliophyta</i>
<i>Clase</i>	<i>Asteridae</i>
<i>Subclase</i>	<i>Dicotyledoneae</i>
<i>Orden</i>	<i>Solanales</i>
<i>Familia</i>	<i>Solanaceae</i>
<i>Género</i>	<i>Capsicum</i>
<i>Especie</i>	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.

1.2 Características botánicas

El chile habanero es una planta de ciclo anual, su altura es variable, pero en los cultivares comerciales puede oscilar entre 75 y 120 cm. Las hojas son simples, lisas y de forma lanceolada, de tamaño variable, lo mismo que su color, el cual puede presentar diferentes tonos de verde dependiendo de la variedad. Pueden ser glabras o pubescentes; el grado de pubescencia también depende de la variedad. Con una nutrición adecuada las hojas pueden alcanzar un tamaño superior a los 15 cm. de longitud y ancho (Tun-Dzul, 2001).

Las flores son de color blanco; su tamaño varía entre 1.5 y 2.5 cm. de diámetro de la corola; estos órganos se originan en cada ramificación y se pueden presentar racimos hasta de seis flores, dando lugar a un promedio de tres frutos. El número de sépalos y pétalos también es variable (de cinco a siete) aún dentro de la misma especie. Los frutos se clasifican como una baya poco carnosa; son huecos y tienen entre tres y cuatro lóbulos. El color a la maduración puede ser amarillo, rojo, naranja o café y su sabor siempre es picante, aunque el grado de pungencia depende de la variedad, pueden ser de tamaño y formas variables (González y Livera, 1991). Las semillas son lisas, ovaladas, y pequeñas (2.5 a 3.5 mm) tienen testa de color café claro a café oscuro y su periodo de germinación varía entre ocho y quince días (Figura 1.1) (Tun-Dzul, 2001).



Figura 1.1 Características morfológicas del chile habanero (*C. chinense*).

1.3 Producción de Capsicum

Por su olor, sabor y aroma el chile se ha convertido en un condimento popular en muchas partes del mundo. En México, el cultivo del chile es una de las hortalizas más importantes debido al consumo popular el cual forma parte de la historia, tradición culinaria y cultural debido a su amplia variedad de formas, tamaños, colores y al característico sabor picante, lo cual lo ha convertido en un producto agrícola con alta demanda mundial (Pérez *et al.*, 2008). Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) el cultivo del chile (*Capsicum* spp.) se ubica entre las siete hortalizas más cultivadas en el mundo, con una producción mundial para el año 2018 estimada en 36 millones de ton. Los tres principales países productores son: China, con 18,184,711 ton (Tabla 1.2); seguido de México, con un volumen de 3,379,289 ton, equivalente a 9% de la producción mundial; y Turquía con una producción de 2,554,974 ton (FAOSTAT, 2018).

CAPÍTULO I

Tabla 1.2 Principales países productores de *Capsicum* spp. a nivel mundial.

Posición	País	Producción (ton)
1	China	18,184,711
2	México	3,379,289
3	Turquía	2,554,974
4	Indonesia	2,542,358
5	España	1,275,457
6	Nigeria	747,367
7	Egipto	713,752
8	EUA	705,790
9	Argelia	651,045

En México, la producción de los chiles habaneros se concentra en la región sureste, en los estados de Tabasco, Yucatán, Quintana Roo y Campeche. También existen reportes de su cultivo con fines comerciales en otros estados del país, tales como Veracruz, Chihuahua, Jalisco, Tamaulipas, Guerrero y Sinaloa (Tun-Dzul, 2001). En menor proporción, se siembra en países como Belice y en algunas islas del Caribe, Costa Rica, Guatemala, Texas y California (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001).

Para el cultivo específicamente de *C. chinense* a nivel nacional para el año agrícola 2019, se produjeron 20,829.61 ton de chile habanero, de las cuales el 49.37% se cosecharon en la región sureste (Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas), y el 50.63% restante de la producción se distribuyó en los demás estados de la república (Figura 1.2). Aún cuando para el año 2015 y 2016, Tabasco incrementó su productividad, dejando a Yucatán en el segundo lugar nacional, en los años comprendidos del 2017 al 2019, Yucatán ha ocupado el primer lugar en producción de chile habanero (SIAP, 2019).

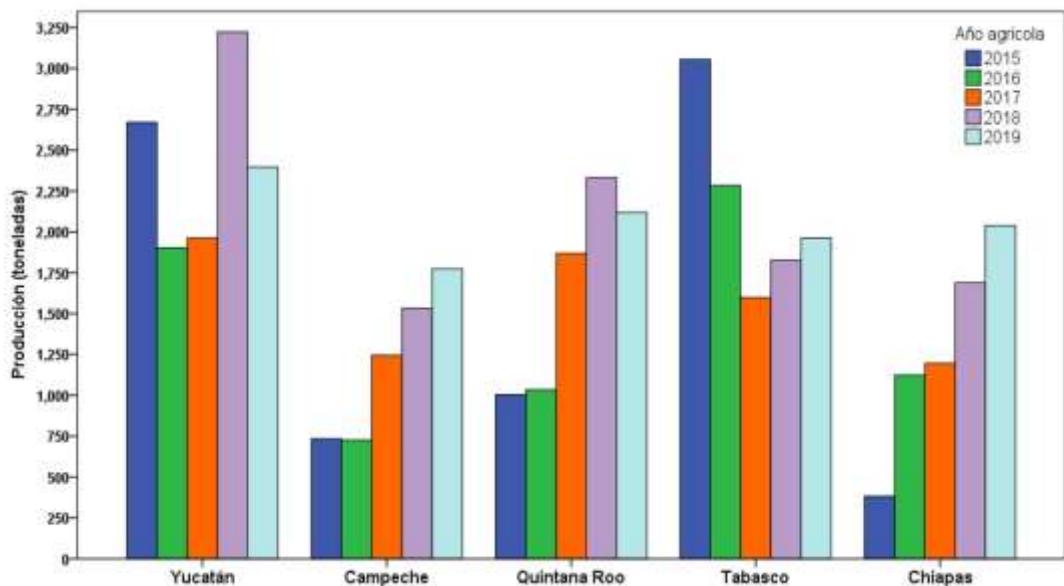


Figura 1.2 Producción nacional de chile habanero en los estados de la región sureste.

El cultivo de chile habanero en la Península de Yucatán es una fuente de trabajo permanente para los productores de la región siendo una de las hortalizas más cultivadas y ampliamente apreciadas por su olor, sabor y pungencia. Debido a sus características y a la gran diversidad genética que existe en la península, el 4 de junio de 2010 obtuvo la denominación de origen como “Chile habanero de la Península de Yucatán” (DOF, 2010), derivando con ello la resolución del “PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-189-SCFI-2012 Chile habanero de la Península de Yucatán (*C. chinense*)-Especificaciones y métodos de prueba” (DOF, 2012). Durante los últimos diez años se ha intensificado la demanda nacional e internacional de chile habanero por eso la importancia económica de este cultivo es evidente (Trujillo, 2001).

1.4 Mejoramiento genético de chile

El mejoramiento genético es la ciencia, el arte y el negocio de mejorar las plantas para el beneficio humano (Bernardo, 2002). El fitomejoramiento inició cuando el hombre empezó a obtener semillas de plantas silvestres y a sembrarlas para beneficiarse de la cosecha. Poco a poco fue utilizando algunos procedimientos elementales de selección para mejorar sus cultivos, basados en la simple observación. En la actualidad, el mejoramiento convencional o domesticación de cultivos sigue los principios básicos de selección y cruza entre individuos con caracteres deseables (Acquaah, 2006).

CAPÍTULO I

Los métodos de mejoramiento tienen como objetivo seleccionar los mejores genotipos dentro de una población, o crear genotipos nuevos con características previamente definidas. Todos los métodos están diseñados, para en mayor o menor grado:

1. Generar semilla cuya descendencia reproduzca el genotipo deseado.
2. Hacer máximo uso de la variabilidad genética presente en la (s) población(es) seleccionada (s).
3. Crear mayor variabilidad genética, a través de la hibridación y recombinación, para obtener nuevos genotipos.
4. Evaluar la descendencia para definir el genotipo.
5. Ejercer control del mecanismo de floración y polinización.
6. Controlar el efecto del ambiente, de la interacción genotipo por ambiente y del error experimental, para mejorar la heredabilidad.

Es relativamente fácil para el mejorador de plantas implementar cualquiera de estas siete acciones, para seleccionar o crear los genotipos deseados. Lo que no es tan fácil y requiere mucho conocimiento y formación es hacerlo lo más rápido y económico posible, en términos de costos y uso de recursos tanto humanos como físicos (Camarena *et al.*, 2014). En México, las actividades de mejoramiento genético están encaminadas a incrementar la productividad, calidad y adaptabilidad de las especies cultivadas. En mejoramiento de chile, la elección de la metodología a emplear depende de los objetivos perseguidos y de los parentales disponibles. Si bien es considerada una especie autógama (Allard, 1960), se han verificado porcentajes de alogamia que varían entre el 7 % y 91 % (Tanksley, 1984; Odland y Porter, 1941), lo cual influye en la estrategia de mejoramiento a emplear y en las precauciones a tomar para la producción de semillas. La obtención de nuevos cultivares se ha hecho ya sea seleccionando dentro de poblaciones e introducciones o bien realizando cruzamientos seguidos de selección. Los métodos más empleados son la selección masal, genealógica y las retrocruzadas.

El mejoramiento de pimientos picantes aunque no está tan avanzado como el de los dulces, también ha sido desarrollado en función de la búsqueda de cultivares con elevados niveles de capscicina y ácido ascórbico, tales son los casos de los trabajos emprendidos por Wani *et al.* (2003), Robi y Sreelathakumary (2004), Yazawa *et al.* (2004). Considerando que Yucatán es centro de diversidad genética de Chile habanero (C.

chinense), y que además de contar con todos los requisitos para un programa de mejoramiento eficiente, ha carecido hasta recientemente de ello. Es indudablemente un cultivo de gran importancia económica, cultural y social para la región, y es además, Yucatán, centro de reserva genética de la especie. Sin embargo, contradictoriamente no existían variedades mejoradas obtenidas a partir de la diversidad genética existente y bajo las condiciones de clima y suelo de la región.

Hace alrededor de 15 años en el CICY se inicio con un programa de mejoramiento a partir de la colecta, la caracterización y la evaluación del germoplasma de la especie, el cual ha permitido poner a disposición de los productores, la sociedad, la industria y el mercado, variedades mejoradas de chile habanero, las cuales conservan aquellos atributos que distinguen al chile habanero de la Península (aroma, sabor y pungencia), y que son superiores por otras características por las que fueron seleccionadas (morfológicas y/o agronómicas), lo que las hacen diferentes y sobresalientes, dentro de la gran diversidad de la especie en la región (Santana-Buzzy *et al.*, 2018).

1.5 Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos

El valor de los recursos fitogenéticos radica en su utilización para la generación de nuevos cultivares con características agronómicas superiores y de interés. Por lo que, los estudios de evaluación y caracterización dan a conocer las variantes génicas presentes en las colecciones de germoplasma para posteriormente ser empleadas en programas de mejoramiento genético vegetal (Hidalgo y Vallejo, 2014; Vallejo y Estrada, 2013). Los recursos fitogenéticos son la base del mejoramiento genético de las plantas, tanto por métodos clásicos como por métodos biotecnológicos, o por la complementación de ambos métodos de mejora. En el Centro de Investigación Científica de Yucatán se conserva el germoplasma de chile habanero, representado por alrededor de 250 colectas de las que se ha podido caracterizar solo 25% de las accesiones conservadas. Esta colección es una de las más completas de la especie en el ámbito internacional (Santana-Buzzy *et al.*, 2018).

Así mismo, el germoplasma de *Capsicum* ha sido objeto de diversos estudios de caracterización morfológica, agronómica, bioquímica, molecular entre otros, tanto a nivel mundial como en México, a fin de identificar accesiones que sirvan como fuentes de genes en el mejoramiento de características para la resistencia a estreses abióticos y bióticos y de otros rasgos de interés (contenidos de capsaicina, carotenoides, formas, tamaños, colores, etc.) para las diferentes agroindustrias demandantes de chiles (Guzmán

CAPÍTULO I

et al., 2020; Araújo *et al.*, 2019; Jesus *et al.*, 2019; Villota-Cerón *et al.*, 2012). La identificación de especies, la caracterización y evaluación de las accesiones mantenidas en los bancos de germoplasma son de fundamental importancia, además; la correcta clasificación de especies botánicas es esencial, una identificación errónea de las especies mantenidas en un banco de germoplasma generaría perdidas al entregar un material genético mal identificado a otras instituciones (Branca *et al.*, 2018; Fonseca *et al.*, 2008).

La identificación de especies en *Capsicum* se ha llevado a cabo tradicionalmente utilizando los descriptores morfológicos; sin embargo, otros descriptores se consideran esenciales para una mayor caracterización precisa del germoplasma, como las indicadas por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos para Capsicum (IPGRI) y por el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) en particular para *Capsicum Chinense* (chile habanero), para este propósito de caracterización, los métodos multivariados se han convertido en una herramienta importante en la clasificación de genotipos conservados en bancos de germoplasma, en este contexto se han realizado diversos trabajos (Branca *et al.*, 2018; Orobiyi *et al.*, 2018; Bharath *et al.*, 2013).

El chile habanero ha sido domesticado en la Península de Yucatán y está fuertemente arraigado a la dieta regional de sus pobladores, consumiéndose tanto fresco como en salsas. Todo ello le confiere a este cultivo un alto valor social, cultural y económico no solo en esta región sino en todo México. Actualmente, el chile habanero es uno de los productos con mayor demanda en los mercados nacional e internacional. Los elevados contenidos de capsaicina le confieren al cultivo un valor agregado exclusivo a sus frutos. Paradójicamente, las variedades criollas de chile habanero son poco rendidoras, sus frutos son pequeños y heterogéneos, incluso en una misma planta los frutos pueden presentar diferente número de lóculos (2-4). Sin embargo, en los últimos 15 años se ha prestado especial atención al mejoramiento genético y al desarrollo tecnológico del chile habanero en el sureste de México. La pungencia es uno de los caracteres más importantes en los trabajos de mejora que se vienen realizando. Canto-Flick *et al.* (2008) determinaron el contenido de capsaicinoides en 18 accesiones de chile habanero autóctono colectadas en la Península de Yucatán.

En 2018, Santana-Buzzy *et al.* (2016) dieron a conocer a 'Mayan Kisín', una variedad de color rojo de chile habanero con altos rendimientos. En un estudio realizado por Peña-Yam *et al.* (2019) estimaron los parámetros genéticos de siete características agronómicas para 11 genotipos de chile habanero, con el propósito de seleccionar progenitores potenciales para la producción de híbridos F1. Sin embargo, conocer la

biología reproductiva de las especies es fundamental para desarrollar un programa eficiente de mejoramiento genético por hibridación. Peña-Yam et al. (2019) reportaron por primera vez, un estudio sobre biología floral del chile habanero, con el propósito de determinar el momento óptimo para la colecta de polen, valorar su viabilidad y definir el estado de desarrollo de la yema floral en la que las anteras se cierran y el estigma es receptivo, con el fin de implementarlo en un programa de cruzamiento.

La caracterización y evaluación del germoplasma en todo su contexto, ha generado una amplia base de datos, plataforma sobre la que se desarrollan los trabajos de selección de materiales genéticos promisorios, tanto para su uso actual o directo, como para su incorporación como progenitores a programas de mejora genética, por poseer características que resultan de interés. Los primeros resultados obtenidos en este sentido fueron ocho variedades criollas de chile habanero, seleccionadas por sus características sobresalientes, particularmente por su elevada pungencia, su alta productividad y por la excelente calidad de sus frutos, las cuales fueron registradas en el Catálogo Nacional de Variedades vegetales (CNVV) del Sistema Nacional de Inspección y Certificación de Semilla (SNICS).

1.6 Composición química de *Capsicum*

La composición química del chile ha sido estudiada ampliamente, en particular con los tópicos relacionados a las vitaminas C y A, el contenido de pigmentos carotenoides y fenoles (Conforti et al., 2007). La composición de carbohidratos, compuestos volátiles, pigmentos carotenoides y capsaicinoides varía dependiendo del estado de madurez de los frutos (Govindarajan, 1986). En el estudio de Pino et al. (2006), estos observaron que el contenido de compuestos volátiles en *C. chinense* varía dependiendo del grado de madurez del fruto, habiendo compuestos que aumentaban, así como algunos otros que disminuían, e incluso desaparecían con la maduración. En otro trabajo realizado por Pino et al. (2007), reportan que la composición de compuestos volátiles en chile habanero es diversa entre las variedades de diferente color de frutos, donde se observó que el contenido de compuestos volátiles es mayor en frutos de las variedades naranja y marrón, a diferencia de las variedades con frutos rojos.

Además de los compuestos volátiles que les confieren el aroma a los frutos de *Capsicum*, otros compuestos que son importantes y que han sido objeto de estudio durante muchos años, en este género, son los carotenoides y los capsaicinoides. El color y la pungencia son los principales parámetros de calidad de las variedades de *Capsicum* (Govindarajan,

CAPÍTULO I

1986). Hay investigaciones que demuestran que las especies de *Capsicum* son fuentes de compuestos fenólicos, flavonoides, capsaicinoides y carotenoides como β -caroteno, β -criptoxantina, capsantina, capsorubina, zeaxantina, anteraxantina, violaxantina, luteína y neoxantina (Loizzo *et al.*, 2015; Pugliese *et al.*, 2014; Pugliese *et al.*, 2013).

1.7 Capsaicinoides

Los compuestos responsables de la pungencia de los chiles (*Capsicum* spp.) son conocidos como capsaicinoides (Barbero *et al.*, 2014). Los dos capsaicinoides más abundantes son la capsaicina (8-metil-N-vainillil-trans-6-nonenamida) y dihidrocapsaicina, tanto que constituyen aproximadamente el 80 – 90% del picor (Othman *et al.*, 2011; Hawer *et al.*, 1994). Además de estos dos principales capsaicinoides, se han encontrado otros capsaicinoides menores en frutos de *Capsicum*, los cuales incluyen a la nordihidrocapsaicina, la homocapsaicina y la homodihidrocapsaicina (Figura 1.3) (Giuffrida *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013). En total, se han reportado más de 20 tipos de capsaicinoides en diferentes especies de *Capsicum* (Barbero *et al.*, 2016).

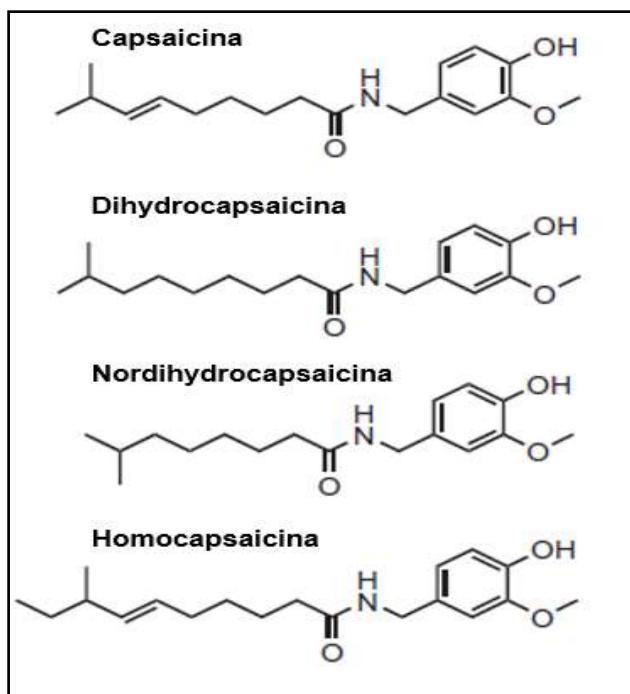


Figura 1.3 Estructura química de algunos capsaicinoides.

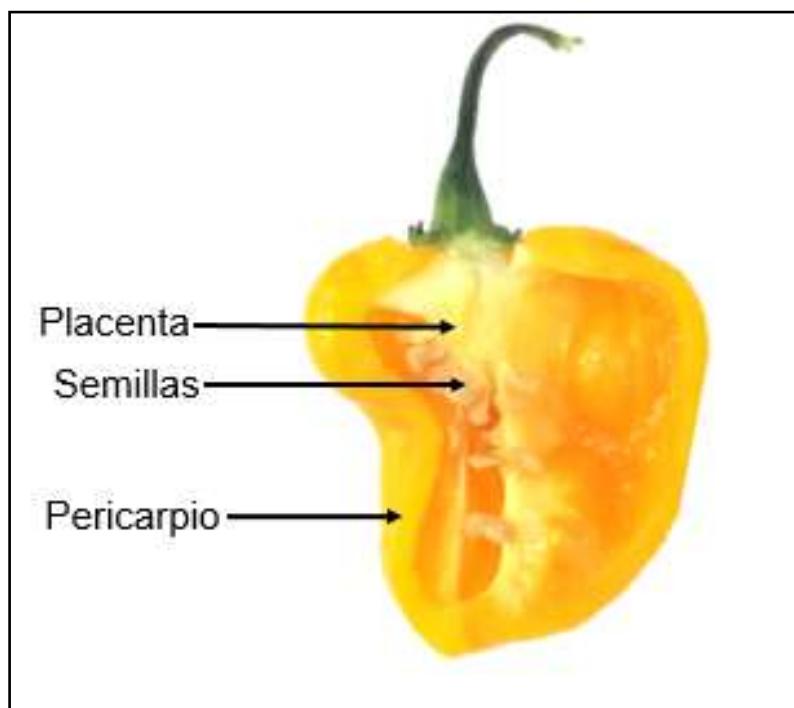
El contenido de capsaicinoides es afectado por diversos factores, múltiples estudios han evaluado el grado de variación determinado por los factores ambientales, las condiciones climáticas, la localización geográfica y las interacciones entre los factores ambientales y genómicos (Butcher *et al.*, 2012; Gurung *et al.*, 2012; Zewdie y Bosland, 2000; Harvell y Bosland, 1997); así como también existen reportes que infieren que el contenido de este

compuesto depende del genotipo, las condiciones de cultivo, los nutrientes del suelo, el estado de madurez de la fruta y el método de conservación después de la cosecha (Nagy *et al.*, 2015, Barbero *et al.*, 2014, Gurung *et al.*, 2011).

El interés científico sobre la capsaicina nació en el año de 1800, pero fue hasta 1876 que Threshin reportó la obtención de cristales de este alcaloide en estado puro, señalando que esta molécula se encuentra muy relacionada con el grupo vainillil y fue el primero en llamarla “capsaicina” (García-Galindo *et al.*, 1995). La capsaicina es el principio picante, encontrándose ausente en las variedades dulces; al igual que los componentes que dan color (capsantina y capsorubina), los capsaicinoides y los compuestos relacionados con ellos, son únicos de los frutos del género *Capsicum* (Collins *et al.*, 1995; Tapia *et al.*, 1993).

1.8 Biosíntesis de los capsaicinoides

Los capsaicinoides se producen en glándulas localizadas en el punto de unión de la placenta con la pared de la vaina y son acumulados en las vacuolas de las células epidérmicas de la placenta hasta que se metabolizan (Figura 1.4) (Stewart *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 1980a). También los capsaicinoides se encuentran en otras partes del fruto como es el pericarpo y la semilla, por su proximidad a la placenta (Moreno *et al.*, 2012; Conforti *et al.*, 2007).



CAPÍTULO I

Figura 1.4 Corte transversal de un fruto de chile habanero.

La ruta de síntesis de los capsaicinoides fue establecida a finales de la década de 1960, utilizando estudios de radio trazadores para investigar los precursores de los capsaicinoides encontrándose que estos compuestos se derivan de la confluencia de dos rutas biosintéticas: la porción fenólica es la vainillilamina, que se forma a partir de la fenilalanina por medio de la ruta de los fenilpropanoides; y el ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina (Kehie *et al.*, 2015).

La vainillilamina se sintetiza mediante conversiones sucesivas de la fenilalanina en los ácidos trans-cinámico, cumárico, cafeico y ferúlico, por la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), la cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H), la cumarato 3-hidroxilasa (Ca3H) y el ácido cafeico metiltransferasa (COMT). La vainillina es un intermediario tardío que es aminado por acción de una transaminasa, para dar lugar a la vainillilamina la cual, por medio de una aciltransferasa llamada capsaicinoide sintasa (CS), se condensa con el derivado acil-graso para producir a los capsaicinoides. Se ha propuesto que el ácido graso se puede formar a partir de la leucina o la valina (García-Galindo *et al.*, 1995) (Figura 1.5).

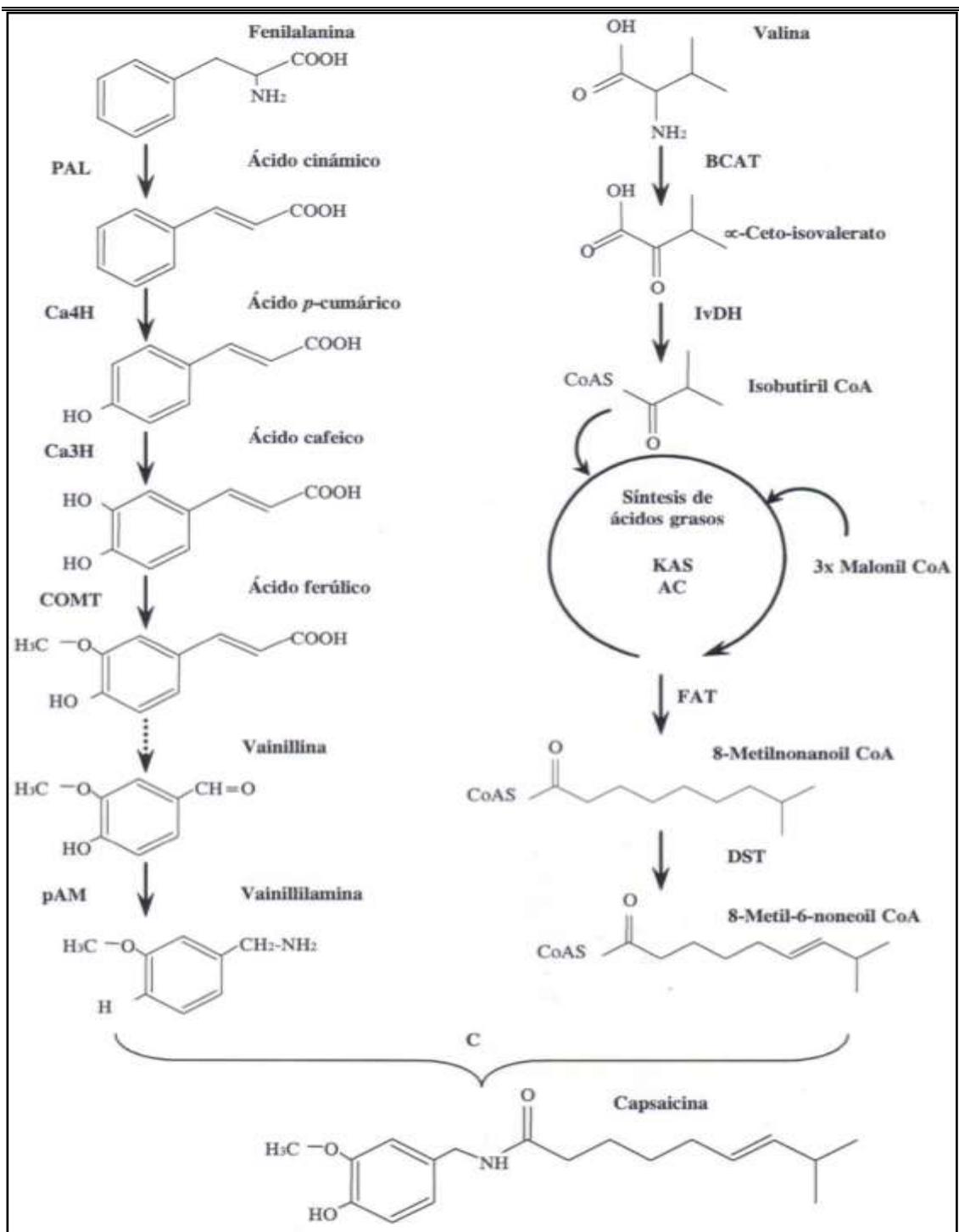


Figura 1.5 Biosíntesis de capsaicinoides.

1.9 Extracción de capsaicinoides

Durante los últimos años, el análisis rápido y exacto del contenido de capsaicinoides en determinadas muestras ha tomado una relevante importancia debido a la demanda de los consumidores de alimentos elaborados a partir de pimientos picantes, de igual modo su

CAPÍTULO I

creciente uso en productos farmacéuticos, debido a lo cual estos compuestos han sido ampliamente estudiados utilizando diversas técnicas de aislamiento y análisis.

Uno de los pasos importantes para la extracción de capsaicinoides es la preparación de la muestra, donde la elección de un protocolo depende del propósito de la investigación. La preparación de las muestras de chile habanero incluye generalmente pasos como el lavado, el pelado, la deshidratación, la molienda, el tamizado y el almacenamiento. Cuando la extracción se realiza en frutos frescos, se requiere una recolección adecuada antes del proceso de extracción, ya que las reacciones químicas y metabólicas continúan en el fruto aún durante la maduración (Fabela-Morón *et al.*, 2019).

El secado de las muestras en un proceso muy común empleado para preservar diferentes productos agrícolas. Se ha informado que las condiciones de secado y los perfiles de temperatura tienen un efecto en la difusión de la humedad, asimismo en la retención o degradación de vitaminas, carotenoides y capsaicinoides en los chiles (Tunde-Akintunde *et al.*, 2005). Se han aplicado diferentes procesos de secado en la conservación y la comercialización de los chiles, uno de los procesos más comunes es el secado al aire libre y bajo el sol, el cual requiere de algunos días para completar la deshidratación de los frutos, además de que este depende de las condiciones climáticas las cuales causan fluctuaciones en el contenido de la humedad, del color, de la calidad microbiológica, así como la pérdida de compuestos bioactivos (Montoya-Ballesteros *et al.*, 2014).

Otro de los métodos mas habituales en la industria alimentaria para la deshidratación de chiles es el secado por convección forzada, donde el producto se coloca en cámaras y el contenido de humedad se elimina por evaporación con calor o aire caliente, esta técnica ofrece un mejor control de calidad del producto, pues las variaciones en las propiedades del producto están relacionadas con las condiciones de operación (Kowalski y Mierzwa, 2011). En la investigación de Chinn *et al.* (2011), examinaron el efecto del secado en horno y la liofilización de las muestras de chile habanero de acuerdo a los rendimientos de extracción de capsaicinoides, encontrando que el rendimiento de capsaicinoides fue mayor en las muestras secas, debido a una mayor penetración del solvente.

La selección del solvente adecuado es un factor determinante para obtener una eficiencia óptima en la extracción de capsaicinoides. La solubilidad del soluto en los solventes depende de la estructura molecular, la polaridad de los enlaces químicos y las interacciones intermoleculares (Martins *et al.*, 2013). Debido a la característica de polaridad de los capsaicinoides que son moléculas no polares, estos tienen por tanto una

mayor afinidad con los solventes de baja polaridad. Para su extracción se han empleado los solventes no polares (hexano, benceno, cloroformo, éter dietílico), los disolventes apróticos polares (acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, dimetilsulfóxido) y los disolventes prócticos polares (n-propanol, metanol, agua). Los disolventes orgánicos comúnmente empleados para la extracción de capsaicinoides en chiles son acetona, metanol, etanol y acetonitrilo (Asnin y Park, 2015).

Sin embargo, la extracción del picor del fruto de *Capsicum* con acetonitrilo da un mayor rendimiento de capsaicinoides en un intervalo menor de tiempo, y reduce la cantidad de pigmentos y aceites presentes en la extracción que con acetona (Collins *et al.*, 1995). Para la obtención de los compuestos, Chinn *et al.* (2011) extrajeron capsaicinoides de muestras frescas y secas de chile habanero utilizando como solventes la acetona, el etanol y el acetonitrilo; encontrando que el etanol y el acetonitrilo eran los mejores solventes para la extracción de capsaicinoides en muestras frescas mientras acetona fue mejor en muestras secas.

Existen diferentes técnicas de extracción de capsaicinoides reportadas en la literatura, sin embargo, considerando los estudios publicados acerca de la extracción de capsaicinoides en chile habanero, la optimización de una técnica en particular no se ha estudiado metódicamente. Los capsaicinoides se pueden obtener mediante técnicas convencionales que se basan en la capacidad de extracción con diferentes solventes y la aplicación de calor mediante un largo periodo de tiempo. Estas técnicas incluyen a la extracción habitual con solventes, la extracción Soxhlet, la maceración y la hidrodestilación. La extracción usual con solvente es la técnica más empleada para la recolección de los capsaicinoides, donde la concentración del solvente, el tiempo, la temperatura, la proporción de soluto/solvente y el número de pasos de extracción son los parámetros considerados (Fabela-Morón *et al.*, 2019).

Además de la extracción de muestras de chile habanero también se ha utilizado esta técnica en otras especies de chile como el trabajo realizado por Bignardi *et al.* (2016) en el cual se analizó el contenido de capsaicinoides en muestras de chile serrano y de chile tabasco utilizando la acetona. Otros solventes utilizados mediante técnicas aceptadas para la extracción de capsaicinoides en muestras de chile habanero son la acetona (Monforte-González *et al.*, 2010; Medina-Lara *et al.*, 2008), el etanol (Chinn *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2007), el metanol (Kehie *et al.*, 2013; Kurian y Starks, 2002) y el acetonitrilo (Asnin y Park, 2015; Amruthaj *et al.*, 2013; Collins *et al.*, 1995), encontrando que este

CAPÍTULO I

último era el mejor solvente para la recuperación de capsaicina, ya que los extractos obtenidos mostraron un mayor nivel de pungencia.

Algunas de las técnicas de substracción de capsaicinoides más recientes son la extracción asistida por ultrasonidos (Barbero *et al.*, 2008), la extracción de fluido supercrítico (Santos *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 1994) y la extracción asistida por microondas (Williams *et al.*, 2004). De los cuales no existen aún metodologías concretas ni protocolos de extracción desarrollados para estos compuestos. En consecuencia, para mejorar la extracción de capsaicinoides en chile habanero se requiere de una investigación exhaustiva en términos de parámetros del método de extracción, especialmente con las técnicas avanzadas y del procesamiento de la muestra del chile habanero, de acuerdo a la obtención de mayor contenido de capsaicinoides para dirigir el desarrollo de una técnica de extracción accesible, eficiente y escalable.

1.10 Cuantificación de capsaicinoides

La industria alimentaria y farmacéutica requiere de procedimientos analíticos confiables, seguros, y su vez de estándares que permitan comparar los niveles de pungencia entre las diversas muestras. El primer método desarrollado para la cuantificación del picor, con relación a los capsaicinoides fue publicado en 1912 por Wilbur Scoville conocido como “Prueba de picor Scoville”, del cual surgió la unidad de medida llamada unidades de picor Scoville (SHU, por sus siglas en inglés) (Scoville, 1912). Este un método organoléptico basado en la experimentación oral de las muestras de interés diluidas en una solución de agua con azúcar (Korel *et al.*, 2002). De esta manera, por ejemplo, si un chile serrano ha sido reportado en 8000 unidades, significa que se necesitan 8000 partes de solución para diluir una parte de extracto de jalapeño hasta el punto en que el picor pueda ser detectado. Como la técnica depende de la evaluación sensorial humana, esta fue criticada pocos años después de su desarrollo debido a la falta de estándar analítico, sumado al error humano y a la agresividad de los capsaicinoides a las células receptoras en la lengua, que reducen la efectividad de las personas capacitadas en esta prueba (Luo *et al.*, 2011).

