



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“Determinación del perfil de aminoácidos libres en  
órganos vegetativos de chile habanero (*Capsicum  
chinense* Jacq.) bajo distintas fuentes de nitrógeno y en  
frutos de diferente grado de desarrollo”**

Tesis que presenta

Ángel Armando Córdova Alvarado

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas, opción Bioquímica y Biología Molecular)

**MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO**

2021

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 **Ángel Armando Córdoba Alvarado** titulado “**Determinación del perfil de aminoácidos libres en órganos vegetativos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo distintas fuentes de nitrógeno y en frutos de diferente grado de desarrollo**”, fue realizado en la **Unidad de bioquímica y biología molecular** de plantas del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección de la **Dra. Ileana Echevarría Machado**, 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, a 29 de noviembre de 2021

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



---

Ángel Armando Córdova Alvarado



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado “Determinación del perfil de aminoácidos libres en órganos vegetativos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo distintas fuentes de nitrógeno y en frutos de diferente grado de desarrollo” bajo la dirección de la Dra. Ileana Echevarría Machado



## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CONACYT por los recursos brindados para la realización de este trabajo. Así como la beca que se me otorgó como becario No. 842668.

Al CICY por permitirme realizar los experimentos y facilitar los recursos disponibles para la realización del trabajo.

A mi Asesora de Tesis la Dra. Ileana Echevarría, por dirigirme de manera comprensiva y paciente en los temas que se trataron durante la realización de este trabajo. De igual forma al comité revisor conformado por la Dra. Teresa Ayora, el Dr. Víctor Aguilar, el Dr. Manuel Martínez y la Dra. Marina Vera; que me compartieron sus valiosos comentarios y recomendaciones para ayudar a mejorar el contenido de este trabajo.

A mi grupo de trabajo el Lab. 07, junto con el grupo del Dr. Manuel Martínez, los técnicos del grupo, la M. en C. Fátima Medina y el M. en C. Ramón Souza.

Al Dr. Felipe Vázquez y la M. en C. Miriam Monforte por permitirme realizar experimentos en el área del lab. 25.

Así como demás compañeros del CICY que compartieron su estancia conmigo, sus conocimientos y anécdotas.



## **DEDICATORIAS**

A mi familia y amigos que me permiten compartir con ellos todo lo que he logrado y alcanzado hasta el día de hoy.

A Neptis por apoyarme siempre en cuanto requería de ayuda y por ser comprensiva y objetiva cuando lo necesitaba.



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
1.1. Capsicum chinense .....	3
1.1.1. Descripción botánica .....	4
1.1.2. Importancia agrícola .....	4
1.1.3. Chile habanero como potencial alimento nutracéutico .....	5
1.2. Nutrientes y su distribución en el suelo .....	6
1.3. Nitrógeno .....	7
1.3.1. Nitrógeno en el suelo .....	7
1.4. Aminoácidos .....	8
1.4.1. Aminoácidos en el suelo .....	10
1.4.2. Papel de los aminoácidos en las plantas .....	11
1.4.3. Aminoácidos en los diferentes órganos de las plantas .....	12
1.5 Estudio de aminoácidos en chile habanero ( <i>Capsicum chinense</i> Jacq.) .....	15
1.5.1. Métodos analíticos para el análisis de aminoácidos .....	17
1.6. Desarrollo de métodos analíticos .....	20
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	22
<b>PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	23
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	23
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	23
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b> .....	24
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIBRES POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)</b> .....	25
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b> .....	25
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
2.2.1 Establecimiento del protocolo de extracción de los aminoácidos libres .....	26
2.2.2 Establecimiento de la metodología para la separación y detección de los aminoácidos libres por TLC .....	27
2.2.2.1 Cromatografía en capa fina de los aminoácidos (separación y detección) .....	28
2.2.2.2 Detección .....	30
2.2.3 Análisis estadístico .....	30
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	30

2.3.1 Establecimiento de las condiciones de extracción de aminoácidos libres .....	30
2.3.2 Establecimiento de las condiciones cromatográficas para el análisis de aminoácidos libres (separación y detección) .....	32
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>EVALUACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN HOJA, TALLO, RAÍZ Y FRUTOS DE CHILE HABANERO.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Material vegetal .....	45
3.2.2 Desinfección y germinación de las semillas.....	45
3.2.3 Tratamientos de nitrógeno inorgánico.....	45
3.2.4 Extracción de aminoácidos libres de frutos y órganos vegetales de chile habanero (hoja, tallo y raíz).....	47
3.2.5 Cromatografía en capa fina de los aminoácidos (separación).....	47
3.2.6 Detección .....	48
3.2.7 Determinación de los perfiles de aminoácidos en los órganos.....	48
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
3.3.1 Obtención del material vegetal para las determinaciones de los perfiles (tratamientos de nitrógeno) .....	48
3.3.2 Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos libres en órganos vegetativos y frutos de chile habanero. ....	52
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>DISCUSIONES GENERALES.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>76</b>

## ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
AA's	Aminoácidos
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
Asn	Asparagina
Cys	Cisteína
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Pro	Prolina
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina
TLC	Cromatografía de capa fina (del inglés <i>thin layer chromatography</i> )
Tre	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Estructura general de un aminoácido. R indica la cadena lateral. ....	8
<b>Figura 1.2.</b> Estructura y clasificación de los 20 aminoácidos proteicos. ....	10
<b>Figura 1.3</b> Diagrama general de la estrategia experimental. ....	24
<b>Figura 2.1</b> Contenido de aminoácidos libres totales en frutos de chile habanero, obtenido a partir de los tres diferentes protocolos de extracción. ....	31
<b>Figura 2.2</b> Contenido de aminoácidos libres totales a partir de las distintas fracciones estudiadas, empleando el protocolo con disolventes orgánicos de polaridad diferente (P3). ....	32
<b>Figura 2.3</b> Desarrollo cromatográfico en capa fina de los aminoácidos de cadena lateral no polar alifática y aromática (A) y de cadena lateral polar sin carga, con carga positivamente y negativamente (B). ....	33
<b>Figura 2.4</b> Cromatografía de capa fina de los estándares de aminoácidos de cadena lateral no polar alifática y aromática (A) y de cadena lateral polar sin carga, cargada positivamente y negativamente(B).....	34
<b>Figura 2.5</b> Cromatografía de capa fina de los estándares de aminoácidos de cadena lateral no polar alifática y aromática (A) y de cadena lateral polar sin carga, cargada positivamente y negativamente (B). ....	35
<b>Figura 2.6</b> Análisis densitométrico de la mezcla de 20 aminoácidos proteicos. ....	36
<b>Figura 2.7</b> Relación entre el Rf de los aminoácidos y la polaridad de la fase móvil empleada (sistemas con n-butanol). ....	38
<b>Figura 2.8</b> Relación entre el Rf de los aminoácidos y la polaridad de la fase móvil empleada (sistemas con n-propanol). ....	39
<b>Figura 3.1</b> Vista de la parte aérea de las plántulas de chile habanero sometidas a diferentes combinaciones de nitrógeno inorgánico. ....	49
<b>Figura 3.2</b> Contenido de biomasa de la parte aérea de plántulas de chile habanero, con respecto a los tratamientos de nitrógeno aplicados en un período de 7 días. ....	50
<b>Figura 3.3</b> Vista de la parte radical de las plántulas de chile habanero sometidas a diferentes combinaciones de nitrógeno inorgánico. ....	51
<b>Figura 3.4</b> Contenido de biomasa de la parte aérea de plántulas de chile habanero, con respecto a los tratamientos de nitrógeno aplicados en un período de 7 días. ....	52
<b>Figura 3.5</b> Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-butanol: ác. Acético:agua 6:2:2.....	53
<b>Figura 3.6</b> Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-butanol: ác. Acético:agua 7:1:2. ....	54

<b>Figura 3.7</b> Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-propanol: ác. Acético:agua 6:2:2. ....	55
<b>Figura 3.8</b> Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-propanol: ác. Acético:agua 7:1:2. ....	56
<b>Figura 3.9</b> Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-butanol: ác. Acético:agua 6:2:2. ....	57
<b>Figura 3.10</b> Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n- butanol: ác. Acético:agua 7:1:2. ....	58
<b>Figura 3.11</b> Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n- propanol: ác. Acético:agua 6:2:2. ....	59
<b>Figura 3.12</b> Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n- propanol: ác. Acético:agua 7:1:2. ....	60
<b>Figura 3.13</b> Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-butanol: ác. Acético:agua 6:2:2. ....	61
<b>Figura 3.14</b> Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-butanol: ác. Acético:agua 7:1:2. ....	62
<b>Figura 3.15</b> Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-propanol: ác. Acético:agua 6:2:2. ....	63
<b>Figura 3.16</b> Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. Fase móvil n-propanol: ác. Acético:agua 7:1:2.....	64
<b>Figura 3.17</b> Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). Fase móvil n-butanol: ác. Acético:agua 6:2:2. ....	65
<b>Figura 3.18</b> Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). Fase móvil n-butanol: ác. Acético:agua 7:1:2. ....	66
<b>Figura 3.19</b> Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). Fase móvil n-propanol: ác. Acético:agua 6:2:2. ....	67

**Figura 3.20** Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). Fase móvil n-propanol: ác. Acético:agua 7:1:2. .... 68

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.1</b> Recopilación de metodologías para el análisis de aminoácidos por TLC. ....	19
<b>Cuadro 2.1</b> Códigos utilizados para los estándares de aminoácidos individuales y agrupados .....	28
<b>Cuadro 2.2</b> Índice de polaridad de los disolventes empleados en las fases móviles (tomado de Reich y Schibbli, 2007). ....	29
<b>Cuadro 2.3</b> Proporciones de los disolventes empleados y polaridad final de los diferentes sistemas evaluados. ....	38
<b>Cuadro 2.4</b> Distancias de migración de los estándares de aminoácidos en las distintas condiciones evaluadas. ....	40
<b>Cuadro 3.1</b> Composición de los tratamientos de nitrógeno aplicados a las plántulas de chile habanero. ....	46



## **RESUMEN**

Los aminoácidos (AA's) son un grupo muy importante de biomoléculas nitrogenadas, que tienen varias funciones de vital importancia en las plantas. Además de su uso para la biosíntesis de proteínas, también representan bloques de construcción para otras vías biosintéticas y desempeñan funciones fundamentales durante los procesos de señalización, así como en la respuesta de adaptación a diversos tipos de estrés.

Debido a la importancia de estos elementos y los procesos en los cuales pueden estar relacionados, el estudio de los mismos es demandante en técnicas o métodos eficientes que permitan una adecuada separación y detección. El ámbito del desarrollo de nuevos métodos, o inclusive la adecuación de los ya existentes, para el análisis del contenido de AA's aún se continúa estudiando, ya que todavía no se han encontrado condiciones cromatográficas universales que trabajen con todo el espectro de AA's conocidos.

En este trabajo se abordó el análisis de perfiles de AA's libres de frutos y de órganos vegetales, mediante el establecimiento de condiciones cromatográficas para su separación en cromatografía de capa fina (TLC). Se lograron establecer cuatro condiciones distintas capaces de separar al menos nueve AA's diferentes. Estos resultados sirven de base para permitir el desarrollo de un método para el análisis de los AA's en diferentes contextos de investigación, lo cual ayudará a una mejor comprensión del papel que desarrollan estos compuestos en procesos clave, tales como la disponibilidad de nitrógeno y el desarrollo de la planta.



## **ABSTRACT**

Amino acids (AA's) are a very important group of nitrogenous biomolecules, which have several functions of vital importance in plants. In addition to their use for protein biosynthesis, they also represent building blocks for other biosynthetic pathways and play fundamental roles during signaling processes, as well as in the adaptive response to various types of stress.

Due to the importance of these elements and the processes in which they may be related, their study is demanding in efficient techniques or methods that allow adequate separation and detection. Therefore, the scope of the development of new methods, or even the adequacy of existing ones, for the analysis of AA's content is still being studied, since universal chromatographic conditions that work with the entire spectrum of known AA's have not yet been found.

In this work the analysis of profiles of free AA's from fruits and plant organs was approached, by establishing chromatographic conditions for their separation in thin layer chromatography (TLC). Four different conditions capable of separating at least 9 different AA's were established. The results serve as a basis to allow the development of a method for the analysis of AA's in different research contexts, which will help to better understand the role that these compounds play in key processes such as nitrogen availability and development of the plant.



### INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es uno de los nutrientes más importantes para los cultivos, existiendo dos formas principales que sirven como fuentes de este elemento para las plantas: las inorgánicas, como el nitrato y el amonio (más comunes) y las orgánicas, como la urea, pequeños péptidos y aminoácidos (AA's) presentes en el suelo. La forma en que las plantas utilicen estas fuentes de N dependerá en gran medida de su disponibilidad en el suelo y de las necesidades de la propia planta.

En los sistemas vivos, los AA's tienen una función muy importante; por ejemplo, en las plantas son el primer producto de asimilación del N, sirven como precursores de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal, al igual que pueden actuar como moléculas señalizadoras de importantes eventos fisiológicos (Götz *et al.*, 2017; Toyota *et al.*, 2018). Por ello, el análisis de estas moléculas se ha vuelto un tema de estudio recurrente en la actualidad, lo que a su vez ha contribuido a que las técnicas para su extracción y separación se conviertan en herramientas esenciales de estudio en distintas áreas de investigación.

Desde años anteriores, hasta la actualidad, la cromatografía de capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) se ha presentado como una herramienta sencilla y con amplio potencial para el análisis de biomoléculas (Sobhani *et al.*, 2019). Por ello, en el presente estudio se propuso utilizar esta técnica para determinar el perfil de AA's en distintos órganos de chile habanero. El conocimiento del mismo proveerá de información relevante para lograr entender en el futuro la función de estas moléculas como reguladoras de etapas clave del desarrollo vegetal.

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una fuente de desarrollo científico y comercial para la península de Yucatán. Las características geográficas favorables en la región han hecho que su desarrollo sea de particular interés y, por ello, se logró adquirir la denominación de origen. Con esta denominación los frutos de esta especie o los productos derivados del mismo que se produzcan en esta zona geográfica quedan protegidos. Sus características organolépticas quedan respaldadas a través de esta denominación, además de dotar de una mayor competitividad a nivel internacional (FIRCO, 2017).



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1. *Capsicum chinense*

El chile, en ocasiones llamado pimiento o ají, es el término utilizado para referirse a las plantas pertenecientes al género *Capsicum* (familia de las Solanaceas), el cual comprende cerca de 30 especies de plantas angiospermas, dicotiledóneas, cuyo origen se remonta en el sur del continente americano. Aunque el número de especies se aproxima a 30, solamente cinco han sido domesticadas (*C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens* R. y P. y *C. chinense* Jacq.), las cuales corresponden a las más conocidas y cultivadas a nivel mundial (Ruiz-Lau *et al.*, 2011).

Esta planta ha fascinado a los humanos desde tiempos remotos, mucho antes que Colón la encontrara y llevara al viejo mundo; existen evidencias que sugieren el consumo de chile en México desde el año 5,000 A.C., donde se encontraron restos de semillas en coprolitos humanos (Krishna De, 2003).

La diversidad de formas, tamaños y colores le ha permitido ganarse un lugar en la gastronomía y costumbres de diversos países. En la actualidad, el chile se ubica entre las siete hortalizas más cultivadas mundialmente (Latournerie *et al.*, 2015). Su consumo se debe en gran mayoría al característico sabor picante que produce al comerlo. Esta es una cualidad conferida por un grupo de alrededor de 13 moléculas relacionadas, conocidas como capsaicinoides, figurando capsaicina y dihidrocapsaicina, en conjunto, como las más abundantes en el fruto (hasta un 90% del contenido total de capsaicinoides).

Aunque el contenido de capsaicinoides está directamente relacionado con la intensidad del picor, existen otros factores que influyen en la producción y acumulación de estos compuestos. De manera general se menciona a *C. chinense* entre los más picantes (Das *et al.*, 2016); lo cual ha incrementado, en gran parte, la popularidad de esta especie en varias regiones del mundo. En México se cultiva de manera tradicional en el sureste del país, particularmente la península de Yucatán, en donde se le conoce como “chile habanero”. Es aquí donde ha desarrollado un

importante nicho de diversificación, además de ser un elemento importante con presencia en la cultura y cocina típica de la región peninsular (Ruiz-Lau *et al.*, 2011).

### **1.1.1. Descripción botánica**

El chile habanero es una planta de ciclo anual, llegando a alcanzar los 12 meses de vida. Es de altura variable, oscilando entre 75 y 120 centímetros en condiciones de invernadero. Cuenta con un tallo grueso, erecto y robusto, sus hojas son simples, lisas y de forma lanceolada. Tiene una raíz principal de tipo pivotante, que profundiza de 0.40 a 1.20 metros, con un sistema radical bien desarrollado. Las flores son de color blanco, aunque algunas veces puede presentarse el color púrpura, contienen ambos órganos sexuales y se forman en las axilas de las ramas (Ruiz *et al.*, 2011). Crece en climas cálidos, aunque puede soportar temperaturas que van desde los 16 °C, hasta los 40 °C, desarrollándose de mejor manera en suelos con un buen drenaje y retención de humedad (Villa *et al.*, 2014).

Los frutos son bayas poco carnosas y huecas de forma acampanada; el color antes de alcanzar la madurez generalmente es verde y al alcanzar el estado maduro puede presentar distintas coloraciones que van desde el amarillo, el naranja, el rojo, el morado o incluso el café (González *et al.*, 2018). El fruto está dividido internamente por membranas que forman paredes incompletas y se unen en el extremo inferior para formar unas estructuras que se conocen coloquialmente como “venas”, las cuales se insertan en la placenta que es de color blanco-amarillento y de apariencia esponjosa.

### **1.1.2. Importancia agrícola**

En México el cultivo de chile habanero se extiende a los estados de Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Colima, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Sonora, Tabasco y la península yucateca (SIAP, 2010). Es en esta última región en donde, gracias al clima y tipo de suelo, ha encontrado un sitio de diversificación, lo que ha permitido que sea un elemento tradicional y arraigado entre la población peninsular; así como uno de los principales productos agrícolas.

Estas características propiciaron que, en el año 2006, los productores y autoridades de Yucatán promovieran ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI) la denominación de origen (DDO), otorgada en 2008; por lo cual únicamente los frutos cultivados y derivados de éstos, producidos en el estado, ostentaban la denominación de origen “Chile habanero de Yucatán”. Posteriormente, en el 2010 se realizaron cambios, y en la denominación quedaron incluidos los

---

tres estados de la Península; actualmente es referida como “Chile habanero de la Península de Yucatán” (DOF, 2010).

Además del alto consumo per cápita en el país, este cultivo tiene un importante valor agrícola para las regiones productoras, generando empleos en el campo, lo cual tiene un impacto social positivo. Tan solo en el cierre del año 2015, el chile habanero registró una producción de aproximadamente 9,351 toneladas, con un valor estimado en 166.9 millones de pesos; siendo Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán los principales estados productores (Ramírez, 2017).

### **1.1.3. Chile habanero como potencial alimento nutracéutico**

En años recientes, los llamados alimentos nutracéuticos han ganado interés por el aumento en la frecuencia de enfermedades como el cáncer, la diabetes y otros padecimientos crónicos. El término nutracéutico se ha designado para aquellos alimentos que, por su contenido fitoquímico, pueden proporcionar beneficios a la salud humana cuando son consumidos (Kalra, 2003). Los frutos picantes del chile habanero pueden emplearse en diferentes preparaciones, dependiendo de la intensidad del aroma y picor, el color y tamaño de los frutos. Sin embargo, no solamente se aprovechan esas características, pues, además, contienen de manera natural numerosos compuestos que han sido relacionados con efectos benéficos en la salud humana (Segura *et al.*, 2016).

Los capsaicinoides, principalmente capsaicina, interactúan con los nociceptores (receptores del dolor) que se encuentra en las terminaciones nerviosas de neuronas nociceptivas (relacionadas con la percepción del dolor). Cuando este compuesto se une al receptor de potencial transitorio V1 (RPTV1) se desencadena una serie de eventos, como el aumento en el flujo de calcio intracelular, la liberación de sustancia P (péptido neurotransmisor) y el bloqueo de canales iónicos; lo que finalmente se interpreta en el cerebro como la sensación de calor o ardor (Caterina *et al.*, 1997).

Seguido de esta sensación existe un período de relajación de las neuronas con la consiguiente des-sensibilización. Este aspecto se ha estudiado intensamente para el tratamiento del dolor en distintos padecimientos como la artritis reumatoide, dolor de cabeza, neuropatías, procesos post-operatorios, entre otros (Luo *et al.*, 2011). Además, la capsaicina también se ha estudiado como auxiliar en el control de peso por sus propiedades termogénicas (Yoshioka *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2013) y como un compuesto anticancerígeno (Ziglioli *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2013).