Aunque la prueba de picor Scoville tiene limitaciones en su análisis, su popularidad y su difusión mundial la han convertido en una escala común para conocer el picor de los chiles (Figura 1.6), la cual también se ha aplicado como referencia al desarrollo de métodos instrumentales más sensibles (Duelund y Mouritsen, 2017; Ryu *et al.*, 2017).

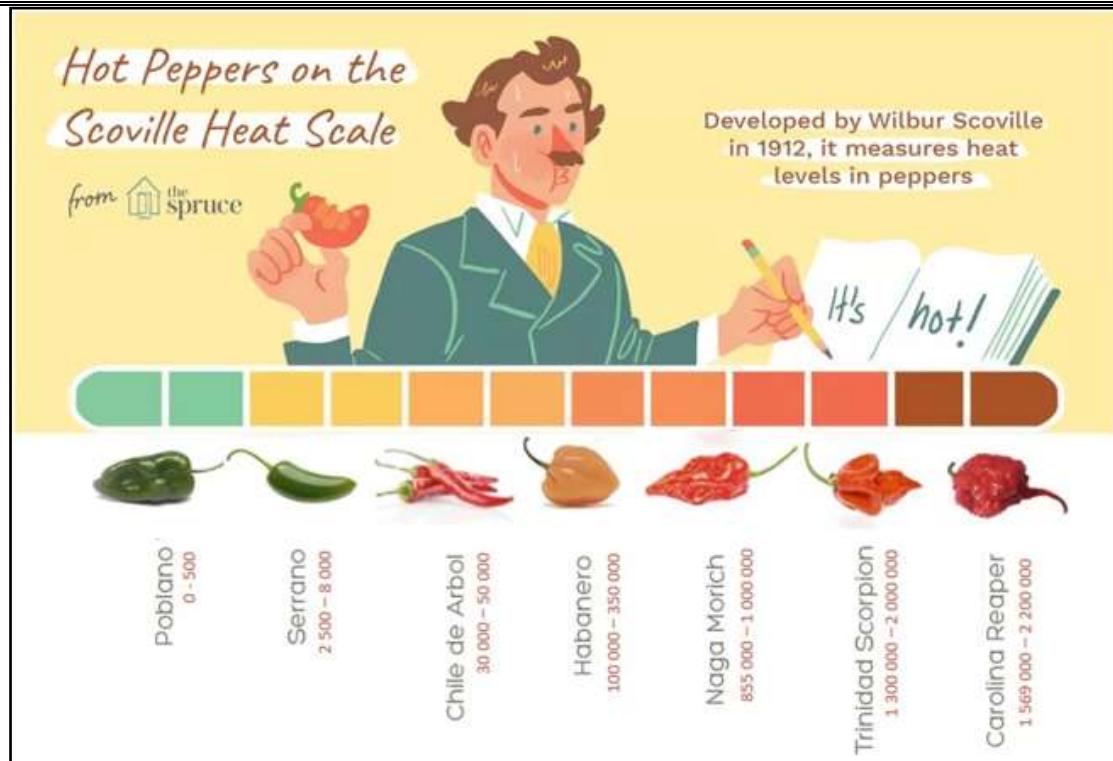


Figura 1.6 Escala de pungencia de Scoville (Modificado de Theresa Chiechi. © The Spruce, 2019).

Entre los principales métodos que permiten un análisis mucho más confiable para este propósito, existen técnicas como la cromatografía en capa fina (Suzuki *et al.*, 1980b), la cromatografía de gases (Thomas *et al.*, 1998; Mullerst *et al.*, 1971) y la cromatografía líquida de alta resolución (Garcés *et al.*, 2006; Schweiggert *et al.*, 2006).

El método analítico más frecuentemente utilizado para cuantificar los capsaicinoides es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) debido a su exactitud, precisión y versatilidad, donde es posible utilizar diferentes sistemas de fases móviles/estacionarias y detectores (Ochoa-Alejo y Ramirez-Malagón, 2001). Las técnicas que usan HPLC proporcionan un estudio más rápido, de menor costo-efectividad, exacto y eficiente del contenido y del tipo de capsaicinoides presentes en la muestra de chile (Collins *et al.*, 1995). Todos los protocolos disponibles de análisis de capsaicinoides mediante HPLC se basan en el uso de fases estacionarias C8 y C18 de diferentes marcas al igual que las mezclas de metanol o de acetona-trílico-agua, ligeramente acidificadas por la adición de ácido acético o fórmico como fases móviles (Jin *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2005).

Uno de los primeros métodos desarrollados para separar y cuantificar los capsaicinoides fue el reportado por Sticher *et al.* (1978), utilizaron una columna de fase inversa C18 y

CAPÍTULO I

como fase móvil, una mezcla de metanol-agua (53:47), donde los capsaicinoides fueron separados en 40 minutos.

La técnica de HPLC actualmente es, sin duda, la técnica analítica más habitual para la caracterización de capsaicinoides provenientes de diferentes especies de chiles, tal como se puede comprobar en la extensa bibliografía que existe (Soares *et al.*, 2020; Chouaibi *et al.*, 2019; Hamed *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2014; Giuffrida *et al.*, 2013; Barbero *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 1995) con respecto a la identificación y análisis de estos compuestos. La metodología de HPLC más comúnmente utilizada para la determinación de capsaicinoides por las industrias, se encuentra contenida en el manual de la American Spice Trade Association (ASTA), el cual requiere de una muestra seca y molida, seguida de una extracción orgánica, y su posterior inyección en el HPLC.

Las unidades de picor Scoville (SHU) pueden ser valoradas a partir de los cálculos de la concentración de capsaicinoides expresadas en partes por millón (ppm), analizadas a partir una muestra en base seca por medio de un HPLC, de acuerdo por la siguiente ecuación (Figura 1.7) reportada por el método ASTA 21.3. Para la determinación de las unidades de picor Scoville (SHU), se multiplica el resultado de las ppm por un factor de conversión de 16.1 (Collins *et al.*, 1995).

SHU

$$(\text{ASTA:ppm}) = \frac{[(\text{pico del área de la capsaicina} + (0.82 \times \text{pico del área de la dihidrocapsaicina})) \times (\text{ppm del estándar}) \times (\text{ml de acetonitrilo})]}{(\text{pico del área total de capsaicinoides del estandar}) \times (\text{g de la muestra})}$$

Figura 1.7 Ecuación reportada por el método ASTA 21.3: ppm, para calcular las unidades SHU.

1.11 Aplicaciones de los capsaicinoides

Los capsaicinoides son los compuestos responsables del picor de los chiles. La pungencia es un atributo comercialmente importante de los chiles picantes debido a la presencia de capsaicinoides, que son los compuestos químicos de relevancia mercantil (Bogusz *et al.*, 2015; Kraft *et al.*, 2014; Perry y Flannery, 2007; Govindarajan, 1986). Estos han sido ampliamente estudiados por su actividad analgésica, antioxidante y en la prevención de la obesidad al aumentar el gasto de energía del cuerpo (Peppin y Pappagallo, 2014; Janssens *et al.*, 2013).

La capsaicina es el principal componente activo de chiles, seguido por la dihidrocapsaicina, la nordihidrocapsaicina, la homodihidrocapsaicina, la homocapsaicina entre otras, los cuales son llamados capsaicinoides (Mueller *et al.*, 2008). La capsaicina

también se considera como un principio activo con propiedades farmacéuticas. Se ha utilizado como analgésico contra inflamación y dolor de artritis (Deal *et al.*, 1991). También ha sido reportado para mostrar su efecto contra el cáncer (Morré y Morré, 2003) y para ser un compuesto activo contra la inflamación neurogénica (ardor de las manos, la boca y los ojos) (Szolcsanyi, 2004). Esta última propiedad es la base para el uso de la capsaicina en aerosoles de pimienta para su uso como producto de defensa. La capsaicina también ha sido reportada para mostrar sus efectos protectores contra los niveles altos de colesterol y la obesidad (Kempaiah *et al.*, 2005).



Figura 1.8 Principales aplicaciones de la capsaicina en la industria.

La capsaicina es el capsaicinoide más estudiado para el alivio del dolor. Se ha demostrado que cuando se usa por vía oral o de forma local- tópica, puede reducir la inflamación y el dolor causado por la osteoartritis y la artritis reumatoide (Robbins, 2000; Cordell y Araujo, 1993; Deal *et al.*, 1991; Marabini *et al.*, 1991). Actualmente, los estudios de capsaicina en el campo médico se centran en la capacidad de esta para inhibir el crecimiento de células cancerosas. Se ha argumentado que la capsaicina induce la muerte celular de apoptosis en células de cáncer humano-gástrico *in vitro* (Kim *et al.*, 1997).

En otro estudio, se describió que la capsaicina fue capaz de reducir el crecimiento de numerosas líneas de células leucémicas a través de la interrupción del ciclo celular en

CAPÍTULO I

fase G0-G1 y la apoptosis. Se observó en ratones que el peso del tumor se redujo en un 50% cuando se inyectó capsaicina (50 mg/kg) diariamente durante 6 días, reportando una mejora en el sistema inmunológico; a su vez disminuye los niveles de colesterol, y al mejorar la circulación reduce la presión sanguínea, por lo que previene la creación de coágulos de sangre; mejora la neuropatía diabética, la fibromialgia y la dispepsia (Ito *et al.*, 2004). También promueve la digestión, disminuye el contenido de triglicéridos en la sangre, posee efectos como laxante y protege contra algunas manifestaciones de cáncer (García y Ortega, 1995).

Los capsaicinoides también han sido utilizados como repelentes para cables subterráneos evitando que los ratones los muerdan (Bosland, 1996), además los capsaicinoides tienen propiedades antimicrobianas (Xing *et al.*, 2006); Tewksbury *et al.* (2008) describieron que estas sustancias son capaces de inhibir el crecimiento del hongo *Fusarium*, que es un problema importante después de la cosecha de frutas y hortalizas. Por tanto, los capsaicinoides podrían ser útiles como biopesticidas. La capsaicina también posee propiedades antimicrobianas, por ese motivo representa una oportunidad explorar su potencial como inhibidor natural de microorganismos patógenos en los alimentos (Xing *et al.*, 2006; Kurita *et al.*, 2002; Dorantes *et al.*, 2000). Generalmente, los capsaicinoides se comercializan en forma de extractos conocidos como oleoresinas (Bernal *et al.*, 1993). Los frutos de Naga jolokia (*C. chinense*) los cuales están clasificados en más de 1 millón de unidades Scoville, estos extractos son utilizados en la India como armas de asalto, e incorporándolos en las bombas de humo para mantener a los elefantes salvajes en distancia (Moirangthem *et al.*, 2012).

JUSTIFICACIÓN

La Península de Yucatán es reconocida como un centro de diversidad genética de chile habanero (*C. chinense*) por la amplia gama que existe de colores, formas y picor del fruto. El chile habanero de Yucatán, es considerado la especie con mayor contenido de capsaicinoides, comparado con otros chiles cultivados en diferentes regiones del mundo, incluyendo su centro de origen. Esta especie ha adquirido gran demanda a nivel nacional como internacional, debido a su diversidad genética, a la adaptabilidad a las condiciones ambientales, a sus múltiples usos como materia prima para diferentes industrias (farmacéutica, alimenticia, militar, química, etc.), la productividad y a las posibilidades de industrialización, pero principalmente a su alto grado de pungencia. El cultivo del chile habanero es una práctica potencialmente rentable, siempre y cuando se pueda ofrecer a los productores y los consumidores variedades e híbridos de alta calidad, por consiguiente, es necesario conocer la diversidad genética de esta especie, lo mismo que el grado de pungencia de cada cultivar.

La información disponible sobre híbridos y variedades de chile habanero, además de su contenido de capsaicinoides, es escasa; por ello el propósito de esta investigación fue caracterizar por medio de descriptores morfológicos una colección de 29 híbridos y 11 variedades de chile habanero (*C. chinense*); siguiendo esta línea, el proceso de extracción y cuantificación del contenido de capsaicinoides mediante varios métodos se desarrollará de manera simultanea, con el fin de seleccionar genotipos de chile habanero que sean de interés para su uso industrial.

OBJETIVO GENERAL

- Seleccionar genotipos (variedades y/o híbridos) de chile habanero con alto potencial para la industria por su contenido de capsaicinoides.

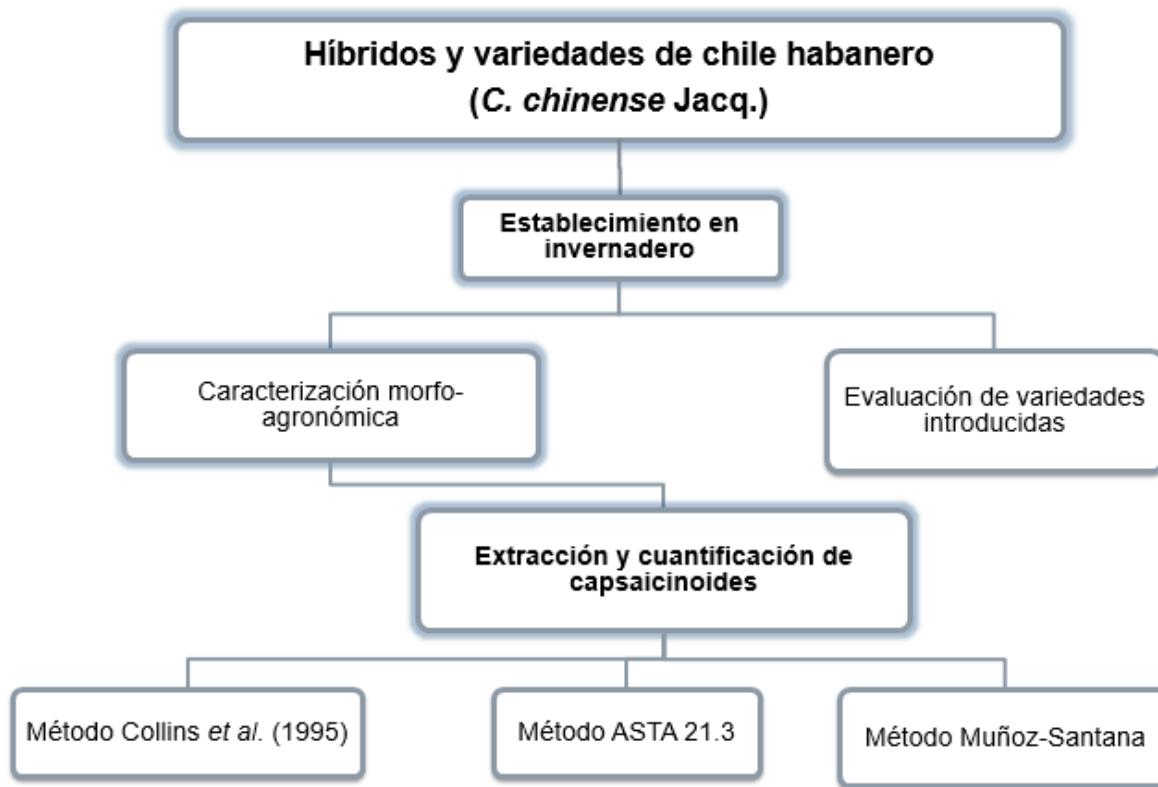
OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfo agronómicamente 29 híbridos F1 y 11 variedades comerciales con base en los descriptores para *Capsicum* spp. establecidos por el SNICS.
- Determinar las correlaciones entre caracteres relacionados con el rendimiento y la pungencia.

CAPÍTULO I

- Evaluar el comportamiento del contenido de capsaicinoides de los chiles más picantes del mundo, cultivados en Yucatán.
- Comparar dos métodos para la cuantificación de capsaicinoides en 29 híbridos F1 y nueve variedades comerciales de chile habanero (*C. chinense*).
- Establecer un método de extracción de capsaicinoides rápido, confiable y reproducible.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

BEHAVIOR OF THE HOTTEST CHILLI PEPPERS OF THE WORLD CULTIVATED IN YUCATAN, MEXICO.

Liliana S. Muñoz-Ramírez, Laura P. Peña-Yam, Susana A. Avilés-Viñas, Adriana Canto-Flick, Adolfo A. Guzmán-Antonio, and Nancy Santana-Buzzy¹

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Calle 43 No. 130 · 32 y 34, Mérida, Yucatán, CP 97205, México.

¹Corresponding author. E-mail: buzzy@cicy.mx.

- ESTE CAPÍTULO HA SIDO PUBLICADO EN LA REVISTA HORTSCIENCE

CAPÍTULO II

2.1 ABSTRACT

The Yucatan Peninsula is recognized as the center of genetic diversity of Habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.), which can be distinguished from those cultivated in other regions of the world by their aroma, taste, and most of all by their pungency. We evaluated three commercial varieties of chili peppers reported as being the hottest in the world: 'Bhut Jolokia', 'Trinidad Moruga Scorpion', and 'Carolina Reaper'. The aim of our study was to determine the behavior of the pungency when cultivated under the edaphoclimatic conditions of Yucatan. Our results show that the three varieties registered greater contents in comparison with those reported in other regions of the world. 'Carolina Reaper' considered to be the hottest variety in the world, with a pungency of 2,200,000 Scoville heat units (SHU) when cultivated in Yucatan, had a pungency of 3,006,330 SHU, which was greater than all the other varieties analyzed.

Additional index words: *Capsicum*, HPLC, pungency, capsaicinoids, Scoville Heat Units

2.2 INTRODUCTION

Chili peppers form part of the identity and culture of Mexico. They belong to the genus *Capsicum*, which originated in America, from Mexico to South America. The word chili derives from the Nahuatl chilli or xilli, and in Mexico it is used to refer to any fruit of the genus *Capsicum* (Long-Solís, 1986). Chili pepper is an extraordinary condiment with a high nutritional value. It is a source of vitamins A, C, and E; minerals; and natural dyes; in addition to its multiple industrial uses, such as flavorings, sauces, powders, and oleoresins, among other products (Qin *et al.*, 2014). It is the only plant species containing capsaicin, the most abundant metabolite among the capsaicinoids which belongs to the alkaloids and is responsible for the pungency of the chili (Duelund and Mouritsen, 2017).

The capsaicinoids, integrated mainly by capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, and homocapsaicin, are produced in glands located in the point of union of the placenta with the pod wall and are accumulated in vacuoles of the epidermal cells of the placenta until they metabolize (Stewart *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 1980a).

The total content of capsaicinoids is called pungency, which is calculated and expressed in SHUs, derived from the organoleptic test for the pungency of the chili peppers (Scoville, 1912). This test has been replaced with high-performance liquid chromatography (HPLC) (Collins *et al.*, 1995; Kozukue *et al.*, 2005). Currently, the capsaicinoids are in great demand in the pharmaceutical industry as a result of their application as anti-inflammatories (Liu and Nair 2010; Tag *et al.*, 2014), antioxidants (Reddy *et al.*, 2010; Rodriguez-Maturino *et al.*, 2012), and anticancer agents (Jia *et al.*, 2013).

Mexico is one of the centers of domestication and diversity of chili peppers. It is also where the greatest genetic diversity of the genus *Capsicum* is located (Ibiza *et al.*, 2012). Yucatan is well known for its culinary tradition, which is associated closely with the Habanero pepper, considered to be one of the hottest chili peppers in the world. In Yucatan, the Habanero pepper found particular conditions of soil and climate that allowed it to adapt and diversify in an environment very different to that of its origin. These conditions are associated with the high temperatures of the region, sparse rainfall, and stony soils (basically calcareous with alkaline pH) very poor inorganic material (Borges-Gomez *et al.*, 2014). In June 2010, the Designation of Origin was granted to “Habanero pepper of the Peninsula of Yucatan” (Diario Oficial de la Federación, 2010). Subsequently, the Official Mexican Standard (NOM-189-SCFI-2012) was generated (Diario Oficial de la Federación, 2013).

CAPÍTULO II

However, there are other varieties of the genus *Capsicum* originating from other regions of the world that have been recognized for their high pungency, such as ‘Bhut Jolokia’, a natural hybrid of *C. chinense* and *C. frutescens*, cultivated mainly in Bangladesh and India (Meghvansi *et al.*, 2010). It can be found with other names, such as Bih Jolokia, Borbih Jolokia, Nagahari, Naga Jolokia, Naga Morich, Naga Moresh, Raja Mirchi, and Dorset Naga (Purkayastha *et al.*, 2012). ‘Bhut Jolokia’ was considered one of the hottest in the world; in 2007, it was registered in the Guinness Book of World Records with 1,001,304 SHU. Later, the ‘Trinidad Moruga Scorpion’ variety, originally from Trinidad and Tobago, occupied that place in the Guinness Book of World Records with a pungency of 2,009,231 SHU (Bosland *et al.*, 2012).

Currently, the ‘Carolina Reaper’ variety, developed by the U.S. company PuckerButt Pepper in South Carolina, is recognized as the most pungent in the world, with 2.2 million SHU (PuckerButt Pepper Company, 2013), and is registered in the Guinness Book of World Records. Taking into account that the Peninsula of Yucatan is known to distinguish the Habanero pepper for its high level of pungency, our proposal was to evaluate, under the conditions of the region, the pungency behavior of three varieties internationally known for their high level of pungency.

2.3 MATERIAL AND METHODS

Plant material and growth conditions. For this study, three varieties of commercially available chili peppers—‘Trinidad Moruga Scorpion’, ‘Bhut Jolokia’, and ‘Carolina Reaper’—were obtained from different suppliers on the Internet [Spicegarden (n.d.) and PuckerButt Pepper Company (2018), respectively]. They were planted from Sept. 2016 to June 2017 in greenhouses located in the seed production unit of the Scientific and Technological Park of Yucatan in Sierra Papacal, Merida, Yucatan, Mexico, at lat. 21°07'20"N and long. 89°43'41"W, and at an altitude of 9 m.a.s.l. During the study period, the average temperature was 18 °C (minimum) and 37 °C (maximum), and relative humidity was 86% (Servicio Meteorologico Nacional, 2018). The seeds were germinated in polystyrene trays with 200 cavities using commercial substrate called PeatMoss Premier (Green Forest, Puebla, Mexico).

The plantlets were transplanted to soil after 35 d, under greenhouse conditions, at a distance of 30 cm between plants and 100 cm between rows. Plant management and irrigation, pest and disease control, and fertilization were conducted following the established standards applied to the cultivation of Habanero pepper in the region (Tun-

Dzul, 2001). One hundred fifty plants per variety were used, distributed in three rows of 50 plants. Each variety was evaluated based on the descriptors established for Capsicum (IPGRI, 1995). The characteristics evaluated were type of epidermis, fruit color, weight of the fruit (measured in grams), pericarp thickness (measured in millimeters), fruit length (measured in centimeters), fruit width (measured in centimeters), number of fruits per plant, yield per plant (grams per plant).

Standards and solvents. Capsaicin (>99%) and dihydrocapsaicin (>97%) (Sigma Aldrich) were used as external standards, whereas methanol, acetonitrile, and HPLC-grade water were used as solvents (J.T. Baker). The filtrates were acquired using a 0.45-mm membrane filter (HVHP0470; Millipore) and degasified before use.

Extraction of capsaicinoids. The extraction of capsaicinoids was performed according to the methodology reported by Collins *et al.* (1995), with slight modifications (100 mg/40 mL, w/v). Mature fruit was picked randomly per row of each variety, cut vertically, and transferred to an aluminum tray to be dried in an oven with a circulation of air for 48 h, after which the dried fruit were ground until a fine homogeneous powder was obtained. The powder was stored at 80 °C. To extract the capsaicinoids, three replicates of 100 mg fruit powder were mixed with 40 mL acetonitrile and maintained in water bath at 80 °C for 4 hours with periodic agitation. The extracts were allowed to cool at room temperature, after which they were centrifuged (Sigma 2-16kl) at 17,968 gn for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected and filtered through syringe filters with a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane of 0.45 mm (no. 721–1345; Thermo Scientific) in 2-mL vials of amber glass and finally stored at 4 °C until the chromatographic analysis was performed.

Analysis of capsaicinoids. Separation and quantification of the capsaicinoids was carried out using HPLC (Agilent series 1200) equipped with an automatic injector and a fluorescence detector. The capsaicinoids were separated by a Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, USA) column (4.6mm i.d. · 250 mm) at a temperature of 25 °C and an injection volume of 20 mL. The wavelengths used for the detection were 280 nm (excitation) and 338 nm (emission). The mobile phase was isocratic with 70% of solvent B (100% methanol) and 30% of solvent A (10% methanol solution v/v). The operating conditions of the HPLC for determining total capsaicinoids were a temperature of 25 °C, a flow rate of 1 mL/min, and a runtime of 15 min.

HPLC calibration. The standards of capsaicin and dihydrocapsaicin were used to obtain a calibration curve based on the relationship of the maximum area for the known

CAPÍTULO II

concentrations of external standards. The stock solution was prepared in 100% (v/v) methanol, and a total of five different concentrations 20, 60, 100, 200, and 300 ppm were used to generate the calibration curve.

Quantification of capsaicinoids. The concentration of the two major capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) was estimated using the calibration curve obtained. The quantified concentration of capsaicinoids is reported in milligrams per gram dry weight (DW). The capsaicin contents obtained in the three varieties were converted to SHU to classify them according to their different levels of pungency. This conversion to SHU was performed by multiplying the capsaicin content by the coefficient corresponding to the pungency value for pure capsaicin (1.6×10^7) (Sanatombi and Sharma, 2008).

Statistical analysis. The experiment was a random block design, with three repetitions. The data obtained are shown as the mean \pm SD. To detect significant differences among capsaicinoid profiles of the chili varieties evaluated, an analysis of variance and a Tukey test ($P < 0.05$) were carried out using the software SPSS (version 22) for Windows.

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

Table 2.1 shows the results of the analysis of the characteristics evaluated for 'Bhut Jolokia', 'Trinidad Moruga Scorpion', and 'Carolina Reaper'. As can be seen, they differ significantly in all characteristics evaluated. 'Bhut Jolokia' presented the greatest fruit length (5.28 cm), which differed significantly from 'Trinidad Moruga Scorpion' and 'Carolina Reaper' (3.63 cm and 2.61 cm, respectively); 'Trinidad Moruga Scorpion' outperformed 'Bhut Jolokia' and 'Carolina Reaper' significantly with regard to fruit weight, fruit width, pericarp thickness, number of fruits per plant, and yield per plant. 'Carolina Reaper' had the lowest values for all characteristics evaluated.

Figure 2.1 shows the distinctive characteristics of the fruit analyzed. There are differences among the three cultivars in terms of the shape of the fruit; however, they have in common the rugged nature of the pericarp. Values similar to those of this study have been reported for fruit weight, fruit length, and fruit width in 'Bhut Jolokia' (Bhagowati and Changkija, 2009; Kundu *et al.*, 2015).

Table 2.1 Morphoagronomic characteristics of the three varieties evaluated.

Varieties	Type of epidermis	Color of fruit	Length of fruit (cm)	Width of fruit (cm)	Thickness of pericarp (mm)	Weight of fruit (g)	No. of fruits /plant	Yield (g plant ⁻¹)

CAPÍTULO II

'Bhut Jolokia'	Wrinkled	Red	5.28 ± 1.52 a ^z	2.42 ± 1.03 b	$1.46 \pm .20$ b	$6.75 \pm .32$ b	219.7 ± 3.65 a	1482.2 ± 9.8 a
'Trinidad Moruga Scorpion'	Wrinkled	Red	3.63 ± 1.64 b	2.97 ± 1.22 a	$1.65 \pm .19$ a	$7.77 \pm .48$ a	108.7 ± 4.09 b	846.7 ± 4.5 b
'Carolina Reaper'	Wrinkled	Red	2.61 ± 2.63 c	2.37 ± 1.71 b	$1.14 \pm .10$ c	$3.70 \pm .45$ c	98.1 ± 2.76 c	362.9 ± 4.3 c

^z The means followed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) with the Tukey test, the data are shown as the mean value \pm SD.



Figure 2.1 Varieties evaluated: a) 'Bhut Jolokia', b) 'Trinidad Moruga Scorpion' and c) 'Carolina Reaper'.

Identification and quantification of Capsaicinoids. To separate the two major capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) responsible for 90% of the pungency (Manirakiza, 2003) using HPLC, the capsaicinoid content in the chili fruit was determined from the retention time and the peak size for each capsaicinoid present, in relation to the time of retention of the commercial standards, for each compound. The chromatograms shown in Fig. 2.2 correspond to the standard and the extract of 'Trinidad Moruga Scorpion', for which it was possible to identify capsaicin and dihydrocapsaicin, with retention times of 7.46 min and 10.62 min, respectively. The calibration curves showed a linear behavior over the concentration, in a range of 20 to 300 ppm of capsaicin and dihydrocapsaicin; the coefficient of correlation (r) was 0.99912 and 0.99931, respectively.

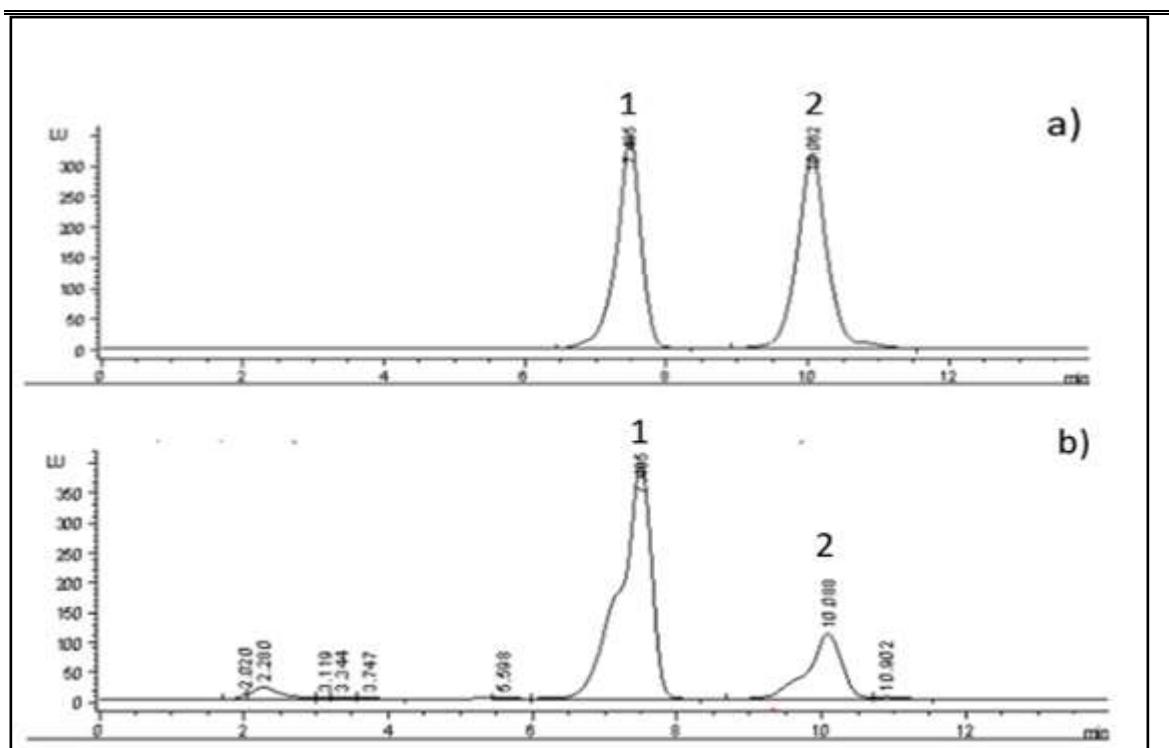


Figure 2.2 HPLC Chromatograms of capsaicin (1) and dihydrocapsaicin (2); a) standard; b) sample of ‘Trinidad Moruga Scorpion’.

The data obtained for pungency (Table 2.2) show the concentration of capsaicin and dihydrocapsaicin, as well as the pungency expressed in SHU of the three cultivars analyzed. The total content of capsaicinoids obtained in this study was within a range of 120.38 to 186.73 mg·g⁻¹ DW, differing significantly from each other. ‘Bhut Jolokia’ has been considered one of the most pungent chili varieties in the world, although this characteristic has shown a high variation depending on the region where it is cultivated. Mathur *et al.* (2000), in a study conducted with this variety in India, reported a pungency of 855,000 SHU, whereas Bosland and Baral (2007) reported 1,001,304 SHU when it was grown in New Mexico, which allowed them to record it in the Guinness Book of World Records as the most spicy variety in the world, displacing ‘Red Savina’ (577,000 SHU).

Subsequently, Islam *et al.* (2015) evaluated the content of capsaicinoids in 92 accessions of ‘Bhut Jolokia’ collections in northwestern India. They found high variability, with a range of 11.95 to 72.05 mg·g⁻¹ DW and a pungency of 191,135 to 1,152,832 SHU.

Table 2.2 Concentration of capsaicinoids analyzed in mg g⁻¹ of dry weight and pungency of the chilli varieties investigated.

Varieties	Total			
	Capsaicin	Dihydrocapsaicin	Capsaicinoids	Pungency (SHU)
	mg·g ⁻¹ DW	mg·g ⁻¹ DW	mg·g ⁻¹ DW	
'Bhut Jolokia'	92.83 ± 5.53 ^z b ^y	27.55 ± 1.79 b	120.38 ± 7.33 c	1,938,089 ± 118,030 c
'Trinidad Moruga Scorpion'	116.40 ± 5.15 a	30.71 ± 1.26 b	147.11 ± 6.42 b	2,368,534 ± 103,395 b
'Carolina Reaper'	123.43 ± 1.77 a	63.30 ± .97 a	186.73 ± 2.75 a	3,006,330 ± 44,384 a

^z Each value is the average of three samples ± the standard deviation of the mean. ^y The averages followed by different letters in the same column are significantly different ($P < 0.05$) with the Tukey test. SHU: Scoville Heat Units.

In our study, the content of capsaicinoids registered for 'Bhut Jolokia' was 120.38 mg·g⁻¹ DW, which corresponds to a pungency of 1,938,089 SHU, surpassing by 48% that reported by Bosland and Baral (2007) (Fig. 2.3). In 2012, Bosland *et al.*, working with 'Trinidad Moruga Scorpion' cultivated in New Mexico, reported a pungency of 2,009,231 SHU. 'Trinidad Moruga Scorpion', cultivated under the conditions of Yucatan, registered a pungency of 2,368,534 SHU (147.11 mg·g⁻¹ DW), which represents a 15% increase in the content of capsaicinoids (Fig. 2.3). However, the most significant pungency was observed in 'Carolina Reaper' cultivated in the state of Yucatan. This cultivar registered 3,006,330 SHU, with a content of 186.73 mg·g⁻¹ DW total capsaicinoids, which represents a 27% increase in the content of capsaicinoids in comparison with those reported in the Guinness Book of World Records (PuckerButt Pepper Company, 2013).

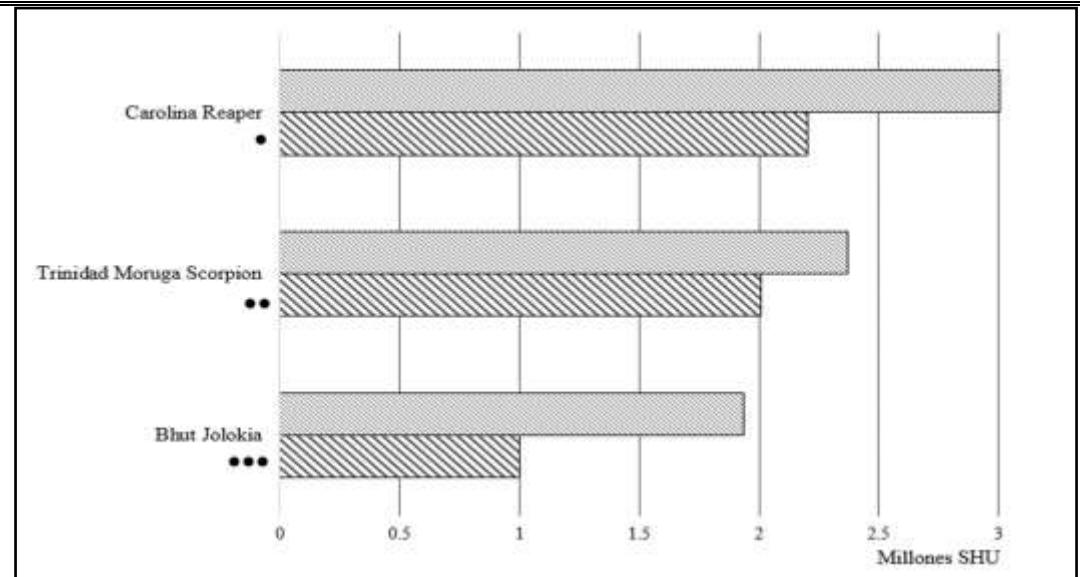


Figure 2.3 Pungency (SHU) of the varieties analyzed in this study compared to those reported by • (PuckerButt Pepper Company, 2013); •• Bosland, Coon, and Reeves (2012); ••• Bosland and Baral (2007).