---

Otros compuestos presentes en el fruto y que han llamado la atención, son aquellos que cuentan con actividad antioxidante, es decir, que permiten reducir el daño que sufren las células por los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Los principales antioxidantes encontrados en el chile habanero son los compuestos fenólicos (flavonoides y antocianinas), el ácido ascórbico (vitamina C) y los carotenoides, que de igual forma son responsables de las coloraciones rojas, amarillas y naranjas del fruto (Gómez y Ochoa, 2013; Wahyuni, 2013).

Además, el chile habanero es también fuente de carbohidratos, lípidos (saturados e insaturados) y proteínas (Segura *et al.*, 2016). Sin embargo, se sabe que, el contenido de estos compuestos es variable y se relaciona con los distintos genotipos de la planta y el estado de desarrollo de la misma; así como con factores ambientales como el clima y los nutrientes que se encuentran disponibles en el suelo (Stewart *et al.*, 2007; Wahyuni *et al.*, 2013).

Aunque existen diversos estudios reportados para el análisis de compuestos fitoquímicos en variedades del género *Capsicum*, la mayoría se enfoca en los relacionados con los beneficios a la salud humana como los capsaicinoides, carotenoides y antioxidantes (Pino *et al.*, 2006; Wahyuni *et al.*, 2013; Kantar *et al.*, 2016); mientras que existe información limitada para compuestos de igual manera importantes como los ácidos grasos y los AA's.

### **1.2. Nutrientes y su distribución en el suelo**

El suelo es un material heterogéneo que consta de tres componentes o fases principales: una sólida, una líquida y una gaseosa. Estas fases influyen específicamente en el suministro de nutrientes hacia las plantas. La fase sólida es el principal reservorio de nutrientes; las partículas de esta fase contienen nutrientes catiónicos como K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu. Por otro lado, la materia orgánica funciona como la principal fuente de N y, en menor medida, también de P y S. La fase líquida del suelo es la que hace más accesibles los nutrientes, facilitando el transporte a través de la misma; los nutrientes transportados en la fase líquida están presentes principalmente en forma iónica. Finalmente, la última fase, la gaseosa, se encarga del intercambio de gases entre los organismos que se encuentran en el suelo (hongos, bacterias y raíces de las plantas) y la atmósfera (Mengel y Kirby, 2001).

### 1.3. NITRÓGENO

El N es el quinto elemento más común en la tierra, es el componente principal de la atmósfera y es un nutriente clave para las distintas formas de vida que habitan el planeta (Johnson y Goldblatt, 2015). Debido a que participa en numerosos procesos, como la síntesis de AA's, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, entre otros compuestos nitrogenados, se ha catalogado a este nutriente como un elemento esencial.

Numerosos estudios mencionan al N como el elemento más importante con influencia en la productividad de los cultivos (Lambers *et al.*, 2008), lo cual se ve reflejado en el excesivo uso de fertilizantes nitrogenados. Esta aplicación excesiva a los cultivos ha conllevado a una serie de problemas ambientales, que aún en la actualidad siguen sin resolverse y representan uno de los principales objetivos a atender en las cumbres de cambio climático.

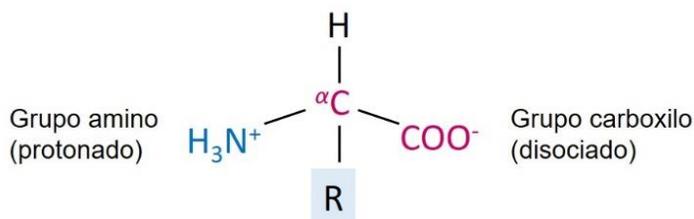
#### 1.3.1. Nitrógeno en el suelo

El N en el suelo puede encontrarse de manera inorgánica, en la forma de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y, de forma orgánica, como AA's, proteínas o péptidos libres, ácidos nucleicos, nucleótidos y urea, entre otras (Dodds y Whiles, 2010). La distribución y disponibilidad de estas distintas formas de N son muy heterogéneas; además, depende, del tipo de suelo, donde sus características físico-químicas particulares, influenciarán los procesos de fijación y, por lo tanto, la disponibilidad del N.

Las plantas toman del suelo principalmente las formas inorgánicas del N, en su forma de catión  $\text{NH}_4^+$  y de anión  $\text{NO}_3^-$ ; la preferencia por uno u otro dependerá del tipo de planta y de sus necesidades fisiológicas, así como de la disponibilidad de estas formas en el suelo (Mengel y Kirby, 2001). Debido a que en el suelo se encuentran coexistiendo ambas formas al mismo tiempo, y a que las formas orgánicas pueden finalmente derivar en sus formas inorgánicas, la absorción de los AA's o las proteínas (formas orgánicas), puede conferir una ventaja competitiva a las plantas. Además, la forma química del N que sea absorbida por las plantas puede influir significativamente en el desarrollo de las mismas (Franklin *et al.*, 2017).

## 1.4. Aminoácidos

Los AA's son un grupo muy importante de biomoléculas nitrogenadas que, como parte de su estructura, cuentan con un grupo amino (-NH<sub>2</sub>), un grupo carboxilo (-COOH), un átomo de hidrógeno y un radical (R) o cadena lateral (la cual permite diferenciar entre todos los AA's y, al mismo tiempo, les confiere sus distintas propiedades) unidos a un átomo de carbono central, denominado carbono α (figura 1.1) (Feduchi *et al.*, 2011).



**Figura 1.4.** Estructura general de un aminoácido. R indica la cadena lateral. A pH 7 el grupo amino se encuentra protonado (carga positiva); mientras que el grupo carboxilo se encuentra en estado disociado (carga negativa) (modificado de *Nelson y Cox*, 2006).

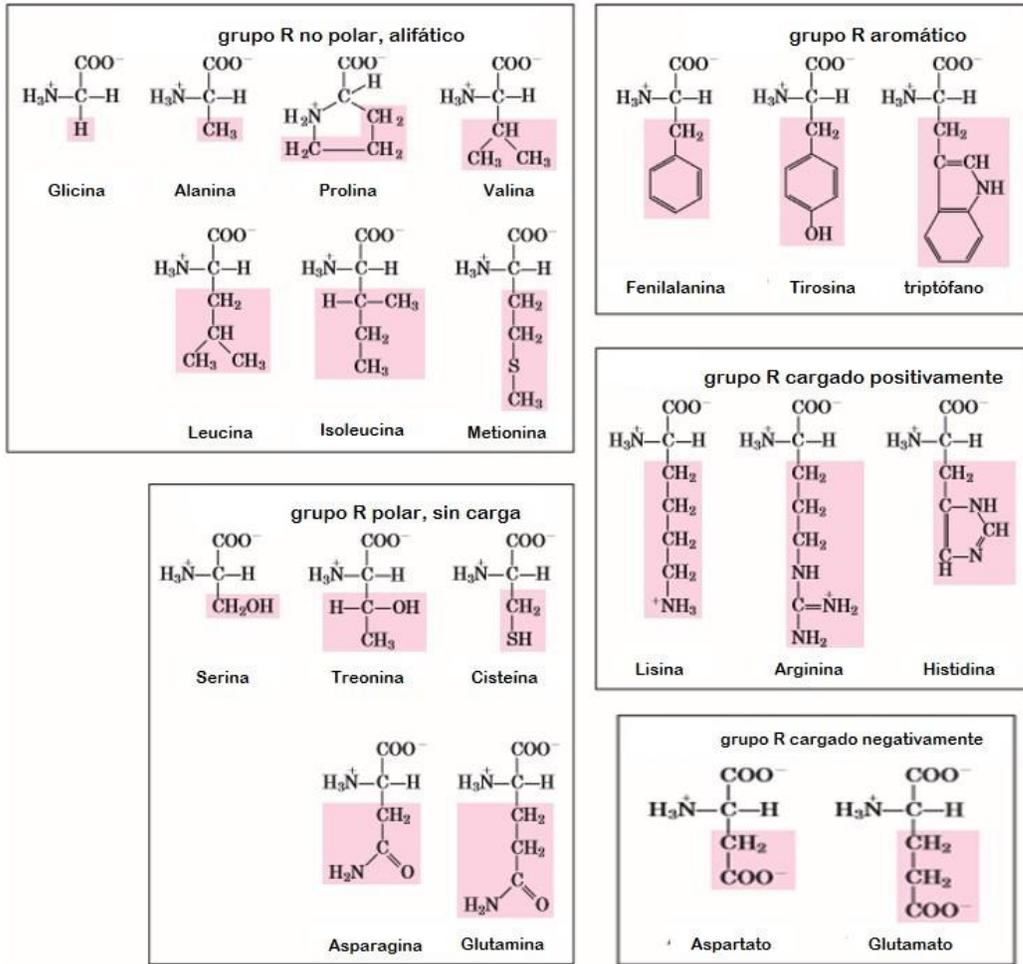
Existen alrededor de 500 AA's en la naturaleza; sin embargo, solo 20 se encuentran presentes en la composición de las proteínas de las formas de vida en la tierra. Éstos también se conocen como AA's proteicos. Todos los AA's proteicos, excepto la glicina, son alfa AA's, esto se refiere a que el carbono α es un centro quiral, por lo cual, los grupos sustituyentes pueden ocupar dos disposiciones espaciales diferentes, contando con al menos dos posibles estereoisómeros, que al no ser imágenes especulares superponibles entre sí se conocen también como enantiómeros.

Todas las moléculas con un centro quiral son ópticamente activas y pueden rotar la luz polarizada cuando se examinan en un polarímetro. Las sustancias que giran en el sentido de las agujas del reloj (hacia la derecha del plano de la luz polarizada) son dextrorrotatorias, del latín *dexter*, derecha; mientras que las que giran en el sentido contrario a las agujas del reloj (a la izquierda del plano de la luz polarizada) son levorrotatorias, del latín *laevus*, izquierda. En general, los enantiómeros D y L tienen las mismas propiedades físicas y químicas, con la excepción de la rotación del plano de la luz polarizada en diferentes direcciones (Genchi, 2017).

Las proteínas presentes en los alimentos generalmente contienen L-α- AA's, pero algunos D-isómeros pueden producirse en alimentos de forma natural o ser inducidos por el procesamiento

en condiciones específicas. En estos alimentos, el proceso de racemización es responsable de la formación de D- AA's y los principales factores involucrados son el pH, la temperatura y la duración del tratamiento. La leche, la carne y los jugos de frutas, que no contienen cantidades sustanciales de D- AA's, a menudo se exponen en el curso de la preparación para el consumo, a condiciones que pueden dar lugar a la racemización (Csapó *et al.*, 2009).

Los AA's se pueden clasificar de acuerdo con las cadenas laterales que contienen; en este caso, cuando el AA en cuestión no contiene un grupo ácido o básico, se clasifica como neutro (aunque los grupos sustituyentes tengan naturaleza polar o no polar). Por lo tanto, si la cadena lateral contiene un grupo básico, el AA será clasificado como AA básico, en el caso contrario será como aminoácido ácido, según sea el caso (Oullete y Rawn, 2015). Tomando en cuenta las propiedades de la cadena lateral (R), pueden clasificarse en cinco grupos, que se enlistan a continuación: AA's con grupo R no polar alifático, AA's con grupo R aromático, AA's con grupo R polar sin carga, AA's con grupo R cargado positivamente y AA's con grupo R cargado negativamente. En la figura 1.2 se enlistan los 20 AA's proteicos, y su clasificación de acuerdo a las propiedades de su cadena lateral R (Nelson y Cox, 2006).



**Figura 1.5.** Estructura y clasificación de los 20 aminoácidos proteicos. Las estructuras corresponden al estado de ionización que predomina en las condiciones fisiológicas (pH 7). La parte sin sombreada en cada estructura es la que se comparte entre todos los distintos aminoácidos, mientras que la parte sombreada corresponde a la cadena lateral variable (modificado de Nelson y Cox, 2006).

### 1.4.1. Aminoácidos en el suelo

En el suelo, la presencia de AA's se debe, en gran parte, a la descomposición de materia orgánica presente. Los cadáveres de animales o el material vegetal en descomposición también pueden generar "parches" de estos compuestos con una concentración muy contrastante al resto del suelo, influyendo de manera muy importante en la forma de adquisición del N por las plantas y los microorganismos circundantes a esas zonas (Hill *et al.*, 2019). Las raíces de las plantas también contribuyen a este hecho, aunque en una pequeña parte, pues excretan hacia el suelo

compuestos de bajo peso molecular, entre los que se pueden mencionar ácidos orgánicos, azúcares y AA's como los más frecuentes (Mengel y Kirby, 2001).

Las concentraciones de N orgánico soluble en los suelos son típicamente en un orden de magnitud mayor que las reservas combinadas de amonio y nitrato; Además, esta fracción contiene una gran proporción de AA's libres, pero son altamente competidas por los microorganismos que los utilizan para sus funciones biológicas, por lo cual pueden encontrarse a una baja disponibilidad y en un muy limitado tiempo. Estos AA's libres pueden servir de fuente de N a especies de plantas que viven en suelos donde las formas inorgánicas de este elemento son poco frecuentes (Jones y Kielland, 2002). Diversos estudios señalan que las fuentes orgánicas de N, como los AA's, son utilizadas por las especies vegetales de regiones del ártico como la taiga y la tundra (Jones y Kielland, 2002; Werdin *et al.*, 2009); lo cual ha centrado la atención en como las plantas pueden ser capaces de captar estas formas distintas del N.

### **1.4.2. Papel de los aminoácidos en las plantas**

Los AA's tienen varias funciones de vital importancia en las plantas; además de su uso para la biosíntesis de proteínas, también representan bloques de construcción para otras vías biosintéticas y desempeñan funciones fundamentales durante los procesos de señalización, así como en la respuesta al estrés en las plantas (Hildebrandt *et al.*, 2015). Son precursores de hormonas, metabolitos secundarios, clorofilas y hasta nucleótidos. Los AA's pueden ser tomados desde el suelo por las plantas o bien, éstas pueden tomar las formas inorgánicas y asimilarlas hasta AA's (Tegeder y Rentsch, 2010).

Parte de éstos se usan en la biosíntesis de proteínas o como precursores de otras moléculas esenciales que contienen N en la raíz o las hojas maduras; mientras que la mayoría se transporta en el sistema vascular de las plantas desde los sitios de asimilación primaria para satisfacer las necesidades nutricionales de otros órganos (Ortiz *et al.*, 2000). También, los AA's funcionan como moléculas protectoras; por ejemplo, en las plantas sometidas a estrés por sequía se produce una acumulación de prolina o de otros AA's, como asparagina y alanina. La prolina puede funcionar como molécula señal para regular funciones mitocondriales, influir en la proliferación o la muerte celular o para provocar la expresión específica de un gen, lo cual permite a la planta poder reponerse del estrés (Szabados y Saviouré, 2010). En general, el papel desempeñado por los AA's acumulados en las plantas varía, desde actuando como osmolito, reguladores del transporte de iones (modulando la apertura del estoma), así como la desintoxicación de metales pesados;

también afectan la síntesis y la actividad de algunas enzimas, la expresión de genes y la homeostasis redox (Rai, 2002).

Aspectos de las plantas como la dormancia y la germinación de las semillas pueden estar influenciados por la presencia de AA's; en este caso, la fenilalanina está relacionada con la síntesis de ácido abscísico; mientras que AA's como la arginina, el glutamato y la metionina demostraron influir fuertemente en la germinación de la semilla (Alhadi *et al.*, 2012)

A pesar de que se ha tenido en cuenta que solo las formas inorgánicas y algunos L- AA's fungen como fuente de N, algunas formas enantioméricas de éstos también pueden ser utilizadas. Hill y colaboradores, en 2011, demostraron que plantas de trigo son capaces de utilizar fuentes orgánicas de N, especialmente a la D-alanina, e incluso teniendo al  $\text{NO}_3^-$  como una fuente alterna de N. Por otra parte, en el 2011, Michard y colaboradores, estudiaron como los D- AA's influyen en el desarrollo de la planta, encontrando que D-serina regula el desarrollo del tubo polínico de *Arabidopsis thaliana* mediante un sistema de comunicación similar al observado en el sistema nervioso de los animales (Michard *et al.*, 2011).

Aunque se sabe de la presencia de ciertos enantiómeros en tejidos vegetales, la fuente de dónde se obtienen, aún es un tema de discusión. Una explicación posible es la absorción a partir del suelo, ya que la rizosfera representa una fuente importante de los mismos para las plantas. En el suelo, estos enantiómeros están presentes por acción de la descomposición de las bacterias, al igual que por la actividad proteolítica de las raíces de las plantas, así como algunas otras fuentes (Hener *et al.*, 2018).

En resumen, si bien se sabe que los AA's tienen diversas funciones que son importantes para la fisiología de las plantas, gran parte de éstas se desconocen o han sido muy poco estudiadas en plantas que no son los típicos modelos de estudio.

### **1.4.3. Aminoácidos en los diferentes órganos de las plantas**

A nivel general, los AA's circulan por toda la planta entre las raíces y los brotes, ya que, además de las importantes funciones con las que están relacionadas, estas moléculas son las utilizadas por los organismos, de manera primordial, como portadoras del N asimilado entre los diferentes órganos (Pratelli y Pilot, 2014). Debido a lo anterior, es de esperarse que el contenido de aminoácidos sea variable en los distintos órganos de la planta, dependiendo además de los factores externos que estén influyendo en el momento determinado del análisis.

Múltiples grupos de investigación alrededor del mundo han incursionado en el análisis de los AA's libres; los alcances han sido igual de variados, unos los estudian como marcadores del estado de desarrollo fenológico, o también como indicadores de cuando existe interacción con factores bióticos o abióticos, entre otras.

Algunos de los estudios realizados en diversas plantas incluyen el de Götz y su grupo de investigación, en el cual se evaluaron los cambios, con respecto a N y ocho AA's, en los brotes de cerezo (*Prunus avium* L.), durante la etapa de latencia invernal y el desarrollo ontogénico. Los AA's glutamato, glutamina, aspartato, asparagina, leucina, alanina, arginina e histidina se eligieron por ser precursores de elementos que interactúan en diversas vías del metabolismo. Se monitorearon los niveles durante cuatro períodos, encontrando patrones de aumento al inicio del estudio y una tendencia a la disminución de manera uniforme conforme pasaba el tiempo, durante la etapa de latencia. Lo anterior ocurrió para todos los AA's estudiados, exceptuando glutamina e histidina. Por otra parte, durante el desarrollo ontogénico las variaciones en los contenidos de estos compuestos fueron más marcadas en todos los AA's estudiados, siendo la alanina uno de los más estables, pero con una tendencia al aumento. De manera general, se encontraron en mayor abundancia en los tejidos de esta planta a los AA's asparagina, glutamina, arginina y glutamato (Götz *et al.*, 2017).

Florencio-Ortíz y colaboradores, en 2018, estudiaron la variación en el contenido de AA's en las hojas de *C. annuum* L., en respuesta a distintas condiciones de estrés biótico y abiótico. Estos autores concluyeron que la infestación por fitopatógenos desencadena un aumento en el contenido de AA's de cadena lateral aromática (tirosina, fenilalanina y triptófano) y de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina); mientras que el estrés hídrico produce una mayor acumulación de AA's como treonina, lisina, histidina, prolina, hidroxiprolina y algunos aromáticos como fenilalanina y triptófano (Flores-Ortíz *et al.*, 2018).

Por otra parte, en perfiles aminoacídicos del pericarpio de plantas de pimiento (*C. annuum* L.), el estudio realizado por Kim y colaboradores en 2019 indica que existe una mayor influencia en el contenido de AA's debido a la interacción del genotipo-ambiente, comparada con la que ocurre simplemente por las diferencias genotípicas particulares de las plantas. En los perfiles de AA's de pericarpio se encontraron 18 distintos AA's; encontrándose en mayor cantidad el glutamato y, en menor cantidad, metionina, cisteína, tirosina, triptófano, isoleucina y lisina (Kim *et al.*, 2019).

En 2015, Zou y colaboradores, analizaron los perfiles de AA's de semillas de *C. annuum* L., encontrando también 18 AA's distintos, con un mayor contenido de ácido glutámico y ácido

aspártico; mientras que los más bajos fueron los correspondientes a prolina, alanina, valina e isoleucina (Zou *et al.*, 2015).

En otro trabajo realizado por Ángeles-López y colaboradores en 2017, se encontró que las plantas de chile (*C. annuum* var. Sonora Anaheim) que se infectaron con el virus del mosaico dorado del pimiento (PepGMV) sufrieron alteraciones en la composición metabólica de ciertos compuestos volátiles para resultar más atractivas a organismos vector que puedan transmitir el patógeno. Estos autores encontraron que estas plantas pueden soportar una mayor infestación de estos vectores y, de igual manera, contienen una mayor carga de AA's en la savia del floema, lo cual resulta beneficioso a los insectos vectores (Ángeles-López *et al.*, 2017).