It has been documented by different authors that the accumulation of capsaicinoids and the pungency of the pepper is influenced by different factors, including genotype, environment conditions, nutritional regime, and ripeness of the fruit (Barbero *et al.*, 2014; Zewdie and Bosland, 2000). Tiwari *et al.*, (2005) compared the capsaicin and dihydrocapsaicin content in Bhut Jolokia cultivated in two regions of India Tezpur (Assam) and Gwalior (Madhya Pradesh) with different climatic conditions. Their results showed that the pungency of the pepper was reduced by more than 50% in Gwalior, a dry region of India, which demonstrates the effect of environmental conditions on pepper pungency. Duelund and Mouritsen (2017) quantified the content of capsaicinoids in 'Carolina Reaper' cultivated in Denmark. They obtained a pungency of 1,046,000 SHU, which was low compared to our result (3,006,330 SHU).

In a study conducted by Canto-Flick *et al.*, (2008), the content of capsaicinoids from 18 accessions of Habanero pepper collected in the Yucatan, Mexico, was determined. They reported pungency values between 405,228 SHU and 892,719 SHU, which are significantly greater than the reports made for Habanero pepper grown in other regions of Mexico (Orellana- Escobedo *et al.*, 2013). Similarly, our results allow inferring that the capsaicinoids are highly influenced by the environment and that the edaphoclimatic conditions of the Yucatan Peninsula exert a favorable effect for the increase of these compounds in these species.

2.5 CONCLUSIONS

Given that the Habanero pepper cultivated in the Yucatan Peninsula has been distinguished with the Denomination of Origin in 2010 for its pungency, aroma, and flavor attributes conferred by the edaphoclimatic conditions of the region the results of this study corroborate that pungency is greatly affected by the environment, including climate and soil conditions. We analyzed the three pepper cultivars Bhut Jolokia, Trinidad Moruga Scorpion, and Carolina Reaper that have been published in the Guinness Book of World Records, at different times, for being the hottest peppers in the world. When these cultivars were grown in the Yucatan, their capsaicinoid content increased by 48%, 15%, and 27%, respectively. ‘Carolina Reaper’, currently considered the hottest in the world (2,200,000 SHU), when cultivated in Yucatan reached a pungency of 3,006,330 SHU.

We consider it important to emphasize that Yucatan is a particularly privileged region in the world for the cultivation of Habanero pepper, which is distinguished by its high level of pungency. Our results provide solid evidence that, not only is capsaicin production stimulated, but also it is potentiated at significantly greater levels, even in cultivars that have been recognized for their high level of pungency.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO III

SELECTION OF HABANERO PEPPER F1 HYBRIDS (*Capsicum chinense* Jacq.) AT THE PENINSULA OF YUCATAN, MEXICO WITH A HIGH POTENTIAL FOR DIFFERENT MARKETS

*Liliana S. Muñoz-Ramírez¹, *Laura P. Peña-Yam¹, Martha A. Alvarez -Gil², Lourdes G. Iglesias-Andreu³, Susana A. Avilés-Viñas¹, Adriana Canto-Flick¹, Adolfo Guzmán-Antonio¹, Nancy Santana-Buzzy^{1**}

¹ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida, CP 97205, Yucatán, México.

² Dpto. Genética y Mejoramiento de Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), gaveta postal 1 San José de las Lajas, Mayabeque, CP 32700, Cuba.

³ Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte. Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101. Colonia Emiliano Zapata, CP.91090, Veracruz, México.

**Correspondence: buzzy@cicy.mx

*The first two authors contribute equally to this work

- ESTE CAPÍTULO HA SIDO PUBLICADO EN LA REVISTA AGRICULTURE

CAPÍTULO III

3.1 ABSTRACT

This study evaluated 29 F1 lines and the 11 genotypes of habanero peppers used in the crossbreeding program developed by the Scientific Research Center of Yucatan, México. A randomized complete block design with four repetitions was used. Eight plants of each of the genotypes were studied per block. A total of 22 qualitative and 18 quantitative descriptors established in the manuals of the International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) and the National Service for Seed Inspection and Certification (SNICS) was used. The multiple correspondence analysis of the qualitative traits explained 38.2% of the total variability. The trait that contributed the most to the qualitative variability identified was the presence of anthocyanins in the node. Principal component analysis showed that the first two axes explained 85.1% of the total variability and that capsaicin content and fruit pericarp thickness were the major contributors to the variation recorded. Based on these results, four F1 hybrids of habanero pepper were selected because of their promising traits for the different markets, i.e., high productive potential and/or high pungency. These traits are described in the section on Results.

Key words: Diversity, hybrid, pungency, habanero pepper.

3.2 INTRODUCTION

All peppers belong to the *Capsicum* genus, which includes around 42 species with broad diversity in the shape, color, and size of the fruit, and in the sensory attributes such as taste, aroma and hotness [1], which make them stand out from the rest of plants used as spices. Only five of these species have been domesticated and cultivated: *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens*, and *C. chinense* Jacq. [2]. Besides being used fresh and in a broad variety of dishes in international cuisine, chili peppers are a raw material of many industries; among them the food industry (powder, pastas, sauces), the military (self-defense sprays, projectiles), pharmaceutical (creams, sprays, patches, ointments), and chemical (protective coatings for electrical wires and as an additive in ship paints) [3–5]. Habanero pepper is widely cultivated in the Yucatan peninsula, a region in Mexico acknowledged as the center of genetic diversity of the species (*Capsicum chinense* Jacq.). Its aroma, taste and hotness, set it apart from the habanero peppers grown in any other part of the world. In 2010, these attributes earned it the denomination of origin “Habanero pepper of the Yucatan peninsula” [6]. Habanero pepper pungency is classified between 100,000 and 300,000 Scoville Heat Units (SHU) [7]. However, the native varieties of southeastern Mexico are considered among the hottest in the world, with pungency ranging between 145,950 and 892,719 SHU [8], probably due to the edaphoclimatic conditions of the region.

Recently, Muñoz-Ramírez et al. [9] evaluated the pungency of ‘Bhut Jolokia’, ‘Trinidad Moruga Scorpion’ and ‘Carolina Reaper’ peppers cultivated at Yucatan, Mexico, which have been published in the Guinness Book of World Records at different periods of time as the hottest peppers in the world [10,11], and the three varieties significantly surpassed the pungency for which they were originally acknowledged. The ‘Carolina Reaper’, grown in Yucatán and regarded as the hottest variety in the world with 2,200,000 SHU, reached 3,006,330 SHU. This allows the inference that in the region of the Yucatan peninsula some of the attributes of habanero pepper, particularly hotness, may be exacerbated. Despite the economic, social and cultural importance of the crop, no improved varieties of habanero peppers had been developed until recently to increase fruit yield and quality while preserving the traits that distinguish Yucatan’s habanero pepper from those grown in other parts of the world.

Paradoxically, the yield of the native varieties of habanero pepper are low, fruits are small and heterogeneous, and fruits from the same plant may present different numbers of locules (2–4). For the last 15 years, special attention has been paid to the genetic

CAPÍTULO III

improvement and technological development of the habanero pepper in southeastern México. Pungency is one of the most important traits considered in the improvement efforts that have been conducted. Canto-Flick et al. [8] worked with a collection of native habanero peppers and determined the capsaicinoids content of 18 accessions collected at the Yucatan peninsula. Whole fruit, placenta, and pericarp total capsaicinoids contents were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The 18 accessions of habanero peppers assessed had a great variety of colors, shapes and sizes of the fruits. The results showed that 83.3% of the collection exceeded the pungency levels reported for habanero peppers [11] from other regions of the world. Interestingly, 33% of the accessions surpassed 500,000 SHU and 44.4% recorded above 600,000 SHU. A pungency level of 892,719 SHU was recorded in the whole fruit of accession NP1EG (yellow habanero), and the pericarp of accession NP3EC (orange habanero) reached 1,382,889 SHU. The pungency levels of both cultivars (NP1EG and NP3EC) were like those of ‘Bhut Jolokia’, but their shape and color were noticeably different, sharing the physical traits of the habanero peppers typical of the region.

In 2018, Santana-Buzzy et al. [12] presented ‘Mayan Kisin’, a high-yielding, red-fruited habanero hot pepper variety (*C. chinense* Jacq.). It is characterized by its high performance, and its bright red and very spicy fruits. ‘Mayan Kisin’ was the result of four selection cycles carried out on landraces collected in the region of Valladolid, in the state of Yucatan, Mexico. A study by Peña-Yam et al. [13] estimated the genetic parameters of seven agronomic characteristics for 11 habanero pepper genotypes. The aim of the study was to select potential progenitors to produce F1 hybrids. They found high values of the phenotypic coefficient of variation (PCV) of capsaicin content (CC). Heritability (h^2) was high (0.98) for yield per plant (YP) and CC (0.93). The principal component analysis (PCA) revealed that the first three components explained 94.02% of the total variation; hence genotypes with high yield and high fruit weight (FW) were obtained (AKN-08, ASBC-09). The genotypes with a greater content of capsaicin were MBI-11 and RES-05. The fruit of RNJ-04 had the greatest length. The greatest number of fruits per plant belonged to genotypes NBA-06, RKI-01, RHC-02, RHN-03, NKA-07, and MSB-12. Thus, the studied genotypes were found to be an excellent source of genetic material for habanero pepper improvement programs. Knowledge of the reproductive biology of a species is crucial to develop an efficient program of genetic improvement by hybridization. Peña-Yam et al. [14] conducted the first reported study on the floral biology of the habanero pepper. The aim of the study was to establish the best times to collect pollen, assess its viability and define the development state of the flower bud in which the anthers are closed and stigma is

receptive. The goal was to use the acquired knowledge in the implementation of the crossbreeding program. The objective of the present study was to select, from among the diversity of habanero peppers in the region, F1 hybrids of high productivity, hotness, and potential for both the fresh and the industrial markets.

3.3 MATERIALS AND METHODS

A total of 29 F1 lines obtained by a Top Cross design were evaluated; 11 improved varieties of habanero pepper that were used as progenitors in the breeding program were also assessed (Figure 3.1). The improved varieties were obtained within the habanero pepper genetic improvement program developed in the Scientific Research Center of Yucatan (CICY) and are registered in the National Catalogue of Vegetables Varieties (CNVV).



Figure 3.1 Evaluated F1 lines and the progenitors of habanero peppers. (Numbers H1 – H29 correspond to F1 lines and numbers P30 – P41 correspond to progenitors).

CAPÍTULO III

A randomized complete blocks experimental design with four repetitions was used, assessing 10 fruits per replica. The plants grew under greenhouse conditions in the Scientific and Technological Park of Yucatan, located in Sierra Papacal, Merida, Yucatan at 21°07'20" N 89°43'41" O, at an altitude of 9 m above sea level, in the period between June 2018 and March 2019. Plants were transplanted into 1 m long bags (Pelemix, Guadalajara, México). The substrate was a thick and fine mix of coconut fiber in a 70:30 proportion; the distance between plants and rows was 20 cm and 160 cm, respectively. Total of eight plants of each genotype were randomly selected from each block and 22 qualitative and 18 quantitative traits were evaluated using the descriptors referenced in the IPGRI Manual [15] for Capsicum, and the SNICS Manual [16] for habanero pepper (*C. chinense* Jacq.) (Table 3.1).

Table 3.1 Qualitative and quantitative traits used to evaluate F1 lines and progenitors of habanero peppers, according to the IPGRI Manual (1995) and the SNICS Manual (2015).

Acronym	Descriptors	Unit/Scores
Qualitative descriptors		
NFA	Number of flowers per axil (IPGRI)	1: one, 2:two, 3: three or more, 4: many flowers in bunches
FP	Flower position (IPGRI)	3: pendant, 5: intermediate, 7: erect
CCO	Corolla color (IPGRI)	1: white, 2: Light yellow, 3: Yellow, 4: Yellow-green, 5: Purple with white base, 6: White with purple base, 7: White with purple margin, 8:Purple, 9:other
CA	Color of anthers (SNICS)	3: violet, 5: violet blue, 7: blue
FC	Filament color (SNICS)	1: light green, 2: yellow green, 3:light blue violet, 4: violet, 5: blue
STE	Stigma exertion (IPGRI)	3: inserted,5: same level ,7: exserted
ACN	Anthocyanin coloration of nodes (SNICS)	1: absent 3: weak, 5:medium, 7: strong
SS	Stem shape (SNICS)	1: cylindical 2: angled
IGC	Intensity of Green color (SNICS)	3: light, 5:medium, 7: dark
LS	Leaf shape (SNICS)	1: lanceolate, 5: ovate, 7: broad ovate
TL	Texture of leaf blade (rugosity) (SNICS)	3: weak,5: moderadate,9: strong
LP	Leaf position (SNICS)	1: erect, 2: horizontal
LBM	Leaf blade margin (IPGRI)	1: entire, 2: undulate, 3: ciliate
IFC	Immature fruit color (SNICS)	3: light green, 5: green, 7: dark green
RFC	Ripe Fruit Color (SNICS)	2: yellow, 4:orange, 5: red, 6: greyed purple
FS	Fruit shape (SNICS)	1: triangular, 2: campanulate, 3: square, 4: rectangular
FST	Fruit surface texture (SNICS)	1: smooth, 2: slightly wrinkled, 3: strongly wrinkled
FSA	Fruit shape of apex (SNICS)	1: acute, 3: rounded, 5: depressed, 7: depressed and acute
MC	Margin of calyx (SNICS)	1: entire, 2: crenate, 3: dentate
FUS	Fruit undulation in cross section (SNICS)	3: weak, 5: medium, 7: strong
DPF	Density of placenta of fruit (SNICS)	3: laxa, 5: semi-distributed, 7: compacta
NL	Number of loculi (SNICS)	2: two, 3: three, 4: four, 5: five
Quantitative Descriptors		
G%	Germination IPGRI	Registered on 7, 10, 15, 18 and 21 days
PH	Plant height (cm) IPGRI	Recorded when in 50% of the plants the first fruit has begun to ripen
SL	Stem length (cm) SNICS	Height to first bifurcation. Measured immediately after first

		harvest
SD	Stem diameter (cm) SNICS	Measured in the middle part to first bifurcation, immediately after first harvest
LLB	Leaf: length of blade (cm) SNICS	Measured in the leaves that belong to the middle part of the plant, after the first harvest.
LWB	Leaf: width of blade (cm) IPGRI, SNICS	Measured on the widest part of the leaf.
LLP	Leaf: length of petiole (cm) SNICS	Measured in the leaves that belong to the middle part of the plant, after the first harvest.
DFL	Days to flowering (IPGRI)	Number of days from sowing/transplanting until 50% of plants have at least one open flower
DFR	Days to fruiting (IPGRI)	Number of days from transplanting until 50% of the plants bear mature fruits at the first and second bifurcation
FL	Fruit length (cm) IPGRI	Average fruit length of 10 ripe fruits of the second harvest
FWI	Fruit width (cm) IPGRI	Measured at the widest point. Average fruit width of 10 ripe fruits of the second harvest
FW	Fruit weight (g) IPGRI	Average fruit weight of 10 ripe fruits of the second harvest
FWT	Fruit wall thickness (cm) IPGRI	Average fruit weight of 10 ripe fruits of the second harvest
FPL	Fruit pedicel length (cm) IPGRI	Average fruit weight of 10 ripe fruits of the second harvest
FTP	Fruit: thickness of pedicel (cm) SNICS	Average fruit weight of 10 ripe fruits of the second harvest
NSF	Number of seeds per fruit (IPGRI)	Average of at least 10 fruits selected from random plants
FYP	Fruit yield/plant (g·plant ⁻¹)	Fruit yield average on 10 plants
CC	Capsaicin content in mg·g ⁻¹ of dry weight (DW)	Twenty fruits of each variety from random plants, extraction and quantification by the Collins <i>et al.</i> (1995) method.

2.1. Capsaicinoids Extraction and Quantification. The extraction and quantification of capsaicinoids followed the methodology reported by Collins *et al.* [17] with slight modifications. The separation and quantification of the capsaicinoids was conducted by HPLC (Agilent series 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with an automatic injector and a fluorescence detector. The capsaicinoids were separated by a Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) column (4.6mmi.d. × 250 mm) at a temperature of 25 °C and an injection volume of 20 µL. The wavelengths used for the detection were 280 nm (excitation) and 338 nm (emission). The mobile phase was isocratic with 70% of solvent B (100% methanol) and 30% of solvent A (10% methanol solution v/v). The HPLC operating conditions to determine total capsaicinoids were flow rate of 1 mL/min and 15 min runtime. Standards of capsaicin and dihydrocapsaicin were used to develop a calibration curve based on the relationship of the maximum areas for the known concentrations of external standards. The stock solution was prepared in 100% (v/v) methanol and five different concentrations (20, 60, 100, 200, and 300 ppm) were used to generate the calibration curve. The concentrations of the two major capsaicinoids (capsaicin and dihydrocapsaicin) were estimated using the calibration curve obtained. The concentration of capsaicinoids is reported in milligrams per gram of dry weight (DW).

2.2. Statistical Analyses. The data obtained from the qualitative traits were subjected to a multiple correspondence analysis (MCA), while data obtained from the quantitative traits

CAPÍTULO III

were processed by variance analysis and the means were contrasted using the t Tests LSD (least significant difference) with $p < 0.05$ in order to determine the significance of the differences among variables. The associations between quantitative traits were determined using Pearson's correlation. The principal component analysis (PCA) used a traits correlation matrix. PCA results were plotted in a bidimensional plane. This was done with the IBM SPSS Statistics version 22 [18]. For the traits showing the greater contribution to variation in the PCA, a Euclidean distance matrix was calculated based on standardized data for cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) [19].

3.4 RESULTS

3.1. Variation of Qualitative Traits. The results of the analysis of the 22 qualitative traits assessed in 29 F1 Lines and 11 progenitors of habanero pepper (Table 3.2) showed that 82.5% of the genotypes presented three or more flowers per axil (NFA); the position of the flower (PF) was in the middle in most of the genotypes (55%). The anthocyanin color of the node (ACN) was absent in only 7.5% of assessed progenitors and F1 lines. The predominant shape of the stem (SS) was cylindrical (80%), and 80% of genotypes had an oval leaf shape (LS) while the shape of the rest was lanceolate. The predominant leaf position (LP) was horizontal (55%), and 95% had a ciliated leaf blade margin (LBM).

Table 3.2 Percentage of distribution of the 22 qualitative traits in F1 lines and progenitors of habanero peppers.

Descriptor	Descriptor occurrence frequency (%)			
NFA	Three or more = 82.5	Many flowers in bunches = 17.5		
FP	Intermediate = 55	Erect = 45		
CCO	Light yellow = 15	Yellow = 82.5	Yellow-green = 2.5	
CA	Violet = 85	Violet blue = 2.5	blue = 12.5	
FC	Light green = 77.5	Yellow-green = 12.5	Violet = 10	
STE	Same level = 25	Exserted = 75		
ACN	Absent = 7.5	Weak= 37.5	Medium = 32.5	Strong = 22.5
SS	Cylindrical = 80	Angled = 20		
IGC	Light = 7.5	Medium = 42.5	Dark = 50	
LS	Lanceolate = 20	Ovate = 80		
TL	Weak = 62.5	Moderated = 37.5		
LP	Erect = 45	Horizontal = 55		
LBM	Ciliate = 95	Undulate = 5		
IFC	Light green = 10	Green = 45	Dark green = 45	
RFC	Yellow = 5	Orange = 7.5	Red = 82.5	Purple = 5
FS	Triangular = 45	Campanulate = 10	Square = 17.5	Rectangular = 27.5
FST	Smooth= 67.5	Slightly wrinkled = 25	Strongly wrinkled = 7.5	
FSA	Acute = 42.5	Rounded = 22.5	Depressed = 35	
MC	Entire = 80	Dentate = 20		

FUS	Weak = 20	Medium = 60	Strong = 20
DPF	Laxa = 17.5	Semi-distributed = 80	Compact = 2.5
NL	two = 2.5	Three = 82.5	Four = 15

Abbreviations are as in Table 3.1.

As to the color of the fruit, three different color shades were apparent in the immature fruit (IFC), with a predominance of green and dark green colors (45%). The genotypes of plants with ripe fruits of different colors (RFC)—yellow, orange, red and purple—were identified. Red was the most frequent color (82.5%) in the assessed genotypes. The shape of the fruit (FS) also exhibited great diversity. The most common was the triangular shape (45%), followed by the rectangular (27.5%); bell and square shapes were found with less frequency (10% and 17.5%, respectively). A total of 42.5% of the fruits had pointed apex (FSA). The smooth texture of the pericarp (FST) was most common (67.5%). Most of the fruits had three loculi (NL) with the density of the placenta (DPF) semi-distributed (80%). Data of the qualitative descriptors itemized for the F1 lines and the progenitors of habanero peppers are shown in Table S1.

Multiple Correspondence Factorial Analyses. The results of the multiple correspondence analyses (MCA) performed for the 22 qualitative traits evaluated in the 40 genotypes of habanero pepper identified two dimensions that explain 38.2% of the total variability (Table 3.3). The traits that contributed the most to axis 1 were anthocyanin coloration of nodes (ACN), the margin of the calyx of the fruit (MC), leaf position (LP), fruit shape (FS) and fruit undulation in cross-section (FUS). The traits contributing most to the second axis were leaf blade margin (LBM), the shape of the fruit apex (FSA) and fruit surface texture (FST).

Table 3.3 Results of the multiple correspondence analysis (MCA) carried out from the qualitative and quantitative traits of the assessed F1 lines and progenitors of habanero pepper.

Descriptors	Dimension	
	1	2
NFA	0.026	0.002
FP	0.059	0.229
CCO	0.103	0.112
CA	0.043	0.142
FC	0.199	0.202
STE	0.230	0.040
ACN	<u>0.758^z</u>	0.319
SS	0.090	0.124
IGC	0.303	0.000
LS	0.165	0.200
TL	0.089	0.001
LP	<u>0.406</u>	0.003
LBM	0.080	<u>0.426</u>
IFC	0.116	0.145

CAPÍTULO III

RFC	0.170	0.167
FS	<u>0.397</u>	0.314
FST	0.215	<u>0.360</u>
FSA	0.297	<u>0.420</u>
MC	<u>0.498</u>	0.084
FUS	<u>0.334</u>	0.057
DPF	0.184	0.194
NL	0.102	0.007
Total active	4.864	3.548
% variance	22.109	16.126
Total		38.235

^zThe underlined descriptors are those with the highest contribution in each dimension. Abbreviations are as in Table 3.1.

Figure 3.2 shows the distribution of the F1 lines and progenitors, as well as the modalities of the traits with a major contribution to axes 1 and 2. As can be appreciated, P33 and P34 move significantly away from the rest of the group. Both genotypes differ from the rest because their pericarps are markedly rugged (fruit surface texture), and their leaf blade margins undulated, in notable contrast with the rest of the genotypes.

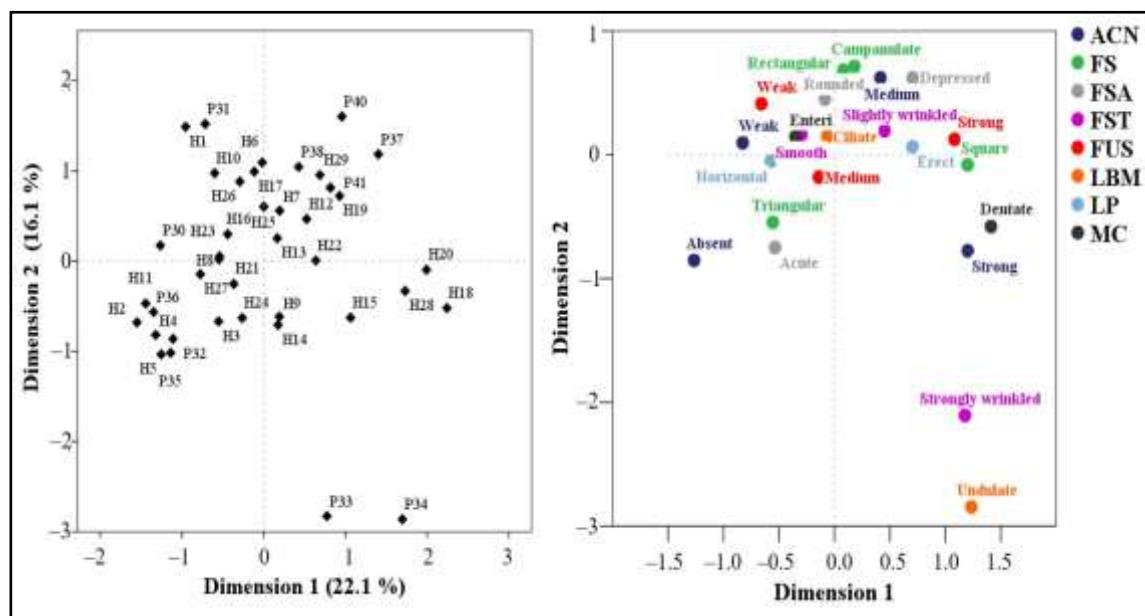


Figure 3.2 Distribution of the assessed F1 lines and progenitors, as well as the modalities of the main traits contributing to the axes 1 and 2, observed from the multiple correspondence analyses (MCA). ACN: Anthocyanin coloration of nodes, FS: Fruit shape, FSA: Fruit shape of apex, FST: Fruit surface texture, FUS: Fruit undulation in cross section, LBM: Leaf blade margin, LP: Leaf position, MC: Margin of calyx.

3.2. Variation of the Quantitative Traits. As can be seen in Table 3.4, most of the evaluated quantitative traits exhibit high variability, with the exception of the thickness of the pedicel of the fruit (FTP) that did not differ significantly ($p < 0.05$), so the trait was not considered in the principal component analysis (PCA).

Table 3.4 Analysis of variance (ANOVA) of the quantitative traits of the evaluated genotypes of habanero pepper.

Traits	Mean squares			
	df	Replication	Genotype	<i>p</i> -value
		3	39	
G (%)	18.23	514.75*	11.45	0
PH (cm)	47.19	900.77*	55.5	0
SL (cm)	12.78	103.96*	7.03	0
SD (cm)	0.014	0.115*	0.008	0
LLB (cm)	2.05	4.45*	0.512	0
LWB (cm)	0.874	1.55*	0.120	0
LLP (cm)	0.951	0.621*	0.09	0
DFL	60.91	132.65*	1.97	0
DFR	8.75	122.5*	0.67	0
FL (cm)	1.34	2.39*	0.67	0
FWI (cm)	0.868	1.20*	0.34	0
FW (g)	9.66	28.20*	5.05	0
FWT (cm)	0.031	0.007*	0.002	0
FPL (cm)	0.097	0.111*	0.066	0.019
FTP (cm)	0.073	0.004	0.004	0.634
NSF	156.75	101.8*	42.53	0
FYP (g·plant ⁻¹)	7519	199983866.76*	13185.38	0
CC (mg·g ⁻¹ DW)	0.0116	2608.631*	0.161	0

*Significant difference ($p < 0.05$), df: degrees of freedom. Abbreviations are as in Table 1.

The results of the analysis of variance carried out for the evaluated traits in the plants and leaves are presented in Table 5. The germination values of F1 lines ranged between 60% and 100%, similar to those recorded for the progenitors (62–94%). Lines H8 and H22 showed 100% germination. The progenitor P34 had the greatest height (155.3 cm), while the lowest height (87.2 cm) belonged to Line H11. Variation was also found for the following traits: stem diameter (SD), with values ranging between 0.99 and 1.9 cm; length of blade (LLB) and width of blade (LWB) showed variations between 9.45 and 15 cm and between 5.2 and 8 cm, respectively; the length of the leaf petiole (LLP) variation values oscillated from 2.5 to 4.35 cm. Line H20 had the highest values for the traits of stem diameter (SD), length of blade (LLB) and width of blade (LWB) (Table 3.5).

Table 3.5 Variation in the morphoagronomic traits evaluated in F1 lines and progenitors of habanero pepper.

F1 Lines	Plant traits	Leaf traits

CAPÍTULO III

No.	Cross	G (%)	PH (cm)	SL (cm)	SD (cm)	LLB (cm)	LWB (cm)	LLP (cm)
H1	P31 x P30	75 jk	104.8 lmnopq	45.4 klmno	1.31 defgh	12.5 ghijklm	6.15 ijklm	3.15 lmn
H2	P32 x P30	88 ef	142.7 bc	52.7 bcd	1.09 lmn	13.7 bcd	6.3 ghijklm	3.5 efgijlk
H3	P33 x P30	85 fg	111.9 hijklmn	55.5 b	1.16 ijklm	13.05 cdefg	6.15 jklm	3.45 fghijk
H4	P35 x P30	60 o	97 pqrs	46.6 ijklnn	1.16 ijklm	13.1 cdefg	6.8 defgh	3.35 ghijkl
H5	P36 x P30	68 mn	121.1 efg	50.6 cdefgh	1.14 ijklm	12.35 hijklm	6.3 ghijklm	3.85 cde
H6	P37 x P30	83 gh	113.5 ghijklmn	51.5 cde	1.15 ijklm	13.9 bc	6.55 defghij	3.2 jklm
H7	P38 x P30	80 hi	123.2 defg	47.8 fghijkl	1.19 hijklm	12.2 hijklmn	6.25 hijklm	3.6 defghi
H8	P40 x P30	<u>100 a</u>	104.2 mnopq	49.2 defghij	1.25 efgi	12.35 hijklm	6.9 cdef	3.25 hijkl
H9	P30 x P34	78 ij	122.4 efg	<u>62.4 a</u>	1.16 ijklm	13.65 bcdef	7.1 bcd	3.55 defghij
H10	P30 x P31	83 gh	93.5 rs	39.2 qrs	1.2 hijklm	14.25 ab	7.45 abc	3.6 defghi
H11	P30 x P32	75 jk	87.2 s	45 lmn	1.12 ijklm	12.25 hijklmn	6.15 ijkml	2.9 mn
H12	P40 x P31	73 kl	126.7def	46.1 ijklnn	1.35 cdef	14.15 ab	6.7 defghij	3.65 defgh
H13	P40 x P32	83 gh	106.9 jklmnop	42.4 opq	1.22 ghij	11.5 o	5.95 lmn	3.75 cdef
H14	P40 x P33	73 kl	115.1 ghijkl	44.5 lmn	1.37 cde	13.15 cdefg	6.85 defg	3.55 defghij
H15	P40 x P34	93 cd	148.5 ab	54.2 bc	1.37 cde	12.4 ghijklm	6.85 defg	3.35 ghijkl
H16	P40 x P35	80 hi	123 defg	51.2 cdefg	1.41 cd	11.7 klmno	6.4 fghijkl	3.2 jklm
H17	P40 x P36	90 de	120.3 efgi	49 efgijlk	1.35 cdef	12 ijklnno	6.45 fghijkl	3.7 defg
H18	P40 x P37	80 hi	133.4 cd	45.7 jklmnno	1.47 c	12.05 ijklnno	6 klm	3.2 jklm
H19	P40 x P38	95 bc	122.6 efg	45.3 klmno	1.39 cd	11.75 jklmnno	6.05 klm	3.5 efgijk
H20	P41 x P34	67 n	138 jklmnno	44 mno	<u>1.9 a</u>	<u>15 a</u>	<u>8 a</u>	3.5 efgijk
H21	P32 X P31	70 lmn	116.9 fghij	51.5cdef	1.21 hijklm	12.8 defghi	6.05 klm	3.15 klmn
H22	P31 X P33	100 a	120.8 efg	52.3 bcde	1.22 ghij	11.75 jklmnno	6.45 fghijkl	3.75 cdef
H23	P31 X P32	90 de	107.2 jklmnop	46.9 ijklnm	1.11 jklmn	11.65 lmn	5.2 p	3.15 klmn
H24	P37 X P35	98 ab	108.5 jklmnno	47.8 ghijkl	1.17 ijklnm	12.6 ghijkl	6.05 klm	3.45 fghijk
H25	P38 X P35	70 lmn	104.4 mnopq	42 opqr	1.19 hijklm	11.3 no	5.95 lmn	3.5 efgijk
H26	P40 X P35	67 n	128.5 de	42 opqr	1.7 b	14 bc	7.5 ab	4.25 ab
H27	P36 X P35	60 o	106.5 klmnop	45.5 klmno	1.16 ijklnm	12.1 ijklnno	6.25 hijklm	3 lmn
H28	P37 X P40	90 de	115.8 ghijk	40.1 pqrs	1.38 cd	14.25 ab	7.45 abc	4.1 abc
H29	P37 X P36	83 gh	114.2 ghijklm	46.75 ijklnm	1.21 ghijkl	13.65 bcde	6.75 defghi	4.25 ab
PROGENITORS								
P30	RK-01	88 ef	95.9 qrs	47 hijklm	1.23 fghi	11.95 ijklnno	6.1 klm	3.6 defghi
P31	RC-02	72 klm	109.9 ijklnm	46.7 ijklnm	1.23 fhij	13.05 cdefg	6.45 fghijkl	2.9 mn
P32	RN-03	74 jkl	115.3 ghijk	51.9 bcde	1.1 klmn	11.7 klmno	5.35 op	3.2 jklm
P33	RJ-04	94 bcd	130.6 de	49.7 defghi	1.17 ijklnm	12.25 hijklmn	6.2 ijklnm	3.3 hijkl
P34	RS-05	94 bcd	<u>155.3 a</u>	55.5 b	1.39 cd	12.6 ghijkl	6.85 defg	<u>4.35 a</u>
P35	NB-06	88 ef	95.3 qrs	45.6 jklmnno	0.99 n	13.35 bcdefg	6.5efghijkl	3.4 fghijk
P36	NK-07	72 klm	97.3 pqrs	43.2 nop	1.09 nm	11.6 mno	5.4 nop	2.8 no
P37	AK-08	100 a	98.2 opqr	38.6 rs	1.34 defg	12.65 efgijlk	7.1bcd	3.3 hijkl
P38	AS-09	82 ghi	105.7 klmnopq	42.1 opqr	1.31 ijklnm	9.45 p	5.3 op	2.5 o
P40	MB-11	62 o	130.3 de	37.7 s	1.43 cd	11.8 jklmnno	5.8 mno	3.9 bcd
P41	MS-12	90 de	103.2 nopqr	49.3 defghi	1.17 ijklnm	12.7 fghijk	7.05 bcde	3.65 defgh
LSD (0.05)		4.70	10.45	3.67	0.12	0.96	0.59	0.36

G: Germination, PH: Plant height (cm), SL: Stem length (cm), SD: Stem diameter (cm), LLB: Leaf length of blade (cm), LWB: Leaf width of blade (cm), LLP: Leaf length of petiole (cm). The averages within each column followed by the same letter are not significantly different from each other based on the probability level $p < 0.05$ of the LSD.