En otra solanácea, como el tomate, el grupo de Guo y colaboradores en 2019, encontró que la infección de las plantas por el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) produjo un aumento en el contenido de AA's en la savia del floema de las plantas, presentando diferencias entre plantas enfermas y sanas. Por un lado, en plantas sanas pudieron ser detectados hasta 20 AA's, incluyendo 16 proteicos y 4 no proteicos; mientras que en plantas infectadas se encontraron 21 en total, los mismos 20 que los detectados en las plantas sanas, más el AA prolina (Guo *et al.*, 2019).

La importancia en el conocimiento de los perfiles de estos metabolitos radica en que la concentración y el tipo de AA en los distintos órganos son cambiantes y pueden ser influenciados por diversos procesos, como el desarrollo vegetal, condiciones de estrés e incluso procesos de infección por patógenos. Estos procesos pueden conducir a modificaciones en la expresión de genes involucrados en el metabolismo y transporte de estas moléculas (Alhadi *et al.*, 2012; Florencio-Ortiz *et al.*, 2018).

Debido a la importancia de estos elementos y los procesos en los cuales pueden estar relacionados, el estudio de los mismos es demandante en técnicas o métodos eficientes que permitan una adecuada separación y detección.

### **1.5 Estudio de aminoácidos en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)**

En el modelo vegetal *C. chinense* se han estudiado a los AA's, principalmente, abordando el enfoque del aporte nutrimental y los beneficios a la salud humana que éstos pueden tener al encontrarse presentes en los frutos de esta especie.

El chile habanero es una especie de gran importancia a nivel comercial, debido principalmente a su creciente demanda por poseer un alto nivel de picor (pungencia) y aroma, únicos entre las especies del género *Capsicum*. Sin embargo, estos atributos no son los únicos que han despertado el interés por sus frutos. Algunos estudios han encontrado que los frutos de chile habanero contienen particularmente altos niveles de carbohidratos (9.2 g / 100 g) y de proteína cruda (1.52 g / 100 g), además de moléculas con propiedades antioxidantes, como carotenoides, flavonoides, ácido ascórbico y compuestos fenólicos (Segura-Campos *et al.*, 2016; Ramírez-Gómez *et al.*, 2016). Anathan *et al.*, (2018) analizaron el contenido de capsaicinoides y los perfiles de ácidos grasos y AA's en frutos de *Capsicum chinense*, encontrando que las variedades de color rojo (completamente maduras) tienen un mayor contenido de capsaicinoides en el tejido placentario (5.85 g / 100 g), seguido de las semillas (3.08 g/100 g) y por último pericarpio (2.39 g / 100g). El contenido de ácidos grasos en placenta y semilla fue cercano a los 23 g / 100 g en ambos, mientras que en pericarpio y fruto completo se encontraron alrededor de 9 g / 100 g, siendo los más abundantes el ácido palmítico, esteárico, oléico, linoléico y  $\alpha$ -linolénico.

En cuanto al contenido de AA's por cada 100 g de proteína, se encontró que las semillas son particularmente abundantes en arginina y glutamato (77 y 195 mg / 100 g, respectivamente); la placenta fue abundante en cuanto al contenido de valina, fenilalanina y tirosina, los principales implicados en la ruta de biosíntesis de capsaicinoides (Val: 57 mg / 100 g y Tyr+Phe: 87 mg / 100 g), mientras que el pericarpio fue abundante en ácido aspártico, prolina y serina (220, 33 y 55 mg / 100 g, respectivamente). Gracias a los altos niveles de compuestos con propiedades benéficas estudiadas que se han encontrado en las diferentes partes del fruto de chile, se permite sugerir el gran potencial de uso de este fruto, tanto como alimento, como nutracéutico.

Por otra parte, además del valor nutrimental que cumplen los AA's, también se han estudiado en un enfoque de "molécula señal", ya que se han visto relacionados con diversidad de funciones e interacciones con otros componentes que regulan actividades primordiales para el desarrollo vegetal. Desde esta otra perspectiva, se ha sugerido que estas moléculas pueden asociarse a receptores específicos, lo cual desencadena una respuesta dirigida hacia otras moléculas señalizadoras, en una especie de cascada de señalización que deriva en un efecto (presencia, aumento o disminución) de alguna función en las plantas (Vincill *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2020).

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado la respuesta de las plantas frente a la escasez de N, elemento esencial para todos los organismos. Santiago-Antonio y col. en el 2014, encontraron que la correlación más alta entre la ganancia de biomasa (crecimiento de la planta) y el contenido

de compuestos nitrogenados, se obtuvo con el contenido total de AA's, sugiriendo la importancia de estos compuestos como un componente clave en el desarrollo vegetal (Santiago-Antonio *et al.*, 2014).

En otro estudio realizado por Serralta-Interián en 2014 con diferentes variedades de chile habanero sometidas a varias fuentes de N, se pudieron encontrar ligeras variaciones en el contenido de AA's totales, debidas, por una parte, a la colección de genes específica de cada variedad de chile habanero (genotipo) y por otra, a la forma en cómo se metaboliza el N cuando ingresa a las células, dependiendo de si se encuentra en su forma de nitrato o amonio (Serralta-Interián, 2014).

Otro punto importante en cuanto a los AA's, es la relación que tienen con ciertos canales. Se conoce que los canales iónicos en plantas, similares a los receptores de glutamato en animales, llamados GLR (del inglés "glutamate like receptor"), son proteínas que participan en una diversidad de relaciones y funciones que son atribuidas a ciertos AA's, principalmente el glutamato (Kong *et al.*, 2015; Toyota *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Sin embargo, éste no es el único AA que puede actuar como señalizador para que ocurra una respuesta excitatoria del canal (apertura o cierre del mismo).

Ejemplo similar a lo mencionado previamente son los estudios llevados a cabo por León-García en 2019, donde se estudió la presencia y actividad de posibles GLR en la raíz de plantas de *C. annuum*. En este trabajo se encontró que ocho de los 12 transcritos de *GLRs* evaluados (*CaGLRs*), estaban presentes en diferentes zonas de la raíz (algunos cerca de la base de la raíz primaria y otros cerca del meristemo apical). Además, se logró observar que algunos AA's, además del L-glutamato, como L-metionina, D-serina y glicina son capaces de provocar la entrada de iones  $Ca^{2+}$  al interior de las células de la raíz de *C. annuum*. Este trabajo permitió sugerir que ciertos AA's pueden actuar en conjunto con los GLRs en el modelamiento de la arquitectura radical.

Por su parte, García-Laynes, (2019), estudió la expresión de al menos ocho transcritos de *GLRs* en chile habanero durante su desarrollo ontogénico, encontrando que los perfiles de expresión de estos transcritos fueron cambiando en respuesta a las condiciones de N suministradas (forma de N y abundancia). De igual forma, se estudió el efecto que tiene el estrés hídrico sobre los niveles de transcritos de *CaGLRs*, comprobando que esta condición causó una mayor variación del perfil de expresión de los transcritos en las plantas sometidas a este tipo de estrés (García-Laynes, 2019).

---

En resumen, el papel de los AA's parece ir un poco más allá del aporte nutrimental y los beneficios que aportan a través de su consumo en los alimentos (como el caso de los AA's esenciales). En los últimos años el papel de los AA's como molécula señal ha llamado el interés de la comunidad científica de manera significativa, pues se han obtenido resultados interesantes que sugieren una estrecha participación en diversos procesos. Conocer el perfil de AA's en plantas modelo, así como en las de interés comercial, permite dar un paso de avance hacia la comprensión de los distintos procesos en los que participan. A su vez, esta comprensión puede dar como resultado un beneficio directo, ya sea en el desarrollo de la planta o en el contenido de nutrientes que éstas aportan.

### **1.5.1. Métodos analíticos para el análisis de aminoácidos**

Como se mencionó anteriormente, los AA's son los principales constituyentes de las proteínas, así como precursores de importantes intermediarios que están involucrados en diversas vías del metabolismo, por lo tanto, se espera que exista una regulación estricta en ambos sentidos, en la captación, así como su disponibilidad final, dependiendo de las necesidades de la planta. Por ello, el análisis del perfil aminoacídico o el contenido de manera cuantitativa o cualitativa de los mismos es un área de interés actual.

Para poder analizar su contenido, es necesario extraer los AA's de la muestra para su posterior estudio. La forma más sencilla para llevar a cabo la misma es a través de extracciones con disolventes mediante reflujo o en modalidad asistida por ultrasonido, microondas, entre otras (Reich *et al.*, 2006; Chakraborty, 2010; Themelis *et al.*, 2019). Una vez que se obtienen los analitos a partir de la muestra, el análisis debe continuar mediante la separación del extracto en sus distintos componentes.

En la literatura existen numerosos reportes del análisis de AA's a partir de muestras vegetales, en donde los métodos cromatográficos son los más empleados. Entre ellos destacan la cromatografía de gases, en menor medida, y principalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como la cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) (Campanella *et al.*, 1999; Meher *et al.*, 2011; Bahwani *et al.*, 2012; Jing *et al.*, 2016).

En general, se podría decir que se han adoptado dos enfoques; uno, en donde la separación de los AA's se lleva a cabo de manera directa y posteriormente existe una derivatización con compuestos que permiten su detección (fluorescencia, luz visible, detectores másicos, entre otros) y el segundo, es la derivatización antes de la separación. En este último, los AA's se

---

convierten a estructuras que pueden ser separadas y reconocidas por los detectores, requiriendo de varios pasos adicionales para llevarlo a cabo (Koga *et al.*, 2017).

Muchas técnicas para el análisis de AA's se basan en la derivatización de éstos, debido a su naturaleza química. La ninhidrina es, por excelencia, el reactivo derivatizante colorogénico más utilizado, gracias a su alta sensibilidad. Este compuesto puede reaccionar con los AA's, resultando en un producto coloreado de un tono azul/violeta, a excepción de la prolina y la hidroxiprolina, con las cuales el producto obtenido se colorea de un tono amarillo (Basu *et al.*, 2016).

En cualquiera de las dos aproximaciones, el análisis de AA's se lleva a cabo, en su mayoría, por métodos implementados para HPLC, el cual figura como el método más utilizado hasta la actualidad. A partir de éste, han surgido numerosas variantes que mejoran su desempeño, siendo muy sensibles y que pueden acoplarse a sistemas de detección sofisticados, como la espectrometría de masas (MS). Sin embargo, a veces los procedimientos previos al análisis pueden ser muy laboriosos y complicados. Por otro lado, la cromatografía de gases (GC) con detector de flama (FID) o de captura de electrones (ECD) también posee una alta sensibilidad y se ha empleado de manera usual. Este método tiene un tiempo relativamente corto de análisis y un gran poder de resolución, pero la derivatización de los AA's previo al análisis es un paso obligatorio (Zaikin y Halket, 2009).

Otra de las metodologías aplicadas en el estudio de estas moléculas es la TLC, que debido a su implementación sencilla, rápida y amplia versatilidad, se volvió una de las técnicas preferidas por los laboratorios grandes y pequeños. En la actualidad, para esta metodología se cuenta con una variedad de fases estacionarias que han dotado de mayor amplitud el rango de aplicaciones de la misma. Además de las fases estacionarias más comunes como el gel de sílice, celulosa y alúmina, se han desarrollado modificaciones del adsorbente para implementar la fase reversa (RP, por sus siglas en inglés "reverse pase") como las conocidas C-18, C-12, C-8, C-2, aminopropilo, difenilo, y fases estacionarias unidas a cianopropilo (Mohamad y El-Desoky, 2012).

Aunque la TLC tiene un menor poder de separación, en comparación con HPLC y la GC, no obstante, ofrece varias opciones que compensan esta desventaja. El empleo de fases estacionarias con tamaño de partícula más pequeño, el acoplamiento a modernos sistemas de detección y el uso de sistemas automatizados que permiten reducir los errores debido a las variaciones de los métodos manuales, son algunas de ellas. Cuando en la TLC se emplean estas

opciones, se conoce como cromatografía de capa fina de alta eficiencia o HPTLC, por sus siglas en inglés.

El cuadro 1.1 resume algunos de los trabajos que han empleado TLC para el análisis de AA's. En la actualidad, la TLC y su implementación de alta eficiencia, ofrecen una alternativa útil para el análisis de estos compuestos, pues es capaz de adaptarse a los procedimientos de derivatización pre y post análisis. También, puede acoplarse con técnicas como MS, al igual que existen amplias opciones en fases estacionarias y móviles para mejorar su desempeño (Morlock y Schwack, 2010).

**Cuadro 1.1** Recopilación de metodologías para el análisis de aminoácidos por TLC

Observaciones	Fase estacionaria	Fase móvil	Analitos detectados	Referencia
La separación de los AA's requiere la adición del reactivo 2-o-[(R)-hidroxipropil]-CD en la fase móvil y el empleo de salicilaldehído en tolueno como revelador.	Sílica	Acetonitrilo:agua (2:5) adicionado con 2-o-[(R)-hidroxipropil]-CD	Enantiómeros de AA's	Hao, <i>et al.</i> , 1996
La detección se realiza con el reactivo ninhidrina en acetona y calentando a 60°C por 30 min.	Sílica impregnada con Cu(II)	Butanol:buffer de acetato (0.3M, pH 6):acetonitrilo (10:12:5)	AA's	Bushan <i>et al.</i> , 1996
Método para la separación de enantiómeros utilizando aditivos quirales para la fase móvil. Detección UV 254 nm	Fase reversa RP C-2 y C-18	Acetonitrilo:agua:β-ciclodextrina	Enantiómeros de AA's	Duncan y Armstrong, 1991
Cromatografía preparativa de AA's no protéicos	Celulosa	Butanol:ácido acético:agua (12:3:5)	AA's no protéicos	Pan <i>et al.</i> , 1995
Análisis de mezclas racémicas de D/L AA's. Visualización con vapor de Yodo	Sílica	Butanol:Cloroformo:ácido acético (3:7:5)	Mezcla racémica de D/L AA's	Bushan y Arora, 2001

## 1.6. Desarrollo de métodos analíticos

La química analítica es la ciencia de obtener, procesar y comunicar información sobre la composición y estructura de la materia. En otras palabras, es el arte y la ciencia de determinar qué es la materia y cuánto existe, empleando instrumentación precisa, software y análisis estadístico. Permite resolver problemas en casi todas las áreas en donde se involucre la química, tanto en ámbitos académicos, como del sector industrial e investigación. Por ejemplo, garantizar la seguridad de los fármacos o la calidad de los alimentos, mediante el desarrollo o la adecuación de métodos de análisis precisos y eficaces para análisis, mediante el uso de estos conocimientos (ACS, 2012).

Cuando se habla de desarrollar un método analítico puede deberse a diferentes cuestiones, una de ellas es que no exista información relacionada con el analito que se quiere estudiar y, por lo tanto, es de carácter obligatorio desarrollar una metodología que permita llevar a cabo esta tarea. Por otro lado, puede que ya exista un método desarrollado, pero éste no es el adecuado para responder las cuestiones analíticas del estudio que se lleva a cabo en particular. Una vez que se haya definido y se tenga claro el objetivo del estudio (por ejemplo, si es de carácter cualitativo o cuantitativo), se deben analizar las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas que conforman el amplio repertorio de herramientas analíticas actuales, problemáticas como la disponibilidad de equipos, sensibilidad de la técnica, costos, tiempo de análisis, entre otras, deben ser analizadas (Reich y Schibli, 2007).

El siguiente paso es estandarizar las técnicas que se utilizarán en el método, desde cómo realizar la extracción y la elección de los disolventes, hasta las condiciones necesarias para la separación del analito y su posterior análisis, sin dejar de lado la documentación de los resultados y la redacción de los reportes, pues es un paso igual de importante que permitirá el registro y resguardo de la información generada.

Finalmente, lo que permitirá establecer un método de rutina, es la comprobación o validación del método, que servirá para demostrar la funcionalidad para el fin previsto. Durante esta etapa se realizan una serie de ensayos que comprobarán las hipótesis en que se basan dichos experimentos y se lleva a cabo el registro de la evaluación de los parámetros de desempeño del método (la precisión, la linealidad, la robustez y los límites de detección y cuantificación, etc.). Generalmente, se considera que la validación del método está ligada estrechamente con el desarrollo del método y en muchas ocasiones, no es posible determinar exactamente en dónde

---

termina el desarrollo del método y en donde empieza la validación, ya que muchos de los parámetros de desempeño del método que están asociados a su validación son evaluados, en algún momento, como parte de su desarrollo (Eurachem, 2005).

## JUSTIFICACIÓN

Los AA's son componentes clave de la nutrición vegetal al ser precursores de importantes moléculas que participan de muy diversas formas en el desarrollo de las plantas. Algunos, por sí solos, pueden constituir moléculas señal que desencadenan eventos fundamentales para el crecimiento y diferenciación vegetal, así como de respuesta a diversos tipos de estrés. Estas funciones pueden estar relacionadas de manera específica para cada órgano y/o especie vegetal. Para poder comprenderlas de mejor manera, es necesario determinar y conocer cuáles son los componentes presentes en los perfiles de los diferentes órganos pertenecientes a especies de interés científico/agronómico.

Hasta la fecha, este estudio no ha sido desarrollado para chile habanero, sin embargo, en el grupo de trabajo se han visto ciertos patrones de cambio en la expresión de transcritos para proteínas canales similares a los GLR, cuyos principales agonistas pueden ser los AA's y otras moléculas. También, se ha encontrado que hay una fuerte relación directa con la variación natural del contenido de AA's y la ganancia de biomasa en las plantas que fueron expuestas a diferentes formas de N. Si bien podría existir una variación natural debida al genotipo de las plantas, sería interesante estudiar cuáles son los AA's que se encuentran más relacionados a estos eventos, mediante el estudio de su aumento o disminución, lo cual podría sugerir una relación directa con el fenómeno estudiado.

Debido a la similitud en su estructura química, se asegura una complejidad metodológica extensa en el análisis de los AA's, tanto para la separación como en la detección de los mismos, la cual ha sido previamente reportada. Por consiguiente, existe un continuo interés en el desarrollo de nuevos métodos; así como en la adecuación de los ya existentes, para la estimación y el análisis del contenido de estas moléculas en diferentes tejidos u órganos vegetales.

## **PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

1. ¿Cuál será el perfil de AA's libres en los diferentes órganos vegetativos de *C. chinense* Jacq.?
2. ¿Se modificará el perfil de AA's libres en los diferentes órganos vegetativos de la planta, de acuerdo a la fuente de N suministrada?
3. ¿Cuáles serán los perfiles de AA's libres en frutos de *C. chinense* Jacq. con diferente grado de desarrollo?

## **OBJETIVO GENERAL**

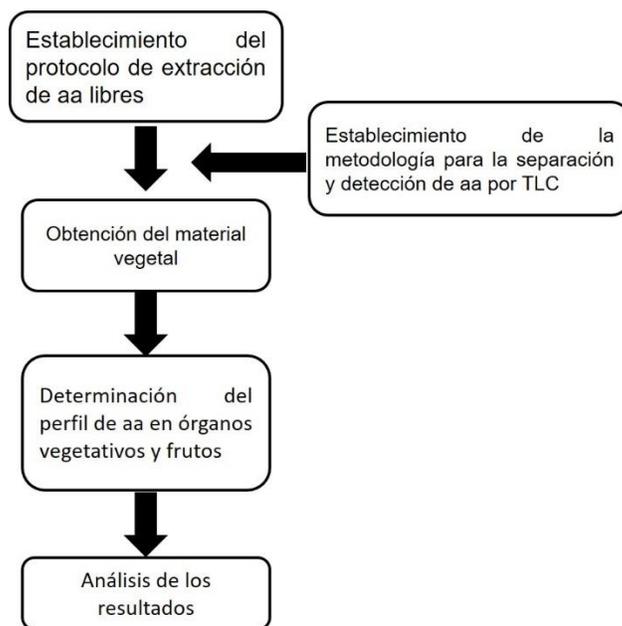
Estudiar el perfil de AA's libres en diferentes órganos vegetativos de plántulas de chile habanero creciendo bajo diferentes fuentes de N y en frutos de diferentes grados de desarrollo.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer un protocolo de análisis adecuado para la determinación del perfil de AA's libres.
2. Determinar el efecto de la fuente de N sobre el perfil de AA's libres en los órganos vegetativos (raíz, tallo y hoja) de chile habanero.
3. Evaluar el efecto del grado de desarrollo de frutos de chile habanero sobre su perfil de AA's libres.

**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

En la figura 1.3 se presenta un resumen de la estrategia experimental que se siguió durante la realización de este proyecto.



**Figura 1.6** Diagrama general de la estrategia experimental

## CAPÍTULO II

### ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE AMINOÁCIDOS LIBRES POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un método analítico siempre partirá de un proceso de comprensión del objetivo perseguido, el cual puede ser diverso (discriminar, detectar, cuantificar, entre otros). Es importante tenerlo claro desde el inicio y durante el desarrollo para lograr una adecuación aceptable. En un siguiente paso, se selecciona un procedimiento de ensayo que permitirá comprobar uno o más parámetros relacionados con la muestra analizada, haciendo necesario conocer sus características físicas y químicas (Reich y Schibli, 2007).