Germination percentage (G%), days to fruiting (DFR), average fruit length (FL) average fruit width (FWI), fruit weight (FW), number of seeds per fruit (NSF), fruit pericarp thickness (FWT), thickness the pedicel of the fruit (FTP) and the content of capsaicin (CC) are traits closely related with the yield and quality of the fruit [20]. Fruit traits variation for F1 lines

and progenitors are shown in Table 3.6. According to the results, line H22 is characterized by greater fruit length (FL) (average value 5.52 cm), while P41 had the lowest length (3.41 cm). As for fruit width (FWI) and fruit weight (FW), the greater average values were recorded in P38 (4.32 cm and 16.82 g, respectively). P30 was the genotype with the greatest number of seeds per fruit (53.7). Genotype P41 stood out for having the thickest pedicel (FTP), while H7 had the thickest pericarp (FWT). Fruit yield per plant (FYP) showed a wide range of variation (846.78 – 99952.50 g·plant⁻¹); genotype H20 (F1 line) had the highest yield while progenitor P34 had the highest capsaicin content (CC) (147.11 mg·g⁻¹ DW).

CAPÍTULO III

Table 3.6 Variation in the quantitative traits evaluated in F1 lines and progenitors of habanero pepper.

No.	CROSS	FRUIT TRAITS										
		DFL	DFR	FL (cm)	FWI (cm)	FW(g)	FWT (cm)	FPL (cm)	FTP (cm)	NSF	FYP (g·plant ⁻¹)	CC (mg·g ⁻¹ DW)
H1	P31 x P30	26 d	70 b	4.46 jkl	3.20 fghijk	13.61 ef	0.242 cde	3.08 abcde	0.47 abc	48.9 abcde	2803.38 h	53.38 h
H2	P32 x P30	33 c	77 a	4.76 gh	3.14 ghijkl	12.04 j	0.255 bc	2.75 degf	0.41 cdefg	41.9 defghijk	2802.46 h	30.30 v
H3	P33 x P30	33 c	63 c	5.37 ab	2.98 nopq	11.55 k	0.182 qr	3.02 abcdef	0.38 fg	50 abcd	3213.19 e	71.85 e
H4	P35 x P30	33 c	70 b	5.03 de	3.01 lmnop	13.40 efg	0.247 bcde	2.7 gf	0.4 defg	41.6 defghijk	2990.92 f	45.12 k
H5	P36 x P30	26 d	70 b	5.12 cd	3.13 ghijklm	12.71 i	0.237 efg	3.18 abc	0.42 bcdefg	45.5 abcdefg	2964.19 fg	33.61 t
H6	P37 x P30	33 c	63 c	4.89 efg	3.30 ef	12.88 hi	0.240 defg	3.01 abcdefg	0.43 abcdef	50 abcd	2943.13 fgh	39.53 p
H7	P38 x P30	33 c	63 c	3.91 pq	3.87 b	15.12 c	0.247 bcde	2.72 efg	<u>0.49 a</u>	49.3 abcde	3375.54 cd	48.17 i
H8	P40 x P30	33 c	63 c	4.81 g	2.96 opq	10.90 l	0.237 efg	2.69 gf	0.43 abcdef	40.3 fghijk	2813.07 gh	41.99 m
H9	P30 x P34	33 c	63 c	4.63 hi	3.08 jklmno	11.95 j	0.232 fghij	3.28 ab	0.39 efg	45.5 abcdefg	3242.48 de	55.85 g
H10	P30 x P31	33 c	77 a	4.89 efg	3.21 fghi	13.33 fg	0.225 hijk	3.16 bcdegf	0.46 abcd	39.1 ghijk	2619.78 i	30.16 v
H11	P30 x P32	26 d	70 b	4.84 fg	3.05 lmnop	13.34 fg	0.235 efg	2.71 cdegf	0.44 abcdef	49.3 abcde	3416.95 c	31.73 u
H12	P40 x P31	42 b	70 b	4.83 fg	3.21 fghij	12.52 i	0.217 klm	3.33 abcde	0.42 bcdefg	47.9 abcdef	2905.59 fgh	44.02 l
H13	P40 x P32	33 c	63 c	4.19 mn	2.97 nopq	9.83 o	0.217 klm	2.79 abcd	0.42 bcdefg	39.6 fghijk	1865.47 pq	32.30 u
H14	P40 x P33	33 c	63 c	4.98 def	2.87 qr	9.47 op	0.192 pq	3.3 cdegf	0.4 defg	36.9 hijk	2090.69 o	85.05 c
H15	P40 x P34	33 c	63 c	4.06 nop	3.23 fg	12.02 j	0.222 ijkl	3.02 abcdefg	0.45 abcde	40.1 fghijk	1550.25 r	73.54 d
H16	P40 x P35	26 d	63 c	4.40 kl	2.96 opq	9.18 pq	0.202 nop	3.56 degf	0.44 abcdef	37.5 ghijk	1726.72 q	40.78 o
H17	P40 x P36	33 c	77 a	4.45 jkl	3.11 ghijklm	8.91 q	0.207 mno	2.83 cdegf	0.41 cdefg	40 fghijk	2139.69 no	38.81 q
H18	P40 x P37	42 b	70 b	4.75 gh	3.50 d	12.74 hi	0.207 mno	<u>3.22 a</u>	0.39 efg	40.6 efg	2100.85 o	41.70 mn
H19	P40 x P38	42 b	63 a	4.13 no	3.28 ef	13.11 gh	<u>0.277 a</u>	3.3 abcd	0.44 abcdef	52.1 ab	1996.91 op	33.33 t
H20	P41 x P34	42 b	63 a	4.86 fg	3.28 ef	15.58 b	0.260 b	2.93 gf	0.46 abcd	38.8 ghijk	<u>9952.50 a</u>	48.22 i
H21	P32 X P31	26 d	70 b	4.54 ijk	3.22 fgh	12.58 i	0.217 klm	2.84 abcdegf	0.43 abcdefg	38.8 ghijk	2089.06 o	35.32 s
H22	P31 X P33	33 c	63 c	<u>5.52 a</u>	2.87 qr	10.25 n	0.170 rs	3.08 abcd	0.4 defg	35.7 ijk	2808.57 gh	58.36 f
H23	P31 X P32	26 d	77 a	4.62 hij	3.08 ijklmno	12.78 hi	0.230 fghijk	3.09 cdegf	0.41 cdefg	40.4 fghijk	2407.16 jklm	35.41 s
H24	P37 X P35	33 c	63 c	4.85 fg	3.20 fghijk	12.58 i	0.210 lm	2.87 abcdegf	0.42 bcdefg	41.7 defghijk	2386.57 jklm	37.18 r
H25	P38 X P35	26 d	63 c	4.20 mn	3.97 b	13.74 de	0.257 b	2.98 bcdegf	0.43 abcdefg	48 abcdef	3385.87 cd	34.91 s
H26	P40 X P35	42 b	77 a	3.83 q	3.44 d	10.82 lm	0.260 b	2.81 degf	0.44 abcdef	42.9 cdefghij	6940.00 b	29.76 v

H27	P36 X P35	33 c	77 a	4.88 efg	3.08 klmno	11.48 k	0.257 b	2.88 abc	0.43 abcdefg	34.1 k	2821.75 gh	27.33 x
H28	P37 X P40	33 c	70 b	4.80 g	3.40 de	13.69 ef	0.197 nop	3.31 abcdegf	0.46 abcd	43.7 bcdefghi	2538.07 ij	41.40 n
H29	P37 X P36	26 d	70 b	4.52 ijk	3.09 hijklmn	11.51 k	0.210 lmn	3.09 abcde	0.47 abc	51.3 abc	2286.72 mn	46.17 j
PROGENITORS												
P30	RK-01	26 d	70 b	4.90 efg	3.01 mnop	14.10 d	0.220 jklm	2.66 gf	0.44 abcdef	<u>52.7 a</u>	2393.75 jklm	23.68 z
P31	RC-02	33 c	63 c	4.31 lm	3.13 ghijklm	12.72 i	0.195 opq	2.96 abcdegf	0.39 efg	42.5 cdefghij	2342.32 klm	15.71 z
P32	RN-03	26 d	70 b	4.02 op	2.81 r	9.75 o	0.240 defg	3.08 abcde	0.4 defg	41.8 defghijk	2276.00 mn	20.34 z
P33	RJ-04	33 c	70 b	5.28 bc	2.42 s	6.75 s	0.147 t	2.86 cdegf	0.44 abcdef	35.1 jk	1482.29 r	120.38 b
P34	RS-05	33 c	77 a	3.63 r	2.97 nopq	7.77 r	0.165 s	3 abcdegf	0.45 abcde	42.9 cdefghij	846.78 s	<u>147.11 a</u>
P35	NB-06	26 d	77 a	4.81 g	2.94 pq	12.70 i	0.252 bcd	2.95 bcdegf	0.44 abcdef	44.2 bcdefghi	2315.25 lm	28.95 w
P36	NK-07	26 d	70 b	5.03 de	3.01 lmnop	10.46 mn	0.227 ghijk	2.76 degf	0.36 g	45.3 abcdefgh	2501.32 ij	29.09 w
P37	AK-08	33 c	70 b	4.48 ijkl	3.67 c	16.67 a	0.235 efgi	3.19 abc	0.46 abcd	49.3 abcde	2485.28 ijk	26.52 y
P38	AS-09	42 b	70 b	3.62 r	<u>4.32 a</u>	<u>16.82 a</u>	0.277 a	2.98 abcdegf	0.48 ab	50.5 abc	2610.28 i	23.82 z
P40	MB-11	33 c	77 a	4.23 mn	2.95 pq	13.52 ef	0.197 nop	3.08 abcde	0.45 abcde	43.5 bcdefghi	1418.63 r	44.54 l
P41	MS-12	48 a	77 a	3.41 s	3.65 c	9.55 op	<u>0.282 a</u>	2.97 abcdegf	0.49 a	49.1 abcde	2448.00 jkl	21.62 z
LSD (0.05)		0.94	0.94	0.17	0.13	0.38	0.012	0.35	0.06	8.81	161.69	0.568

DFL: Days to flowering, DFR: Days to fruiting, FL: Fruit length (cm), FWI: Fruit width (cm), FW: Fruit weight (g), FWT: Fruit wall thickness (cm). FPL: Fruit pedicel length (cm), FTP: Thickness the Pedicel of the Fruit (cm), NSF: Number of seeds per fruit, FYP: Fruit yield/plant ($\text{g} \cdot \text{plant}^{-1}$), CC: Capsaicin content ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ DW). The averages within each column followed by the same letter are not significantly different from each other based on the probability level $p < 0.05$ of the LSD.

3.2.1. Correlation Analysis. The analysis of the quantitative traits' correlations (Figure 3) indicated that the trait width of blade (LWB) presented a positive and significant correlation with the length of blade (LLB), while fruit width (FWI) correlated negatively with fruit length (FL). On the other hand, fruit width (FWI) had a positive correlation with fruit weight (FW) 0.642. Plant fruit yield (FYP) shows an association with stem diameter (SD), length of blade (LLB) and width of blade (LWB), which allows us to infer that there is a direct relation between the bearing of the plant and the productivity. Capsaicin content (CC) showed a positive and significant correlation (0.557) with plant height (PH), and a negative correlation with fruit pericarp thickness (FWT), with a value of -0.620, which indicates that fruits with a thin pericarp have a greater capsaicin concentration. The values of the correlations can be consulted in Table S2.

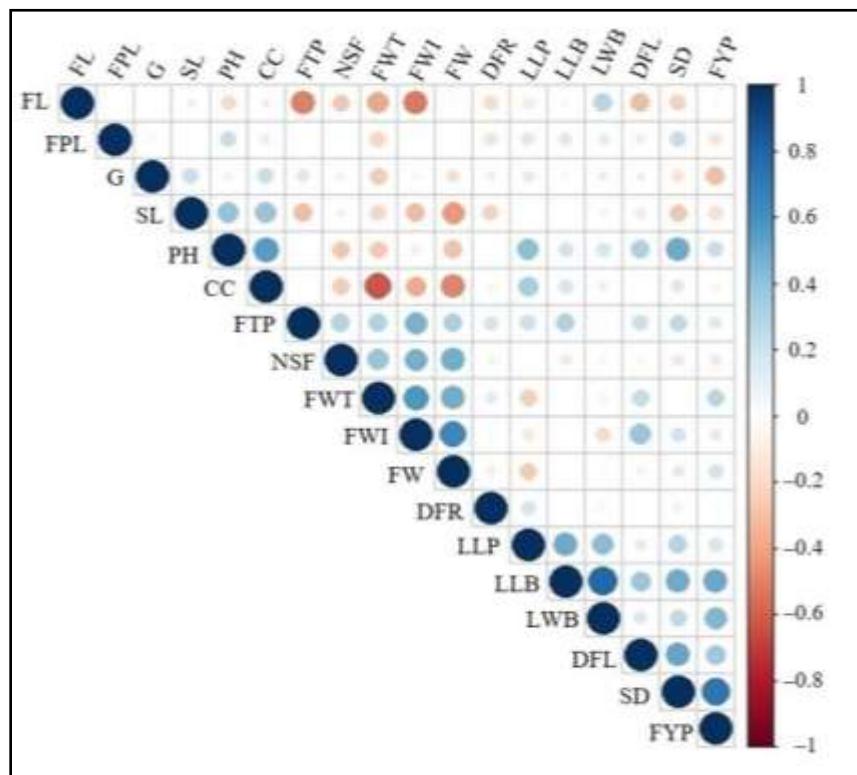


Figure 3.3 Pearson correlation matrix for the 18 quantitative traits of the 29 F1 lines and the 11 progenitors of habanero pepper. FL: Fruit length, FPL: Fruit pedicel length, G: Germination, SL: Stem length, PH: Plant height, CC: Capsaicin content, FTP: Thickness the pedicel of the fruit, NSF: Number of seeds per fruit, FWT: Fruit wall thickness, FWI: Fruit width, FW: Fruit weight, DFR: Days to fruiting, LLP: Leaf length of petiole, LLB: Leaf length of blade, LWB: Leaf width of blade, DFL: Days to flowering, SD: Stem diameter, FYP: Fruit yield/plant.

3.2.2. Principal Component Analysis. Results of the PCA (Table 3.7) showed that the first six axes represented 85.1% of the total variation, and that the first component explained most of the variation (%), ordering the genotypes by capsaicin contents (CC) and by fruit pericarp thickness (FWT). The second principal component was composed of the traits stem diameter (SD) and yield per plant (FYP), the third component was associated with fruit length (FL), the fourth with the number of seeds per fruits (NSF), the fifth component with the pedicel length (FPL), and the sixth component was related to stem length (SL). Figure 3.4 shows the distribution of the evaluated traits for the first two components, according to their contribution to the explained total variation.

Table 3.7 Principal components, own values, self-values, and percentage of explained total variance.

Eigenvalues	Principal components					
	1	2	3	4	5	6
Own values	1.942	1.762	1.328	1.163	1.057	0.938
% Explained variance	0.251	0.207	0.118	0.090	0.074	0.059
% Accumulated variance	0.251	0.458	0.576	0.666	0.799	<u>0.851</u>
Traits						
G (%)	0.118	-0.149	-0.285	0.417	-0.047	0.364
PH (cm)	0.315	0.182	-0.360	-0.236	-0.050	-0.254
SL (cm)	0.249	-0.178	-0.165	0.084	-0.445	<u>-0.602</u>
SD (cm)	0.100	<u>0.460</u>	-0.118	-0.271	0.230	0.106
LLB (cm)	0.190	0.415	0.136	0.298	-0.095	0.052
LWB (cm)	0.194	0.335	0.319	0.360	-0.148	-0.188
LLP (cm)	0.260	0.243	-0.164	0.273	-0.083	0.320
DFL	0.057	0.245	0.015	-0.020	-0.142	0.065
DFR	-0.039	0.261	0.066	-0.241	-0.313	0.051
FL (cm)	0.153	-0.139	<u>0.563</u>	0.180	0.164	-0.117
FWI (cm)	-0.352	0.216	-0.325	0.065	0.043	-0.030
FW (g)	-0.363	0.205	0.065	0.187	0.173	-0.135
FWT (cm)	<u>-0.383</u>	0.177	-0.031	-0.056	-0.330	-0.202
FPL (cm)	0.112	0.079	-0.186	0.198	<u>0.697</u>	-0.451
NSF	-0.279	0.042	-0.242	<u>0.463</u>	-0.128	-0.081
FYP (g·plant ⁻¹)	0.020	<u>0.458</u>	0.180	-0.261	-0.191	0.008
CC (mg·g ⁻¹ DW)	0.395	-0.039	-0.216	-0.031	-0.014	0.072

^z The underlined traits are the ones with the highest contribution in each component. The underlined traits are the ones with the highest contribution in each component. Abbreviations are as in Table 3.1.

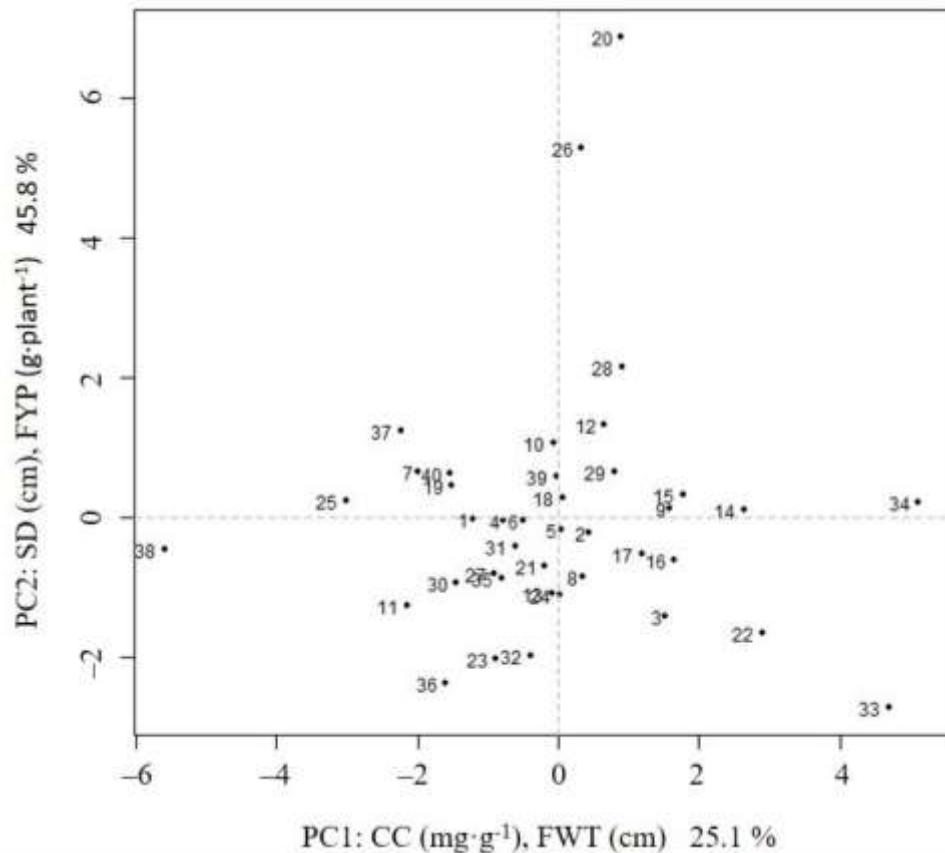


Figure 3.4 Dimensional representation of the distribution of F1 lines and progenitors of evaluated habanero peppers in the first two principal components. (Numbers 1 – 29 correspond to F1 lines H1–H29 and numbers 30 – 41 correspond to progenitors P30 – P41).

3.2.3. Cluster Analysis. Five groups were identified in the dendrogram obtained from the cluster analysis (Figure 3.5) based on the plant and fruit traits, which are described in Table 3.8. As can be seen, the F1 lines H20 and H26, which presented the highest values of stem diameter (SD) and fruit yield per plant (FYP), comprised group 1. Five Lines F1 (H9, H14, H15, H16, and H22) and two progenitors (P33 and P34) were located in group 2, characterized by presenting the highest mean values for stem length (SL), fruit pedicel length (FPL) and capsaicin content (CC). F1 lines (H7, H19 and H25) and two progenitors (P38 and P41) were allocated in group 3, with the highest mean values of fruit pericarp thickness (FWT) and of number of seeds per fruit (NSF). Four F1 lines (H10, H12, H18, and H28) and two progenitors (P37 and P40) with the lowest mean values for stem length (SL) comprised group 4. Group 5 was composed of most of the F1 lines (15) and five progenitors that exhibited the highest values of fruit length (FL).

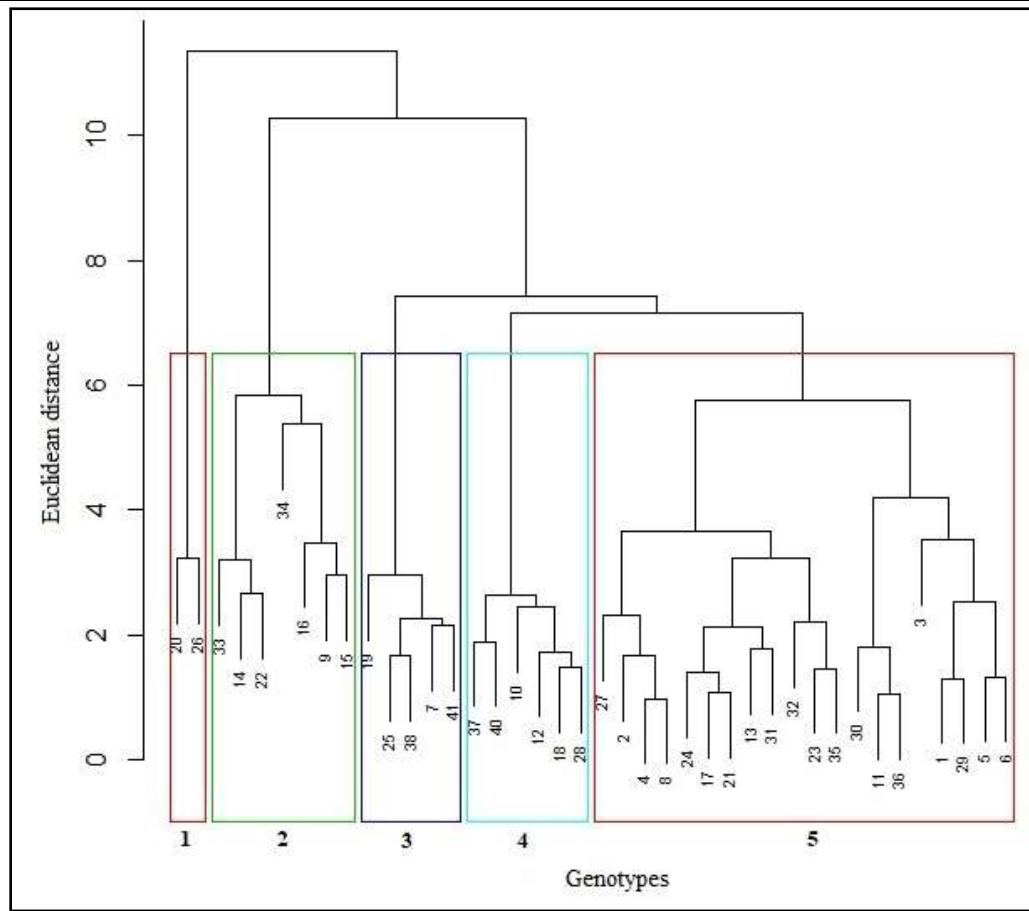


Figure 3.5 Dendrogram of the hierarchical cluster analysis showing the clusters of the 29 F1 lines and 11 progenitors habanero pepper based on the traits with greater contribution to the PCA.

Table 3.8 Mean values of the evaluated qualitative and quantitative traits for each of the groups established by cluster analysis.

GROUPS	SL (cm)	SD (cm)	FL (cm)	FWT (cm)	FPL (cm)	NSF	FYP (g·plant ⁻¹)	CC (mg·g ⁻¹ DW)
Group 1	43.00	1.80*	4.35	0.26	2.87	40.85	33785.00*	38.99
Group 2	52.83*	1.30	4.65	0.19	3.16*	39.10	1963.97	83.01*
Group 3	45.30	1.25	3.85	0.27*	2.99	49.80*	2763.32	32.37
Group 4	41.23	1.36	4.67	0.21	3.22	44.02	2344.70	38.06
Group 5	47.79	1.18	4.77*	0.23	2.88	44.54	2594.50	36.06

* Highest value between groups. SL: Stem length (cm), SD: Stem diameter (cm), FL: Fruit length (cm), FWT: Fruit wall thickness (cm), FPL: Fruit pedicel length (cm), NSF: Number of seeds per fruit, FYP: Fruit yield/plant (g·plant⁻¹) y CC: Capsaicin content in mg·g⁻¹ of dry weight (DW).

3.5 DISCUSSION

The variance analysis of traits with agricultural interest is critical for the development of programs aiming to obtain the varieties and hybrids with high productivity and/or that carry

CAPÍTULO III

other important traits and attributes of agricultural interest [21]. The results of the analysis of the evaluated qualitative and quantitative traits of the 40 genotypes of habanero pepper revealed a broad genetic diversity, which notably fosters the work on the genetic improvement of the crop. As for the variation in the qualitative traits, the behavior of the ACN trait was interesting. Only 7.5% of the evaluated habanero pepper genotypes showed the absence of anthocyanins in the node of the plants, in contrast to what has been reported by Bozokalfa et al. [21] in another species of the genus (*C. annuum* L.). Their study found that node anthocyanins were absent in 47 of the 48 genotypes they assessed. This allows us to infer that, probably, this trait may be associated with the species.

Fonseca et al. [22] studied the genetic diversity of habanero peppers in the Amazon, and observed the predominance of some traits, such as the dark red color of the ripe fruit (42%), triangular-shaped fruits (42.1%) and rugged fruit surface (42.1%), in most of the evaluated genotypes. In our study, the MCA explained 38.2% of the total variability found, and identified some qualitative traits that contributed to clustering the genetic materials in a bidimensional plane. Castellón et al. [23], in a study on variations of native *C. annuum* L. accessions in Oaxaca, Mexico, found that MCA for the examined qualitative variables explained 88.5% of the variability, far higher than the findings in our study, which indicates greater variability in the habanero pepper. These same authors found statistically significant differences for all evaluated variables, except for the number of fruits per plant. In contrast, our study of 18 qualitative traits found that they all differed significantly ($p < 0.05$), except for the thickness of the pedicel of the fruit (FTP).

The width of the fruit (FWI) correlated negatively with fruit length (FL). On the other hand, the descriptor fruit width (FWI) had a positive correlation with fruit weight (FW), with a value of 0.642. Similar results were reported by Bharath et al. [24] and by Sharma et al. [25]. In our study, the trait pericarp thickness (FWT) had a positive association with fruit width (FWI) and fruit weight (FW). Moreira et al. [26] also worked with *C. chinense* and their results were similar to ours. Fruit yield per plant (FYP) shows an association with stem diameter (SD) and length of blade (LLB), indicating a direct influence between the bearing of the plant and the productivity. Likewise, capsaicin content (CC) had a significant positive correlation with plant height (PH), with a value of 0.557, and correlated negatively with fruit pericarp thickness (FWT), with a value of -0.620. Butcher et al. [27] identified an association between capsaicin and fruit wall thickness of -0.083, a lower value than the one we found in our study.

Both the PCA and the cluster analysis provide information showing the presence of an important genetic variability in the set of evaluated genotypes, which agrees with what has been reported by different authors [28,29]. Multivariate analyses have been used widely to evaluate the genetic variability of many crops [30,31]. Bozokalfa et al.'s results [21], including the PCA of the variation of 48 *C. annuum* accessions and lines, showed that the first six axes explained 54.29% of the variability, a value slightly lower than what we found in this study. Finally, the results of the cluster analysis obtained by Bianchi et al. [32] clustered *Capsicum* accessions in eight groups.

Our PCA showed that the traits capsaicin contents (CC), fruit pericarp thickness (FWT), stem diameter (SD) and fruit yield per plant (FYP) contributed the most to the accumulated variation. On the other hand, the cluster analysis generated five groups. Group 1 recorded the highest values for the following traits: Stem diameter (SD) and fruit yield per plant (FYP). Group 2 exhibited the highest values for stem length (SL), fruit pedicel length (FPL) and capsaicin content (CC), while the highest values for fruit pericarp thickness (FWT) and the number of seeds per fruit (NSF) were located in group 3. The lowest mean values for stem length (SL) were found in group 4 and group 5 had the highest value for fruit length (FL).

3.6 CONCLUSION

The Yucatan peninsula is a particularly privileged region of the world for habanero pepper genetic diversity. Based on the analysis of the data of the qualitative and quantitative traits, and taking into account the color, weight, shape and size of the fruit, as well as the yield and capsaicin content, we selected four F1 lines (H7, H14, H20, H27) (Figure 6) because of their high yield potential and/or high pungency. The data presented in this study, associated with productivity and other important traits, as well as the broad morphologic description of the evaluated genotypes, allowed us to identify four F1 lines with high potential for different markets—on one hand, for the fresh fruit market, because of the high fruit quality, attractive colors, pretty shapes and high yields. On the other hand, the market is looking for a reliable and efficient source of high-quality capsaicin for different industries, particularly for the pharmaceutical industry. However, the most relevant result of our study is the fact of being able to obtain for the first time a habanero pepper hybrid (H14) with the greatest content of capsaicin to date (1,300,000–1,500,000 SHU). The hottest peppers in the world are not of the habanero type, and lack the attributes that give the habanero pepper from Southeast Mexico its high demand at international level. The germplasm of the habanero pepper that has

CAPÍTULO III

supported this program of genetic improvement is stored in the Habanero Pepper Gene Bank of the Scientific Research Center of Yucatan (CICY), Yucatan, Mexico.

HYBRID	DESCRIPTION
a)	 HYBRID H14: New hybrid of habanero pepper of dark green color as an unripe fruit and intense red when ripe. Vigorous plant of great height and productive. Short cycle plant (70–75 days). Its fruit is large (4–5 cm), with a triangular shape and low weight (9–10 g), thin and slightly rugged pericarp. Extremely hot (1,300,000–1,500,000 SHU). Recommended for capsaicin extraction.
b)	 HYBRID H7: New habanero pepper hybrid with high yields, bell shape fruits of intense green color when unripe and bright red when ripe. It is very productive, and its fruit is weighty (14–16 g). Short cycle plant (70–75 days). It is characterized by its high pungency (700,000–800,000 SHU). Recommended for the industry.
c)	 HYBRID H20: New hybrid of habanero pepper of dark green color that turns intense red when ripe. Vigorous, short cycle (70–75 days) plant with high yields. Its fruit is large (4–5.5 cm) and very heavy (15–16 g), squared shape as has an excellent shelf life. It is very hot (700,000–800,000 SHU). Recommended for industrial purposes and for capsaicin extraction.
d)	 HYBRID H27: New habanero pepper hybrid with deep green color as an unripe fruit and bright orange when ripe, triangular-shaped (4–5 cm), with long shelf life. Plant with a short cycle of 70 to 75 days. Moderately hot fruit (400,000–500,000 SHU). Recommended for fresh fruit markets.

Figure 3.6 F1 hybrids a) H14, b) H7, c) H20 and d) H27 were selected because of their high productivity potential and high hotness.

REFERENCES

1. Barboza GE, García CC, González SL, Scaldaferro M, Reyes X. Four new species of *Capsicum* (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. *PLoS One.* **2019**, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209792>
2. Adebola PO, Morakinyo JA. Evaluation of morpho-agronomic variability of wild and cultivated kola (Cola species Schott et Endl.) in South Western Nigeria. *Genet Resour Crop Evol.* **2006**, 53(4):687–694. <https://doi.org/10.1007/s10722-004-3558-1>
3. Von Hagen RL, Norris P, Schulte BA. Quantifying Capsaicinoids from Chili Pepper and Motor Oil Mixtures Used in Elephant Deterrent Fences. *Chromatographia* **2020**, <https://doi.org/10.1007/s10337-020-03934-8>
4. Wahyuni Y, Ballester AR, Sudarmonowati E, Bino RJ, Bovy AG. Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *J Nat Prod.* **2013**, 76(4):783–93. <https://doi.org/10.1021/np300898z>
5. Cirlini, M., Luzzini, G., Morini, E., Folloni, S., Ranieri, R., Dall'Asta, C., & Galaverna, G. Evaluation of the volatile fraction, pungency and extractable color of different Italian *Capsicum annuum* cultivars designed for food industry. *Eur Food Res Technol.* **2019**, 245(12):2669–78. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03378-x>
6. Diario Oficial de la Federacion. Declaratoria General de Protección de la Denominación de Origen Chile Habanero de la Península de Yucatán. **2010**. p. 7–12. Available online: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5145315yfecha=04/06/2010 (accessed on 1 october 2020)
7. Fabela-Morón MF, Cuevas-Bernardino JC, Ayora-Talavera T, Pacheco N. Trends in Capsaicinoids Extraction from Habanero Chili Pepper (*Capsicum Chinense* Jacq.): Recent Advanced Techniques. *Food Rev Int.* **2020**, 36(2):105–34. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1630635>
8. Canto-Flick A, Balam-Uc E, Bello-Bello JJ, Lecona-Guzmán C, Solís-Marroquín D, Avilés-Viñas S, Gómez-Uc, E.; López-Puc, G.; Santana-Buzzy, N.; Iglesias-Andreu, L.G. Capsaicinoids content in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Hottest known cultivars. *HortScience.* **2008**, 43(5):1344–9. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.43.5.1344>
9. Muñoz-Ramírez LS, Peña-Yam LP, Avilés-Viñas SA, Canto-Flick A, Guzmán-Antonio AA, Santana-Buzzy N. Behavior of the hottest chili peppers in the world cultivated in Yucatan, Mexico. *HortScience.* **2018**, 53(12):1772–5. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13574-18>
10. Bosland PW, Coon D, Reeves G. “Trinidad Moruga Scorpion” pepper is the world’s hottest measured Chile pepper at more than two million Scoville heat units. *HortTechnology.* **2012**, 22(4):534–8. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.22.4.534>
11. Bosland PW, Baral JB. “Bhut Jolokia” - The world’s hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *HortScience.* **2007**, 42(2):222–4. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.42.2.222>
12. Santana-buzzy N, Canto-flick A, Balam-uc E. ‘ Mayan Kisin ’, a High-yielding , Red-fruited ,

CAPÍTULO III

- Habanero-type Hot Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Cultivar. *HortScience*. **2016**, 51(5):604–5. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.5.604>
13. Peña-Yam LP, Muñoz-Ramírez LS, Avilés-Viñas SA, Canto-Flick A, Pérez-Pastrana J, Guzmán-Antonio A, Santana-Buzzy, N.; Aguilera-Cauch, E.A.; Mijangos-Cortés, J.O. Analysis of genetic parameters of habanero pepper (*Capsicum chinense* jacq.) in the yucatan, Mexico. *HortScience*. **2019**, 54(3):429–33. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13710-18>
14. Peña-Yam LP, Muñoz-Ramírez LS, Avilés-Viñas SA, Canto-Flick A, Guzmán-Antonio A, Santana-Buzzy N. Floral biology studies in habanero pepper (*Capsicum chinense* jacq.) to implement in a cross-breeding program. *Agric*. **2019**, 9(12). <https://doi:10.3390/agriculture9120249>
15. IPGRI. Descriptors for capsicum. International, Plant Genetic Resources Institute, editors. Rome, Italy: *International Plant Genetic Resources Institute*; **1995**, 1–110 p.
16. SNICS. Manual grafico para la descripción varietal de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). **2015**, 28p.
17. Collins MD, Wasmund LM, Bosland PW. Improved method for quantifying capsaicinoids in *Capsicum* using high-performance liquid chromatography. *HortScience*. **1995**, 30(1):137–9. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.1.137>
18. IBM. IBM SPSS Statistics for Windows. NY, USA,: IBM Cor: Armonk; **2013**.
19. Mohammadi SA, Prasanna BM. Analysis of genetic diversity in crop plants - Salient statistical tools and considerations. *Crop Sci*. 2003,43(4):1235–48. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.1235>
20. Orobiyi A, Loko LY, Sanoussi F, Agré AP, Korie N, Gbaguidi A, Adjatin, A.; Agbangla, C.; Dansi, A. Agro-morphological characterization of chili pepper landraces (*Capsicum annuum* L.) cultivated in Northern Benin. *Genet Resour Crop Evol*. **2018**, 65(2):555–69. <https://doi.org/10.1007/s10722-017-0553-x>
21. Bozokalfa MK, Eşiyok D, Turhan K. Patterns of phenotypic variation in a germplasm collection of pepper (*Capsicum annuum* L.) from Turkey. *Spanish J Agric Res* **2009**, 7(1):83–95. www.inia.es/sjar
22. Fonseca RM, Lopes R, Barros WS, Lopes MTG, Ferreira FM. Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accessions along the upper Rio Negro - Amazonas. *Crop Breed Appl Biotechnol*. **2008**, 8:187–94. DOI: 10.12702/1984-7033.v08n03a02
23. Castellón Martínez E, Carrillo-Rodríguez JC, Chávez-Servia JL, Vera-Guzmán AM. Phenotype variation of chile morphotypes (*Capsicum annuum* L.) native to Oaxaca, Mexico. *Int J Exp Bot*. **2014**, 83:225–36.
24. Bharath SM, Umaharan P. Fruit Trait Variation in a Caribbean Germplasm Collection of Aromatic Hot Peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience*. **2013**, 48(5):531–8. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.5.531>
25. Sharma VK, Semwal CS, Uniyal SP. Genetic variability and character association analysis in bell pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Hortic For*. **2010**, 2(3):58–65. Available online <http://www.academicjournals.org/jh>

26. Moreira AFP, Ruas PM, Ruas C de F, Baba VY, Giordani W, Arruda IM, Rodrigues R, Goncalves LS. Genetic diversity, population structure and genetic parameters of fruit traits in *Capsicum chinense*. *Sci Hortic (Amsterdam)*. **2018**, 236:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.012>
27. Butcher JD, Crosby KM, Yoo KS, Patil B, Jifon JL, Rooney WL. Heterosis in different F1 *Capsicum annuum* genotypes for fruit traits, ascorbic acid, capsaicin, and flavonoids. *Sci Hortic (Amsterdam)*. **2013**, 159:72–9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.03.022>
28. Bonny S. L'agriculture écologiquement intensive Nature: et défis. *Cah Agric*. **2011**, 20(6):451–62. <https://doi.org/10.1684/agr.2011.0526>
29. Sharifi P, Astereki H, Pouresmael M. Evaluation of variations in chickpea (*Cicer arietinum* L.) yield and yield components by multivariate technique. *Ann Agrar Sci*. **2018**, 16(2):136–42. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.02.003>
30. Narez-Jiménez Carlos A., Efraín de-la-Cruz-Lázaro, Armando Gómez-Vázquez, Guillermo Castaño-Nájera, Aldenamar Cruz-Hernández CM-Q. La Diversidad Morfológica in situ de Chiles Silvestres (*Capsicum* spp.) de Tabasco, México. *Rev Fitotec Mex*. **2014**, 37(3):209–15. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802014000300005yIngs=
31. Nsabiyyera Vallence, Maurine Logose, Ochwo-Ssemakula Mildred, Peter Sseruwagi, Paul Gibson CO. Morphological Characterization of Local and Exotic Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.) Collections in Uganda ". *Bioremediation, Biodivers Bioavailab*. **2013**, 7(1):22–32. <http://oar.icrisat.org/id/eprint/6366>
32. Bianchi PA, Dutra IP, Moulin MM, Santos JO, Santos Júnior AC. Caracterização morfológica e análise da variabilidade genética entre acessos de pimenta. *Cienc Rural*. 2016, 46(7):1151–7. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20150825>

CAPÍTULO III

Table S1. Evaluated qualitative descriptors in F1 lines and progenitors of habanero pepper.