Los AA's son moléculas nitrogenadas muy versátiles, participan en numerosos procesos fundamentales del desarrollo vegetal y constituyen la principal forma de removilización de AA's en el interior de la célula vegetal (Pratelli y Pilot, 2014). Se ha descrito que la concentración de AA's en los tejidos vegetales puede variar debido a un gran número de factores biológicos, desde el nivel de nutrientes en el suelo (Xu *et al.*, 2018), hasta procesos de infestación por agentes patógenos (Ángeles-López, 2016). Por ello, el análisis de los perfiles metabólicos presenta una estrategia adecuada para conocer de mejor manera el importante papel que cumplen estos componentes biológicos; siendo necesario el empleo de técnicas analíticas adecuadas que permitan la obtención de resultados comparables, confiables y rápidos.

El desarrollo y adecuación de métodos de análisis es un área de continuo crecimiento pues existe constante demanda de metodologías actualizadas, que incluyan un esquema de trabajo simplificado y de ser posible permitan la utilización de tecnologías amigables con el medio ambiente para reducir en mayor medida el impacto generado hacia el ambiente.

La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica de separación utilizada aproximadamente desde 1938 (MERCK, 2019); aunque en un principio fue considerada una técnica cualitativa, el avance tecnológico ha permitido aumentar y mejorar su implementación, convirtiendo a la TLC moderna en una herramienta tanto cualitativa como cuantitativa, además de sencilla. Esta técnica es ampliamente utilizada en los laboratorios para el análisis rutinario de productos alimenticios

(análisis de lípidos, vitaminas, etc.), extractos herbolarios, control de calidad en medicamentos, detección de adulterantes y principios activos, por mencionar los más comunes (Sherma, 2000).

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Establecimiento del protocolo de extracción de los aminoácidos libres

Para el establecimiento de las condiciones de extracción de los AA's se usaron frutos de chile habanero de 45 días post-antesis (DPA), los cuales fueron molidos hasta polvo fino y congelados a -80 °C hasta su uso.

Durante el establecimiento del protocolo de extracción, se tomaron como base tres protocolos de la literatura, los cuales se adaptaron acorde a los objetivos del proyecto: **P1**, corresponde a la extracción con solución amortiguadora y agitación manual (Gördes *et al.*, 2011); **P2**, extracción con solución amortiguadora y homogenizador mecánico y **P3**, a la extracción con disolventes de diferente polaridad (Hudaib *et al.*, 2015). De todos los protocolos adaptados, se eligió el que permitió una mayor extracción de AA's.

Para **P1**, se siguió la metodología descrita por Gordes *et al.*, (2011), con algunas modificaciones. Se tomó 1 g de tejido (previamente molido con N líquido en mortero) y se maceró durante 1 h, junto con 5 mL del amortiguador Tris HCl 100 mM (pH 8) en un vial de vidrio, mantenido en hielo. El vial fue agitado ocasionalmente cada 15 minutos y una vez pasado el tiempo establecido, el extracto se transfirió a tubos de polipropileno para su centrifugación a 10,000 x g durante 15 min. Una vez finalizado este proceso, el sobrenadante se separó y se almacenó en congelación a -20 °C hasta su uso.

El protocolo **P2**, de manera similar al anterior, consistió en tomar 1 g de tejido molido y macerar en un vial de vidrio con 5 mL del amortiguador Tris HCl 50 mM (pH 8), homogenizando el tejido, durante 2 min. con ayuda de politrón, manteniendo el vial en hielo. Pasado este tiempo, el extracto se filtró y se centrifugó a 10,000 x g, durante 15 min. Posteriormente, el sobrenadante se separó y se almacenó en congelación a -20 °C hasta su uso.

Para el protocolo **P3**, se siguió el procedimiento general descrito por Hudaib *et al.*, (2015), con ligeras modificaciones. Se realizaron extracciones subsecuentes utilizando disolventes de polaridad distinta, empleando el siguiente orden decreciente: etanol-agua (70%:30%, v/v, Etanol-70), polaridad: 0.65 para el etanol y 1 para el agua; metanol (100%, Metanol-100), polaridad: 0.76;

---

acetona (100%, Acetona-100), polaridad: 0.36; cloroformo (100%, Cloroformo-100), polaridad: 0.26.

La extracción se realizó con 1g de tejido molido en un vial de vidrio añadiendo 5 mL del primer disolvente, que fue Etanol-70; la mezcla se incubó en hielo durante 1 hora (agitando ocasionalmente cada 15 minutos). Pasado el tiempo establecido, el extracto se transfirió a tubos de polipropileno para su centrifugación a 10,000 g durante 15 min. y se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf, conservando el material vegetal para la siguiente extracción. Esto se repitió con el resto de los disolventes, de manera individual, continuando con Metanol-100, Acetona-100 y, por último, Cloroformo-100, tratando de mantener la relación inicial de tejido-disolvente 1 a 5. Las fracciones se recuperaron por separado y se secaron bajo presión reducida únicamente las correspondientes a Acetona-100 y Cloroformo-100. Una vez seco, el extracto se conservó en congelación a -20 °C hasta su uso. Para su uso, las fracciones secas se resuspendieron en 100 µl de acetona y 80 µl de cloroformo en las respectivas fracciones.

Para evaluar la capacidad de recuperación del método de extracción, los AA's totales se cuantificaron por espectrofotometría, siguiendo la metodología reportada por Yemm y Cooking, (1955).

### **2.2.2 Establecimiento de la metodología para la separación y detección de los aminoácidos libres por TLC**

Para la adecuación del proceso cromatográfico se probaron distintas condiciones de separación y detección, usando inicialmente los estándares de los 20 AA's proteicos. Se prepararon soluciones acuosas de los mismos, en forma individual y agrupados en cinco categorías, de acuerdo a las características de su cadena lateral variable, como se describe en el cuadro 2.1. Para la preparación de las soluciones acuosas de los estándares, se disolvió 1 mg de cada AA individualmente en 1 mL de agua desionizada. Posterior a esto, de cada estándar se tomaron 10 µL, que se completaron hasta un volumen de 100 µL con agua destilada en un tubo nuevo. Para realizar las mezclas, se tomaron de igual forma 10 µL de esta solución y se añadieron en un mismo tubo nuevo, una vez añadidos los AA's correspondientes al grupo preparado, se completó el volumen necesario de agua destilada para alcanzar los 100 µL.

**Cuadro 2.1** Códigos utilizados para los estándares de aminoácidos individuales y agrupados.

Código	Aminoácido
G	Glicina
A	Alanina
P	Prolina
V	Valina
L	Leucina
I	Isoleucina
M	Metionina
Mx1 (no polar alifática)	G,A,P,V,L,I,M
F	Fenilalanina
Y	Tirosina
W	Triptófano
Mx2 (aromática)	F,Y,W
S	Serina
T	Treonina
C	Cisteína
N	Asparagina
Q	Glutamina
Mx3 (polar sin carga)	S,T,C,N,Q
K	Lisina
R	Arginina
H	Histidina
Mx4 (carga +)	K,R,H
D	Ác. aspártico
E	Ác. glutámico
Mx5 (carga -)	D,E
MxT	todos los anteriores

### 2.2.2.1 Cromatografía en capa fina de los aminoácidos (separación y detección)

La separación por TLC se llevó a cabo aplicando los estándares de los 20 AA's, en placas de aluminio, utilizando como fase estacionaria sílica-gel 60F (fase normal).

Para el desarrollo en fase normal, se utilizó como fase móvil una mezcla de n-butanol-ácido acético-agua en proporción 12:3:5. Durante la adecuación de las condiciones cromatográficas, en fase normal, se probaron también distintas proporciones de los disolventes que conforman el

sistema de fase móvil, anteriormente ensayada, con el fin de obtener diferentes polaridades. Igualmente, en algunos casos el n-butanol fue sustituido por n-propanol. El cálculo del índice de polaridad de un sistema de tres componentes se llevó a cabo sustituyendo los valores indicados en el cuadro 2.2 para cada disolvente, en la siguiente ecuación (modificada de Reich y Schibbli, 2007):

$$P'_{ABC} = P'_A \left( \frac{V_a}{V_a + V_b + V_c} \right) + P'_B \left( \frac{V_b}{V_a + V_b + V_c} \right) + P'_C \left( \frac{V_c}{V_a + V_b + V_c} \right)$$

Donde:

P'ABC es el índice de polaridad calculado para un sistema de tres componentes.

P'A, P'B y P'C corresponden al índice de polaridad del disolvente A, B y C, respectivamente.

V<sub>a</sub>, V<sub>b</sub> y V<sub>c</sub> corresponden a la proporción que ocupan el disolvente A, B y C, respectivamente, en el sistema.

Los índices de polaridad de los disolventes empleados en las fases móviles se encuentran en el cuadro 2.2.

**Cuadro 2.2** Índice de polaridad de los disolventes empleados en las fases móviles (tomado de Reich y Schibbli, 2007).

Disolvente	Índice de Polaridad P'
n-Butanol	3.9
n-Propanol	4.0
Ácido acético	6.0
Agua	10.2

La separación cromatográfica se llevó a cabo en cámaras de vidrio para TLC (Twin through chamber) de CAMAG. Se aplicó 1 µL de los estándares de cada AA a una distancia de 0.8 cm del borde inferior, de manera puntual y equidistante (cada 1 cm) en placas de 20 cm x 10 cm (dejando 2 cm en los lados izquierdo y derecho). Una vez que las aplicaciones secaron, el desarrollo se llevó a cabo, colocando 10 mL de la fase móvil (correspondiente) junto con la placa, dentro de la cámara, dejando transcurrir el tiempo necesario para que la fase móvil alcance el frente del disolvente (3 cm antes del borde superior de la placa). Una vez que la fase móvil alcanzó el frente de disolvente en la placa (40 min aprox. para cada análisis), se retiró la misma y se eliminó el exceso de fase móvil con ayuda de una corriente de aire.

### **2.2.2.2 Detección**

Para la detección de los AA's separados por TLC, se utilizó el reactivo revelador ninhidrina, preparado a partir de la disolución de 0.2 g del mismo en 100 mL de etanol absoluto. La placa se impregnó con la solución de ninhidrina, se calentó a 110 °C durante 3 min y se dejó enfriar. Las bandas que corresponden a estos compuestos pueden detectarse a simple vista en la placa y el análisis densitométrico de los mismos se realizó a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 570 nm, usando un densitómetro modelo Scanner 4, de la marca CAMAG (Basilea campina, Suiza), operado mediante el software Wincats V.2.1.

### **2.2.3 Análisis estadístico**

Todos los datos analizados, así como gráficos y tests estadísticos de comparación (ANOVA, Tukey, Kruskal-Wallis, entre otros) se realizaron con ayuda del software SigmaPlot v.11.0, Minitab 10.0 y el paquete de análisis de datos de Excel.

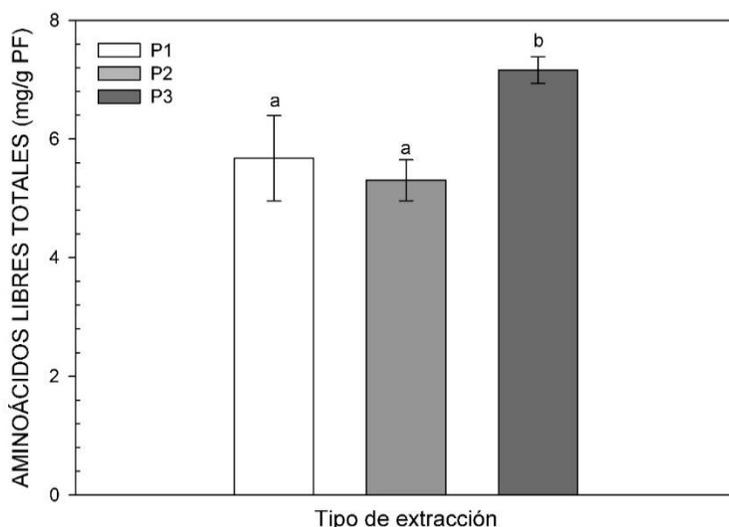
## **2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.3.1 Establecimiento de las condiciones de extracción de aminoácidos libres**

Para los fines de este trabajo se probaron tres protocolos, que variaron en cuanto al disolvente de extracción y en la forma de extracción, para comparar la cantidad total de AA's libres recuperada y elegir el que más se acoplara al objetivo del estudio.

En la Figura 2.1 se ilustra el contenido total de AA's libres que se logró extraer con los diferentes protocolos empleados (P1 al P3). La mayor cantidad de AA's totales, a partir de frutos, se logró extraer al usar el protocolo P3, basado en extracciones secuenciales con disolventes orgánicos. El empleo de este protocolo permitió extraer una cantidad de AA's totales, que correspondieron a 7.11 mg/g PF, seguido por los protocolos P1 y P2, con los cuales se logró extraer 5.67 mg/g PF y 5.34 mg/g PF, respectivamente. Al analizar las cantidades obtenidas, no parece haber una diferencia significativa cuando se compararon estos últimos dos, a pesar de que en P1, se

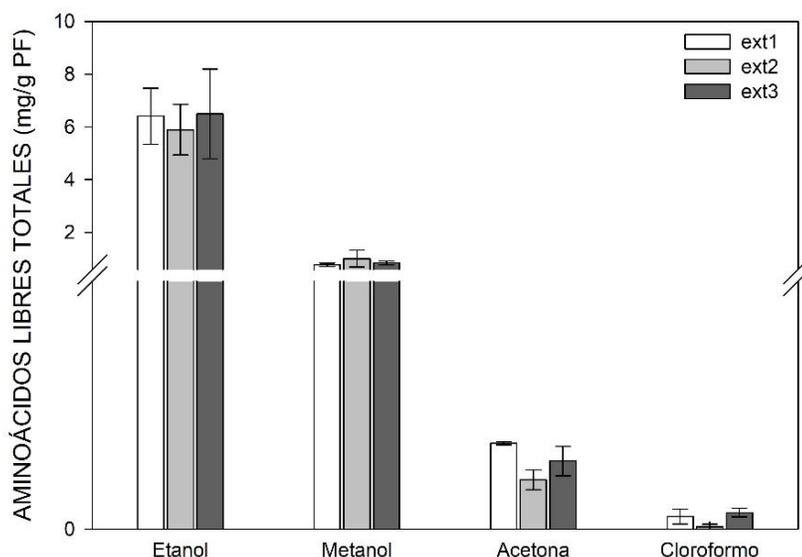
maceró de manera manual y se permitió la incubación durante 1 h en hielo; mientras que en P2, en el que se usó politrón y no se llevó a cabo esta incubación tan prolongada.



**Figura 2.1** Contenido de aminoácidos libres totales en frutos de chile habanero, obtenido a partir de los tres diferentes protocolos de extracción. Los datos representan el valor promedio de tres extractos biológicos y tres repeticiones biológicas (n=9) y las líneas verticales son la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0.005$ ).

Al realizar un análisis más detallado de las fracciones obtenidas a partir del protocolo P3 (Figura 2.2), se puede notar que los primeros dos disolventes, correspondiendo a Etanol-70 y Metanol-100, permiten extraer la gran mayoría (>90%) de compuestos solubles, desde un inicio. Sin embargo, es importante señalar que debido a las características de diferente polaridad que presentan se logró encontrar todavía una recuperación, aunque mínima, de AA's libres en las últimas dos fracciones analizadas, correspondiendo a los disolventes Acetona-100 y Cloroformo-100. Este resultado puede ser indicativo de la presencia de AA's menos polares que puedan ser más fácilmente extraídos con estos disolventes.

Debido a estos resultados, se decidió por elegir este último protocolo (P3) para continuar con el estudio, ya que puede resultar ventajoso emplear un esquema de polaridad cambiante, tomando en cuenta las distintas propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos.



**Figura 2.2** Contenido de aminoácidos libres totales a partir de las distintas fracciones estudiadas, empleando el protocolo con disolventes orgánicos de polaridad diferente (P3). Los datos muestran los resultados a partir de tres extracciones biológicas diferentes (ext 1, ext 2, ext 3) y las líneas verticales son la desviación estándar (n=3 repeticiones).

### 2.3.2 Establecimiento de las condiciones cromatográficas para el análisis de aminoácidos libres (separación y detección)

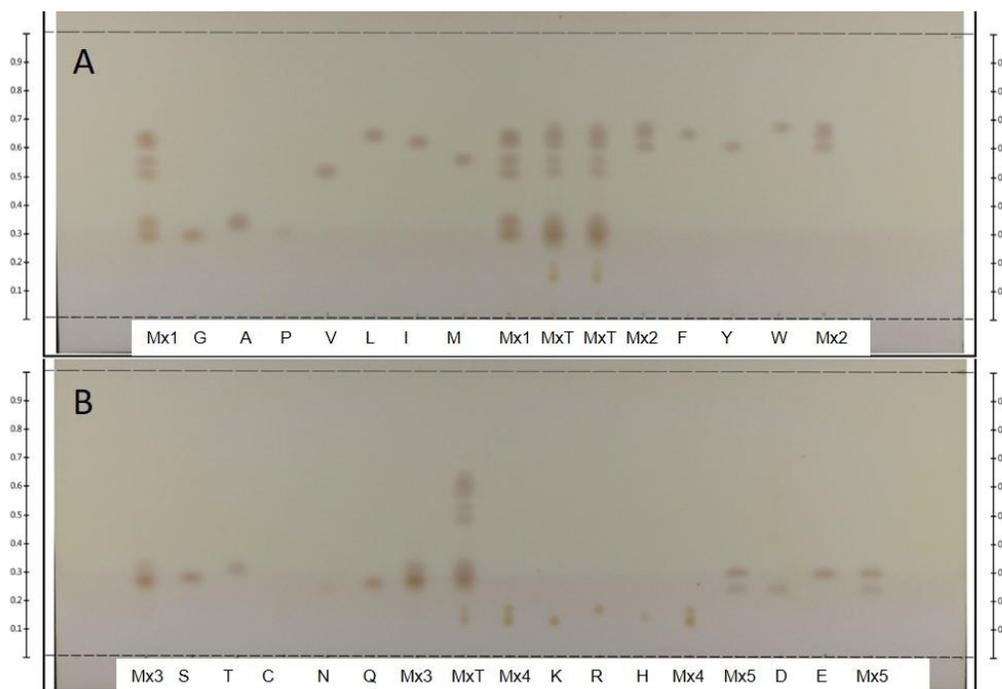
Para el establecimiento de las condiciones cromatográficas, se analizaron las distancias relativas de migración ( $R_f$ ) de los AA's cuando se separaron por TLC en fase normal. Bajo estas condiciones, se usó inicialmente n-butanol-ácido acético-agua (12:3:5) como fase móvil. La Figura 2.3 ilustra el proceso final que incluye la separación y detección, con el reactivo de ninhidrina, de los 20 estándares de AA's, de manera individual y por grupos (según las propiedades de su cadena "R"). El esquema de aplicación siguió la distribución que se menciona a continuación. Los carriles con una sola inicial en mayúscula son estándares de AA's individuales, mientras que los carriles marcados con Mx1, Mx2, Mx3, Mx4, Mx5 y MxT, corresponden a las mezclas de los AA's de cadena lateral no polar alifática, de cadena aromática, cadena lateral polar sin carga, cadena cargada positivamente y cadena cargada negativamente, respectivamente.

Al usar estas condiciones, ciertos AA's parecen tener una distancia de migración similar; por ejemplo, glicina, prolina y serina ( $R_f$  aprox. 0.3), al igual que alanina y treonina ( $R_f$  aprox. 0.36).

Otros fueron menos afines a la fase estacionaria, pero más a la fase móvil y migraron una distancia mayor, aunque siguen teniendo una dificultad similar para resolverse de algunos otros, como fue el caso de fenilalanina, leucina, isoleucina, tirosina y triptófano ( $R_f$ : entre 0.6 y 0.72) (Figura 2.3 A y B).

Por otro lado, el grupo de los AA's con carga positiva (histidina, lisina y arginina) tuvieron una alta afinidad a la fase estacionaria y presentaron la menor distancia recorrida ( $R_f$ : entre 0.1 y 0.2) (Figura 2.3 B).