F1 LINES			FLOWER				PLANT				LEAF					FRUIT							
No.	CROSS	NFA	FP	CCO	CA	FC	STE	ACN	SS	IGC	LS	TL	LP	LBM	IFC	RFC	FS	FST	FSA	MC	FUS	DPF	NL
H1	P31 x P30	3	5	2	3	2	7	3	1	7	5	3	2	3	3	5	4	1	5	1	3	5	4
H2	P32 x P30	3	5	2	7	1	5	1	1	7	5	3	2	3	5	5	1	1	1	1	3	5	3
H3	P33 x P30	3	5	4	7	1	5	3	1	7	5	3	1	3	5	5	1	2	1	1	1	7	5
H4	P35 x P30	3	5	4	3	1	5	3	1	7	1	3	2	3	5	5	1	1	1	1	1	5	3
H5	P36 x P30	4	5	4	3	1	5	3	2	7	1	3	2	3	5	5	1	1	1	1	1	5	3
H6	P37 x P30	3	7	2	3	1	7	5	1	7	5	3	1	3	5	5	4	1	5	1	1	5	4
H7	P38 x P30	3	5	4	3	1	7	5	1	7	5	3	1	3	5	5	2	2	5	1	1	5	3
H8	P40 x P30	3	5	4	7	1	7	3	1	5	5	3	2	3	5	5	4	1	3	1	1	5	3
H9	P30 x P34	3	5	4	3	1	5	7	2	5	5	3	1	3	5	5	1	2	3	1	1	5	3
H10	P30 x P31	3	7	4	3	1	7	3	1	7	5	5	2	3	3	5	4	1	3	1	1	5	3
H11	P30 x P32	4	5	4	7	2	7	3	1	7	1	3	2	3	5	5	1	1	1	1	1	3	3
H12	P40 x P31	3	5	2	3	4	7	5	2	7	5	5	2	3	7	5	4	1	5	1	1	7	5
H13	P40 x P32	3	7	4	3	1	7	5	2	3	5	5	2	3	7	5	1	1	3	1	1	5	3
H14	P40 x P33	4	5	4	3	1	7	7	2	5	5	5	2	3	7	5	1	2	1	1	1	5	3
H15	P40 x P34	3	5	4	3	1	7	7	2	5	5	5	1	3	7	5	4	3	5	1	1	5	3
H16	P40 x P35	3	5	4	3	1	5	3	1	3	5	5	2	3	7	5	4	1	3	1	1	5	3
H17	P40 x P36	3	7	4	3	1	7	5	1	5	5	3	2	3	7	5	4	1	3	1	1	3	3
H18	P40 x P37	3	7	4	3	4	7	7	2	3	5	5	1	3	7	5	3	1	5	2	7	3	3
H19	P40 x P38	3	7	4	3	1	7	5	1	5	5	5	1	3	7	5	3	2	5	1	1	5	3
H20	P41 x P34	3	7	4	3	1	7	7	1	7	5	3	1	3	7	5	3	2	5	2	7	3	2
H21	P32 X P31	3	7	4	3	1	7	3	1	7	5	5	2	3	7	5	1	1	1	1	1	5	3
H22	P31 X P33	4	7	4	3	1	7	5	1	5	5	3	1	3	5	5	1	2	1	2	7	5	3
H23	P31 X P32	3	7	4	3	1	7	3	1	7	1	3	2	3	5	5	3	1	3	1	1	5	3
H24	P37 X P35	3	7	4	3	1	5	5	1	5	1	3	1	3	5	5	1	1	1	1	1	5	3
H25	P38 X P35	3	7	4	3	1	7	5	1	5	5	3	1	3	5	5	2	1	1	1	1	3	3
H26	P40 X P35	3	7	4	3	1	7	3	1	7	5	5	2	3	7	5	2	2	3	1	1	3	3
H27	P36 X P35	3	5	2	3	1	7	3	1	7	5	5	1	3	7	4	1	1	1	1	1	5	3
H28	P37 X P40	3	5	4	3	4	7	7	1	5	5	5	1	3	7	5	4	1	5	2	7	3	3
H29	P37 X P36	3	7	4	5	1	7	5	1	5	5	3	2	3	5	5	3	1	5	1	7	5	4

PROGENITORS																							
P30	RK-01	4	7	4	3	1	5	3	1	7	5	3	2	3	3	5	1	1	1	1	5	5	3
P31	RC-02	4	7	2	3	2	5	3	1	5	5	5	2	3	3	5	4	1	1	5	1	5	4
P32	RN-03	3	5	4	3	1	7	1	1	7	1	3	2	3	7	5	1	1	1	1	5	5	3
P33	RJ-04	3	5	4	3	4	7	7	1	5	1	3	2	3	5	5	1	3	1	2	5	5	3
P34	RS-05	3	5	4	7	1	7	7	2	5	5	5	1	3	5	5	3	3	1	2	5	3	4
P35	NB-06	3	5	4	3	1	5	1	1	7	5	3	2	3	7	4	1	1	1	1	5	3	4
P36	NK-07	3	5	4	3	1	7	3	1	7	1	3	2	3	7	4	1	1	1	1	3	5	3
P37	AK-08	4	7	3	3	1	7	5	1	5	5	3	1	3	5	2	3	1	3	2	7	5	3
P38	AS-09	3	5	4	3	2	7	5	1	5	5	5	1	3	5	2	1	2	5	1	3	5	3
P40	MB-11	3	7	4	3	2	7	7	1	5	5	3	1	3	7	6	4	1	5	1	5	7	3
P41	MS-12	3	5	4	3	1	7	5	1	7	5	3	1	3	7	6	2	2	5	2	5	5	3

NFA: Number of flowers per axil, FP: Flower position, CC0: Corolla color, CA: Color of anthers, FC: Filament color, STE: Stigma exsertion, ACN: Anthocyanin coloration of nodes, SS: Stem shape, IGC: Intensity of Green color, LS: Leaf shape, TL: Texture of leaf blade, LP: Leaf position, LBM: Leaf blade margin, IFC: Immature fruit color, RFC: Ripe fruit color, FS: Fruit shape, FST: Fruit surface texture, FSA: Fruit shape of apex, MC: Margin of calyx, FUS: Fruit undulation in cross section, DPF: Density of placenta of fruit, NL: Number of loculi. Please consult the classification code in Table 2.

CAPÍTULO III

Table S2. Pearson correlation matrix for the 18 quantitative descriptors of 29 F1 lines and 11 progenitors of habanero pepper.

	G	PH	SL	SD	LLB	LWB	LLP	DFL	DFR	FL	FWI	FW	FWT	FPL	FTP	NSF	FYP	CC
G	1																	
PH	.069	1																
SL	.225	.398*	1															
SD	-.150	.496**	-.277	1														
LLB	.051	.200	-.012	.498**	1													
LWB	-.110	.176	.067	.253	.783**	1												
LLP	.123	.412**	.027	.300	.495**	.426**	1											
DFL	.084	.316*	-.117	.523**	.373*	.169	.124	1										
DFR	-.110	-.028	-.236	-.089	-.024	.057	.188	.023	1									
FL	-.004	-.206	.087	-.233	.050	.286	-.116	-.315*	-.183	1								
FWI	-.042	-.097	-.327*	.196	.020	-.188	-.133	.387*	-.042	-.529**	1							
FW	-.170	-.287	-.435**	.134	.024	.038	-.260	.069	-.110	-.035	.642**	1						
FWT	-.254	-.268	-.219	.003	-.019	-.067	-.248	.248	.139	-.390*	.580**	.490**	1					
FPL	.049	.224	.024	.231	.146	.114	.145	.102	-.152	-.003	.026	-.012	-.210	1				
FTP	.160	.021	-.315*	.261	.301	.035	.220	.211	.187	-.508**	.461**	.325*	.304	.012	1			
NSF	.074	-.278	-.084	-.138	-.124	-.057	.028	.036	-.072	-.274	.476**	.482**	.381*	-.012	.299	1		
FYP	-.305	.237	-.180	.722**	.504**	.445**	.180	.364*	-.036	-.036	.130	.197	.281	-.142	.148	-.116	1	
CC	.236	.557**	.389	.156	.179	.090	.333*	.014	-.079	.084	-.376	-.492**	-.620**	.102	.013	-.250	-.066	1

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed), ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). G: Germination, PH: Plant height, SL: Stem length, SD: Stem diameter, LLB: Leaf length of blade, LWB: Leaf width of blade, LLP: Leaf length of petiole, DFL: Days to flowering, DFR: Days to fruiting, FL: Fruit length, FWI: Fruit width, FW: Fruit weight, FWT: Fruit wall thickness, FPL: Fruit pedicel length, FTP: Thickness the pedicel of the fruit, NSF: Number of seeds per fruit, FYP: Fruit yield/plant, CC: Capsaicin content.

CAPÍTULO IV

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES DE LOS HÍBRIDOS F1 Y VARIEDADES DE CHILE HABANERO (*C. chinense*) POR LOS MÉTODOS DE COLLINS *et al.* (1995) Y ASTA 21.3.

4.1 INTRODUCCIÓN

Los chiles muestran una gran diversidad de formas, tamaños y colores, que además son consumidos por una gran parte de la población en todo el mundo, debido a sus compuestos químicos, como son los carotenoides (provitamina A), los flavonoides, las vitaminas (vitaminas C y E), los minerales, y los aceites esenciales (Howard *et al.*, 2016; Purkayastha *et al.*, 2012; Forero *et al.*, 2009). Los capsaicinoides son los responsables de la pungencia. Han sido descritos veintitrés análogos de capsaicinoides en la literatura publicada (Sarpras *et al.*, 2016) estos incluyen a la capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, homocapsaicina, y norcapsaicina. La capsaicina y la dihidrocapsaicina constituyen el 90% de estos compuestos en los chiles (Korel *et al.*, 2002).

El nivel de pungencia en las especies de *Capsicum* se determina mediante una prueba organoléptica, medida en la escala de Unidad de Picor Scoville (SHU) (Scoville, 1912). La escala SHU mide la cantidad de veces que un extracto de chile se diluye para hacer que la pungencia sea indetectable en agua azucarada, haciendo uso del gusto humano, por ello esta prueba organoléptica de Scoville es subjetiva y no proporciona niveles cuantitativos del picor en las especies de *Capsicum* (Olatunji y Afolayan, 2020). Hoy en día, la prueba organoléptica de Scoville ha sido reemplazada en gran medida por métodos cromatográficos que se consideran más confiables y precisos, los cuales incluyen cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GCMS) y espectrometría UV (Ryu *et al.*, 2017; Bajer *et al.*, 2016; Giuffrida *et al.*, 2013; Barbero *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 1995).

CAPÍTULO IV

Las técnicas que usan HPLC, proporcionan un análisis más rápido, de menor costo-efectividad, exacto y eficiente del contenido y del tipo de capsaicinoides presentes en la muestra de chile (Collins *et al.*, 1995). La metodología de HPLC más comúnmente utilizada para la determinación de capsaicinoides por la industria, se encuentra contenida en el manual de la American Spice Trade Association (ASTA), el cual requiere de una muestra seca y molida, seguida de una extracción orgánica, y su posterior inyección en el HPLC.

El chile habanero (*C. chinense*) es considerada una de las especies más picantes del mundo debido a su alto contenido de capsaicina obteniendo valores entre 100,000 – 300,000 Scoville Heat Units (Fabela-Morón *et al.*, 2019). El *C. chinense* se cultiva principalmente en el estado de Yucatán, México, donde además tiene una gran importancia regional por su denominación de origen (Cuevas-Glory *et al.*, 2015), que garantiza su autenticidad, control de calidad e identificación del producto en todo el mundo, centrándose principalmente en el contenido de capsaicinoides (NOM-189-SCFI-2018).

Los chiles producidos en la Península de Yucatán se distinguen de los demás cultivados en otras partes del mundo por su sabor, olor y alta pungencia, encontrándose genotipos de chile habanero con valores altos de pungencia (145,950 – 892,719 SHU) (Canto-Flick *et al.*, 2008). Así como también, en los estudios publicados en esta línea de investigación, se pudo corroborar que la pungencia es un atributo muy afectado por el medio ambiente, enfatizando que Yucatán, es una región particularmente privilegiada en el mundo para el cultivo de chile habanero, pues las condiciones edafoclimáticas, no solo estimulan la producción de capsaicina, sino que la potencializa a niveles significativamente mayores (Muñoz-Ramirez *et al.*, 2018).

Los capsaicinoides son compuestos con diversas aplicaciones industriales debido a sus propiedades antioxidantes (Hervert-Hernández *et al.*, 2010), anti-inflamatorias (Thán *et al.*, 2000), analgésicas (Smith y Brooks, 2014) y antimicrobianas (Molina-Torres *et al.*, 1999), pero que su contenido está influenciado por el genotipo, así como por la interacción genotipo-ambiente y como tal el contenido de capsaicinoides es variable dentro y entre genotipos de especies de *Capsicum* (Giuffrida *et al.*, 2013; Gurung *et al.*, 2011). Por esta razón, es necesario contar con un método de análisis que logre indicar aquellas

variedades o híbridos de chile, que contienen mayores cantidades de capsaicinoides. Este capítulo tiene como propósito comparar dos métodos de extracción y cuantificación de capsaicina y dihidrocapsaicina presentes en una colección de 29 híbridos y nueve variedades de chile habanero cultivados en Yucatán, el cual permita obtener una mayor cantidad de estos compuestos.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo. Para este estudio, se utilizaron 29 híbridos F1 y nueve variedades de chile habanero (*C. chinense*). Estos fueron sembrados durante el período de Junio 2018 a Marzo 2019 en invernaderos ubicados en la unidad de producción de semillas (SPU) del Parque Científico y Tecnológico de Yucatán en Sierra Papacal, Mérida, Yucatán, México, a 21 ° 07 ' 20 " N 89 ° 43 ' 41 " O y altitud de 9 msnm. Durante el período de estudio, la temperatura promedio fue de 18 °C mínimo y 37 °C máximo y la humedad relativa fue de 86% (Servicio Meteorológico Nacional, 2018).

Las semillas se germinaron en bandejas de poliestireno con 200 cavidades utilizando PEAT MOSS® como sustrato; las plántulas se trasplantaron al suelo después de 35 días, en condiciones de invernadero, a una distancia de 30 cm entre plantas y 100 cm entre hileras. El manejo y el riego de plantas, el control de plagas y enfermedades y la fertilización se llevaron a cabo siguiendo los estándares establecidos aplicados al cultivo de chile habanero en la región (Tun-Dzul, 2001). Los frutos de cada variedad se cortaron verticalmente y se transfirieron a una bandeja de aluminio para secar en un horno de circulación de aire durante 48 horas, después los frutos secos de cada variedad se molieron hasta obtener un polvo fino y homogéneo; estos se almacenaron a -80 °C.

Extracción y cuantificación de capsaicinoides. La extracción y cuantificación de capsaicinoides se realizó por dos métodos: 1) método de Collins *et al.* (1995) (a partir de aquí se encontrará en el documento referido como el método de Collins) con modificaciones menores, para la extracción de capsaicinoides, tres réplicas de 250 mg de polvo de los frutos de cada genotipo se mezclaron con 40 ml de acetonitrilo y se mantuvieron en baño María a 80 °C durante cuatro horas con agitación periódica. Los extractos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, después fueron centrifugados

CAPÍTULO IV

(Sigma 2-16 kl) a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C; posteriormente se recogió el sobrenadante, y se filtró a través de una jeringa con filtros de membrana de PTFE de 0.45 µm (Thermo Scientific N (Cat. 721-1345) en viales de 2 ml de vidrio ámbar; y finalmente se almacenaron a 4 °C hasta que se realizó el análisis cromatográfico.

La separación y cuantificación de los capsaicinoides se llevó a cabo utilizando el HPLC (Agilent serie 1200) equipado con un inyector automático y un detector de fluorescencia. Los capsaicinoides se separaron mediante una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (4.6 mm i.d x 250 mm) a una temperatura de 25 °C y un volumen de inyección de 20 µL. Las longitudes de onda empleadas para la detección fueron 280 nm (excitación) y 338 nm (emisión). La fase móvil fue isocrática con 70% de disolvente B (100% de metanol) y 30% de disolvente A (10% de metanol v/v). Las condiciones operativas de la HPLC para la determinación de los capsaicinoides totales fueron: temperatura de 25 °C, flujo de 1 ml/min y un tiempo de corrida de 15 min.

Los estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina que se utilizaron para obtener una curva de calibración, están basados en la relación del área máxima para las concentraciones conocidas de estándares externos. La solución madre se preparó en 100% (v/v) de metanol; se utilizó un total de cinco concentraciones diferentes 20, 60, 100, 200 y 300 ppm para generar la curva de calibración. La concentración de los dos capsaicinoides principales (capsaicina y dihidrocapsaicina) se estimó empleando la curva de calibración obtenida. La concentración cuantificada de capsaicinoides se reporta en mg g⁻¹ de peso seco (PS). Los contenidos de capsaicina obtenidos en las tres variedades se convirtieron a SHU para clasificarlos según sus diferentes niveles de pungencia. La conversión a SHU se realizó multiplicando el contenido de capsaicina por el coeficiente correspondiente al valor de pungencia para la capsaicina pura de 1.6×10^7 (Sanatombi y Sharma, 2008).

2) Método ASTA 21.3 (a partir de aquí se encontrará en el documento referido como el método ASTA), para la extracción de capsaicinoides. Se realizaron tres réplicas de 25 g de polvo de los frutos de cada genotipo, se mezcló con 200 ml de etanol al 95% y se mantuvo en reflujo a 80 °C durante 5 horas; los extractos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y posteriormente se centrifugaron (Sigma 2-16 kl) a 14 000 rpm por 10 min a 4 °C, el sobrenadante se colectó y se filtró a través de filtros de jeringa de membrana PTFE

de 0.45 µm (Thermo Scientific N° cat. 721-1345) en viales de vidrio ámbar de 2 ml. Finalmente fueron almacenados a 4 °C hasta su análisis cromatográfico.

La separación y cuantificación de los capsaicinoides se realizó usando HPLC (Agilent serie 1200) equipado con un inyector automático y un detector de fluorescencia. Los capsaicinoides fueron separados por una columna Zorbax ODS C18 (4.6 mm i.d. x 150 mm) a temperatura de 25 °C y un volumen de inyección de 20 µL. Las longitudes de onda empleadas para la detección fueron 280 nm (excitación) y 325 nm (emisión). La fase móvil fue isocrática con un 40% de disolvente B (100% de acetonitrilo) y 60% de solvente C (100% de agua destilada con 1% de ácido acético v/v). Las condiciones de funcionamiento del HPLC para la determinación de los capsaicinoides totales fueron temperatura de 25 °C, velocidad de flujo de 1.5 ml / min, y un tiempo de corrida de 27 min. Para la identificación de los picos se utilizó soluciones de estándares de referencia bajo las mismas condiciones y su tiempo de retención se comparó con el de las muestras analizadas. La solución madre fue preparada en 100% (v/v) de etanol, un total de dos soluciones A (0.15 mg/ml) y B (0.015 mg/ml).

Las unidades de picor de Scoville (SHU) son la suma de los dos principales capsaicinoides. Es calculada de la siguiente manera:

- a) Capsaicina, SHUC = (C/A) x (Cs/CX) x (HC/RC).
- b) Dihidrocapsaicina, SHUD = (D/A) x (Cs/CX) x (HD/RD).
- c) Total SHUT = SHUC + SHUD.

Dónde,

A = área promedio del pico del estándar;

C, y D = áreas promedios de los picos para los respectivos capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) a partir de inyecciones duplicadas;

Cs = concentración de std (mg/ml);

CX = concentración de la muestra en el extracto (mg/ml);

CAPÍTULO IV

HC y HD = factores de picor para los respectivos capsaicinoides;

RC y RD = factores de respuesta de los respectivos capsaicinoides en relación con el estándar. La concentración de capsaicinoides cuantificada se reportó en mg g⁻¹ de peso seco (PS).

Análisis estadísticos. Los datos obtenidos se muestran como la media ± DE. Para detectar diferencias significativas entre el perfil de capsaicinoides de los genotipos de chile evaluados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el software SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 22 para Windows.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 4.1 se observa la gran diversidad en cuanto la morfología y las diferentes tonalidades de color en estado inmaduro y maduro de los híbridos (H1–H29) y las variedades (P30–P41) de habanero utilizadas en este estudio.

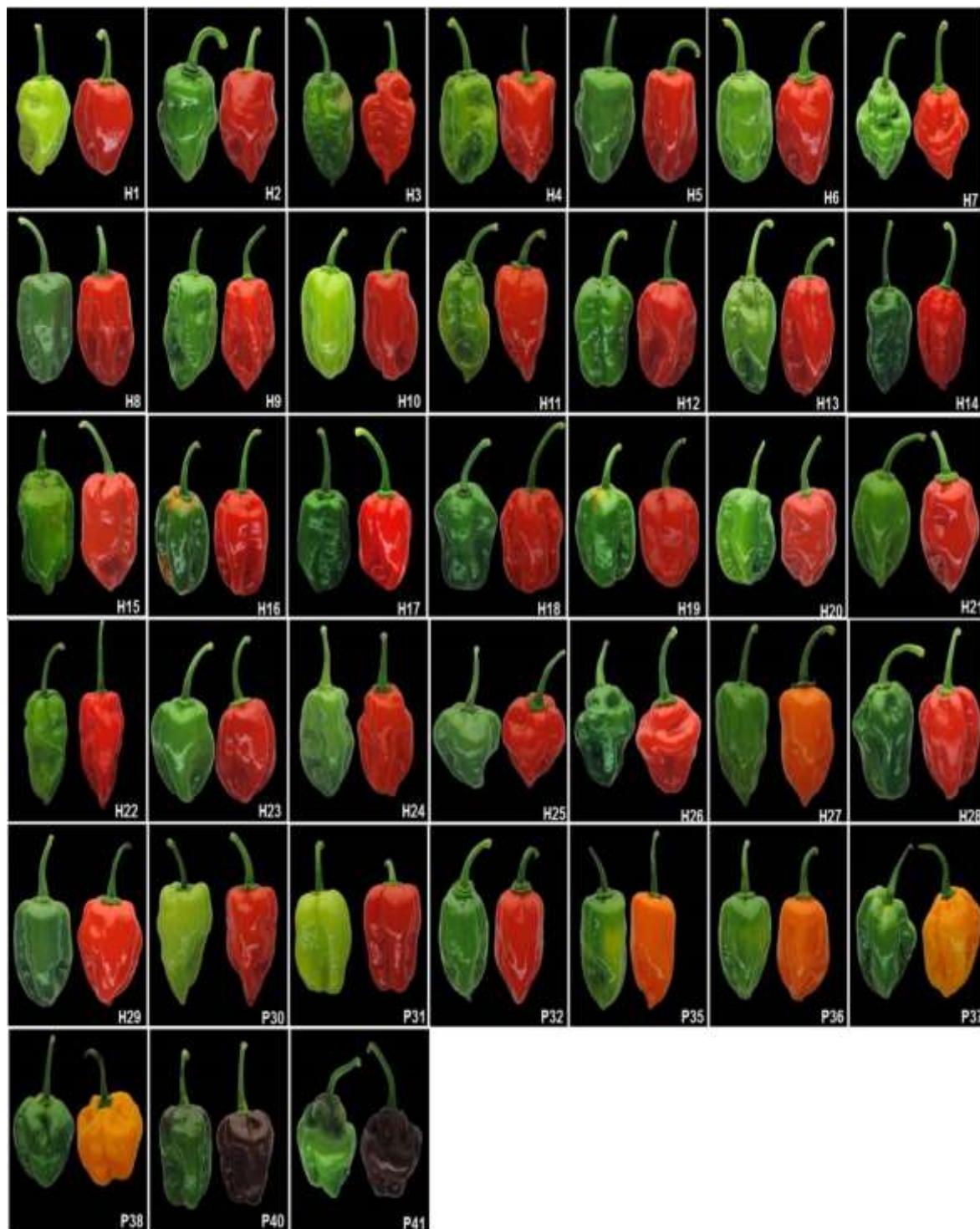


Figura 4.1 Diversidad morfológica de 29 híbridos (H1-H29) y nueve variedades de chile habanero (*C. chinense*) (P30-P41) cultivadas en Yucatán, México.

4.3.1 Contenido de capsaicinoides por el método de Collins. Para la identificación y cuantificación de los dos capsaicinoides mayoritarios (capsaicina y dihidrocapsaicina), mediante el método de Collins, en la figura 4.2a se muestra el cromatograma de uno de los híbridos de chile habanero evaluadas en este estudio, donde se observan dos picos mayoritarios, correspondientes a la capsaicina (1) y la dihidrocapsaicina (2), los cuales fueron identificados por comparación de los tiempos de retención de los estándares comerciales de ambos compuestos, donde se pudo determinar que el tiempo de retención para la capsaicina fue de 7.31 min y para la dihidrocapsaicina fue de 9.80 min (figura 4.2 b). Siendo la capsaicina y la dihidrocapsaicina los capsaicinoides que representan el 90% del picor (Korel *et al.*, 2002).

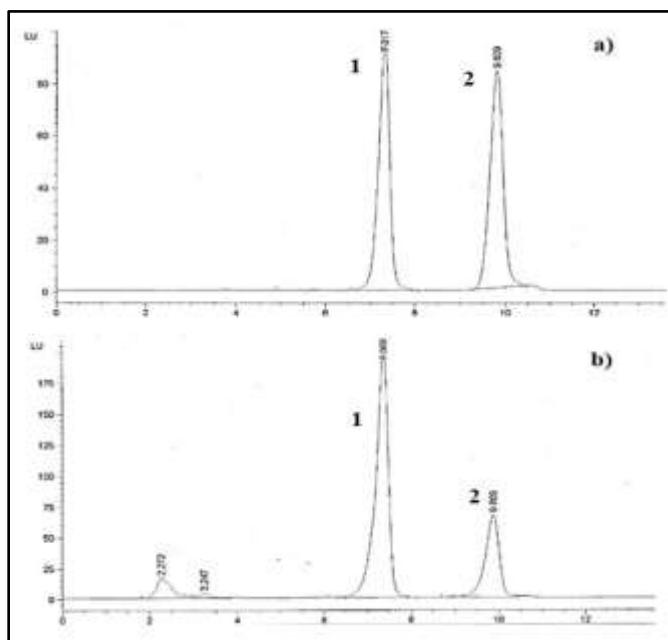


Figura 4.2 Cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución mediante el método de Collins (HPLC por sus siglas en inglés) de los estándares capsaicina y dihidrocapsaicina (a) y el cromatograma del híbrido H5 (b), se ilustra la separación de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2).

La linealidad fue encontrada en el rango de 20 – 300 ppm para ambos compuestos. Las soluciones estándar se prepararon a partir de una solución madre de capsaicina y dihidrocapsaicina utilizando cinco diluciones en serie a 20, 60, 100, 200 y 300 ppm. Cada solución se inyectó tres veces y se ejecutaron en el HPLC. Las curvas estándar se generaron trazando el área del pico frente a la concentración. Las curvas de calibración

para capsaicina y dihidrocapsaicina mostraron buena linealidad con un coeficiente de correlación (R^2), $R^2 = 0.99912$ (Figura 4.3) y $R^2 = 0.99931$ (Figura 4.4) para capsaicina y dihidrocapsaicina respectivamente. Los valores de R^2 fueron altamente significativos, lo que confirma la buena linealidad del método. En el reporte de Martins *et al.* (2017), mencionan que valores de coeficiente de correlación (R^2) mayores 0.90 son considerados satisfactorios o aceptables, por ende, los resultados obtenidos cumplieron con este criterio.

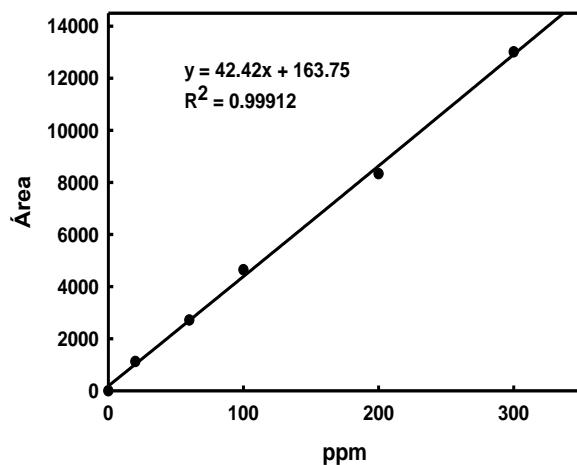


Figura 4.3 Curva de calibración del estándar de capsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 338 nm.

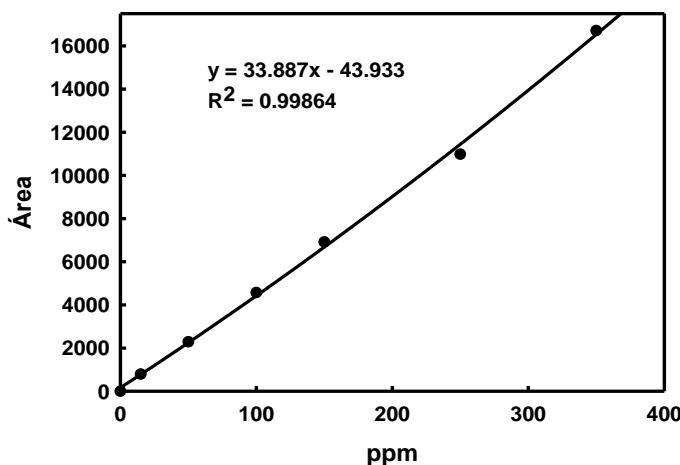


Figura 4.4 Curva de calibración del estándar de dihidrocapsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 338 nm.

CAPÍTULO IV

La pungencia es uno de los principales atributos de calidad de los chiles, y es de gran importancia tanto para los mejoradores como para las industrias (Dang *et al.*, 2018). En general, los estudios sobre la acumulación de capsaicinoides en chiles, han mostrado un aumento en la concentración de estos compuestos durante las primeras etapas del desarrollo del fruto, y esto se mantiene durante la maduración, hasta alcanzar un valor máximo, que generalmente sucede entre los 40 y 60 días (Barbero *et al.*, 2014).

En la tabla 4.1 se aprecian los contenidos de capsaicina y dihidrocapsaicina, con su correspondiente valor de SHU de híbridos y variedades de chile habanero analizadas por los dos métodos. Se sabe que los frutos de chile habanero son muy picantes debido a sus altos contenidos de capsaicinoides (Canto-Flick *et al.*, 2008). La concentración de los capsaicinoides totales para el método de Collins estuvo en un rango de 15.71 mg g⁻¹ PS (variedad P31) a 85.05 mg g⁻¹ PS (híbrido H14), que convertido a unidades de picor Scoville es 252,979 - 1,369,360 SHU. La menor concentración para el compuesto capsaicina fue la variedad P31 con 10.89 mg g⁻¹ PS mientras que el híbrido H14 fue el de mayor concentración con 73.55 mg g⁻¹ PS, respecto al compuesto dihidrocapsaicina el genotipo con la menor concentración fue la variedad P41 (2.93 mg g⁻¹ PS) mientras que el de mayor concentración la registró el híbrido H22 (14.36 mg g⁻¹ PS).

El contenido de capsaicinoides totales encontrado en las diferentes variedades e híbridos en este estudio son superiores a lo reportado por otros grupos de investigación para chile habanero (Soares *et al.*, 2020; Hamed *et al.*, 2019; Olguín-Rojas *et al.*, 2019). El Bhut jolokia un híbrido natural de *Capsicum chinense* x *Capsicum frutescens*, es conocido como uno de los chiles más picantes del mundo con un total de 1,001,304 SHU (Bosland y Baral, 2007), en este estudio se hallaron tres híbridos con valores mayores al de Bhut Jolokia, los cuales fueron el híbrido H14 con 1,369,360 SHU, el H15 con 1,183,915 SHU y H3 con 1,156,762 SHU, los cuales son híbridos prometedores para recomendar a diferentes industrias por sus altos contenidos de capsaicinoides así como también para utilizarlos en futuros trabajos de mejoramiento genético. Los híbridos de chile habanero brindan mayores rendimientos y contenido de capsaicinoides, bajo un buen manejo que las variedades de polinización abierta (Bosland y Vostava, 2012). La concentración de capsaicinoides varía dependiendo del genotipo, la madurez del fruto y de las condiciones de cultivo (Zewdie y Bosland, 2000).