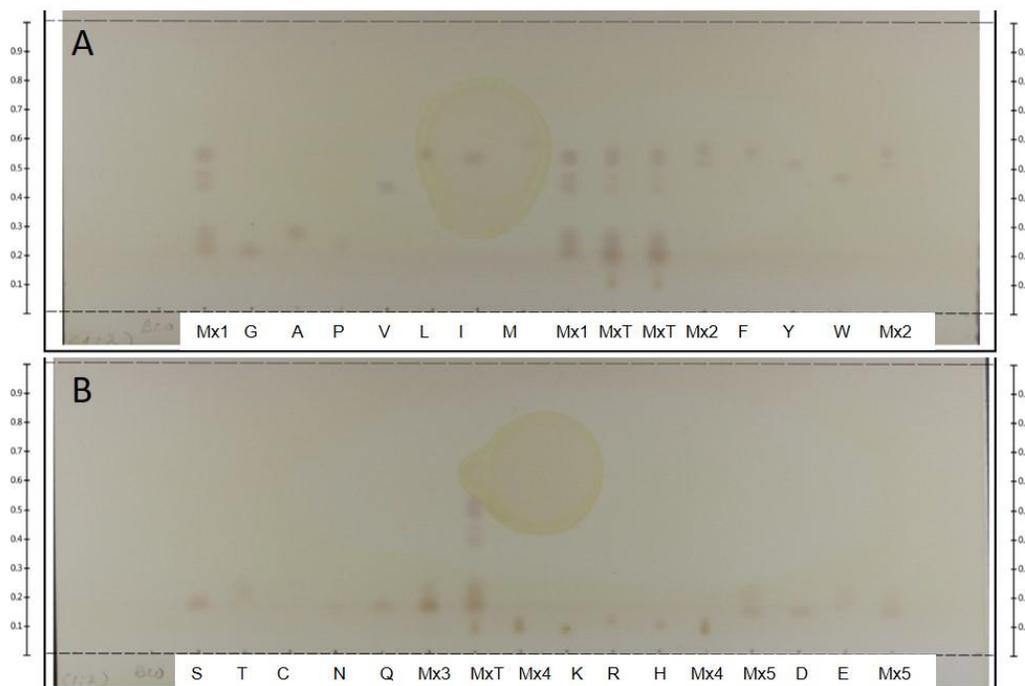
De este experimento inicial pudo obtenerse un primer acercamiento del comportamiento de algunos AA's en el sistema cromatográfico y también encontrar otros factores a probar para lograr una mayor separación.



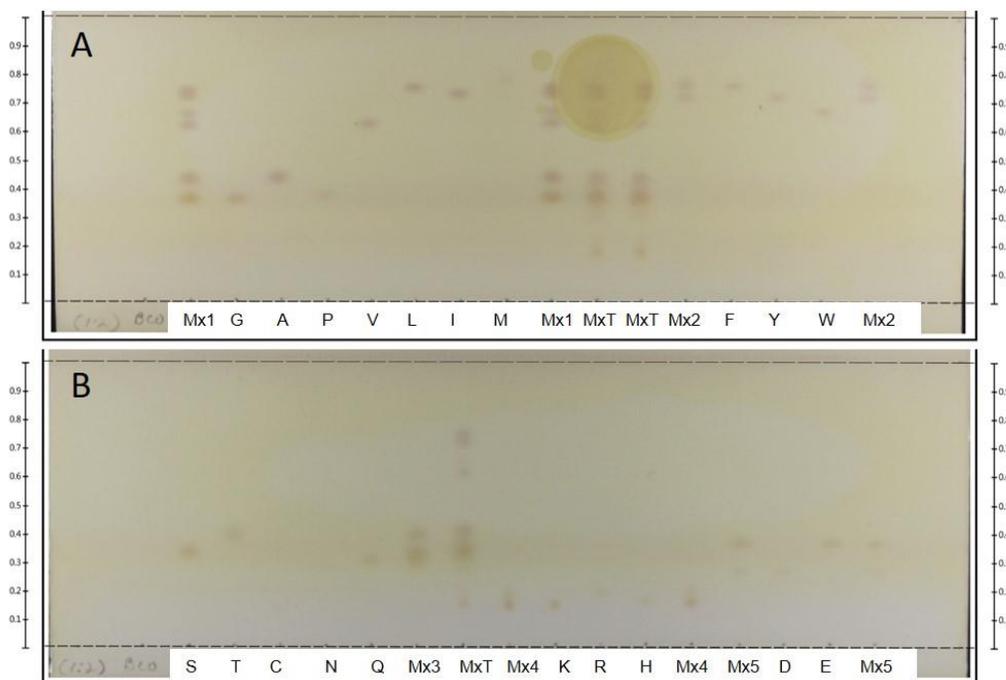
**Figura 2.3** Desarrollo cromatográfico en capa fina de los aminoácidos de cadena lateral no polar alifática y aromática (A) y de cadena lateral polar sin carga, con carga positivamente y negativamente (B). Se usó una concentración de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  de los estándares. Como fase estacionaria se usó sílica-gel 60F (fase normal) y como fase móvil n-butanol-ácido acético-agua (12:3:5).

A partir de estos resultados se decidió realizar algunos cambios al proceso cromatográfico. En primer lugar, para descartar que el efecto de doble pico de algunas bandas analizadas fuera por el efecto de la cantidad aplicada, la concentración de los estándares fue reducida a la mitad ( $0.5$

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (Figura 2.4). De manera adicional, se probó una elución doble de la placa cromatográfica (manteniendo la misma composición de fase móvil) (Figura 2.5).



**Figura 2.4** Cromatografía de capa fina de los estándares de aminoácidos de cadena lateral no polar alifática y aromática (A) y de cadena lateral polar sin carga, cargada positivamente y negativamente (B). Se usaron condiciones de desarrollo cromatográfico similares a las de la figura 2.3, excepto que la concentración de los estándares fue la mitad ( $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ).



**Figura 2.5** Cromatografía de capa fina de los estándares de aminoácidos de cadena lateral no polar alifática y aromática (A) y de cadena lateral polar sin carga, cargada positivamente y negativamente (B). Las condiciones fueron similares a las de la figura 2.4, pero desarrollando una doble elución de la placa, usando la misma fase móvil.

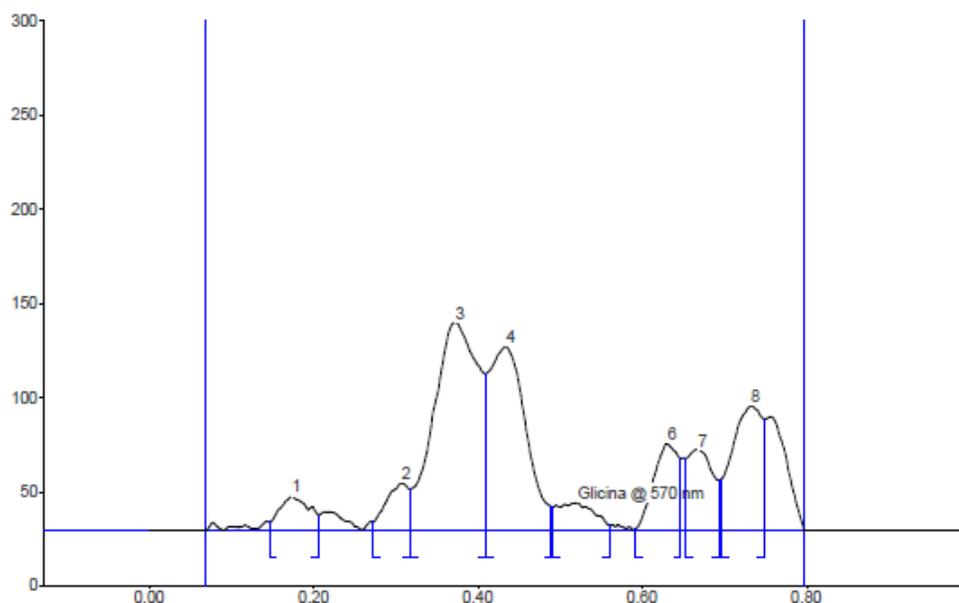
Los resultados obtenidos a partir de estas modificaciones indicaron que la separación de bandas y detección de picos no mejoró sustancialmente al aplicar la mitad de la concentración de los estándares. Por otro lado, se logró detectar al menos un pico más cuando se utilizó el esquema de doble elución.

Se pudieron apreciar, de forma común en todas las placas, cuatro zonas de agrupación de AA's en el carril en donde los 20 compuestos fueron aplicados de manera mezclada (Figuras 2.3 a 2.5, carriles MxT). Comparando el análisis densitométrico de las placas, se encontró que la mayor cantidad de picos detectados fue aquella donde se aplicó un esquema de doble elución.

A partir de estos resultados se lograron detectar un máximo de ocho picos en el carril donde se aplicaron los 20 AA's. Tomando en cuenta la condición evaluada y de acuerdo con los  $R_f$  determinados al aplicar los estándares de manera individual, se sugiere que en el pico 1 se encuentran los AA's: lisina, arginina e histidina, en el 2: glutamina y ácido aspártico, en el 3: glicina, serina, prolina y ácido glutámico, en el 4: asparagina, treonina y alanina, en el 5: parece

que se detectó una señal de contraste con el fondo de la placa (no se encontró algún  $R_f$  que coincidiera con ese pico), en el 6: valina, en el 7: metionina y finalmente en el pico 8: leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina y triptófano (Figura 2.6).

Igualmente, tomando en cuenta la mejor condición, se pudo sugerir un orden de elución para los AA's, que se describe a continuación en orden ascendente de  $R_f$ : en el primer lugar se encuentran los AA's más afines a la fase estacionaria, que fueron lisina, histidina y arginina con valores de  $R_f$  de 0.15, 0.16, y 0.35, respectivamente; el segundo grupo, que también es el más numeroso, conformado por ácido aspártico, glutamina, serina, asparagina, glicina, ácido glutámico, prolina, treonina y alanina, con  $R_f$  de 0.26, 0.31, 0.34, 0.35, 0.36, 0.36, 0.38, 0.4 y 0.43, respectivamente; un tercer grupo, que logra separarse del resto y también entre sí mismos, compuesto por valina ( $R_f=0.63$ ) y metionina ( $R_f=0.68$ ). Finalmente, en el cuarto grupo se encontraron los AA's isoleucina, tirosina, leucina, fenilalanina y triptófano, cuyos  $R_f$  fueron 0.71, 0.73, 0.76, 0.77 y 0.79, respectivamente. Cisteína, bajo estas condiciones, parece no tener una adecuada reacción con el reactivo de ninhidrina (esta situación se describe más adelante).



**Figura 2.6** Análisis densitométrico de la mezcla de 20 aminoácidos proteicos. La numeración de los picos se asigna de manera automática, el número más bajo corresponde al  $R_f$  más bajo y así sucesivamente. La lectura se obtuvo a partir de la cromatografía realizada bajo de las condiciones descritas en la figura 2.5

Recopilando los resultados obtenidos en esta parte, se tomó en cuenta, finalmente, que una concentración de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  resultó en una mejoría de la señal detectable para algunos AA's como la lisina, arginina e histidina; pero, también se puede destacar que, en lo sucesivo, se trabajó con concentraciones molares de los estándares ( $1\text{ mM}$  para cada estándar de aa), en lugar de  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para lograr una mayor homogeneidad, ya que existe una marcada diferencia de pesos moleculares entre algunos AA's.

La siguiente modificación al sistema cromatográfico consistió en variar la polaridad del sistema de fase móvil. Esta propiedad se eligió por ser uno de los principales componentes que ejerce una importante influencia sobre el comportamiento de los analitos en la cromatografía.

Se probaron distintas proporciones de los disolventes que conformaban la fase móvil anteriormente ensayada, con el fin de obtener diferentes polaridades.

Se calculó la polaridad para cada sistema (Cuadro 2.3), y estos datos se utilizaron para construir un gráfico en el cual se representan los  $R_f$ s obtenidos para cada AA, contra el valor de polaridad del sistema utilizado; todo esto con el fin de encontrar una condición que permitiera lograr una mayor cantidad de AA's separados entre sí ( $R_f$ s diferentes para cada aminoácido). Los valores de polaridad ensayados, usando al n-butanol, estuvieron entre 5.37 y 6.42 (Cuadro 2.3).

Durante el desarrollo de estos ensayos se realizó una búsqueda de sistemas alternativos, que también fueron probados. A partir de esta búsqueda se propuso el uso del disolvente n-propanol, para posiblemente mejorar la separación de cierto grupo de AA's, especialmente para los que habían presentado una mayor afinidad con la fase estacionaria (lisina, arginina e histidina). Por ello, bajo las mismas mezclas con ácido acético y agua, se probó la sustitución del n-butanol por el n-propanol como disolvente.

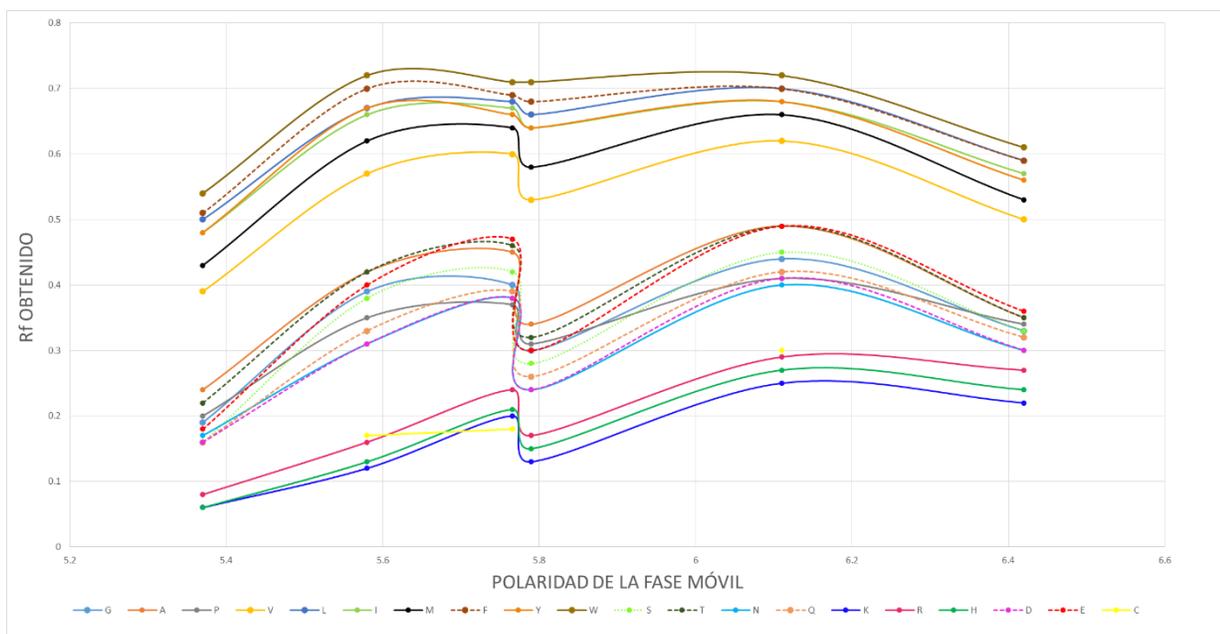
Para la presentación de los resultados, se graficó la respuesta cromatográfica de los AA's contra las diferentes polaridades evaluadas. En el caso del n-propanol, se evaluó un rango de polaridad entre 5.44 y 6.47.

**Cuadro 2.3** Proporciones de los disolventes empleados y polaridad final de los diferentes sistemas evaluados. P': polaridad.

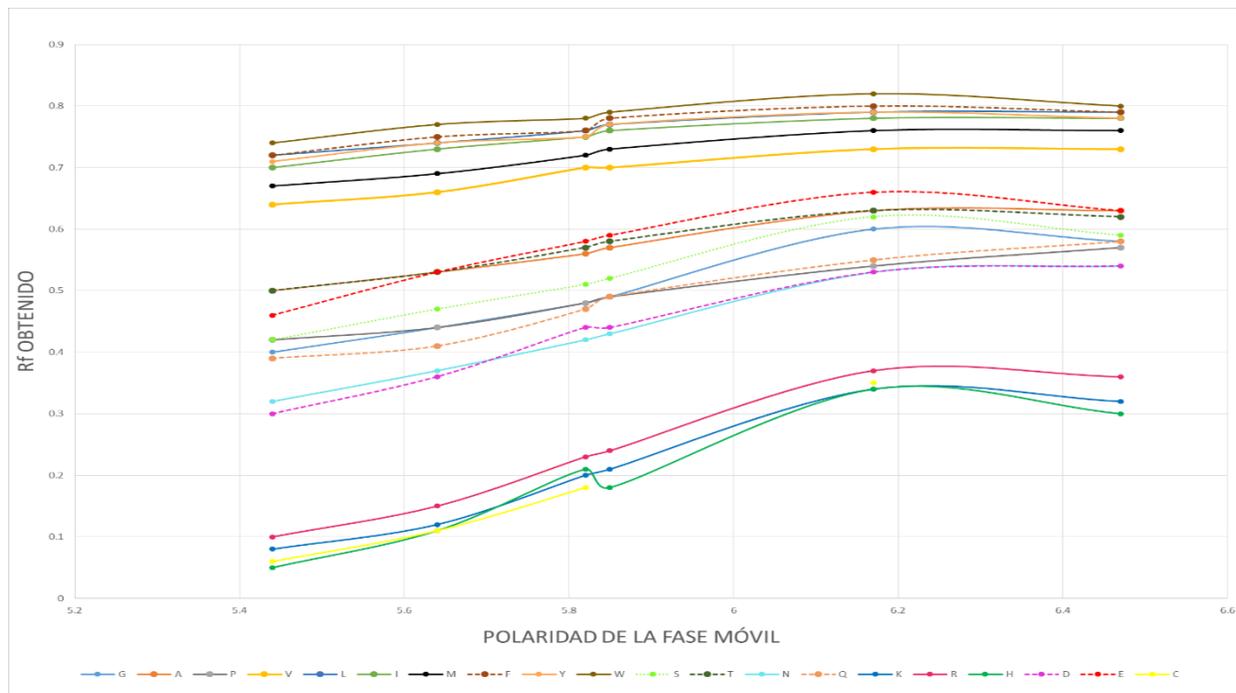
Sistemas con n-butanol	Sistemas con n-propanol
n-butanol:ácido acético: agua (7:1:2) P'= 5.37	n-propanol:ácido acético: agua (7:1:2) P'= 5.44
n-butanol:ácido acético: agua (6:2:2) P'= 5.58	n-propanol:ácido acético: agua (6:2:2) P'= 5.64
n-butanol:ácido acético: agua (10:4:4) P'= 5.75	n-propanol:ácido acético: agua (10:4:4) P'= 5.81
n-butanol:ácido acético: agua (12:3:5) P'= 5.79	n-propanol:ácido acético: agua (12:3:5) P'= 5.85
n-butanol:ácido acético: agua (9:4:5) P'= 6.11	n-propanol:ácido acético: agua (9:4:5) P'= 6.17
n-butanol:ácido acético: agua (10:3:7) P'= 6.42	n-propanol:ácido acético: agua (10:3:7) P'= 6.47

Igualmente, bajo estas condiciones se probó la aplicación de 2 mM de cisteína (estándar), en lugar de 1 mM, lo cual permitió la detección de este AA.

Los R<sub>f</sub>'s obtenidos para cada aminoácido usando diferentes polaridades en los sistemas de fase móvil con n-butanol y n-propanol son presentados en las Figuras 2.7 y 2.8, respectivamente.



**Figura 2.7** Relación entre el R<sub>f</sub> de los aminoácidos y la polaridad de la fase móvil empleada (sistemas con n-butanol).



**Figura 2.8** Relación entre el  $R_f$  de los aminoácidos y la polaridad de la fase móvil empleada (sistemas con n-propanol)

A partir de los resultados anteriores, se pudieron identificar comportamientos cromatográficos de los AA's en común. Se notaron tres agrupamientos de AA's, de acuerdo a sus  $R_f$ 's, en las distintas placas que se evaluaron.

El primer agrupamiento estuvo conformado por aquellos AA's que presentaron los valores de  $R_f$ 's más bajos, desde 0.06 (muy afines a la fase estacionaria), como Lys, His, Arg y Cis. Para éstos, las mejores condiciones de separación se obtuvieron usando el sistema de fase móvil n-propanol:ácido acético:agua (7:1:2), en los que se obtuvieron  $R_f$ 's distintos para los cuatro AA's mencionados (aunque con poca diferencia entre His y Cys). En el segundo agrupamiento se encontraron los AA's con valores de  $R_f$ 's intermedios, que fueron desde 0.16, como la Gly, Ala, Gln, Pro, Ser, Asn, Tre, el Asp y Glu. La mejor condición para lograr la separación de un mayor número de AA's dentro de este grupo fueron dos; primero, n-propanol:ácido acético:agua (7:1:2) en donde se obtuvieron  $R_f$ 's diferentes para Asp, Asn y Glu, mientras que Ala y Tre, Pro y Ser, así como Gln y Gly, aún migraron juntos (Figuras 2.7 y 2.8).

Por otro lado, en la segunda condición, con n-propanol:ácido acético:agua (6:2:2), se lograron obtener  $R_f$ s distintos para el Asp, Asn, Ser y Gln, mientras que los que migraron juntos fueron la Gly con la Pro y a su vez Glu, Tre y Ala (Figuras 2.7 y 2.8).