4.3.2 Contenido de capsaicinoides por el método ASTA. La concentración de los dos capsaicinoides mayoritarios (capsaicina y dihidrocapsaicina) se expresó como el área promedio bajo la curva. Los contenidos de capsaicina obtenidos se convirtieron en SHU con el fin de clasificarlos de acuerdo con sus diversos niveles de picor. El análisis por HPLC, permitió la identificación, separación y cuantificación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina presentes en los extractos etanólicos de los frutos de los genotipos evaluados. En la Figura 4.5, se observa el perfil cromatográfico de estos dos capsaicinoides en la muestra del estándar utilizado, y una muestra del extracto crudo de fruto del híbrido H5. Ambos compuestos fueron los capsaicinoides mayoritarios encontrados en todas las muestras analizadas en el presente estudio, registrándose tiempos de retención de 12.80 min para capsaicina y de 20.86 min para dihidrocapsaicina.

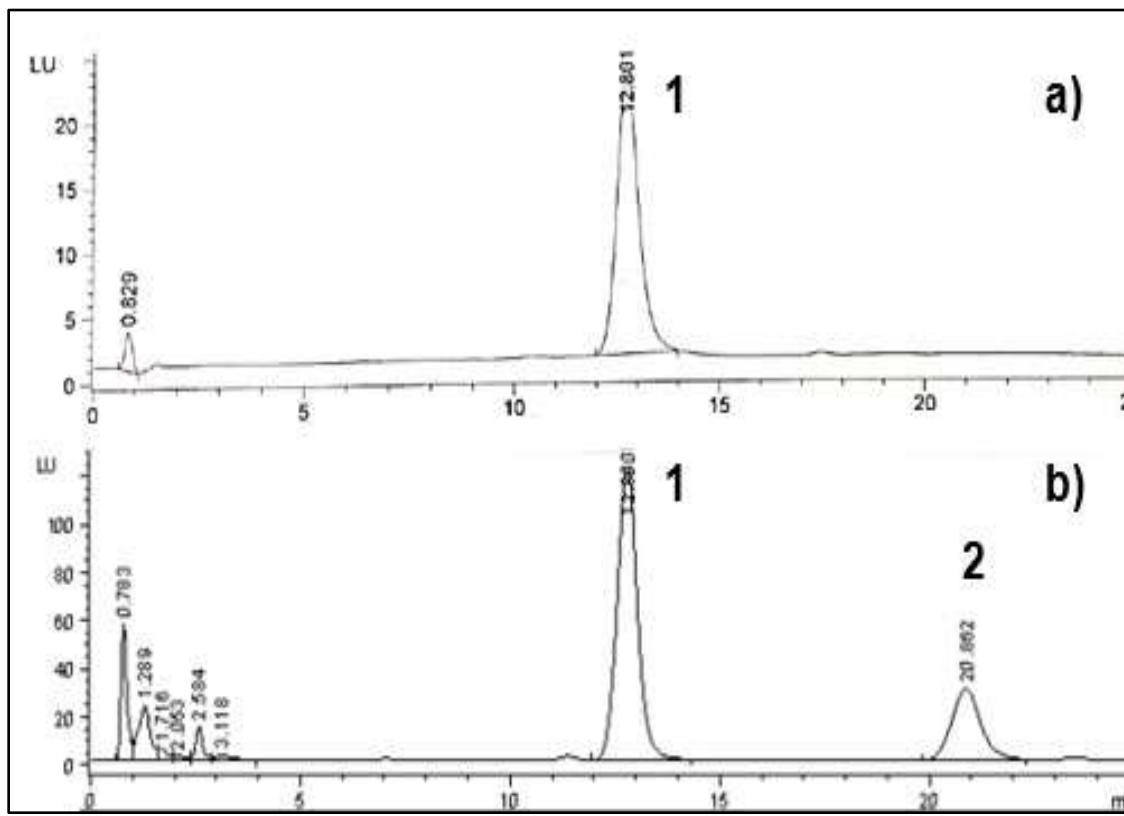


Figura 4.5 Cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución mediante el método ASTA (HPLC por sus siglas en inglés) del estándar capsaicina (a) y cromatograma del extracto etanólico del híbrido H2 (b). Se ilustra la separación de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2).

CAPÍTULO IV

La extracción y cuantificación de los capsaicinoides en esta colección de híbridos y variedades de chile habanero se realizó en frutos maduros, pues es en esta etapa cuando hay un aumento significativo en el contenido de los mismos (Sarpras *et al.*, 2019). El contenido de capsaicinoides totales estuvo en un rango de 9.66 mg g^{-1} PS (variedad P31) a 48.76 mg g^{-1} PS (híbrido H14), que convertido a unidades de picor Scoville es 155,544 - 785,027 SHU (Tabla 4.1). Por medio de este método el genotipo con la menor concentración para capsaicina fue la variedad P31 con 6.57 mg g^{-1} PS mientras que el híbrido H14 fue el de mayor concentración con 41.42 mg g^{-1} PS, respecto al compuesto dihidrocapsaicina el genotipo con la menor concentración fue la variedad P41 (2.41 mg g^{-1} PS) mientras que el de mayor concentración la registró el híbrido H22 (8.00 mg g^{-1} PS).

Orellana-Escobedo *et al.* (2013) en su estudio que el chile habanero cultivado en el estado de Chihuahua encontraron concentraciones de 9.09 mg g^{-1} de chile seco de capsaicina y 4.02 mg g^{-1} de chile seco de dihidrocapsaicina. Por otro lado, el estudio realizado en España por Garcés-Claver *et al.* (2006) donde analizaron chiles habaneros cultivados bajo sistemas hidropónicos, arrojó concentraciones de capsaicinoides de 6.63 mg g^{-1} de peso seco de capsaicina y 3.72 mg g^{-1} de peso seco de dihidrocapsaicina; las cuales son concentraciones menores a las reportadas en este estudio para los híbridos y variedades de chile habanero cultivados en Yucatán, México. En el 2018, Jeeatid *et al.* evaluaron el contenido de capsaicinoides en siete híbridos de *C. chinense* en diferentes ambientes encontrando valores similares a los reportados en este estudio mediante el método ASTA (149,803 – 609,827 SHU).

Tabla 4.1 Contenido de capsaicinoides de híbridos y variedades de chile habanero (*C. chinense*) cultivadas en Yucatán analizadas por dos métodos.

#	MÉTODO Collins				METODO ASTA				SHU
	C	DHC	Capsaicinoides totales	SHU	C	DHC	Capsaicinoides totales		
	mg g ⁻¹ PS	mg g ⁻¹ PS	mg g ⁻¹ PS		mg g ⁻¹ DW	mg g ⁻¹ PS	mg g ⁻¹ PS		
Híbridos	H1	41.36 ± 2.19 ^f	12.02 ± 0.47 ^b	53.38 ± 2.67 ^d	859,457	14.02 ± 0.17 ^{qr}	4.07 ± 0.05 ^p	18.09 ± 0.21 st	291,273
	H2	24.06 ± 1.09 ^{nop}	6.24 ± 0.27 ^{lmn}	30.30 ± 1.37 ^{pqr}	487,852	14.27 ± 0.17 ^q	3.95 ± 0.05 ^q	18.22 ± 0.21 ^s	293,300
	H3	59.71 ± 0.22 ^c	12.14 ± 0.01 ^b	71.85 ± 0.23 ^b	1,156,762	31.73 ± 0.38 ^c	7.03 ± 0.08 ^c	38.77 ± 0.46 ^c	624,138
	H4	35.88 ± 0.08 ^g	9.24 ± 0.16 ^{de}	45.12 ± 0.24 ^f	726,415	17.75 ± .021 ^m	4.56 ± 0.05 ^l	22.31 ± 0.26 ⁿ	359,146
	H5	26.44 ± 1.87 ^{klm}	7.23 ± 0.69 ^{hijk}	33.67 ± 2.57 ^{mno}	542,026	15.38 ± 0.18 ^o	4.42 ± 0.05 ^m	19.80 ± 0.23 ^q	318,804
	H6	32.84 ± 0.36 ^{hi}	6.69 ± 0.21 ^{jklm}	39.53 ± 0.57 ^{ijk}	636,497	15.64 ± 0.18 ^o	3.82 ± 0.04 ^r	19.46 ± 0.23 ^{qr}	313,286
	H7	40.27 ± 0.97 ^f	7.91 ± 0.14 ^{fg}	48.17 ± 1.11 ^e	775,592	19.59 ± .023 ^k	3.94 ± 0.04 ^q	23.53 ± 0.27 ^m	378,753
	H8	35.42 ± 0.86 ^g	6.58 ± 0.14 ^{klm}	41.99 ± 1.00 ^{ghi}	676,117	18.93 ± 0.22 ^l	3.69 ± 0.04 ^t	22.62 ± 0.27 ⁿ	364,185
	H9	46.47 ± 5.97 ^d	9.38 ± 1.54 ^{de}	55.85 ± 7.52 ^{cd}	899,128	26.23 ± 0.31 ^d	6.08 ± 0.07 ^e	32.32 ± 0.38 ^d	520,276
	H10	22.00 ± 2.05 ^{opq}	8.17 ± 0.82 ^f	30.17 ± 2.87 ^{pqr}	485,651	11.70 ± 0.14 ^{wv}	4.80 ± 0.05 ^j	16.50 ± 0.19 ^w	265,724
	H11	24.83 ± 0.69 ^{mn}	6.90 ± 0.22 ^{ijkl}	31.73 ± 0.91 ^{opq}	510,838	14.14 ± 0.16 ^q	4.23 ± 0.05 ^o	18.37 ± 0.21 ^s	295,701
	H12	35.04 ± 1.48 ^{gh}	8.98 ± 0.52 ^e	44.02 ± 2.00 ^{fgh}	708,699	21.80 ± 0.25 ^h	5.82 ± 0.06 ^f	27.63 ± 0.33 ^h	444,830
	H13	27.74 ± 0.01 ^{ijkl}	4.57 ± 0.08 ^{rs}	32.30 ± 0.09 ^{nop}	520,069	17.74 ± 0.21 ^m	3.10 ± 0.04 ^x	20.84 ± 0.24 ^o	335,460
	H14	73.55 ± 0.50^a	11.50 ± 0.04 ^b	85.05 ± 0.55^a	1,369,360	41.42 ± 0.49^a	7.34 ± 0.09 ^b	48.76 ± 0.58^a	785,027
	H15	63.18 ± 0.27 ^b	10.36 ± 0.02 ^c	73.54 ± 0.24 ^b	1,183,915	38.24 ± 0.45 ^b	6.90 ± 0.08 ^d	45.14 ± 0.53 ^b	726,726
	H16	34.57 ± 0.10 ^{gh}	6.22 ± 0.08 ^{mn}	40.78 ± 0.19 ^{ij}	656,592	21.28 ± 0.25 ⁱ	4.06 ± 0.05 ^p	25.34 ± 0.30 ^k	408,003
	H17	32.12 ± 1.04 ⁱ	6.68 ± 0.23 ^{jklm}	38.81 ± 1.27 ^{jk}	624,786	20.51 ± 0.24 ^j	4.41 ± 0.05 ^m	24.92 ± 0.30 ^l	401,198
	H18	34.99 ± 3.33 ^{gh}	6.71 ± 0.81 ^{ijklm}	41.70 ± 4.14 ^{ghij}	671,336	21.46 ± 0.25 ⁱ	4.34 ± 0.05 ⁿ	25.81 ± 0.30 ^j	415,498
	H19	28.43 ± 0.34 ^{jk}	4.89 ± 0.03 ^{qr}	33.33 ± 0.37 ^{mno}	536,549	17.57 ± 0.20 ^m	3.34 ± 0.04 ^w	20.91 ± 0.24 ^o	336,570
	H20	40.32 ± 0.93 ^f	7.90 ± 0.24 ^{fgh}	48.22 ± 1.17 ^e	776,263	24.57 ± 0.29 ^e	5.00 ± 0.06 ⁱ	29.58 ± 0.35 ^f	476,249
	H21	25.57 ± 1.98 ^{lmn}	9.75 ± 0.86 ^{cd}	35.32 ± 2.84 ^{lm}	568,665	14.01 ± 0.17 ^{qr}	5.74 ± 0.07 ^g	19.75 ± 0.23 ^q	317,960
	H22	44.00 ± 0.74 ^e	14.36 ± 0.06^a	58.36 ± 0.81 ^c	939,608	23.15 ± 0.27 ^f	8.00 ± 0.09^a	31.15 ± 0.37 ^e	501,549
	H23	25.03 ± 0.24 ^{mn}	10.38 ± 0.13 ^c	35.41 ± 0.38 ^{lm}	570,083	12.26 ± 0.14 ^t	5.35 ± 0.06 ^h	17.61 ± 0.21 ^u	283,509
	H24	29.28 ± 0.23 ^j	7.91 ± 0.06 ^{fg}	37.18 ± 0.30 ^{kl}	598,651	13.83 ± 0.16 ^r	3.98 ± 0.04 ^q	17.81 ± 0.21 ^{tu}	286,672
	H25	28.38 ± 0.77 ^{jk}	6.53 ± 0.18 ^{lm}	34.91 ± 0.96 ^{lmn}	562,021	16.38 ± 0.19 ⁿ	4.05 ± 0.04 ^p	20.43 ± 0.24 ^p	328,946
	H26	24.31 ± 0.13 ^{mno}	5.46 ± 0.15 ^{opq}	29.76 ± 0.28 ^{pqr}	479,204	11.55 ± 0.14 ^w	2.86 ± 0.03 ^z	14.41 ± 0.17 ^y	231,992

CAPÍTULO IV

	H27	19.95 ± 0.94^{qrs}	7.38 ± 0.36^{ghi}	27.33 ± 1.31^{rs}	439,979	11.92 ± 0.14^{uv}	4.85 ± 0.06^j	16.77 ± 0.20^{vw}	269,967
	H28	35.31 ± 0.01^g	6.09 ± 0.11^{mno}	41.40 ± 0.12^{hij}	666,512	22.43 ± 0.26^g	4.18 ± 0.05^o	26.61 ± 0.31^i	428,465
	H29	36.86 ± 0.15^g	9.32 ± 0.10^{de}	46.18 ± 0.04^{ef}	743,407	16.30 ± 0.19^n	4.30 ± 0.05^n	20.60 ± 0.24^{op}	331,733
Variedades	P30	19.80 ± 0.01^{qrs}	3.88 ± 0.00^t	23.68 ± 0.01^{tu}	381,292	13.03 ± 0.15^s	2.75 ± 0.03^z	15.79 ± 0.18^x	254,151
	P31	10.89 ± 0.54^u	4.83 ± 0.23^{qr}	15.71 ± 0.77^w	252,979	6.57 ± 0.08^y	3.09 ± 0.03^x	9.66 ± 0.11^z	155,544
	P32	14.69 ± 1.08^t	5.65 ± 0.45^{nop}	20.34 ± 1.52^v	327,524	8.58 ± 0.10^x	3.74 ± 0.04^s	12.32 ± 0.14^z	198,386
	P35	22.47 ± 0.12^{op}	6.48 ± 0.05^{lm}	28.95 ± 0.17^{qrs}	466,076	14.74 ± 0.17^p	4.65 ± 0.05^k	19.39 ± 0.23^r	312,216
	P36	21.81 ± 0.06^{pqr}	7.28 ± 0.01^{ghij}	29.09 ± 0.08^{qrs}	468,270	12.39 ± 0.15^t	4.61 ± 0.05^k	17.00 ± 0.20^v	273,739
	P37	21.96 ± 0.09^{pqr}	4.56 ± 0.08^{rst}	26.52 ± 0.18^{st}	426,973	14.13 ± 0.17^{qr}	3.48 ± 0.04^v	17.61 ± 0.20^u	283,441
	P38	19.68 ± 0.08^{rs}	4.13 ± 0.16^{st}	23.82 ± 0.24^{tu}	383,440	12.44 ± 0.14^t	3.03 ± 0.03^y	15.47 ± 0.18^x	249,108
	P40	39.37 ± 0.13^f	5.17 ± 0.08^{pqr}	44.54 ± 0.22^{fg}	717,019	24.77 ± 0.29^e	3.56 ± 0.04^u	28.33 ± 0.34^g	456,096
	P41	18.69 ± 0.04^s	2.93 ± 0.00^u	21.63 ± 0.04^{uv}	348,161	12.20 ± 0.00^{tu}	2.41 ± 0.03^z	14.62 ± 0.03^y	235,339

Cada valor es el promedio de tres muestras \pm la desviación estándar de la media. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey. C: capsaicina, DHC: dihidrocapsaicina, SHU: unidades de picor Scoville y PS: Peso seco.

4.3.3 Comparación de los métodos evaluados. Entre las principales diferencias en estos dos métodos de extracción y cuantificación de capsaicinoides analizados son el tipo de solvente utilizado, el acetonitrilo para el método de Collins y el etanol para el método ASTA; de igual manera el tipo de procedimiento de extracción, dentro de estas técnicas se dispuso un baño maría durante 4 horas para método de Collins, mientras que utilizó el reflujo durante cinco horas para el método ASTA; por último, las condiciones de HPLC adoptadas para la fase móvil metanol/agua en el método de Collins, difieren de la fase de acetonitrilo/agua con ácido acético para el método ASTA.

La selección de un solvente adecuado es un factor determinante para obtener una extracción eficiente (Fabela-Morón *et al.*, 2019). Disolventes orgánicos utilizados comúnmente para la extracción de capsaicinoides son la acetona, el metanol, el etanol y el acetonitrilo (Asnin y Park, 2015). Los capsaicinoides además pueden ser extraídos mediante técnicas convencionales que se basan en la capacidad de extracción con diferentes solventes y la aplicación de calor por un largo tiempo. Las técnicas convencionales incluyen la maceración, la extracción Soxhlet y la hidrodestilación (Azmir *et al.*, 2013).

De acuerdo a lo reportado por Chinn *et al.* (2011), en esta investigación se obtuvo capsaicinoides mediante extracción convencional por maceración sólida/líquida en muestras de chile habanero, utilizando solventes como el etanol, la acetona y el acetonitrilo, encontrando que el etanol y el acetonitrilo eran los mejores solventes para la extracción. Diversos autores han concluido que el acetonitrilo es el solvente con mayor eficiencia en la extracción de capsaicinoides (Acunha *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2014; Karnka *et al.*, 2002).

En la Figura 4.6, se aprecian los contenidos de capsaicinoides totales de los 29 híbridos y las nueve variedades de chile habanero analizadas mediante los dos metodologías utilizadas, estos resultados indican que con el método de Collins se obtienen mayores cantidades de capsaicinoides totales, para la mayoría de los genotipos evaluados; siendo un 50% mayor la cantidad de capsaicina obtenida a diferencia del método ASTA, lo que evidencia una mayor eficiencia en la extracción de capsaicinoides dada por el método de Collins.

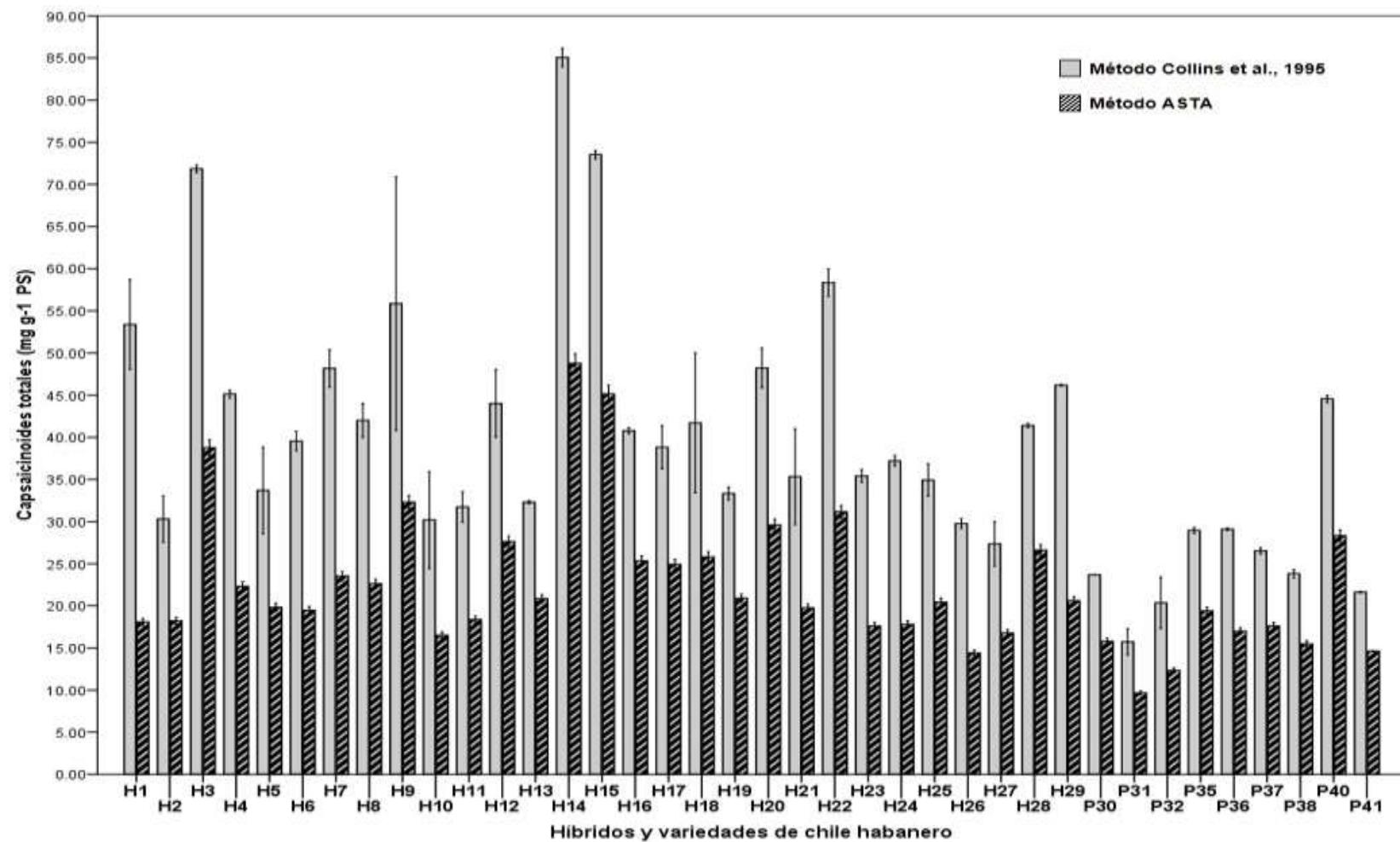


Figura 4.6 Comparación en el contenido de capsaicinoides totales (mg g⁻¹ PS) mediante los dos métodos analizados. Los valores son el promedio de tres muestras ± DE de la media.

Para una mejor apreciación de las diferencias entre el contenido de capsaicinoides a través de las dos metodologías analizadas en este capítulo, se realizó una comparación, considerando a los seis híbridos con mayor pungencia (Figura 4.7). Esta asociación expone que en ambos métodos (Collins y ASTA), el híbrido H14 es el espécimen que alcanzó el nivel más alto de capsaicinoides totales, por ello figura con una pungencia de 1,369,360 SHU de acuerdo a la técnica de Collins; por el contrario, con la metodología de ASTA reportó 785,027 SHU. En orden por el contenido de unidades de picor Scoville (SHU), el segundo híbrido con mayor picor fue el H15, seguido por el H3, el H22, el H9, y por último el H20 con una cifra de 776,263 SHU (Collins) y de 476,249 SHU (ASTA).

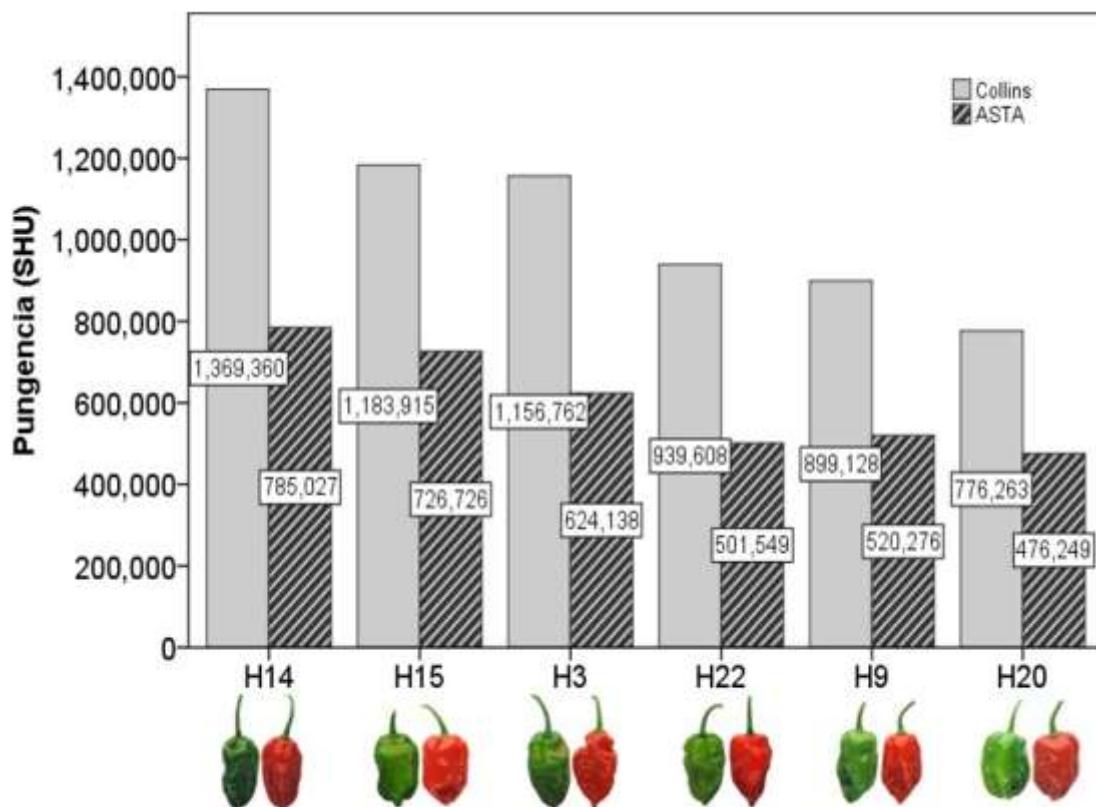


Figura 4.7 Análisis de los híbridos con mayor pungencia, de acuerdo a las unidades de picor Scoville (SHU), contrastando los dos métodos.

CAPÍTULO IV

Los valores arrojados por ambos procesos demuestran que, entre ellos existe una sensibilidad distinta que varía por hasta 448,512 SHU. La diferencia entre los valores percibidos por los métodos de Collins y ASTA, podría atribuirse al tipo de solvente utilizado para la extracción, ya que el primero utiliza el acetonitrilo, y este es el solvente con mayor poder de extracción de capsaicinoides (Acunha *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2014; Karnka *et al.*, 2002). Sin embargo, el uso de este producto químico, eleva el costo de manufactura en la industria de obtención de capsaicinoides. Debido a esto, el chile habanero es un cultivo de alto valor para la industria de extracción de capsaicinoides, por ello existe la necesidad de contar con un método de extracción y cuantificación de estos compuestos que sea eficiente y confiable, pero que a su vez sea asequible para los costos de producción.

Conforme a las características como el rendimiento, el peso del fruto, el tamaño y su alto contenido de capsaicinoides, se seleccionaron diez híbridos (H1, H3, H4, H7, H9, H12, H14, H15 H20 y H22); que sobresalieron en estas características, exponiendo su potencial para incursionar tanto en el mercado de consumo en fresco nacional e internacional, así como por los diversos usos y aplicaciones que tienen en las diferentes industrias (Figura 4.8).



Híbridos:

	H1	H3	H4	H7	H9	H12	H14	H15	H20	H22
Color del fruto maduro:	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
Color del fruto inmaduro:	Verde claro	Verde intermedio	Verde intermedio	Verde intermedio	Verde intermedio	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde intermedio
Forma:	Cuadrado	Triangular	Triangular	Acampanulado	Triangular	Rectangular	Triangular	Rectangular	Cuadrado	Triangular
Nº de lóculos:	3	3	3	3	3	3-4	2-3	3	2	3
Tipo de epidermis:	Liso	Semirugoso	Liso	Semirugoso	Semirugoso	Liso	Rugoso	Semirugoso	Semirugoso	Semirugoso
Tamaño:	4.46 x 3.20	5.37 x 2.98 cm	4.63 x 3.08 cm	3.91 x 3.87 cm	4.63 x 3.08 cm	4.83 x 3.21 cm	4.98 x 2.87 cm	4.07 x 3.23 cm	4.86 x 3.28 cm	5.53 x 2.87 cm
Espesor de pericarpio:	2.42 mm	1.84 mm	2.47 mm	2.46 mm	2.33 mm	2.17 mm	1.94 mm	2.22 mm	2.61 mm	1.68 mm
Peso:	13.61 g	11.56 g	13.40 g	15.12 g	11.95 g	12.52 g	9.47 g	12.02 g	15.58 g	10.26 g
Nº de frutos por planta:	206	278	227	224	272	233	221	129	639	274
Rendimiento planta (kg):	2.80	3.21	2.99	3.38	3.24	2.90	2.09	1.55	9.95	2.80

Días a floración:	26	33	33	33	33	42	33	33	42	33
Pungencia:	859,457 SHU	1,156,762 SHU	726,415 SHU	775,592 SHU	899,128 SHU	708,699 SHU	1,369,360 SHU	1,183,915 SHU	776,263 SHU	939,608 SHU
Preferible para:										
Consumo en fresco										
Industria										
Exportación										

Figura 4.8 Híbridos F1 seleccionados por destacar en la mayoría de los caracteres evaluados.

CAPÍTULO IV

CAPÍTULO V

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN HÍBRIDOS Y VARIEDADES DE CHILE HABANERO

5.1 INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*C. chinense*) es una hortaliza de gran interés económico, sus frutos poseen características únicas de sabor y picor. Su pungencia se debe a los capsaicinoides, los cuales en la industria farmacéutica han promovido su estudio fitoquímico (Morán-Bañuelos *et al.*, 2008). Debido a la importancia tanto económica, biológica y al elevado uso de estos productos, es necesario contar con métodos de análisis rápidos, eficaces y reproducibles para la de extracción y cuantificación de estos compuestos. El chile habanero se utiliza como materia prima en el procesamiento de diferentes productos alimenticios, los cuales están destinados principalmente al mercado nacional e internacional en forma de frutos frescos, salsas, pasta, chile seco, chile en polvo, condimento, oleoresinas y para la obtención de capsaicina (Wahyuni *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2009).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las herramientas más eficaces para la separación y análisis de un gran número de compuestos naturales presentes en plantas, alimentos y formulaciones farmacéuticas. En particular, esta técnica es la más empleada a la hora de analizar los capsaicinoides presentes en pimientos y alimentos elaborados a partir de los mismos (Schweiggert *et al.*, 2006).

En México, el chile habanero obtuvo la denominación de origen como “Chile habanero de la Península de Yucatán” (DOF, 2010), así como el proyecto de Norma Oficial Mexicana (PROY-NOM- 189-SCFI-2012), que establece las políticas de protección lo mismo que las especificaciones que el chile habanero cultivado en la Península de Yucatán debe cumplir para que se le otorgue esta distinción, la cual le da un valor agregado. El 21 de febrero del 2018 fue actualizada a “PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM- 189-SCFI-2018 Chile habanero de la Península de Yucatán (*C. chinense* Jacq.) Especificaciones y métodos de prueba” (DOF, 2018), donde se actualizó en específico el método de

CAPÍTULO V

extracción y cuantificación de capsaicinoides. Las principales características para obtener la denominación de origen “Chile habanero de la Península de Yucatán” son:

1. Provenir de cultivares locales y sin adición de genes de otras especies, cultivados dentro del territorio comprendido por la Declaratoria.
2. Tener forma acampanada con terminación en punta, constituido de 2 a 4 lóculos.
3. Estar exentos de pudrición, manchas, enfermedades y plagas (por ejemplo: picudo, mosca blanca, piojo harinoso, ácaro y babosa).
4. Concentración superior a los 6.5 mg capsaicinoides totales por g de peso seco, equivalente a 104,650 Unidades Scoville (SHU) cuando el fruto se encuentra en estado inmaduro; y superior a los 12.5 mg de capsaicinoides totales por g de peso seco, equivalente a 201,250 SHU, cuando el fruto se encuentre en su estado de madurez. Esta especificación se verifica con el método de prueba descrito en el numeral 12.2.2 de la presente Norma Oficial Mexicana. El cual se basa principalmente en el establecido en el manual de la American Spice Trade Association (ASTA) método ASTA 21.3.

De acuerdo a los resultados del capítulo anterior (Capítulo IV) donde se compararon dos métodos de extracción y cuantificación siendo uno de ellos el ASTA 21.3; en este método se evidenció una menor concentración de capsaicinoides; de manera que el objetivo de este capítulo fue optimizar un método de extracción y cuantificación de los dos principales capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) presentes en híbridos y variedades de chile habanero, en el cual se alcanzará un mayor contenido de estos compuestos de una manera rápida, reproducible y con el menor consumo posible de disolventes y de muestra.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo. Para este estudio, se utilizaron 29 híbridos F1 y nueve variedades de chile habanero (*C. chinense*). Estos fueron sembrados durante el período de Junio 2018 a Marzo 2019 en invernaderos ubicados en la unidad de producción de semillas (SPU) del Parque Científico y Tecnológico de Yucatán en Sierra Papacal, Mérida, Yucatán, México, a 21° 07' 20" N 89° 43' 41" O y altitud de 9 msnm.

Durante el período de estudio, la temperatura promedio fue de 18 °C mínimo y 37 °C máximo y la humedad relativa fue de 86% (Servicio Meteorológico Nacional, 2018).

Las semillas se germinaron en bandejas de poliestireno con 200 cavidades utilizando PEAT MOSS® como sustrato; las plántulas se trasplantaron al suelo después de aproximadamente 35 días, en condiciones de invernadero, a una distancia de 30 cm entre plantas y 100 cm entre hileras. El manejo y el riego de plantas, el control de plagas, enfermedades y la fertilización se llevaron a cabo siguiendo los estándares establecidos aplicados al cultivo de chile habanero en la región (Tun-Dzul, 2001). Para cada variedad se cortaron verticalmente los frutos, y se transfirieron a una bandeja de aluminio para secar en un horno de circulación de aire durante 48 horas, posteriormente los frutos secos de cada variedad se molieron hasta obtener un polvo fino y homogéneo; y por último estos se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

*Extracción y cuantificación de capsaicinoides. (**Estos datos son confidenciales para la solicitud de su patente**).*

La linealidad de la curva de calibración fue diseñada, para que los estándares de la capsaicina y la dihidrocapsaicina fueran detectados en el rango de 15 – 350 ppm para las muestras. Las soluciones estándar se prepararon a partir de una solución madre de capsaicina y dihidrocapsaicina, utilizando cinco diluciones en serie a 15, 50, 100, 150, 250 y 350 ppm. Cada solución se inyectó tres veces y se ejecutó en el HPLC. Las curvas estándar se generaron trazando el área del pico frente a la concentración.

Análisis estadísticos. Los datos obtenidos se muestran como la media ± DE. Para detectar diferencias significativas entre el perfil de capsaicinoides de los genotipos de chile evaluados, se realizó una prueba de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el software SPSS (versión 22) para Windows.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A través del análisis de regresión lineal de las concentraciones de los estándares de la capsaicina (Figura 5.1) y la dihidrocapsaicina (Figura 5.2), se establece que hay una linealidad cercana a 1, con un coeficiente de correlación (R^2) de $R^2 = 0.99673$ y $R^2 =$

CAPÍTULO V

0.99697 respectivamente, lo que confirma la precisión en la preparación y dilución de los estándares utilizados, así como la confiabilidad en el método.