Finalmente, los que presentaron un  $R_f$  alto (poca afinidad a la fase estacionaria), desde 0.39, donde se encontraron Val, Met, ILeu, Ile, Tyr, Trp y Phe. Para este último grupo, las mejores condiciones de separación se obtuvieron con dos sistemas de fase móvil: el primero, n-butanol:ácido acético:agua (7:1:2) permitió obtener  $R_f$ s distintos para Val, Met, Phe, Trp y Leu; se mantuvieron migrando juntos Tyr e Ile. Con la segunda condición, de n-butanol:ácido acético:agua (6:2:2) se lograron  $R_f$ s distintos para los AA's mencionados anteriormente más la Ile; sin embargo, en esta ocasión migraron juntos Tyr y Leu (Figura 2.7).

La evaluación de los  $R_f$ s de los estándares, en las diferentes polaridades analizadas, se resume en el cuadro 2.4, en donde se registró un  $R_f$  "esperado" para cada AA's específico, como se describió anteriormente.

**Cuadro 2.4** Distancias de migración de los estándares de aminoácidos en las distintas condiciones evaluadas

Aminoácido	$R_f$			
	Condición 1 n-but:ác. acético:agua (6:2:2)	Condición 2 n-but:ác. acético:agua (7:1:2)	Condición 3 n-prop:ác. acético:agua (6:2:2)	Condición 4 n-prop:ác. acético:agua (7:1:2)
Glicina (G)	0.32	0.16	0.44	0.4
Alanina (A)	0.37	0.22	0.53	0.49
Prolina (P)	0.31	0.18	0.44	0.42
Valina (V)	0.53	0.38	0.68	0.64
Leucina (L)	0.62	0.51	0.76	0.74
Isoleucina (I)	0.6	0.48	0.75	0.71
Metionina (M)	0.57	0.41	0.71	0.66
Fenilalanina (F)	0.62	0.51	0.76	0.71
Tirosina (Y)	0.6	0.46	0.76	0.71
Triptofano (W)	0.66	0.56	0.8	0.76
Serina (S)	0.32	0.14	0.47	0.42
Treonina (T)	0.36	0.18	0.52	0.48
Cisteína (C)	0.15	0.06	0.15	0.11
Glutamina (Q)	0.3	0.12	0.42	0.4
Lisina (K)	0.15	0.05	0.15	0.12

---

Arginina (R)	0.18	0.07	0.19	0.15
Histidina (H)	0.16	0.06	0.13	0.07
Ácido aspártico (D)	0.3	0.1	0.37	0.33
Ácido glutámico (E)	0.36	0.13	0.51	0.46

---

Con esta nueva jerarquización de AA's, basándonos en su respuesta cromatográfica de acuerdo a la polaridad de la fase móvil, se decidió la selección de las cuatro condiciones mencionadas para poder resolver la mayor cantidad de AA's posibles. Estas condiciones fueron los sistemas conformados por n-butanol:ácido acético:agua en las proporciones 6:2:2 y 7:1:2; así como estos mismos sistemas (proporciones de disolventes), manteniendo el agua y el ácido acético, pero cambiando el disolvente n-butanol por n-propanol.



## CAPÍTULO III

### EVALUACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN HOJA, TALLO, RAÍZ Y FRUTOS DE CHILE HABANERO.

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

En el medio natural, uno de los nutrientes más importantes para los organismos es el N, ya que este elemento es esencial para la vida al estar relacionado de manera directa con moléculas biológicas que la sustentan. En el suelo, este macronutriente se encuentra principalmente en formas inorgánicas como nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), o bien puede encontrarse en forma orgánica, principalmente como AA's, proteínas o péptidos libres, ácidos nucleicos, nucleótidos y urea (Dodds y Whiles, 2010). Cada forma es en mayor o menor medida asimilable para las distintas formas de vida que habitan en el suelo.

Como parte de su metabolismo, las plantas pueden tomar diferentes formas del N. Por ejemplo, algunas plantas que se han adaptado a crecer en suelos reductores que presentan un pH bajo, como los que se encuentran en bosques maduros o tundra ártica, tienden a absorber en su mayoría amonio o AA's principalmente. En cambio, las plantas adaptadas a un pH más alto y a suelos más aeróbicos tienen una mayor tendencia hacia el nitrato (Maathuis, 2009).

Después de ingresar a la célula vegetal, el destino inmediato del N inorgánico es la síntesis de AA's y otras amidas (Atilio y Causin, 1996). La glutamina y el glutamato son los primeros AA's que se sintetizan y esto ocurre mediante reacciones de transferencia del grupo amida, en un ciclo donde intervienen las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintasa (GS-GOGAT) (Pratelli y Pilot, 2014). Posteriormente, el N, ahora integrado en forma de AA's puede ser transportado hacia otros destinos y compartir su grupo nitrogenado para la síntesis de nuevas moléculas, sean éstas otros AA's, o bien, otras moléculas nitrogenadas, que pueden involucrarse en diversos procesos adaptativos (Yao *et al.*, 2020)

Las plantas al ser organismos sésiles se encuentran expuestas a numerosos riesgos, como plagas, condiciones adversas, entre otros; para disminuir el impacto negativo que estos eventos provocan en su desarrollo o adaptación, las plantas han desarrollado diferentes estrategias. Por ejemplo, se ha observado que, durante eventos de estrés oxidativo, biótico y abiótico, las plantas pueden alterar el metabolismo primario para dirigirlo hacia la síntesis de moléculas involucradas

---

en mecanismos de protección. Durante la síntesis de estas moléculas protectoras juegan un papel importante un buen número de AA's, actuando como precursores, que finalmente proporcionan el esqueleto para dar origen a otras moléculas involucradas en diversos eventos de señalización importantes, como ciertas hormonas o algunos metabolitos secundarios (Florencio Ortiz, 2015; Piñero *et al.*, 2019).

En las plantas cuyos frutos son comestibles, el proceso de maduración implica cambios drásticos en el metabolismo. Se sugiere un alto recambio de proteínas existentes y otras recién sintetizadas; esto finalmente se refleja en las características de la fruta, como la consistencia, la palatabilidad y el valor nutrimental que aportan. En el caso del tomate se ha visto que el sabor se realza durante este proceso, que resulta de una combinación de diferentes componentes entre azúcares, ácidos orgánicos y AA's libres.

Sorrequeta *et al.*, (2010) estudiaron los cambios en el contenido de AA's libres durante la maduración del tomate, principalmente enfocados en L-glu, el cual es conocido por ser un "AA de sabor". En el estudio se encontró que existe un drástico aumento de los AA's libres durante la maduración del fruto, y los autores sugieren que podría deberse al aumento de la actividad de diferentes peptidasas, capaces de liberarlos a partir de proteínas endógenas y glutamato de los péptidos que lo contenían.

Conocer las variaciones en los niveles de AA's que ocurren en los diferentes órganos vegetales podría contribuir a determinar el estado nutricional de la planta. Además, a través de este conocimiento se podría sugerir la existencia de otros procesos de importancia como eventos estacionales en cultivos de interés (Götz *et al.*, 2017), infestación de organismos patógenos (Ángeles-López, 2018), elementos extraños, contaminantes o agentes peligrosos en el suelo (Xu *et al.*, 2018), entre otros.

El estudio de estas moléculas ha sido pobremente estudiado en el género *Capsicum*, donde la gran mayoría de éstos se han realizado en *C. annuum*. En esta especie se han evaluado en órganos, hojas (Florencio-Ortiz *et al.*, 2018; Ángeles-López *et al.*, 2017), semilla (Zou *et al.*, 2015) y en el pericarpo del fruto (Kim *et al.*, 2019). Sin embargo, muy pocos estudios se han hecho en la especie *C. chinense* (Anathan *et al.*, 2018).

Teniendo como base los antecedentes generados en el grupo, en donde se ha sugerido que los AA's pueden ser moléculas señales para regular el desarrollo en chile habanero (Santiago-

Antonio *et al.*, 2014; Serralta-Interian, 2014; García-Laynes, 2019; León-García, 2019), en este trabajo se propuso estudiar los perfiles de los mismos en diferentes órganos de esta especie.

### **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.2.1 Material vegetal**

El material vegetal provino de dos orígenes distintos; los primeros de los órganos vegetativos hoja, tallo y raíz, de plántulas que fueron sometidas a diferentes combinaciones de N inorgánico, en hidroponia; mientras que los segundos, fueron frutos de chile habanero, cultivados en condiciones de invernadero. Para la obtención de ambos se utilizaron semillas de chile habanero de la variedad Jaguar.

#### **3.2.2 Desinfección y germinación de las semillas.**

La desinfección de las semillas se realizó lavándolas con una solución de etanol al 80% (v/v) en un frasco de vidrio previamente esterilizado, el cual se colocó en agitación durante cinco minutos. Posteriormente, con ayuda de un colador pequeño, previamente esterilizado, se eliminó el exceso de etanol y las semillas se enjuagaron con una solución de hipoclorito de sodio al 30% (Cloralex comercial, v/v) en el mismo frasco y en agitación durante 15 minutos; lo anterior se repitió en cuatro ocasiones. Finalmente, el exceso de hipoclorito de sodio se eliminó y se lavaron las semillas con agua destilada por 2 min. en cinco ocasiones más. Las semillas ya desinfectadas se mantuvieron en agua destilada y en condiciones de oscuridad a 4°C por 72 horas.

Para la germinación se colocaron de 10 a 15 semillas, desinfectadas, en recipientes de plástico que contenían vermiculita como sustrato. Estos recipientes se mantuvieron en condiciones controladas de oscuridad y a una temperatura de 25 °C.

#### **3.2.3 Tratamientos de nitrógeno inorgánico**

Una vez que ocurrió la germinación, las plántulas, se cultivaron en condiciones de hidroponía como describió Santiago-Antonio *et al.* (2014). Las plántulas de 15 días después de germinadas, se trasplantaron a condiciones de hidroponia, con medio Hoagland, donde se sometieron a ausencia de N durante cuatro días (T0) y posteriormente se les adicionaron las siguientes combinaciones de N inorgánico, manteniendo a 5 mM la concentración de N total en el medio:

---

N1: 100%  $\text{NO}_3^-$  (5 mM), N2: 80%  $\text{NO}_3^-$  (4 mM): 20%  $\text{NH}_4^+$  (1 mM) y N3: 50%  $\text{NO}_3^-$  (2.5 mM) : 50%  $\text{NH}_4^+$  (2.5 mM). La formulación del medio se detalla en el cuadro 3.1. Fueron colocadas 15 plántulas por cada tratamiento.

**Cuadro 3.1** Composición de los tratamientos de nitrógeno aplicados a las plántulas de chile habanero

SALES	TRATAMIENTOS DE NITRÓGENO [5 mM]		
	N1: 100% $\text{NO}_3^-$	N2: 80% $\text{NO}_3^-$ : 20 % $\text{NH}_4^+$	N3: 50% $\text{NO}_3^-$ : 50 % $\text{NH}_4^+$
<b>MICRONUTRIENTES</b>	<b><math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\mu\text{M}</math></b>	<b><math>\mu\text{M}</math></b>
$\text{H}_3\text{BO}_3$	12.5	12.5	12.5
$\text{MnSO}_4$	1	1	1
$\text{ZnSO}_4$	1	1	1
$\text{CuSO}_4$	0.5	0.5	0.5
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0.1	0.1	0.1
$\text{NiCl}$	0.1	0.1	0.1
Fe-EDTA	10	10	10
<b>MACRONUTRIENTES</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>	<b>mM</b>
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2	0.2	0.2
$\text{MgSO}_4$	0.2	0.2	0.2
$\text{KNO}_3$	3	3	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1	-	-
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	-	1	2.5
KCl	-	-	3
$\text{CaCl}_2$	-	1	1

Los órganos vegetativos se colectaron durante un curso temporal, a los tres, cinco y siete días a partir de la imposición de los tratamientos. Las plántulas fueron fotografiadas en los días de la cosecha y se usaron cinco plántulas por tratamiento para determinación del peso fresco aéreo y radical. Para estos datos, se aplicaron las pruebas comparativas de ANOVA y pruebas de comparación de Tukey y Kruskal-Wallis. El resto fue congelado en N líquido y almacenado en un ultracongelador a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Por otro lado, los frutos de chile habanero fueron obtenidos de plantas cultivadas en condiciones de invernadero. Se colectaron frutos de 25, 45 y 60 días post-antesis (DPA). Igualmente, este material se congeló con N líquido, para almacenarse en un ultracongelador a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

### **3.2.4 Extracción de aminoácidos libres de frutos y órganos vegetales de chile habanero (hoja, tallo y raíz).**

Se realizaron extracciones subsecuentes a cada tipo de material vegetal (hoja, tallo, raíz y frutos), utilizando disolventes de polaridad distinta. Se siguió un esquema de polaridad desde las más alta, hasta la más baja comenzando por una mezcla de etanol-agua (70%:30%, v/v.), polaridad:  $P' = 0.65$  para el etanol y  $P' = 1$  para el agua; metanol (100%), polaridad:  $P' = 0.76$ ; acetona (100%), polaridad:  $P' = 0.36$ ; cloroformo (100%), polaridad:  $P' = 0.26$ , como se describió en el capítulo II.

La extracción se realizó usando 1g de tejido fresco, molido en un vial de vidrio añadiendo 5 mL de disolvente; la mezcla se incubó en hielo durante 1 hora (agitando ocasionalmente cada 15 minutos). Pasado el tiempo establecido, el extracto se transfirió a tubos de polipropileno para su centrifugación a 10,000 g durante 15 min.; una vez finalizado este paso se separó el sobrenadante en un tubo eppendorf, conservando el material vegetal para la siguiente extracción. Esto se repitió con todos los disolventes, comenzando con el etanol al 70%, y continuando con el orden mencionado anteriormente, finalizando con el cloroformo. Las fracciones se recuperaron por separado y se secaron bajo presión reducida. Una vez seco, el extracto se conservó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.2.5 Cromatografía en capa fina de los aminoácidos (separación)**

La separación por TLC se llevó a cabo aplicando los estándares de los 20 AA's, en placas de aluminio, utilizando como fase estacionaria sílica-gel 60F (fase normal). Para el desarrollo en fase normal, se utilizaron como fase móvil una mezcla de los disolventes n-butanol:ácido acético:agua y n-propanol:ácido acético:agua, ambas en la proporción (6:2:2). Adicionalmente, para cada una, se evaluó la proporción 7:1:2, ensayando, finalmente, un total de cuatro condiciones cromatográficas (para cada tipo de material vegetal).

Previo a esto, los estándares se prepararon, cada uno por separado, disolviendo la cantidad necesaria de AA en agua desionizada, para obtener una concentración de 1 mM.

La separación cromatográfica se llevó a cabo en cámaras para TLC de vidrio (Twin through chamber) de CAMAG. Se colocaron 10 mL de la fase móvil, correspondiente, dentro de la cámara de vidrio y se introdujo la placa con los extractos ya aplicados, colocándola con cuidado para su desarrollo. Una vez que la fase móvil alcanzó la marca del frente de disolvente en la placa, se retiró la misma y se eliminó el exceso de fase móvil con ayuda de una corriente de aire.

---

### **3.2.6 Detección**

Para la detección de los AA's separados por TLC en fase normal, se utilizó una solución reveladora con el reactivo ninhidrina. Este reactivo se preparó disolviendo 0.2 g del mismo en 100 mL de etanol absoluto. Una vez que la cromatografía finalizó y la placa se secura, se impregnó con el reactivo, se calentó a 110 °C, durante 3 min. y se dejó enfriar. Una vez que esto sucedía, se fue desarrollando un color de tonalidad morada en las zonas donde se encontraban los AA's que reaccionaron con la solución (variando en intensidad). Las placas cromatográficas fueron analizadas en un densitómetro, a una longitud de onda de 570 nm, donde se registra la respuesta del detector en forma gráfica (picos de mayor o menor intensidad) contra la distancia recorrida por las sustancias analizadas.

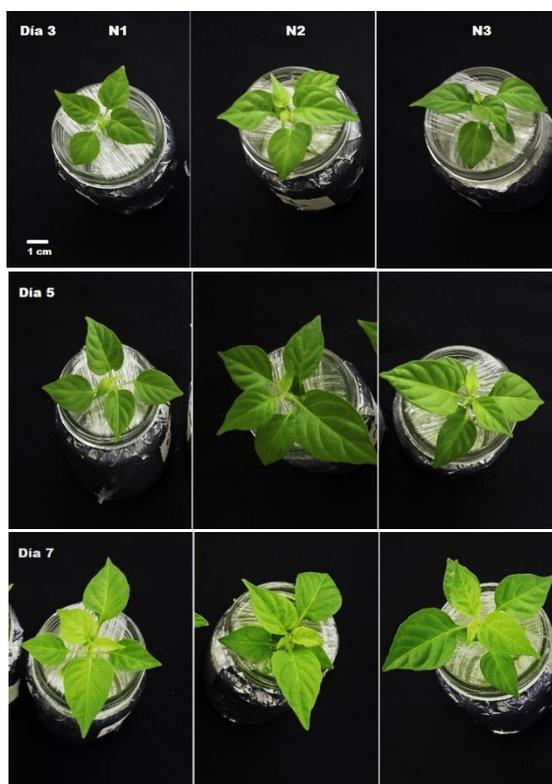
### **3.2.7 Determinación de los perfiles de aminoácidos en los órganos**

Se seleccionaron las mejores condiciones de extracción y determinación de los AA's, establecidas en las secciones anteriores, para llevar a cabo la determinación de los perfiles en los diferentes órganos vegetales y frutos.

## **3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.3.1 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de las plántulas de chile habanero**

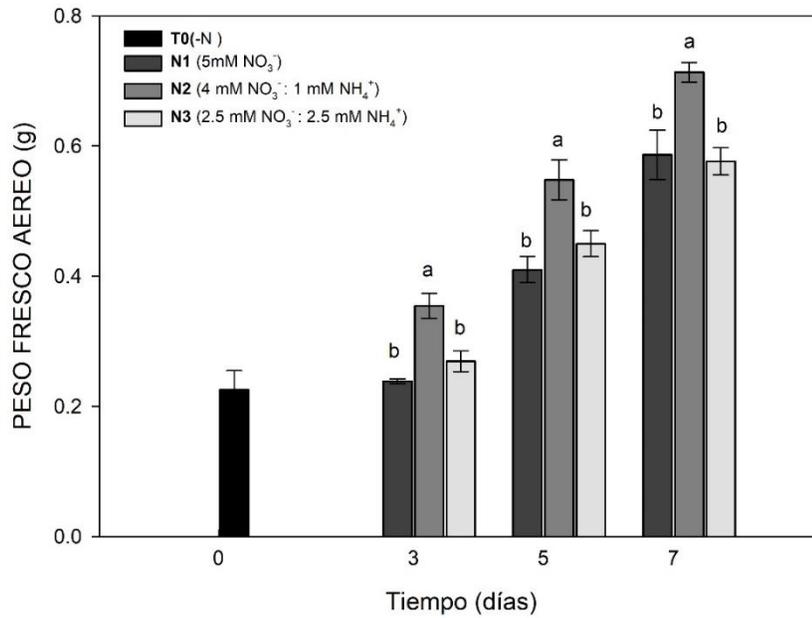
En la Figura 3.1 se muestra la morfología de las plántulas de chile habanero creciendo bajo diferentes combinaciones de fuentes de N inorgánico.



**Figura 3.1** Vista de la parte aérea de las plántulas de chile habanero sometidas durante tres, cinco y siete días a diferentes combinaciones de nitrógeno inorgánico. N1: 100%  $\text{NO}_3^-$ , N2: 80%  $\text{NO}_3^-$ : 20%  $\text{NH}_4^+$ , N3: 50%  $\text{NO}_3^-$ : 50%  $\text{NH}_4^+$ . En todos los casos la concentración total de N fue de 5 mM.

Se puede distinguir una mejor adaptación de la planta, así como un tamaño de hojas y tonalidad más vistosa en el tratamiento N2, para los días 3 y 5. De igual forma, al comparar las plantas en el día 7, se percibe visualmente poca diferencia entre los tratamientos, pero al realizar el registro gráfico de la ganancia de biomasa (Figura 3.2), se corroboró que la mejor respuesta adaptativa y la mayor ganancia de biomasa aérea, se obtuvo con el tratamiento N2.

En el gráfico de la Figura 3.2 se puede observar la ganancia de biomasa de la parte aérea, registrado como peso fresco, con respecto al tiempo evaluado. Se puede destacar que, en todos los tiempos evaluados, el tratamiento con mayor ganancia fue el N2 (80 % de  $\text{NO}_3^-$  y 20 % de  $\text{NH}_4^+$ ), mientras que los tratamientos restantes no parecen mostrar un aumento significativo cuando se comparan entre ellos, durante cada día evaluado.