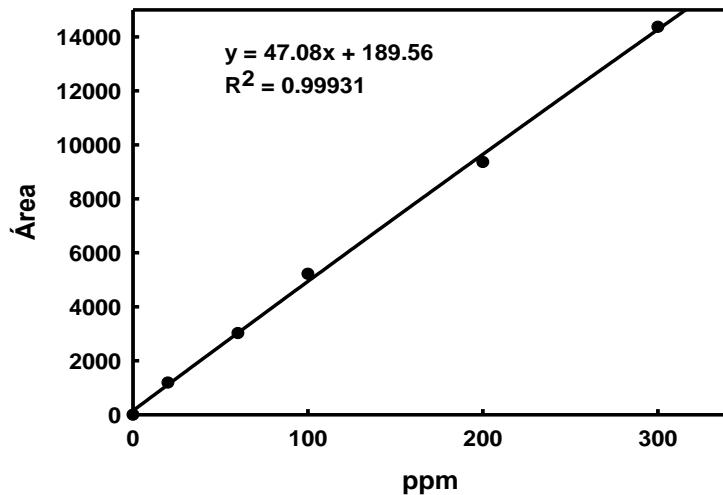


Figura 5.1 Curva de calibración del estándar de capsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 325 nm.

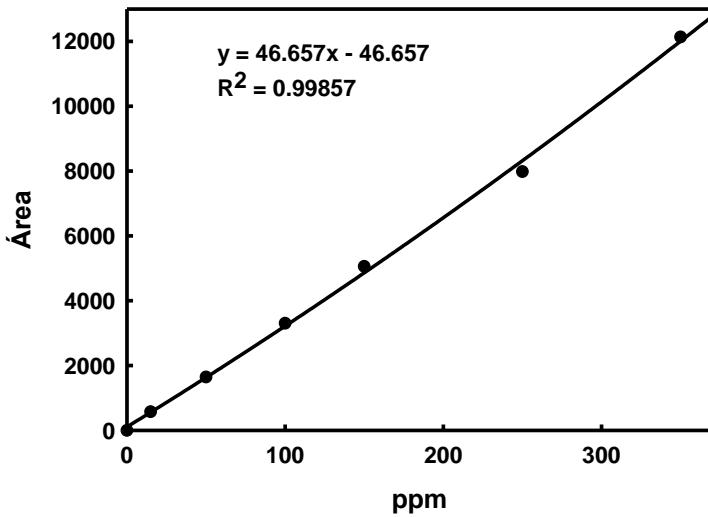


Figura 5.2 Curva de calibración del estándar de dihidrocapsaicina. La excitación y emisión de la longitud de onda fue de 280 y 325 nm.

Los dos principales capsaicinoides: la capsaicina y la dihidrocapsaicina fueron separados identificados y cuantificados por el HPLC, utilizando un compuesto estándar. Los

cromatogramas del compuesto estándar y del extracto etanólico, los resultados obtenidos del híbrido H25 se muestran en la Figura 5.3. Ambos compuestos se encontraron en todas las muestras analizadas en el presente estudio, donde se indican los tiempos de retención de 11.67 min para capsaicina y 18.74 min para dihidrocapsaicina.

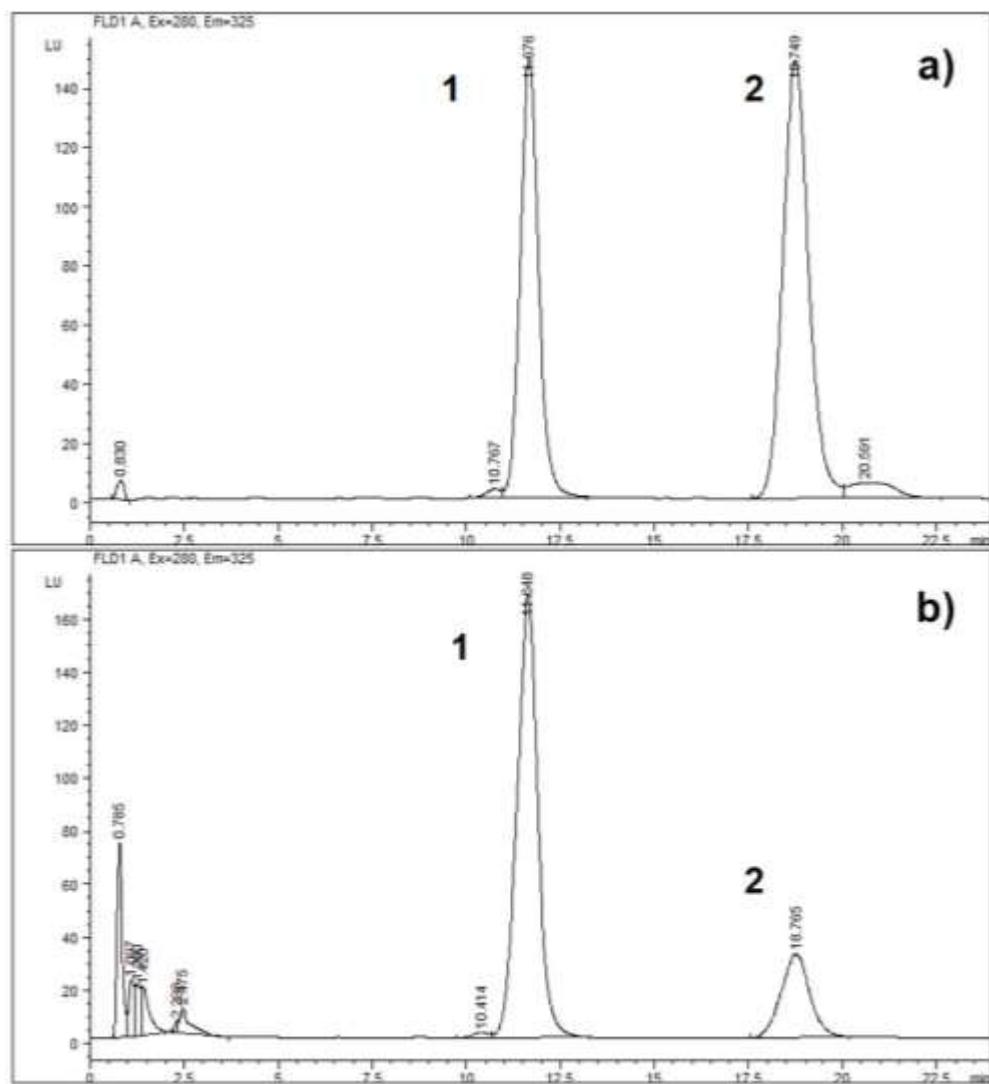


Figura 5.3 Cromatograma de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) de los estándares capsaicina y dihidrocapsaicina (a) y del híbrido H25 (b). Se ilustra la separación de capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2).

Con esta nueva técnica de extracción y cuantificación, se evaluaron 29 híbridos y nueve variedades de chile habanero, cultivadas en Yucatán, en su estado óptimo de

CAPÍTULO V

maduración. La concentración de capsaicinoides es expresada en unidades de mg g⁻¹ de peso seco. Los resultados obtenidos, a través del método concebido para este capítulo se encuentran en la Tabla 5.1, donde es posible observar las cantidades correspondientes a los dos capsaicinoides mayoritarios (capsaicina y dihidrocapsaicina) y el valor de pungencia expresado en unidades de picor SHU (todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado).

La concentración de los capsaicinoides totales se halló en un rango de 9.93 mg g⁻¹ PS a 51.42 mg g⁻¹ PS, que convertido a unidades de picor Scoville es 159,905 - 827,884 SHU. El mayor contenido de capsaicina se obtuvo en el híbrido H14 con 51.42 mg g⁻¹ PS (827,884 SHU), mientras que la variedad P31 obtuvo la menor concentración para el compuesto capsaicina con 6.75 mg g⁻¹ PS (159,905 SHU). Respecto al compuesto dihidrocapsaicina el híbrido H22 fue el de mayor concentración con 8.25 mg g⁻¹ PS (523,172 SHU), siendo la variedad P30 el de menor concentración registrando 2.85 mg g⁻¹ PS (262,944 SHU) (Tabla 5.1). Todos los genotipos de chile habanero evaluados en este estudio a excepción de la variedad P31 están por encima del rango de concentración de capsaicinoides (12.5 mg por gramo de peso seco) que especifica la Norma Oficial Mexicana para otorgar la denominación de origen “Chile habanero de la Península de Yucatán” (DOF, 2018).

Los valores de capsaicinoides totales se presentaron entre 9.93 y 51.42 mg g⁻¹ PS (159,905-827,884 SHU), lo cual se encuentra dentro del rango reportado por Canto-Flick *et al.* (2008) encontrado en fruto completo de accesiones de chile habanero; y su vez por los datos evidenciados por Alpizar (2002), quien reporta valores similares en los habaneros criollos de color naranja de la Península de Yucatán. Los capsaicinoides más abundantes en los frutos de *Capsicum* son la capsaicina y la dihidrocapsaicina, ambos constituyen el 80 y 90% del total (Al Othman *et al.*, 2011). Por su parte en el 2009 Antonious *et al.* realizaron un análisis de capsaicina y dihidrocapsaicina en 63 accesiones de *C. chinense* donde señalan que las concentraciones y proporciones relativas de estos dos capsaicinoides varían significativamente, esto entre las accesiones de un mismo país y los países de origen, encontrando que en algunas accesiones el contenido de dihidrocapsaicina era mayor que el de capsaicina. Relativo al trabajo de Antonious *et al.*

(2009) en todos los genotipos de chile habanero evaluados, la capsaicina siempre fue el capsaicinoide mayoritario.

Tabla 5.1 Contenido de capsaicinoides de híbridos y variedades de chile habanero (*C. chinense*) cultivadas en Yucatán

	#	C	DHC	Capsaicinoides totales	Pungencia (SHU)
		mg g ⁻¹ PS	mg g ⁻¹ PS	mg g ⁻¹ PS	
Híbridos	H1	16.36 ± 0.25 ^{klm}	4.69 ± 0.06 ^{ghij}	21.05 ± 0.31 ^{jklm}	338,861
	H2	14.80 ± 0.24 ^{lmnop}	4.08 ± 0.06 ^{hijklm}	18.88 ± 0.29 ^{lmno}	303,975
	H3	34.19 ± 0.33 ^c	7.93 ± 0.49 ^a	42.12 ± 1.07 ^c	678,198
	H4	19.16 ± 0.36 ^{hi}	4.78 ± 0.07 ^{fghi}	23.94 ± 0.43 ^{hij}	385,465
	H5	17.07 ± 0.39 ^{ijkl}	4.89 ± 0.12 ^{fgh}	21.96 ± 0.52 ^{jkl}	353,600
	H6	17.23 ± 0.45 ^{ijk}	4.19 ± 0.10 ^{hijklm}	21.42 ± 0.56 ^{jklm}	344,793
	H7	19.59 ± 0.17 ^{gh}	3.88 ± 0.04 ^{ijklmno}	23.46 ± 0.24 ^{ij}	377,767
	H8	21.52 ± 1.03 ^{fg}	4.14 ± 0.14 ^{hijklm}	25.67 ± 1.18 ^{ghi}	413,224
	H9	28.78 ± 0.18 ^d	6.56 ± 0.32 ^c	35.34 ± 0.50 ^d	568,970
	H10	13.62 ± 0.13 ^{nop}	5.50 ± 0.03 ^{def}	19.12 ± 0.17 ^{lmno}	307,753
	H11	16.60 ± 2.09 ^{jklm}	4.82 ± 0.52 ^{fghi}	21.42 ± 2.61 ^{jklm}	344,874
	H12	24.05 ± 1.73 ^e	6.51 ± 0.58 ^c	30.56 ± 2.31 ^{ef}	492,040
	H13	19.21 ± 0.92 ^{hi}	3.35 ± 0.15 ^{nopqr}	22.56 ± 1.07 ^{jk}	363,256
	H14	43.82 ± 1.18 ^a	7.60 ± 0.49 ^{ab}	51.42 ± 1.68 ^a	827,884
	H15	39.13 ± 0.84 ^b	7.23 ± 0.45 ^b	46.36 ± 1.28 ^b	746,446
	H16	21.53 ± 0.56 ^{fg}	4.05 ± 0.11 ^{hijklmn}	25.58 ± 0.67 ^{ghi}	411,837
	H17	22.14 ± 0.36 ^{ef}	4.78 ± 0.11 ^{fghi}	26.93 ± 0.45 ^g	433,496
	H18	22.19 ± 0.25 ^{ef}	4.49 ± 0.10 ^{ghijkl}	26.67 ± 0.36 ^{gh}	429,460
	H19	19.14 ± 0.34 ^{hi}	3.61 ± 0.08 ^{lmnop}	22.75 ± 0.42 ^{ijk}	366,277
	H20	27.35 ± 0.50 ^d	5.51 ± 0.09 ^{def}	32.87 ± 0.58 ^{de}	529,144
	H21	15.20 ± 0.28 ^{klmno}	6.10 ± 0.14 ^{cd}	21.30 ± 0.43 ^{jklm}	342,863
	H22	24.24 ± 0.27 ^e	8.25 ± 0.36 ^a	32.50 ± 0.64 ^e	523,172
	H23	13.21 ± 0.28 ^{op}	5.72 ± 0.28 ^{de}	18.92 ± 0.57 ^{lmno}	304,673
	H24	15.22 ± 0.45 ^{klmno}	4.43 ± 0.13 ^{ghijkl}	19.64 ± 0.58 ^{klmn}	316,243
	H25	18.79 ± 1.13 ^{hij}	4.59 ± 0.21 ^{ghijk}	23.38 ± 1.35 ^{ij}	376,338
	H26	14.42 ± 0.68 ^{mnop}	3.47 ± 0.10 ^{mnopqr}	17.89 ± 0.79 ^{nop}	288,024
	H27	13.88 ± 0.14 ^{nop}	5.51 ± 0.06 ^{def}	19.38 ± 0.21 ^{lmno}	312,065
	H28	23.94 ± 0.02 ^e	4.43 ± 0.02 ^{ghijkl}	28.37 ± 0.04 ^{fg}	456,731
	H29	17.17 ± 0.06 ^{ijkl}	4.47 ± 0.00 ^{ghijkl}	21.64 ± 0.07 ^{jklm}	348,397
Variedades	P30	13.49 ± 0.04 ^{nop}	2.85 ± 0.00 ^r	16.33 ± 0.06 ^{opq}	262,944
	P31	6.75 ± 0.42 ^r	3.18 ± 0.00 ^{opqr}	9.93 ± 0.03 ^r	159,905
	P32	9.67 ± 0.10 ^q	4.09 ± 0.03 ^{hijklm}	13.77 ± 0.07 ^q	221,668
	P35	15.88 ± 0.06 ^{klmn}	5.05 ± 0.04 ^{efg}	20.93 ± 0.10 ^{jklnm}	337,040
	P36	13.46 ± 0.02 ^{nop}	5.00 ± 0.03 ^{efg}	18.46 ± 0.06 ^{mnop}	297,212
	P37	15.20 ± 0.03 ^{klmno}	3.75 ± 0.01 ^{klmno}	18.95 ± 0.05 ^{lmno}	305,080
	P38	12.75 ± 0.06 ^p	3.06 ± 0.00 ^{pqr}	15.81 ± 0.07 ^{pq}	254,584

CAPÍTULO V

P40	27.12 ± 0.09 ^d	3.90 ± 0.00 ^{ijklmn}	31.02 ± 0.09 ^{ef}	499,397
P41	14.99 ± 0.19 ^{klmnpq}	2.90 ± 0.03 ^{qr}	17.88 ± 0.23 ^{nop}	287,904

Cada valor es el promedio de tres muestras ± la desviación estándar de la media. Los promedios seguidos de letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey. C: capsaicina, DHC: dihidrocapsaicina y PS: peso seco.

El picor de los chiles habaneros, el cual es ocasionado por el contenido de capsaicinoides, es uno de los principales atributos de calidad sensorial de esta especie. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas variedades e híbridos cada vez más picantes es un reto para los fitomejoradores (Bosland *et al.*, 2012). El nivel de pungencia de los chiles, determina en gran medida la demanda y la forma de su consumo en estado inmaduro o maduro; en fresco o procesado; como especia, en salsas, en pasta, molido, oleoresinas o para la extracción de capsaicina. En este sentido, es esencial disponer de un método de extracción y cuantificación, que cumpla con las características de eficiencia y confiabilidad.

5.3.1 Comparación del método ASTA con el método Muñoz-Santana

Este apartado se centra en la comparación entre dos métodos de extracción de capsaicinoides en muestras de híbridos y variedades de chile habanero. Los parámetros que se compararon fueron: la temperatura, el disolvente, el volumen del disolvente, el tiempo de extracción, el tamaño de muestra y el número de muestras simultáneas que se pueden extraer a la vez. En la Tabla 5.2 se concentran las características de los métodos desarrollados para la extracción de capsaicinoides en frutos de chile habanero.

Tabla 5.2 Resumen de las características de los métodos de extracción desarrollados.

Parámetros de extracción	Método Muñoz-Santana (Baño maría)	Método ASTA (Extracción directa por reflujo)
Temperatura	75 °C	80 °C
Disolvente	Etanol	Etanol
Volumen de disolvente	50 ml	200 ml

Tiempo de extracción	4 horas	5 horas
Tamaño de la muestra	500 mg	25 g
Nº de muestras simultaneas	16	1

Como puede advertirse en la Tabla 5.2, los métodos desarrollados presentan ventajas y desventajas entre ellos. La extracción mediante baño maría presenta algunos beneficios con relación a la extracción directa por reflujo; como es el tamaño de muestra a utilizar y el volumen de disolvente por muestra, siendo menor la cantidad de solvente utilizado en el método Muñoz-Santana, así como también un menor tiempo de extracción facilita mucho el análisis de una gran cantidad de muestras, además de ahorrar energía y tiempo de trabajo.

La extracción por baño maría facilita realizar varias extracciones de forma sincrónica, por ejemplo los equipos disponibles en el laboratorio donde labora este grupo de investigación, es posible realizar 16 extracciones simultaneas utilizando el baño maría y una extracción empleando el reflujo, de esta manera un operario podría extraer completamente 16 muestras de chile empleando el baño maría en cuatro horas de tiempo, este mismo operario tardaría 80 horas en extraer las mismas 16 muestras empleando el reflujo. Lo que indica que la técnica de extracción mediante el baño maría es la más adecuada, porque permite analizar un mayor número de muestras en menor tiempo.

Es ampliamente conocido que el rendimiento de una extracción química depende de varios factores, como son el tipo de disolvente, el estado de la muestra, el tiempo y la temperatura de extracción (Dai y Mumper, 2010). En el análisis de Mokhtar *et al.* (2016), realizaron la extracción de la capsaicina y la dihidrocapsaicina en una variedad de *C. annuum* con seis diferentes solventes (metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, isopropanol y acetonitrilo) concluyendo que el metanol y el etanol fueron los solventes con los que se obtuvo un mayor rendimiento de estos compuestos. Asimismo, Barbero *et al.* (2008), estudiaron el efecto del metanol, el etanol, el acetonitrilo, y el agua en la extracción de capsaicinoides; los resultados confirman que el mejor disolvente para la extracción de capsaicinoides es el metanol, seguido del etanol y el acetonitrilo; de

CAPÍTULO V

acuerdo a ellos, el agua no es un buen disolvente para la extracción de estos compuestos.

Otro de los factores fundamentales en una extracción eficiente de capsaicinoides es la temperatura, en general cuanto mayor es la temperatura, mayor es la eficacia en el proceso de extracción (Huie, 2002). Sin embargo, algunos procesos de degradación pueden ocurrir a altas temperaturas y el rendimiento de estos compuestos es menor (Barbero *et al.*, 2008). En el 2016 Mokhtar *et al.* estudiaron el efecto de cuatro temperaturas (50, 75, 100 y 120 °C) en la extracción de capsaicinoides, donde obtuvieron que las altas temperaturas mejoraron la extracción y reportaron que la degradación de los capsaicinoides comenzó a 125 °C; por tanto, la temperatura elegida por ellos de 100 °C.

Los valores del contenido de capsaicinoides totales percibidos en el método Muñoz-Santana fueron contrastados con los resultados alcanzados en el capítulo IV mediante el método ASTA. La concentración de capsaicinoides totales mediante el método ASTA oscilo entre 9.66 – 48.76 mg g⁻¹ PS, mientras que en el método desarrollado en este capítulo fue de 9.93 – 51.42 mg g⁻¹ PS, por lo que es posible inferir que la sensibilidad del método Muñoz-Santana marca una tendencia al alta, con una diferencia mínima, pero con otras bondades ya mencionadas. En la Figura 5.4 se puede apreciar que el contenido de capsaicinoides totales es mayor en el método Muñoz-Santana para todos los genotipos de chile habanero evaluados.

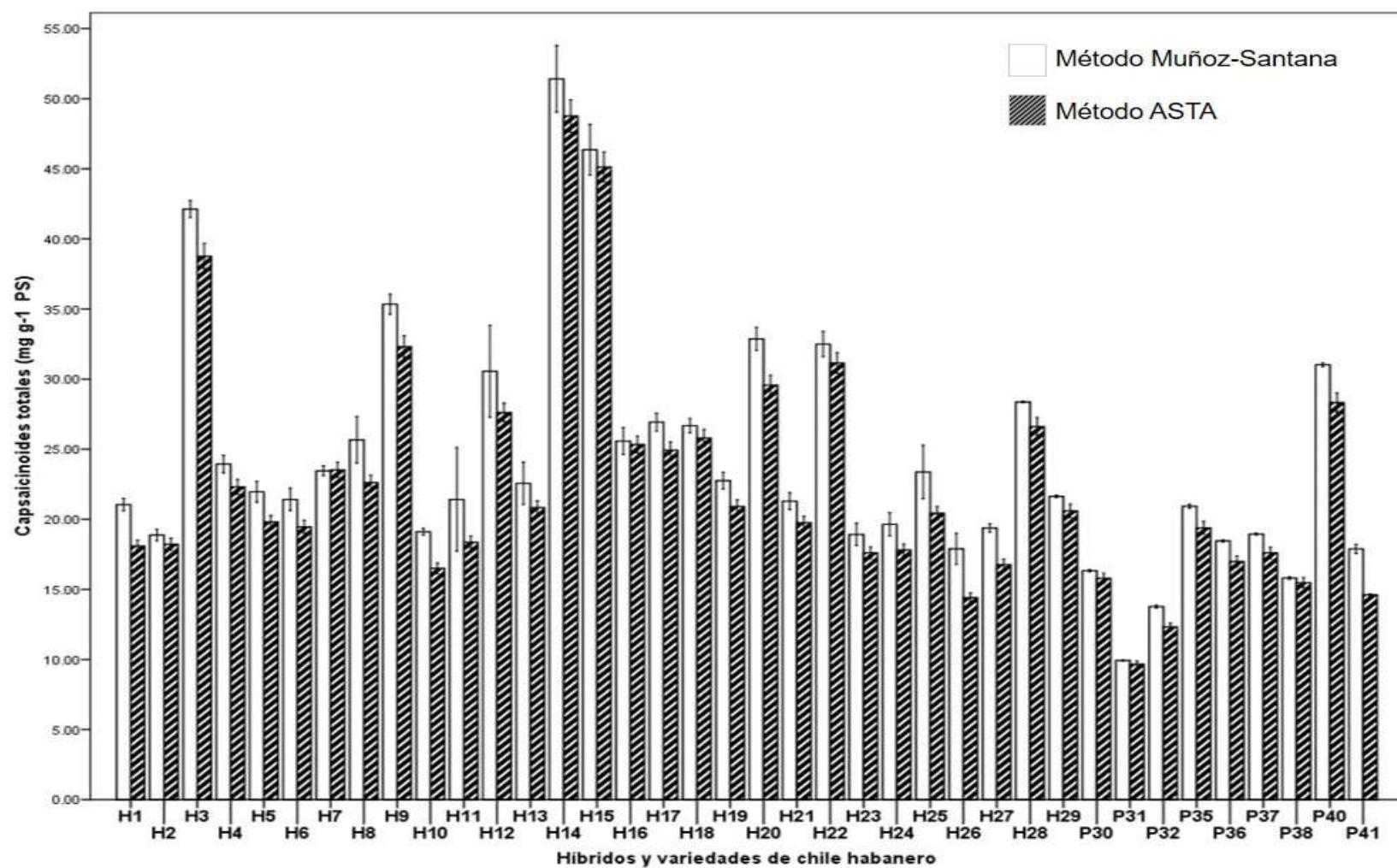


Figura 5.4 Comparación en el contenido de capsaicinoides totales (mg g⁻¹ PS) mediante los dos métodos analizados. Los valores son el promedio de tres muestras ± DE de la media.

A partir de la determinación de los seis híbridos con un nivel elevado de capsaicinoides (Figura 5.5), fue posible observar de manera clara la diferencia entre los compuestos percibidos por la técnica de ASTA y, por el método Muñoz-Santana propuesto en este capítulo. A través de este análisis, el híbrido H14 es el que alcanza el pico más alto de compuestos capsaicinoides, con una cifra de 827,884 SHU de acuerdo al método Muñoz-Santana, mientras que con el procedimiento de ASTA refiere un 785,027 SHU, coincidiendo con los valores del capítulo IV. De acuerdo al orden descendente de pungencia, el segundo y el tercer híbrido con mayor contenido de capsaicinoides, es el H15 y el H3 respectivamente; en tanto que el híbrido H9 ocupa el cuarto lugar, esto difiere de lo evidenciado en el capítulo IV, donde el H22 ocupaba esta posición. Siguiendo con la jerarquía de acuerdo al valor de unidades de picor Scoville, el híbrido H20 y el híbrido H22 ocupan el quinto y sexto lugar con una cifra de 529, 144 SHU (método Muñoz-Santana) y de 476, 249 SHU (ASTA) respectivamente.

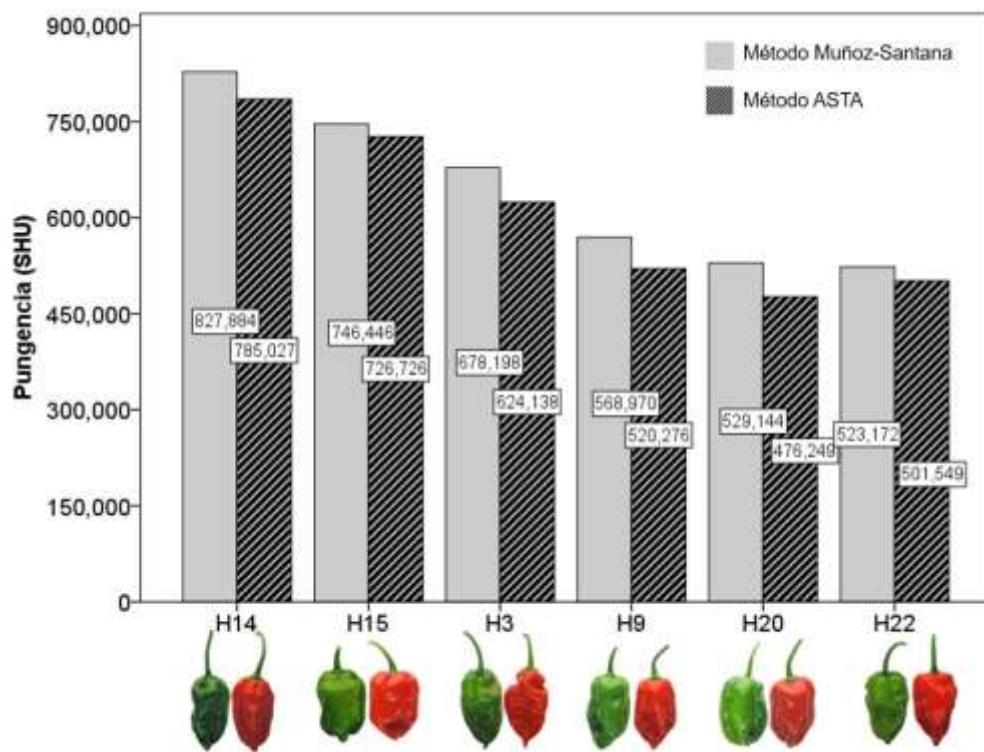


Figura 5.5 Evaluación de los híbridos con mayor contenido de unidades de picor Scoville (SHU), de acuerdo al método Muñoz-Santana y a la técnica de ASTA.

Las diferencias entre el contenido de capsaicinoides varió entre los 2 a 3 mg g⁻¹ PS, lo cual podría resultar poco e insignificante, pero si se extrapola a los kilogramos de muestra utilizados en el proceso de extraer compuestos de cada variedad de chile, resultaría una cantidad considerable. Por ejemplo, en un kilogramo de peso seco del híbrido H1 mediante el método ASTA obtendríamos 18.09 g de capsaicinoides, mientras que con el método Muñoz-Santana obtendríamos 21.08 g de capsaicinoides totales. Por lo que, se concluye que el método Muñoz-Santana desarrollado en este capítulo, además de obtener mayor contenido de capsaicinoides, de igual manera permite realizar la extracción de un mayor número de muestras en un mínimo de tiempo, del mismo modo que el costo y el volumen del disolvente utilizado, por ejemplo, para realizar la extracción de capsaicinoides en 10 muestras de chile mediante el método ASTA utilizaremos 2000 ml de etanol mientras que con el método Muñoz-Santana utilizaríamos 500 ml de etanol en el análisis de esas mismas 10 muestras, lo mismo que la contaminación ambiental son menores, por consiguiente, esta metodología tendría superioridad en cuanto al costo-beneficio para las industrias interesadas en la obtención mercantil de estos compuestos.

CAPÍTULO V

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES

Dentro de la colección de chile habanero, los caracteres cualitativos, color de antocianinas de los nudos, el margen del cáliz del fruto, la posición de la hoja, la forma del fruto y la ondulación transversal del fruto aportaron el 38.2 % de la variabilidad total. Mientras que los cuantitativos, contenido de capsaicina, espesor de pericarpio, diámetro del tallo y rendimiento por planta, aportaron la mayor variación (85.1%).

Las correlaciones entre los atributos refieren que los genotipos H20 y H26, poseen el rendimiento más alto con 9.95 y 6.94 kg/planta respectivamente; y un diámetro de tallo de 1.9 cm para H20 y el H26 con 1.7 cm. La asociación entre los valores de longitud del fruto y el contenido de capsaicina, demostraron que los genotipos H9, H14, H15, H16, H22, P33 y P34, fueron superiores al resto de la colección; siendo el genotipo H22 el de mayor longitud con 5.52 cm y el P34 el de mayor contenido de capsaicina con 147.11 mg g⁻¹ PS. Los genotipos que se encuentran dentro del grupo con el mayor espesor de pericarpio y un elevado número de semillas por frutos, son el H7 (0.247 cm / 49), H19 (0.277 cm / 52), H25 (0.257 cm / 48), P38 (0.277 cm / 50) y P41 (0.282 cm / 49).

El rendimiento y la pungencia, es una asociación de caracteres que sugiere que el espesor del pericarpio está correlacionado positivamente con el ancho de fruto (0.58) y el peso de fruto (0.49), esto apunta a que los chiles con un pericarpio grueso presentan un mayor ancho y peso de fruto. El contenido de capsaicina presentó una relación negativa con los caracteres peso de fruto (-0.49) y espesor de pericarpio (-0.62); lo que demuestra que, a menor peso de fruto y menor espesor de pericarpio, el contenido de capsaicina es mayor.

El contenido de capsaicinoides de las variedades e híbridos, evaluados por el método de Collins, osciló entre los 15.71 – 85.05 mg g⁻¹ PS. Los genotipos que se distinguen en esta característica fueron: los híbridos H14 con 1,369,360 SHU; el H15 con 1,183,915 SHU; y el H3 con 1,156,762 SHU. Los capsaicinoides totales, analizados a través del método ASTA, reportaron valores que van desde los 9.66 a los 48.76 mg g⁻¹ PS. Los genotipos

CAPÍTULO VI

con mayor contenido, de acuerdo al método antes mencionado, son el híbrido H14 con 785,027 SHU y el H15 con 726,726 SHU. A partir de los valores reportados por los dos métodos, se determinó que el método de Collins resultó ser el sistema con mayor eficacia, ya que logró extraer más del 50% del contenido de capsaicinoides en todos los genotipos evaluados, a diferencia de lo percibido por el método ASTA.

A través de este trabajo, fue posible optimizar una metodología de extracción y de cuantificación de capsaicinoides, que consigue reducir el tiempo de extracción, la cantidad de solvente y el tamaño de muestra, ostentando a su vez rapidez, confiabilidad y exactitud; por lo que la efectividad de este método es superior al método ASTA, utilizado en el “PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM- 189-SCFI-2012 Chile habanero de la Península de Yucatán (*C. chinense* Jacq.) Especificaciones y métodos de prueba”.

6.2 PERSPECTIVAS

Los resultados de esta investigación aportan un catálogo de híbridos y variedades de chile habanero con sus características agronómicas y sus contenidos de capsaicinoides con la finalidad de que sean de interés para diferentes industrias.

Se sugiere cultivar la misma variedad o híbrido en la Península de Yucatán y en otro estado de la república, en la misma temporada y con las mismas condiciones de cultivo, para evaluar el contenido de capsaicinoides y con esos resultados, complementar futuras investigaciones respecto a las condiciones edafoclimáticas que intervienen en el picor de los frutos.

Se requiere validar el método Muñoz-Santana de extracción y cuantificación de capsaicinoides desarrollado en CICY, en diferentes laboratorios y con diferentes operadores para someter la patente.

Se recomienda continuar con investigaciones que impulsen el aprovechamiento del prometedor potencial de los capsaicinoides.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

- Acunha, T. D. S., Crizel, R. L., Tavares, I. B., Barbieri, R. L., Pereira de Pereira, C. M., Rombaldi, C. V., y Chaves, F. C. (2017). Bioactive compound variability in a Brazilian *Capsicum* pepper collection. *Crop Science*, 57(3), 1611-1623.
- Adebola, P. O., & Morakinyo, J. A. (2006). Evaluation of morpho-agronomic variability of wild and cultivated kola (*Cola* species Schott et Endl.) in South Western Nigeria. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 687-694.
- Al Othman, Z. A.; Y. B. Hadj A.; M. Abdelaty H.; A. Abdel G. (2011). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruit Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 16: 8919-8929.
- Allard, R. W. (1999). *Principles of plant breeding*. John Wiley & Sons.
- American Spice Trade Association. (1985). Official analytical methods American Trade Association. 3rd. Englewood Cliffs, N.J.
- Amruthraj, N. J., Raj, J. P., y Lebel, L. A. (2013). Polar Aprotic Extraction of Capsaicinoids from *Capsicum chinense* Bhut jolokia fruit for Antimicrobial activity. *International Journal of Biological and Pharmaceutical Research*, 4(12), 959-964.
- Antonious, G. F., Lobel, L., Kochhar, T., Berke, T., y Jarret, R. L. (2009). Antioxidants in *Capsicum chinense*: Variation among countries of origin. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 44(6), 621-626.
- Araújo, L. M., Neves, L. G., Sousa, D. A., Zeviani, W. M., Silva, L. D. R., & Marostega, T. N. (2019). Biochemical descriptors: importance of the genetic divergence study in peppers. *Horticultura Brasileira*, 37(2), 210-214.
- Asnin, L., y Park, S. W. (2015). Isolation and analysis of bioactive compounds in *Capsicum* peppers. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(2), 254-289.
- ASTA ANALYTICAL METHODS, Method 20.1 (revisado en octubre de 2004), Extractable color in capsicums and their oleoresins. <http://www.astaspice.org>.

BIBLIOGRAFÍA

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... y Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
- Bajer, T., Bajerová, P., Kremr, D., Eisner, A., Adam, M., y Ventura, K. (2016). Comparison of Two Ultrasonic Systems with Different Settings for Extraction of Capsaicinoids from Chili Peppers. *International Journal of Food Engineering*, 12(6), 567-576.
- Barbero, G. F., Liazid, A., Azaroual, L., Palma, M., y Barroso, C. G. (2016). Capsaicinoid contents in peppers and pepper-related spicy foods. *International journal of food properties*, 19(3), 485-493.
- Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M., y Barroso, C. G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75(5), 1332-1337.
- Barbero, G. F., Palma, M., y Barroso, C. G. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica chimica acta*, 578(2), 227-233.
- Barbero, G. F., Ruiz, A. G., Liazid, A., Palma, M., Vera, J. C., and Barroso, C. G. (2014). Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.). *Food chemistry* 153: 200-206.
- Barboza, G. E., Carrizo García, C., Leiva González, S., Scaldaferro, M., & Reyes, X. (2019). Four new species of Capsicum (Solanaceae) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. *PloS one*, 14(1), e0209792.
- Bernal, A. M.; Calderón, A. A.; Pedreño, M. A.; Muñoz, R.; Barceló, A. R.; Merino; F. C. (1993). Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annum* (var. annum) fruits. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 41, 1041-1044.
- Bhagowati, R. R., and Changkija, S. 2009. Genetic variability and traditional practices in Naga King Chili landraces of Nagaland. *Asian Agri-History* 13: 171-180.

- Bharath, S. M., Cilas, C., & Umaharan, P. (2013). Fruit trait variation in a caribbean germplasm collection of aromatic hot peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Hortscience*, 48(5), 531-538.
- Bignardi, C., Cavazza, A., Rinaldi, M., y Corradini, C. (2016). Correlation between different markers for the assessment of red chilli pepper powders stability during shelf-life. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(4), 391-399.
- Bogusz S,Marco PH, Valderrama P, Damasceno FC, ArandaMS, Zini CA (2015). Analysis of volatile compounds in *Capsicum* spp. by headspace solid-phase microextraction and GC × GC-TOFMS. *Anal Methods* 7:521–529.
- Bonilla-Barrientos, O., Lobato-Ortiz, R., García-Zavala, J. J., Cruz-Izquierdo, S., Reyes-López, D., Hernández-Leal, E., & Hernández-Bautista, A. (2014). Diversidad agronómica y morfológica de tomates arriñonados y tipo pimiento de uso local en Puebla y Oaxaca, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 37(2), 129-139.
- Borges-Gomez, L., Moo-Kauil, C., Ruiz-Novelo, J., Osalde-Balam, M., Gonzalez-Valencia, C., Yam-Chimal, C., and Can-Puc, F. (2014). Soils used for habanero chili production in Yucatán: predominant physical and chemical characteristics. *Agrociencia (Montecillo)*, 48: 347-359.
- Bosland PW (1996). Capsicums: innovative uses of an ancient crop. In: Janick J (ed) *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, pp 479–487
- Bosland, P. W., Coon, D., and Reeves, G. (2012). ‘Trinidad Moruga Scorpion’ Pepper is the World’s Hottest Measured Chile Pepper at More Than Two Million Scoville Heat Units. *HortTechnology*, 22: 534-538.
- Bosland, P. W., Votava, E. J., y Votava, E. M. (2012). *Peppers: vegetable and spice capsicums* (Vol. 22). Cabi.
- Bosland, P.W., Baral, J.B., (2007). ‘Bhut Jolokia’ – the world’s hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. *HortScience*, 42: 222–224.

BIBLIOGRAFÍA

- Branca, F., Chiarenza, G. L., Cavallaro, C., Gu, H., Zhao, Z., & Tribulato, A. (2018). Diversity of Sicilian broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) landraces and their distinctive bio-morphological, antioxidant, and genetic traits. *Genetic resources and crop evolution*, 65(2), 485-502.
- Butcher, J. D., Crosby, K. M., Yoo, K. S., Patil, B. S., Ibrahim, A. M. H., Leskovar, D. I., y Jifon, J. L. (2012). Environmental and genotypic variation of capsaicinoid and flavonoid concentrations in Habanero (*Capsicum chinense*) peppers. *HortScience*, 47(5), 574-579.
- Camarena Mayta, F., Chura Chuquija, J., & Blas Sevillano, R. H. (2014). Mejoramiento genético y biotecnológico de las plantas. UNALM/AGROBANCO.
- Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Bello-Bello, J.J., Lecona-Guzman, C., Solis-Marroquin, D., Aviles-Vinas, S., Gomez-Uc, E., Lopez-Puc, G., Santana-Buzzy, N., Iglesias-Andreu, L.G., (2008). Capsaicinoid content in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): hottest known cultivars. *HortScience*, 43: 1344–1349.
- Carrizo García, C., Barfuss, M. H., Sehr, E. M., Barboza, G. E., Samuel, R., Moscone, E. A., y Ehrendorfer, F. (2016). Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of botany*, 118(1), 35-51.
- Chile habanero de la Península de Yucatán. Disponible en URL: http://www_siap_gob_mx/index.php?option=comcontent&view=article&id=306:chile-habanero-de-la-peninsula-de-Yucatan&catid=72:infogramas&Itemid=422
- Chinn, M. S., Sharma-Shivappa, R. R., y Cotter, J. L. (2011). Solvent extraction and quantification of capsaicinoids from *Capsicum chinense*. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 340-345.
- Chouaibi, M., Rezig, L., Hamdi, S., y Ferrari, G. (2019). Chemical characteristics and compositions of red pepper seed oils extracted by different methods. *Industrial crops and products*, 128, 363-370.

- Collins, M. D., Wasmund, L. M., and Bosland, P. W. (1995). Improved method for quantifying capsaicinoids in capsicum using high-performance liquid chromatography. Hortscience, 30: 137–139.
- Conforti F, Statti G, Menichini F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var.*acuminatum* L.) in relation to maturity stage. Food Chemistry, 102(4), 1096–1104.
- Cordell GA, Araujo OE (1993). Capsaicin: identification, nomenclature, and pharmacotherapy. Ann Pharmacother, 27, 330–336
- Cuevas-Glory, L. F., Sosa-Moguel, O., Pino, J., y Sauri-Duch, E. (2015). GC–MS Characterization of volatile compounds in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) by optimization of headspace solid-phase microextraction conditions. Food analytical methods, 8(4), 1005-1013.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313-7352.
- Dang, Y. M., Hong, Y. S., Lee, C. M., Khan, N., Park, S., Jeong, S. W., y Kim, K. S. (2018). Determination of Capsaicinoids in Red Pepper Products from South Korea by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. Analytical Letters, 51(9), 1291-1303.
- Davis, C. B., Markey, C. E., Busch, M. A., y Busch, K. W. (2007). Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(15), 5925-5933.
- de Almeida, C. M. C. V., dos Santos Dias, L. A., Okabe, E. T., & Medeiros, J. R. P. (2005). Variability in genetic resources of cacao in Rondônia, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5(3).
- Deal, C.L.; Schnitzer, T.J.; Lipstein, E.; Seibold, J.R.; Stevens, R.M.; Levy, M.D.; Albert, D.; Renold, F. (1991). Treatment of arthritis with topical capsaicin: A double-blind trial. Clin. Ther, 13, 383-395.

BIBLIOGRAFÍA

- Diario Oficial de la Federación (DOF). (2010). Declaratoria General de Protección de la Denominación de Origen Chile Habanero de la Península de Yucatán. Disponible en URL:http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5145315&fecha=04/06/2010 consultado 1 marzo 2018.
- Djamgoz, M. B., y Isbilen, B. (2006). Dietary compounds as anti-cancer agents: a preliminary evaluation of ion channels and membrane excitability as possible target mechanisms. *Turkish Biochem.*
- Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annuum* extracts. *Int. J. Food Microbiol.*, 57, 125–128.
- Duelund, L., and Mouritsen, O. G. (2017). Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark. *Food chemistry*, 221: 913-918.
- Fabela-Morón, M. F., Cuevas-Bernardino, J. C., Ayora-Talavera, T., y Pacheco, N. (2020). Trends in Capsaicinoids Extraction from Habanero Chili Pepper (*Capsicum Chinense* Jacq.): Recent Advanced Techniques. *Food Reviews International*, 36(2), 105-134.
- FAOSTAT (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en URL: <http://faostat.fao.org/site/567/>
- Fonseca, R. M., Lopes, R., Barros, W. S., Lopes, M. T. G., & Ferreira, F. M. (2008). Morphologic characterization and genetic diversity of *Capsicum chinense* Jacq. accesions along the upper Rio Negro-Amazonas. *Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Forero, M. D., Quijano, C. E., y Pino, J. A. (2009). Volatile compounds of chile pepper (*Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum*) at two ripening stages. *Flavour and fragrance journal*, 24(1), 25-30.
- Garcés-Claver, A., Arnedo-André, M. S., Avier Abadía, R., Gil-Ortega, S. J., y 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(25), 9303–9311.
- García-Galindo H., Ortega Martínez J., García Rosales M.A., Martínez Martínez C., Beristain Guevara, C.I. (1995). La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia*, 46, 82-102.
- Giuffrida D, Dugo P, Torre G, Bignardi C, Cavazza A, Corradini C, Dugo G (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem*, 140(4):794–802
- González y M. Livera (eds.) (1991). Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. pp. 21.
- Govindarajan, V. S. (1986). *Capsicum*: production, technology, chemistry, and quality. Part III. Chemistry of the color, aroma and pungency stimuli. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24, 245–255.
- Gurung, T., Techawongstien, S., Suriharn, B., y Techawongstien, S. (2012). Stability analysis of yield and capsaicinoids content in chili (*Capsicum* spp.) grown across six environments. *Euphytica*, 187(1), 11-18.
- Gurung, T., Techawongstien, S., Suriharn, B., y Techawongstien, S. (2011). Impact of Environments on the Accumulation of Capsaicinoids in *Capsicum* spp. *HortScience*, 46(12), 1576-1581.
- Guzmán, F. A., Moore, S., de Vicente, M. C., & Jahn, M. M. (2020). Microsatellites to enhance characterization, conservation and breeding value of *Capsicum* germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67(3), 569-585.
- Hamed, M., Kalita, D., Bartolo, M. E., y Jayanty, S. S. (2019). Capsaicinoids, Polyphenols and Antioxidant Activities of *Capsicum annuum*: Comparative Study of the Effect of Ripening Stage and Cooking Methods. *Antioxidants*, 8(9), 364.

BIBLIOGRAFÍA

- Harvell, K. P., y Bosland, P. W. (1997). The environment produces a significant effect on pungency of Chiles. HortScience, 32(7), 1292-1292.
- Hawer, W. S., Ha, J., Hwang, J., y Nam, Y. (1994). Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography. Food chemistry, 49(1), 99-103.
- Hernández, J. A., Ochoa, A. A., López, E., y García, H. S. (2009). Extracción de capsaicinoides durante la deshidratación osmótica de chile Habanero en salmuera. CyTA–Journal of Food, 7(2), 127-134.
- Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S. G., y GONi, I. S. A. B. E. L. (2010). Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(6), 3399-3406.
- Hidalgo, R. y Vallejo, F. 2014. Bases para el estudio de los recursos genéticos de especies cultivadas. 1a Ed. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Cali. 286p.
- Howard, L. R., y Wildman, R. E. (2016). Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In Handbook of nutraceuticals and functional foods (pp. 173-199). CRC Press.
- Huang, X. F., Xue, J. Y., Jiang, A. Q., y Zhu, H. L. (2013). Capsaicin and its analogues: structure-activity relationship study. Current medicinal chemistry, 20(21), 2661-2672.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and bioanalytical chemistry, 373(1-2), 23-30.
- Ibiza, V. P., Blanca, J., Cañizares, J., y Nuez, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. Genetic resources and crop evolution, 59(6), 1077-1088.

- IPGRI, AVRDC and CATIE. (1995). Descriptors for *Capsicum* (*Capsicum* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; the Asian Vegetable Research and Development Center, Taipei, Taiwan, and the Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. p. 28–38.
- Islam, M. A., Sharma, S. S., Sinha, P., Negi, M. S., Neog, B., and Tripathi, S. B. (2015). Variability in capsaicinoid content in different landraces of *Capsicum* cultivated in north-eastern India. *Scientia Horticulturae*, 183: 66-71.
- Ito K, Nakazato T, Yamato K, Miyakawa Y, Yamada T, Hozumi N, Segawa K, Ikeda Y, Kizaki M (2004). Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Res*, 64:1071–1078
- Janssens, P. L. H. R., Hursel, R., Martens, E. A. P., y Westerterp-Plantenga, M. S. (2013). Acute Effects of Capsaicin on Energy Expenditure and Fat Oxidation in Negative Energy Balance. *PLoS ONE*, 8, e67786.
- Jeeatid, N., Suriharn, B., Techawongstien, S., Chanhai, S., Bosland, P. W., y 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.
- Jesus, R. D., Santos, G. D. N., Piccin, A. S., Balsalobre, T. W., Sala, F. C., & Carneiro, M. S. (2019). Characterization of pepper accessions using molecular markers linked to pungency and SSR. *Horticultura Brasileira*, 37(2), 152-160.
- Jia, S. S., Xi, G. P., Zhang, M., Chen, Y. B., Lei, B., Dong, X. S., y Yang, Y. M. (2013). Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncology reports*, 29(1), 349-354.
- Jin, R., Pan, J., Xie, H., Zhou, B., y Xia, X. (2009). Separation and quantitative analysis of capsaicinoids in chili peppers by reversed-phase argentation LC. *Chromatographia*, 70(5-6), 1011-1013.

BIBLIOGRAFÍA

- Karnka, R., Rayanakorn, M., Watañesk, S., y Vaneesorn, Y. (2002). Optimization of high-performance liquid chromatographic parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method. *Analytical sciences*, 18(6), 661-665.
- Kehie, M., Kumaria, S., Tandon, P., y Ramchiaray, N. (2015). Biotechnological advances on in vitro capsaicinoids biosynthesis in capsicum: a review. *Phytochemistry Reviews*, 14(2), 189-201.
- Kehie, M., Kumaria, S., y Tandon, P. (2013). In vitro plantlet regeneration from cotyledon segments of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili, and determination of capsaicin content in fruits of in vitro propagated plants by High Performance Liquid Chromatography. *Scientia horticulturae*, 164, 1-8.
- Kempaiah, R.K.; Manjunatha, H.; Srinivasan, K. (2005). Protective effect of dietary capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein in rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 275, 7-13.
- Kim JD, Kim JM, Pyo JO, Kim SY, Kim BS, Yu R, Han IS (1997). Capsaicin can alter the expression of tumor forming-related genes which might be followed by induction of apoptosis of a Korean stomach cancer cell line, SNU-1. *Cancer Lett* 120:235–241
- Korel, F., Bağdatlioğlu, N., Balaban, M. Ö., y Hişil, Y. (2002). Ground red peppers: Capsaicinoids content, Scoville scores, and discrimination by an electronic nose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3257-3261.
- Kowalski, S. J., y Mierzwa, D. (2011). Hybrid drying of red bell pepper: energy and quality issues. *Drying Technology*, 29(10), 1195-1203.
- Kozukue, N., Han, J. S., Kozukue, E., Lee, S. J., Kim, J. A., Lee, K. R., and Friedman, M. (2005). Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography– mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 9172-9181.

- KraftKH, BrownCH,NabhanGP,LuedelingE, Ruiz JDL, d'Eeckenbrugge GC (2014).Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. Proc Natl Acad Sci USA, 111:6165–6170.
- Kundu, S., Das, A., and Ghosh, B. (2015). Modulation of pungency and major bioactive compounds in pepper due to agro-climatic discrepancy: a case study with *Capsicum chinense* 'Bhut Jolokia' fruit. Int J Pharm Pharm Sci, 7:294.
- Kurian, A. L., y Starks, A. N. (2002). HPLC analysis of capsaicinoids extracted from whole orange habanero chili peppers. Journal of food science, 67(3), 956-962.
- Kurita, S., Kitagawa, E., Kim, C., Momose, Y., Iwahashi, H., (2002). Studies on the antimicrobial mechanism of capsaicin using yeast DNA microarray. Biosci. Biotechnol. Biochem. 66, 532–536.
- Latournerie, L., Chávez, J. L., Pérez, M., Castañón, G., Rodríguez, S. A., Arias, L. M., y Ramírez, P. (2002). Valoración in situ de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. Revista Fitotecnia Mexicana, 25(1), 25-33.
- Liu, Y., y Nair, M. G. (2010). Capsaicinoids in the hottest pepper 'Bhut Jolokia' and its antioxidant and antiinflammatory activities. Natural product communications, 5(1), 91-94.
- Loizzo, M.R., Pugliese, A., Bonesi, M., Menichini, F., Tundis, R., (2015). Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. LWT FoodSci. Technol, 64 (2), 623–631.
- Long-Solis, J. (1986). Capsicum y cultura. La historia del chilli. Fondo de Cultura Económico, México, 178 p.
- Luo, X. J., Peng, J., y Li, Y. J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. European Journal of Pharmacology, 650(1), 1–7.

BIBLIOGRAFÍA

- Manirakiza, P. A. (2003). Pungency principles in *Capsicum* - analytical determinations and toxicology. London: Taylor and Francis. (pp. 71-86).
- Marabini S, Ciabatti PG, Polli G, Fusco BM, Geppetti P (1991). Beneficial-effects of intranasal applications of capsaicin in patients with vasomotor rhinitis. Eur Arch Oto Rhino Laryngol, 248:191–194
- Martins, C. R., Lopes, W. A., y Andrade, J. B. D. (2013). Solubilidade das substâncias orgânicas. Química Nova, 36(8), 1248-1255.
- Martins, Frederico S., Leonardo L. Borges, Claudia S. C. Ribeiro, Francisco J. B. Reifschneider, and Edemilson C. Conceição. (2017). “Novel Approaches to Extraction Methods in Recovery of Capsaicin from Habanero Pepper (CNPH 15.192).” Pharmacognosy Magazine.
- Mathur, R., Dangi, R.S., Das, S.C., Malhotra, R.C., (2000). The hottest chilli variety in India. Current. Science, 79: 287–288.
- Medina-Lara, F., Echevarría-Machado, I., Pacheco-Arjona, R., Ruiz-Lau, N., Guzmán-Antonio, A., y Martinez-Estevez, M. (2008). Influence of nitrogen and potassium fertilization on fruiting and capsaicin content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). HortScience, 43(5), 1549-1554.
- Meghvansi, M. K., Siddiqui, S., Khan, M. H., Gupta, V. K., Vairale, M. G., Gogoi, H. K., and Singh, L. (2010). Naga chilli: a potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications. Journal of ethnopharmacology, 132: 1-14.
- Moirangthem, S. S., Gogoi, S., Thongbam, P. D., Ramya, K. T., Fiyaz, R. A., y Pandey, D. S. (2012). Effect of sowing time and crop geometry on the capsaicinoid content in Bhoot Jolokia (*Capsicum chinense* Jacq.). Journal of Food Science and Technology, 51, 1974–1981.
- Mokhtar, M., Russo, M., Cacciola, F., Donato, P., Giuffrida, D., Riazi, A., ... & Mondello, L. (2016). Capsaicinoids and carotenoids in *Capsicum annuum* L.: optimization of

- the extraction method, analytical characterization, and evaluation of its biological properties. *Food Analytical Methods*, 9(5), 1381-1390.
- Molina-Torres, J., Garcia-Chavez, A., y Ramirez-Chavez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: Affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3), 241–248.
- Monforte-González, M., Guzmán-Antonio, A., Uuh-Chim, F., y Vázquez-Flota, F. (2010). Capsaicin accumulation is related to nitrate content in placentas of habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(5), 764-768.
- Montoya-Ballesteros, L. C., González-León, A., García-Alvarado, M. A., y Rodríguez-Jimenes, G. C. (2014). Bioactive compounds during drying of chili peppers. *Drying technology*, 32(12), 1486-1499.
- Morán-Bañuelos, S. H., Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., Castillo-González, F., Soto-Hernández, R. M., y Miguel-Chávez, S. (2008). Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia*, 42(7), 807-816.
- Moreno, E., Fita, A., González-Mas, M. C., y Rodríguez-Burrueto, A. (2012). HS-SPME study of the volatile fraction of *Capsicum* accessions and hybrids in different parts of the fruit. *Scientia Horticulturae*, 135, 87-97.
- Morré, D. J., y Morré, D. M. (2003). Synergistic *Capsicum*-tea mixtures with anticancer activity. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 55(7), 987-994.
- Mueller-Seitz, E., Hiepler, C., y Petz, M. (2008). Chili pepper fruits: Content and pattern of capsaicinoids in single fruits of different ages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 12114–12121
- Mullerst, F., Joshi, R. K., y Buchi, J. (1971). Study of components of capsaicin.2 Quantitative gas chromatographic determination of individual homologs and analogs of capsaicin in mixtures from a natural source and of vanillyl pelargonic amide as adulteration. *Journal of Chromatography*, 63(2), 281.

BIBLIOGRAFÍA

- Muñoz-Ramírez, L. S., Peña-Yam, L. P., Avilés-Viñas, S. A., Canto-Flick, A., Guzmán-Antonio, A. A., y Santana-Buzzy, N. (2018). Behavior of the hottest chili peppers in the world cultivated in Yucatan, Mexico. *HortScience*, 53(12), 1772-1775.
- Nagy, Z.; Daood, H. G.; Ambrozy, Z.; Helyes, L. (2015). Determination of Polyphenols, Capsaicinoids, and Vitamin C in New Hybrids of Chili Peppers. *J. Anal. Methods Chem*, 2015, 1–10.
- Nascimento, P. L., Nascimento, T. C., Ramos, N. S., Silva, G. R., Gomes, J. E. G., Falcão, R. E., ... y Silva, T. (2014). Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). *Molecules*, 19(4), 5434-5447.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-189-SCFI-2012, Chile Habanero de la Península de Yucatán (*Capsicum Chinense* Jacq.)-Especificaciones y métodos de prueba. Disponible en URL: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4730/seeco2/seeco2.htm>
- Ochoa Alejo, N.; Ramírez – Malagón, R. (2001). In vitro chili pepper biotechnology *in vitro cell* 37:701-729.
- Odland, M. L., & Porter, A. W. (1941). A study of natural crossing in peppers (*Capsicum frutescens*). In *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*
- Olatunji, T. L., y Afolayan, A. J. (2020). Comparison of nutritional, antioxidant vitamins and capsaicin contents in *Capsicum annuum* and *C. frutescens*. *International Journal of Vegetable Science*, 26(2), 190-207.
- Olguín-Rojas, J. A., Fayos, O., Vázquez-León, L. A., Ferreiro-González, M., Rodríguez-Jimenes, G. D. C., Palma, M., ... y Barbero, G. F. (2019). Progression of the total and individual capsaicinoids content in the fruits of three different cultivars of *Capsicum chinense* Jacq. *Agronomy*, 9(3), 141.
- Orellana-Escobedo, L., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Ornelas-Paz, J. J., and Sepulveda, D. R. (2013). Capsaicinoids content and proximate composition of Mexican chili peppers (*Capsicum* spp.) cultivated in the State of Chihuahua:

- Contenido de capsaicinoides y composición proximal de chiles mexicanos (*Capsicum* spp.) cultivados en el estado de Chihuahua. CyTA-Journal of Food 11: 179-184.
- Orobiyi A, Loko LY, Sanoussi F, Agré AP, Korie N, Gbaguidi A, et al. (2018). Agro-morphological characterization of chili pepper landraces (*Capsicum annuum* L.) cultivated in Northern Benin. Genet Resour Crop Evol. 65(2):555–69.
- Othman, Z. A. A., Ahmed, Y. B. H., Habil, M. A., y Ghafar, A. A. (2011). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. Molecules, 16(10), 8919-8929.
- Peña-Yam, L. P., Muñoz-Ramírez, L. S., Avilés-Viñas, S. A., Canto-Flick, A., Pérez-Pastrana, J., Guzmán-Antonio, A., ... & Mijangos-Cortés, J. O. (2019). Analysis of Genetic Parameters of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) in the Yucatan, Mexico. *HortScience*, 54(3), 429-433.
- Peña-Yam, L. P., Muñoz-Ramírez, L. S., Avilés-Viñas, S. A., Canto-Flick, A., Guzmán-Antonio, A., & Santana-Buzzy, N. (2019). Floral Biology Studies in Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) to Implement in a Cross-Breeding Program. *Agriculture*, 9(12), 249.
- Peppin, J. F., y Pappagallo, M. (2014). Capsaicinoids in the treatment of neuropathic pain: a review. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 7, 22–32.
- Pérez, C.L.M., Castañón N.G., Mayek P. N., (2008). “Diversidad morfológica de chiles (*Capsicum* spp.) De Tabasco, México”. Cuadernos de biodiversidad. n. 27 (sept.). issn 1575-5495, pp. 11-22.
- Perry L and Flannery KV, (2007). Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, Mexico. Proc Natl Acad Sc USA, 104:11905–11909.
- Pino, J., González, M., Ceballos, L., Centurión-Yah, A. R., Trujillo-Aguirre, J., Latournerie-Moreno, L., y 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(4), 1682-1686.

BIBLIOGRAFÍA

- Pino, J., Sauri-Duch, E., y Marbot, R. (2006). Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food chemistry*, 94(3), 394-398.
- Producción a Nivel Nacional (2019). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP).
- PuckerButt Pepper Company. (2013). *Smokin' Ed's 'Carolina Reaper'® wins Guinness World Record—Smokin' Ed's 'Carolina Reaper'® Officially the Hottest Chili Pepper in the World!* Available online at: <http://www.guinnessworldrecords.com/news/2013/11/confirmed-smokin-eds-carolina-reaper-sets-new-record-for-hottest-chilli-53033>
- PuckerButt Pepper Company. (2018). Available online at: <https://store.puckerbuttpappercompany.com/collections/carolina-reaper-worlds-hottest-pepper/products/smokin-eds-carolina-reaper>
- Pugliese, A., Loizzo, M. R., Tundis, R., O'Callaghan, Y. (2013). The effect of domestic processing on the content and bioaccessibility of carotenoids from chili peppers (*Capsicum* species). *FoodChem*, 141, 2606–2613.
- Pugliese, A., O'Callaghan, Y., Loizzo, M. (2014). In vitro investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annuum*). *Eur. J. Nutr.* 53 (2), 501–510.
- Purkayastha, J., Alam, S. I., Gogoi, H. K., Singh, L., and Veer, V. (2012). Molecular characterization of "Bhut Jolokia" the hottest chilli. *Journal of biosciences* 37: 757-768.
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., and Yang, Y. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 5135-5140.

- Ramírez- Malagon, R. and Ochoa- Alejo, N. (1996). An improved and reliable chili pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration method. *Plant Cell Reports*, 16(3/4):226-231.
- Reddy, K. K., Ravinder, T., Prasad, R. B., y Kanjilal, S. (2010). Evaluation of the antioxidant activity of capsiate analogues in polar, nonpolar, and micellar media. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(2), 564-569.
- Robbins W (2000). Clinical applications of capsaicinoids. *Clin J Pain* 16:S86–S89.
- Robi, R., & Sreelathakumary, I. (2004). Influence of maturity at harvest on capsaicin and ascorbic acid content in hot chilli (*Capsicum chinense* Jacq.). *Capsicum & Eggplant Newsletter*. (23): 13-16.
- Rodriguez-Maturino, A., Valenzuela-Solorio, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Mendoza, D., Grimaldo-Juarez, O., Aviles-Marin, M., y Cervantes-Diaz, L. (2012). Antioxidant activity and bioactive compounds of Chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) and Habanero (*Capsicum chinense*): A comparative study. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(9), 1758-1763.
- Ryu, W. K., Kim, H. W., Kim, G. D., y Rhee, H. I. (2017). Rapid determination of capsaicinoids by colorimetric method. *Journal of food and drug analysis*, 25(4), 798-803.
- Sanatombi, K., and Sharma, G. J. (2008). Capsaicin content and pungency of different *Capsicum* spp. cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 36: 89-90.
- 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-Marroquin D., Gómez-Uc E., Muñoz-Ramirez 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). Merida, Yucatán, México: Centro de Investigación Científica de Yucatán.

BIBLIOGRAFÍA

- Santana-Buzzy, N., Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., & Gil, M. A. (2016). 'Mayan Kisin', a High-yielding, Red-fruited, Habanero-type Hot Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Cultivar. *HortScience*, 51(5), 604-605.
- Santos, P., Aguiar, A. C., Barbero, G. F., Rezende, C. A., y Martínez, J. (2015). Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 22, 78-88.
- Sarpras, M., Ahmad, I., Rawoof, A., y Ramchary, N. (2019). Comparative analysis of developmental changes of fruit metabolites, antioxidant activities and mineral elements content in Bhut jolokia and other *Capsicum* species. *LWT*, 105, 363-370.
- Sarpras, M., Gaur, R., Sharma, V., Chhapekar, S. S., Das, J., Kumar, A., ... y Ramchary, N. (2016). Comparative analysis of fruit metabolites and pungency candidate genes expression between Bhut Jolokia and other *Capsicum* species. *PLoS One*, 11(12).
- Schweiggert, U., Carle, R., y Schieber, A. (2006). Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 557(1), 236-244.
- Scoville, W. L. (1912). Note on capsicums. *Journal of the American Pharmacists Association*, 1(5), 453–454.
- Servicio Meteorológico Nacional. (2018). Climatología. Datos Estadísticos. <http://smn.cna.gob.mx/es/climatologia/temperaturas-y-lluvias/resumenes-mensuales-de-temperaturas-y-lluvias> accedido 8 marzo 2018.
- Silva, W. C., de Carvalho, S. I. C., & Duarte, J. B. (2013). Identification of minimum descriptors for characterization of *Capsicum* spp. germplasm. *Horticultura Brasileira*, 31(2), 190-202.

- Smith, H., y Brooks, J. R. (2014). Capsaicin-based therapies for pain control. In *Capsaicin as a Therapeutic Molecule*, (pp. 129-146). Springer, Basel.
- Smith, P.G. y Heiser, C.B. (1957). Taxonomy of *Capsicum chinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. Bull. Torrey Bot. Club 84:413-420.
- Soares, R. S., da Costa Ribeiro, C. S., Ragassi, C. F., de Carvalho, S. I. C., Maldonade, I. R., da Silva Filho, J. G., ... y Reifsneider, F. J. B. (2020). New Brazilian lines of Habanero pepper (*Capsicum chinense*): Morpho-agronomic and biochemical characterization in different environments. *Scientia Horticulturae*, 261, 108941.
- Spicegarden, Available online at: <http://www.spicegarden.eu/Semillas-de-Trinidad-Moruga-scorpion-Capsicum-chinens>
- Stewart Jr, C., Mazourek, M., Stellari, G. M., O'Connell, M., y Jahn, M. (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 979-991.
- Sticher, O., Soldati, F., y Joshi, R. K. (1978). High-performance liquid-chromatographic separation and quantitative-determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin and homodihydrocapsaicin in natural capsaicinoid mixtures and fructus-capsici. *Journal of Chromatography*, 166(1), 221-231.
- Suzuki T, Fujiwake H, Iwai K. (1980a). Intracellular localization of capsaicin and its analogs, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit. 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell Physiol*, 21: 839–853
- Suzuki, T., Kawada, T., y Iwai, K. (1980b). Formation and metabolism of pungent principle of capsicum fruits. Effective separation of capsaicin and its analogs by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*, 198(2), 217–223.
- Szolcsanyi, J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*, 38, 377-384.

BIBLIOGRAFÍA

- Tag, H. M., Kelany, O. E., Tantawy, H. M., y Fahmy, A. A. (2014). Potential anti-inflammatory effect of lemon and hot pepper extracts on adjuvant-induced arthritis in mice. *The Journal of Basic y Applied Zoology*, 67(5), 149-157.
- Tanksley, S. D. (1984). High rates of cross-pollination in chile pepper. *HortScience*, 19(4), 580-582.
- Tapia, J.C., García, R., Escamilla, E.M., Graciano C. y Rocha J.A. (1993). Capsaicin Recovery from Cell Culture Broth. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 32(10): 2242-2246.
- Tewksbury JJ, Reagan KM, Machnicki NJ, Carlo TA, Haak DC, Penaloza ALC, Levey DJ (2008). Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 11808–11811
- Thán, M., Németh, J., Szilvássy, Z., Pintér, E., Helyes, Z., y Szolcsányi, J. (2000). Systemic anti-inflammatory effect of somatostatin released from capsaicin-sensitive vagal and sciatic sensory fibres of the rat and guinea-pig. *European journal of pharmacology*, 399(2-3), 251-258.
- Thomas, B. V., Schreiber, A. A., y Weisskopf, C. P. (1998). Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2655-2663.
- Thompson, R. Q., Phinney, K. W., Sander, L. C., y Welch, M. J. (2005). Reversed-phase liquid chromatography and argentation chromatography of the minor capsaicinoids. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 381(7), 1432-1440.
- Tiwari, A., Kaushik, M. P., Pandey, K. S., and Dangi, R. S. (2005). Adaptability and production of hottest chilli variety under Gwalior agro-climatic conditions. *Current Science*, 88: 1545-1546.
- Trujillo, J. (2001). Descripción varietal del chile habanero (*Capsicum chinense* Jaq.), chile habanero, memorias, Mérida, Yuc.

- Trujillo-Aguirre J., Gutiérrez-Alonso O., Pérez-Llanes C. (2004). Morfología de planta y fenología de genotipos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) colectados en Yucatán, México Primera Convención Mundial del Chile: 59-63.
- Tunde-Akintunde, T. Y., Afolabi, T. J., y Akintunde, B. O. (2005). Influence of drying methods on drying of bell-pepper (*Capsicum annuum*). Journal of Food Engineering, 68(4), 439-442.
- Tun-Dzul. J. (2001). Chile habanero Características y Tecnología de Producción. INIFAP produce, Mérida, Yucatán, México, 13-24.
- USDA. (2011). Plants profile. Natural Resources Conservation Service. Disponible: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=CACH30>. 29/04/2016
- Vallejo, F. y Estrada, E. 2013. Mejoramiento genético de plantas. 2a Ed. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Cali. 454p.
- Villota-Cerón, D., Bonilla-Betancourt, M. L., Carmen-Carrillo, H., Jaramillo-Vásquez, J., & García-Dávila, M. A. (2012). Caracterización morfológica de introducciones de *Capsicum* spp. existentes en el Banco de Germoplasma activo de Corpoica CI Palmira, Colombia. *Acta Agronómica*, 61(1), 16-26.
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., y Bovy, A. G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. Journal of natural products, 76(4), 783-793.
- Wani, K. P., Ahmed, N., Tanki, M. I., & Narayan, R. (2003). Stability analysis for yield and quality characters in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Capsicum & Eggplant Newsletter. (22): 75-78.
- Williams, O. J., Raghavan, G. V., Orsat, V., y Dai, J. (2004). Microwave-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum* fruit. Journal of Food Biochemistry, 28(2), 113-122.

BIBLIOGRAFÍA

- Xing, F., Cheng, G., Yi, K., (2006). Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.* 102, 1318–1321.
- Yao, J., Nair, M. G., y Chandra, A. (1994). Supercritical carbon dioxide extraction of Scotch Bonnet (*Capsicum annuum*) and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(6), 1303-1305.
- Yazawa, S., Yoneda, H., Hosokawa, M., Fushiki, T., & Watanabe, T. (2004). *Novel capsaicinoid like substances in the fruits of new non-pungent cultivar'CH-19 Sweet'of pepper (Capsicum annuum)*. *Capsicum & Eggplant Newsletter*. (23): 17-20.
- Zewdie, Y., and Bosland, P. W. (2000). Evaluation of genotype, environment, and genotype-by-environment interaction for capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 111: 185-190.