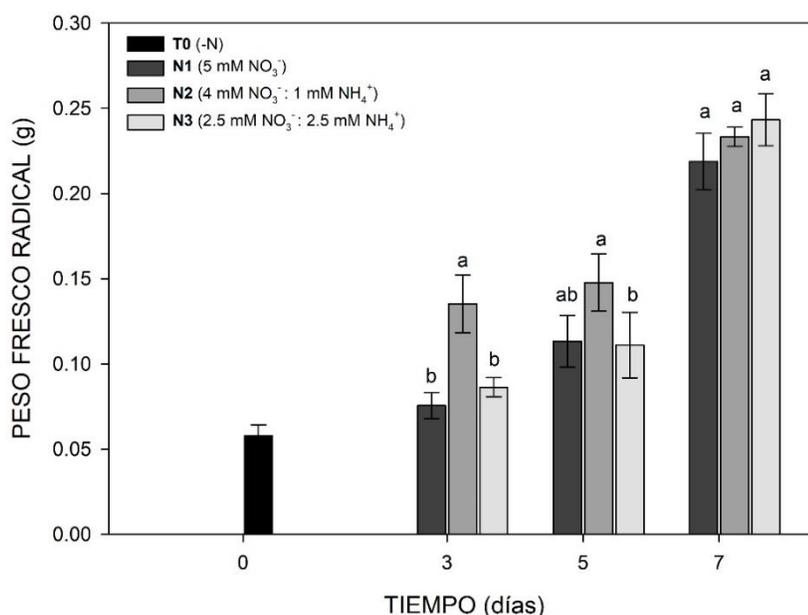
**Figura 3.2** Contenido de biomasa de la parte aérea de plántulas de chile habanero, con respecto a los tratamientos de nitrógeno aplicados en un período de 7 días. Los tratamientos se describen en la Figura 3.1. Se presenta el valor promedio ( $n=5$ ) y las líneas verticales representan la desviación estándar. Letras diferentes significa diferencias significativas entre tratamiento por día ( $p \leq 0.005$ ). T0: plántulas en ausencia de N por 96 horas.

Por otro lado, en la evaluación visual de la parte radical (Figura 3.3), se observa un aumento gradual del crecimiento de la raíz conforme al tiempo evaluado, a pesar de que se percibe una alta similitud entre los tres tratamientos, durante los tres tiempos evaluados. Un análisis más detallado mediante el registro gráfico del peso fresco de la raíz permitió encontrar las diferencias entre los tratamientos (Figura 3.4).



**Figura 3.3** Vista de la parte radical de las plántulas de chile habanero sometidas a diferentes combinaciones de nitrógeno inorgánico. Las condiciones de N se describen en la Figura 3.2.

Para la parte radical se obtuvo una mayor ganancia de biomasa durante los días 3 y 5 con el tratamiento N2; sin embargo, esta diferencia no fue significativa al día 7 de tratamiento (Figura 3.4). Se destaca que este experimento fue desarrollado en frascos de cristal pequeños y al día 5 de tratamiento, las plantas provenientes de N2, al ser las de mayor tamaño para ese día, ya sus raíces ocupaban la gran parte de este frasco.

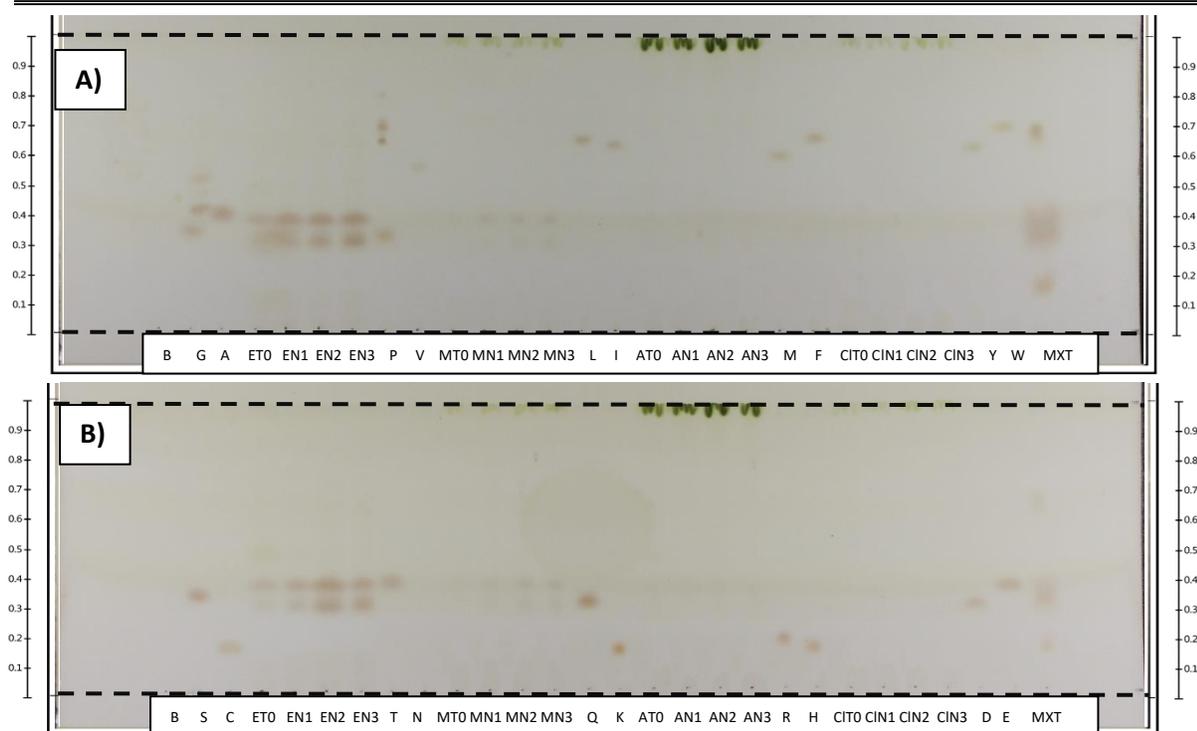


**Figura 3.4** Contenido de biomasa de la parte radical de plántulas de chile habanero, con respecto a los tratamientos de nitrógeno aplicados en un período de 7 días. Los tratamientos y las condiciones se describen en la Figura 3.2.

### 3.3.2 Análisis cromatográfico del perfil de aminoácidos libres en órganos vegetativos y frutos de chile habanero.

Una vez obtenido el material vegetal para la determinación de los perfiles se procedió a aplicar las condiciones fijadas en los apartados anteriores para la extracción y el ensayo cromatográfico de cada tejido estudiado.

Se comenzó por ensayar una de las tres condiciones cromatográficas establecidas, para cada tipo de material vegetal; la cual fue el desarrollo cromatográfico en fase normal con fase estacionaria de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> y como fase móvil n-propanol:ácido acético agua (7:1:2). Los perfiles cromatográficos se presentan en las Figuras 3.5 a 3.8. La aplicación de las placas siguió la distribución mencionada a continuación. Los carriles con una sola letra mayúscula, corresponden a cada estándar de AA (ver cuadro 2.1), los carriles marcados como ET0, EN1, EN2 y EN3, corresponden al disolvente Etanol para el testigo (T0), el tratamiento N1, el tratamiento N2 y el tratamiento N3, respectivamente; los carriles con MT0, MN1, MN2 y MN3, corresponden al disolvente Metanol y sus respectivos tratamientos; los carriles con AT0, AN1, AN2 y AN3, corresponden al disolvente Acetona con los respectivos tratamientos y los carriles con CIT0, CIN1, CIN2 y CIN3, corresponden a los extractos del disolvente cloroformo, junto con los tratamientos evaluados.

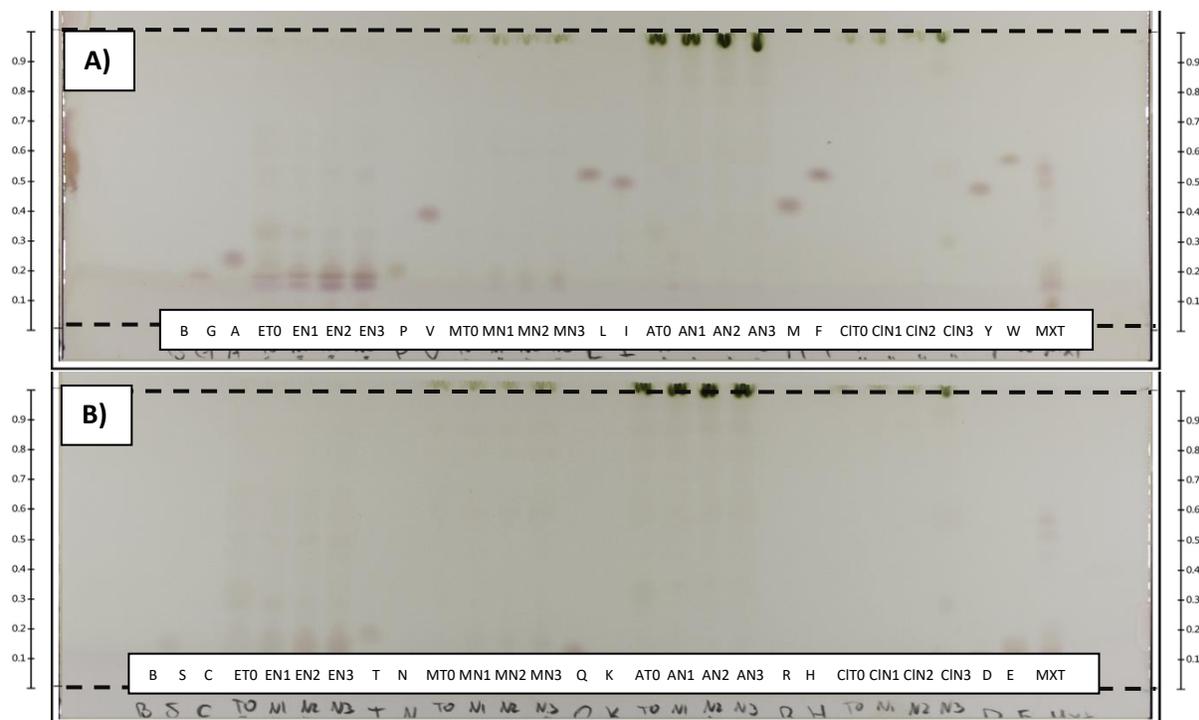


**Figura 3.5** Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Butanol:ácido acético:agua (6:2:2)

En la Figura 3.5 se pueden ver los perfiles obtenidos utilizando la fase móvil n-butanol:ácido acético:agua (6:2:2). De manera general los perfiles, tanto del testigo T0, como los tratamientos N1, N2 y N3, registraron bandas en  $R_f$ s similares, las lecturas del densitómetro detectaron señales en los valores 0.029, 0.36 y, para el testigo, una señal más en 0.049. Comparando estos valores de  $R_f$ s con los estándares de AA's se sugiere que estas bandas podrían corresponder con glicina, prolina, serina, glutamina, ácido aspártico y glutámico, mientras que la señal adicional detectada en T0 puede corresponder a valina (ver Cuadro 2.4 del capítulo anterior).

El siguiente sistema evaluado, n-butanol:ácido acético:agua (7:1:2), se aprecia en la Figura 3.6. Al utilizar este sistema de fase móvil, se registraron bandas con valores de  $R_f$ s de 0.09, 0.14, 0.17, 0.26 de forma común para los tratamientos, y únicamente en los tratamientos N2 y N3 se pudo registrar, de manera adicional, bandas en el  $R_f$  0.46.

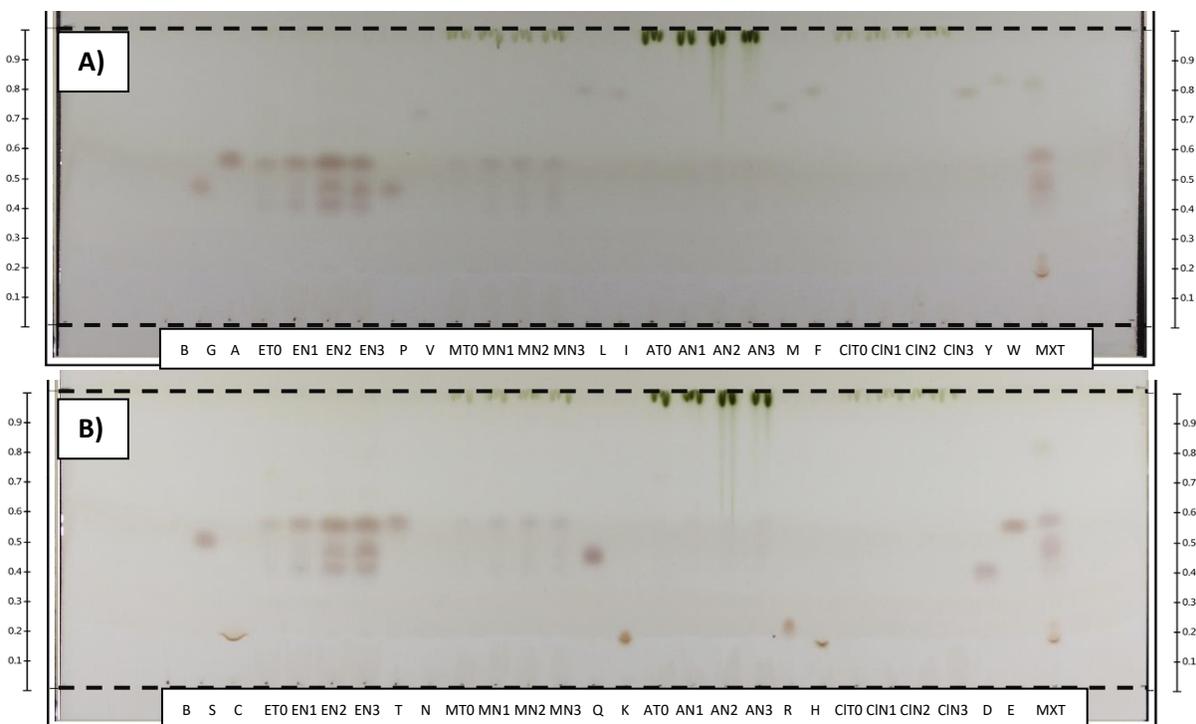


**Figura 3.6** Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-butanol:ácido acético:agua (7:1:2)

Comparando los *R<sub>f</sub>*s registrados con las distancias de los estándares, se sugiere la presencia de glicina, prolina, serina, ácido aspártico y glutámico entre todos los tratamientos (incluido el testigo T0); mientras que para los tratamientos N2 y N3 la señal adicional pudiera corresponder a isoleucina y tirosina.

La Figura 3.7 permite observar los perfiles de hoja bajo diferentes tratamientos, utilizando como fase móvil n-propanol:ácido acético:agua (6:2:2).

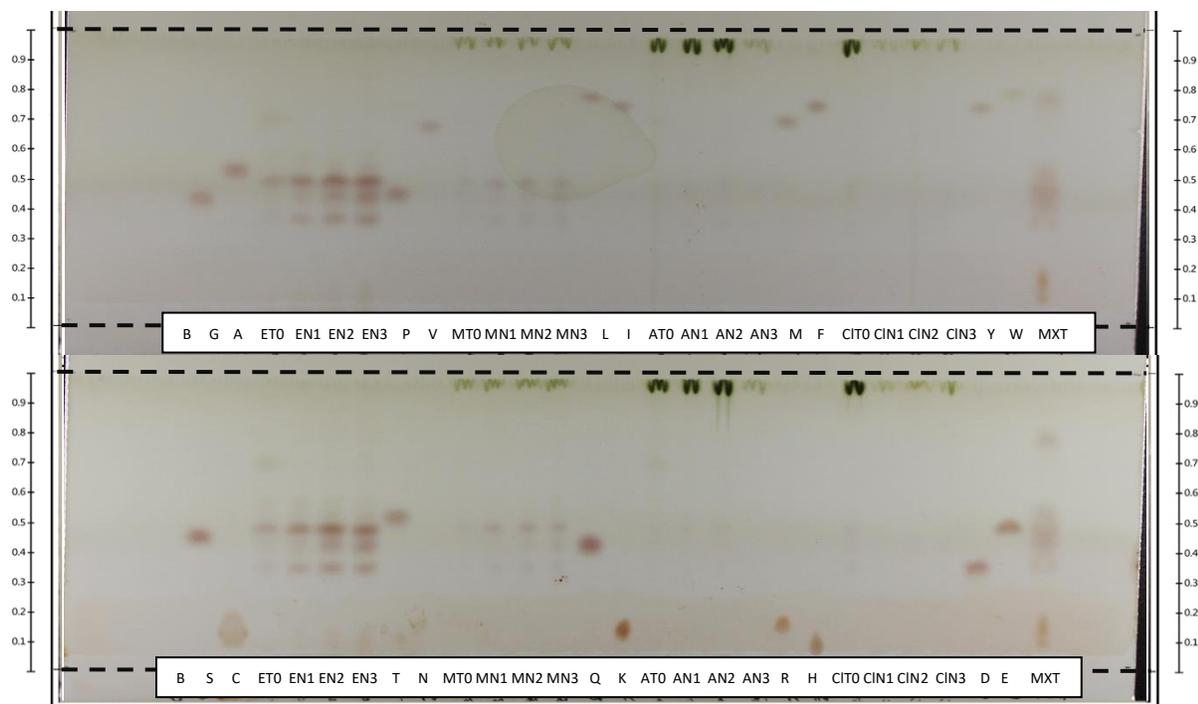


**Figura 3.7** Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Propanol:ácido acético:agua (6:2:2)

Con este tercer sistema de fase móvil, los perfiles de hoja registraron bandas en los  $R_f$ s 0.37, 0.44, 0.47 y 0.51. En esta ocasión, los cuatro perfiles evaluados presentaron las señales en común; sin embargo, la intensidad de coloración obtenida fue de menor a mayor, con respecto al orden mencionado de los tratamientos, testigo T0, N1, N2 y N3, lo cual puede indicar que estos dos últimos promueven la mayor cantidad de AA's libres en la hoja. Cuando se comparan los valores registrados con los  $R_f$ s de los estándares de AA's se puede sugerir la presencia de glicina, prolina, serina, treonina, glutamina, ácido glutámico y aspártico.

Finalmente, la cuarta fase móvil evaluada permitió la obtención de los perfiles que se muestran en la Figura 3.8.



**Figura 3.8** Perfil de aminoácidos libres de hoja de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Propanol:ácido acético:agua (7:1:2)

Utilizando el cuarto sistema de fase móvil se puede notar que los extractos de hoja que estuvieron en ausencia de N por 96 horas (carriles T0 con iniciales “E”, “M”), presentaron una señal apenas distinguible a simple vista (únicamente en el carril del extracto hidroalcohólico, con letra “E”). En el densitómetro se lograron detectar cuatro picos correspondientes a los *R<sub>f</sub>*s 0.32, 0.44, 53 y 0.65. Comparando con la distancia de migración de los estándares de AA’s, por la similitud con su *R<sub>f</sub>*, podría sugerirse que se encuentran presentes en este órgano vegetal evaluado los AA’s: glicina, prolina, serina, glutamina, ácido aspártico, glutámico, valina y metionina; estos dos últimos solamente se aprecian en este tratamiento. Los perfiles difieren cuando se evalúan los órganos expuestos a diferentes proporciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  (carriles N1, N2 y N3 con iniciales “E”, “M”). En los diferentes tratamientos, la señal producida al revelarse la placa es más intensa y nuevamente, los extractos hidroalcohólicos (carriles con letra inicial “E”) fueron los de mayor intensidad de color. Al hacer una comparación entre los tratamientos, se pueden distinguir bandas en los *R<sub>f</sub>*s 0.33, 0.45, 0.53 (tratamiento N1); 0.32, 0.41 y 0.45 (tratamientos N2 y N3). Es perceptible también que algunos de estos AA’s parecen diferir en abundancia (por la intensidad de su señal visible), siendo el tratamiento N3 el que sugiere un mayor contenido de AA’s. Los

estándares de AA's que se encuentran en ese rango de R<sub>f</sub>s son los anteriormente mencionados para el tratamiento T0, a excepción de la valina y metionina. Los resultados para los tratamientos N2 y N3 en hoja, sugieren que estos dos generan una mayor acumulación de AA's libres en este órgano vegetal; este resultado fue consistente en todos los perfiles obtenidos con las diferentes fases móviles evaluadas.

Los perfiles de AA's en el tallo, obtenidos con las diferentes fases móviles propuestas, se presentan en las Figuras numeradas de 3.9 a 3.12. El primer sistema de fase móvil, n-butanol:ácido acético:agua (6:2:2), fue el que permitió la detección de la menor cantidad de bandas.



**Figura 3.9** Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Butanol:ácido acético:agua (6:2:2)

Evaluando este sistema se pudieron registrar bandas apenas visibles en el testigo (T0), que se intensificaron en tonalidad, de menor a mayor, en cuanto a los tratamientos N1, N2 y N3, respectivamente. Mediante las lecturas del densitómetro se encontraron señales en los valores de R<sub>f</sub>s 0.27, 0.33 y 0.45, que comparando con los R<sub>f</sub>s de los estándares de AA's sugieren la presencia de prolina, serina, glutamina, ácido aspártico y glutámico. A pesar de que el tallo es un

órgano de transporte hacia todos los demás sitios de la planta, este sistema no permitió un adecuado despliegue del contenido de AA's libres en el perfil.

Con el segundo sistema de fase móvil, n-butanol:ácido acético:agua (7:1:2) se obtuvo un mayor número de bandas al revelar la placa, como se observa en la Figura 3.10.

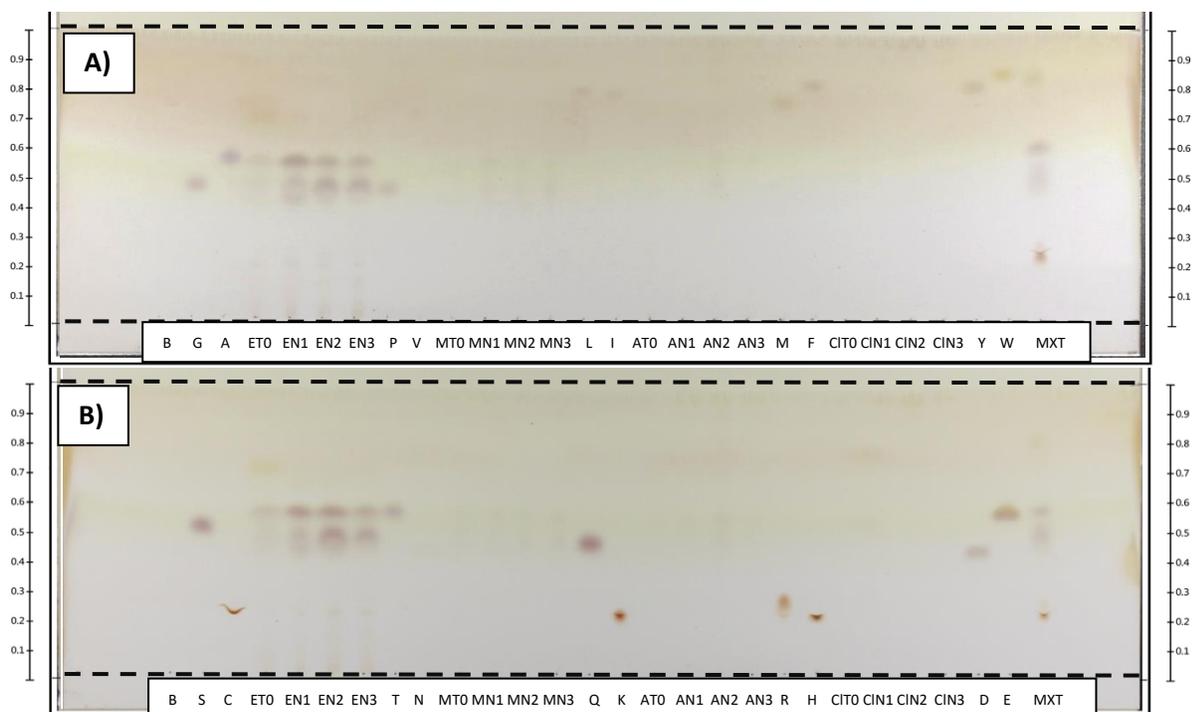


**Figura 3.10** Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Butanol:ácido acético:agua (7:1:2)

La lectura del densitómetro permitió registrar bandas en los valores de  $R_f$ s 0.14, 0.22 y 0.26. La coloración de mayor intensidad, en esta ocasión se obtuvo en el tratamiento N1, el cual coincidió con el mayor número de bandas detectadas. Los valores de  $R_f$ s obtenidos se asemejan a los de los estándares de glicina, prolina, alanina, treonina, glutamina, ácido aspártico y serina.

Con el tercer sistema de fase móvil, n-propanol:ácido acético:agua (6:2:2), se alcanzaron mayores valores de  $R_f$ s, para este caso, se aumentó también el número de bandas detectadas, comparando con el sistema anterior, lo cual se puede observar en la Figura 3.11.



**Figura 3.11** Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60  $F_{254}$  n-Propanol:ácido acético:agua (6:2:2)

El tercer sistema de fase móvil permitió la detección de bandas en los  $R_f$ 's 0.44, 0.53 en el testigo T0, mientras que para los tratamientos N1, N2 y N3, se registraron señales en 0.22, 0.43, 0.47, y 0.52. Cuando se comparan los valores de  $R_f$ 's obtenido con los de los estándares de AA's, se presume que podrían estar presentes glicina, alanina, prolina, serina, glutamina, ácido glutámico, aspártico, y, en el caso de los tratamientos N1, N2 y N3, se aprecian en menor proporción (de acuerdo a la intensidad del color) cisteína, lisina, arginina e histidina.

Los perfiles de tallo obtenidos empleando la cuarta fase móvil se presentan en la Figura 3.12. Esta condición fue la que mayor número de bandas permitió detectar entre las cuatro evaluadas.



**Figura 3.12** Perfil de aminoácidos libres de tallo de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Propanol:ácido acético:agua (7:1:2)

Bajo estas condiciones se pudo apreciar una señal menos intensa en los carriles donde se evaluó el tallo proveniente de plántulas en ausencia de N por 96 horas. Las lecturas del densitómetro registraron valores de  $R_f$ s en 0.27, 0.35 y 0.47, para el testigo T0. En los tratamientos N1, N2 y N3 se registró también, además de los valores anteriores, bandas en 0.07, 0.37 y 0.44. Los AA's que podrían estar presentes, de acuerdo a los valores de  $R_f$ s comparados contra los estándares son glicina, serina, treonina, prolina, glutamina, ácido glutámico y aspártico; estos dos últimos parecen estar en mayor proporción en el tratamiento N1, por la intensidad de coloración, mientras que glicina, serina y glutamina parecen estar en mayor proporción en los tratamientos N2 y N3.

Las Figuras 3.13 a 3.16 se presentan los perfiles de AA's libres obtenidos a partir de las raíces. De los tres órganos vegetales analizados, el de raíz fue el que menor cantidad de señales mostró en el revelado de las placas, así como en la lectura de las mismas en el densitómetro.

Los resultados con el primer sistema evaluado, n-Butanol:ácido acético:agua (6:2:2) se muestra en la Figura 3.13.



**Figura 3.13** Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60  $F_{254}$  n-Butanol:ácido acético:agua (6:2:2)

Empleando este sistema de fase móvil se encontraron bandas con valores de  $R_f$ 's de 0.3, 0.32 y 0.38, únicamente para los tratamientos N1, N2 y N3. Comparando estos valores con los obtenidos de los estándares de AA's, con este sistema se pueden detectar glicina, alanina, prolina, serina, treonina, glutamina, ácido glutámico y aspártico.

El siguiente sistema de fase móvil probado, n-butanol:ácido acético:agua (7:1:2), permitió la detección de un menor número de bandas, comprado con el sistema anterior, como se puede observar en la Figura 3.14. Nuevamente, no se logró la detección de bandas en el carril del testigo T0, y en este caso, la coloración más intensa se puede apreciar en los carriles de extracto etanólico para los tratamientos N2 y N3 (etiquetas EN2 y EN3).



**Figura 3.14** Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-butanol:ácido acético:agua (7:1:2)

El empleo de esta fase móvil permitió el registro de bandas en los  $R_f$ s 0.11, 0.14 y 0.16. Comparando con los  $R_f$ s de los estándares, los AA's que podrían ser detectados bajo estas condiciones cromatográficas son glicina, prolina, serina, treonina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico

Al tratarse de sistemas que emplean n-propanol en sus proporciones, se obtienen valores de  $R_f$  más altos en las bandas detectadas. Esto puede verse en la Figura 3.15 donde se muestran los perfiles de raíz obtenidos utilizando como sistema de fase móvil n-propanol:ácido acético:agua (6:2:2). De nueva cuenta el carril del testigo (etiqueta "ET0") no registró alguna banda al momento de revelar la placa, ni en las lecturas del densitómetro.

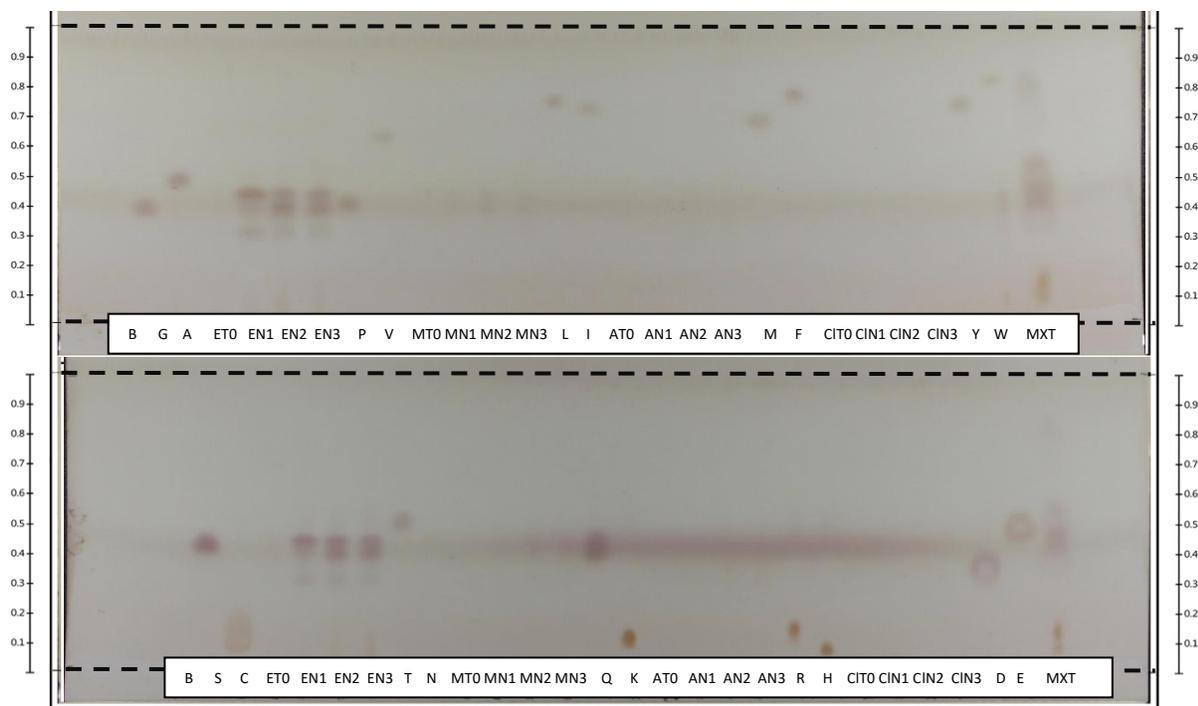


**Figura 3.15** Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F254 n-Propanol:ácido acético:agua (6:2:2)

Para los tratamientos N1, N2 y N3, se lograron registrar bandas con  $R_f$ 's en 0.39 y 0.43; comparando estos valores con los estándares se sugiere que pueden detectarse los AA's glicina, alanina, prolina, serina, glutamina y ácido aspártico. Además de estas señales, adicionalmente, en N2 y N3 se pudo registrar una leve banda en el  $R_f$  0.13, lo cual sugiere que puede tratarse de los AA's cisteína, lisina o histidina.

El cuarto sistema evaluado, n-propanol:ácido acético:agua (7:1:2), permitió una mejor separación de los componentes presentes en los perfiles. Como se observa en la Figura 3.16 de nueva cuenta no se registró señal alguna en el carril del testigo T0.



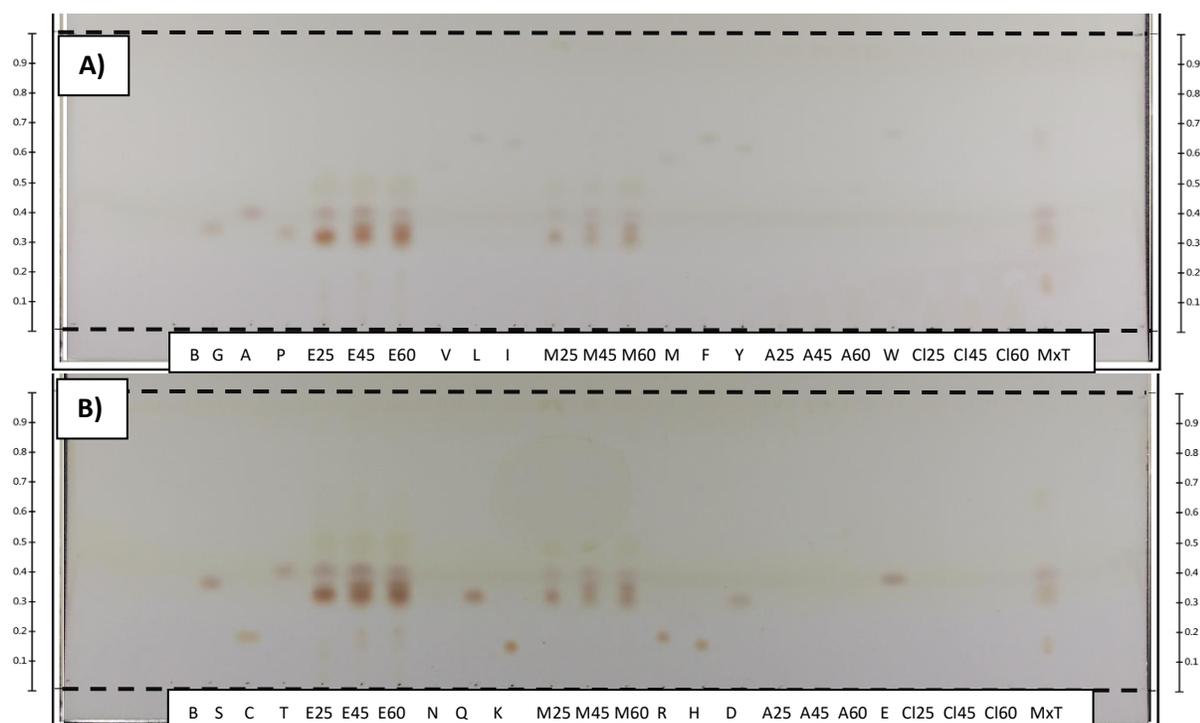
**Figura 3.16** Perfil de aminoácidos libres de raíz de chile habanero expuestos a diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico. En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Propanol:ácido acético:agua (7:1:2)

Cuando se comparan los tratamientos N1, N2 y N3, se encuentran bandas detectadas en los  $R_f$ s 0.28, 0.37 y 0.41, de manera común. Comparando con las distancias recorridas por los estándares de AA's, se podrían detectar utilizando esta condición cromatográfica, glicina, prolina, serina, glutamina y ácido aspártico. En el revelado de la placa también se pudo observar una coloración más intensa en la banda con  $R_f$  similar a serina y glutamina, para N1; mientras que en N2 y N3 la coloración más intensa se aprecia en las bandas con  $R_f$ s similares a glicina, serina, prolina y glutamina.

La evaluación del perfil de AA's en el fruto, se realizó durante los estadíos de desarrollo de 25, 45 y 60 DPA. En primer lugar se evaluaron las fases móviles de n-Butanol:ácido acético:agua en proporciones 6:2:2 (Figura 3.17) y 7:1:2 (Figura 3.18). De forma similar a la distribución utilizada anteriormente en las placas; se aplicaron los estándares individuales y los diferentes tratamientos agrupados por disolvente. Para este caso, los carriles con una sola letra mayúscula, corresponden a cada estándar de AA (ver cuadro 2.1), mientras que los carriles marcados como E25, E45 y E60, corresponden al disolvente Etanol para frutos con 25, 45 y 60 DPA, respectivamente; los carriles con M25, M45 y M60, corresponden al disolvente Metanol y sus

respectivos tratamientos; los carriles con A25, A45 y A60, corresponden al disolvente Acetona con los respectivos tratamientos y los carriles con CI25, CI45 y CI60, corresponden a los extractos del disolvente cloroformo, junto con los tratamientos evaluados.



**Figura 3.17** Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

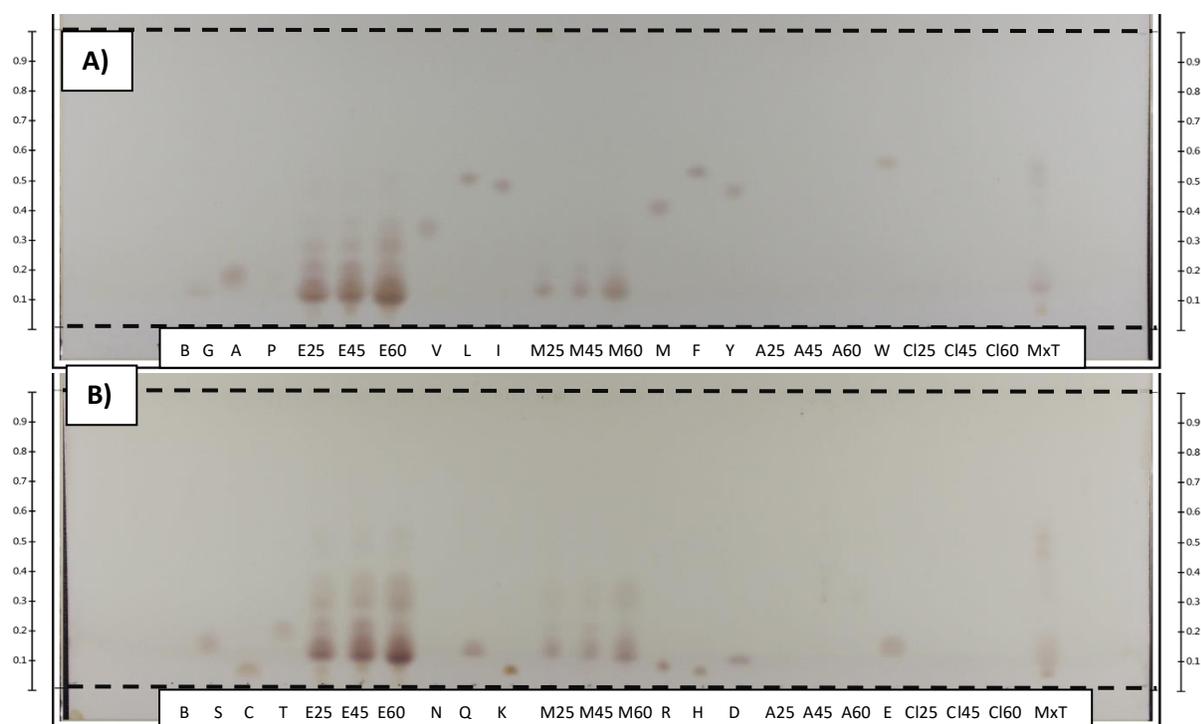
Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Butanol:ácido acético:agua (6:2:2)

Analizando el primer sistema evaluado, en el perfil de 25 DPA, se pueden detectar bandas en los Rf's 0.1, 0.3 y 0.37, que cuando se comparan con las distancias recorridas por los estándares de AA's podrían corresponder a prolina, treonina, glutamina, ácido aspártico y ácido glutámico, con la mayor abundancia (debido a su tonalidad más intensa) y en menor medida, lisina e histidina (Figura 3.17).

A los 45 DPA, el perfil que se obtiene presenta bandas en los Rf's 0.13, 0.3, 33 y 0.37; en este caso, además de la presencia de los AA's anteriormente mencionados, se puede sugerir la presencia adicional de glicina, serina y arginina. Finalmente, los frutos de 65 DPA presentaron un perfil con bandas en los Rf's 0.13, 0.3, 0.34 y 0.36; comparando las distancias recorridas por los estándares de AA's, se puede sugerir el mismo conjunto de AA's que en los frutos de 45 DPA,

aunque con una señal ligeramente más intensa, esto corroborado en las alturas de las señales registradas por el densitómetro.

Aplicando la segunda fase móvil, se puede observar que se redujo la distancia de migración para todos los AA's. En los frutos con 25 DPA se registran bandas en los  $R_f$ s 0.09, 0.19, 0.26, 0.31, .44 y .47. Estas distancias pueden sugerir la presencia de glicina, alanina, prolina, serina, treonina, valina, glutamina, ácido glutámico y aspártico y en menor cantidad lisina e histidina. A los 45 DPA se alcanzaron a registrar bandas en los  $R_f$ s 0.1, 0.3, 0.37 y 0.45, que sugiere la presencia de glicina, prolina alanina, treonina, valina, glutamina, ácido glutámico y aspártico (aparentemente en mayor abundancia debido a la coloración más intensa en la placa).

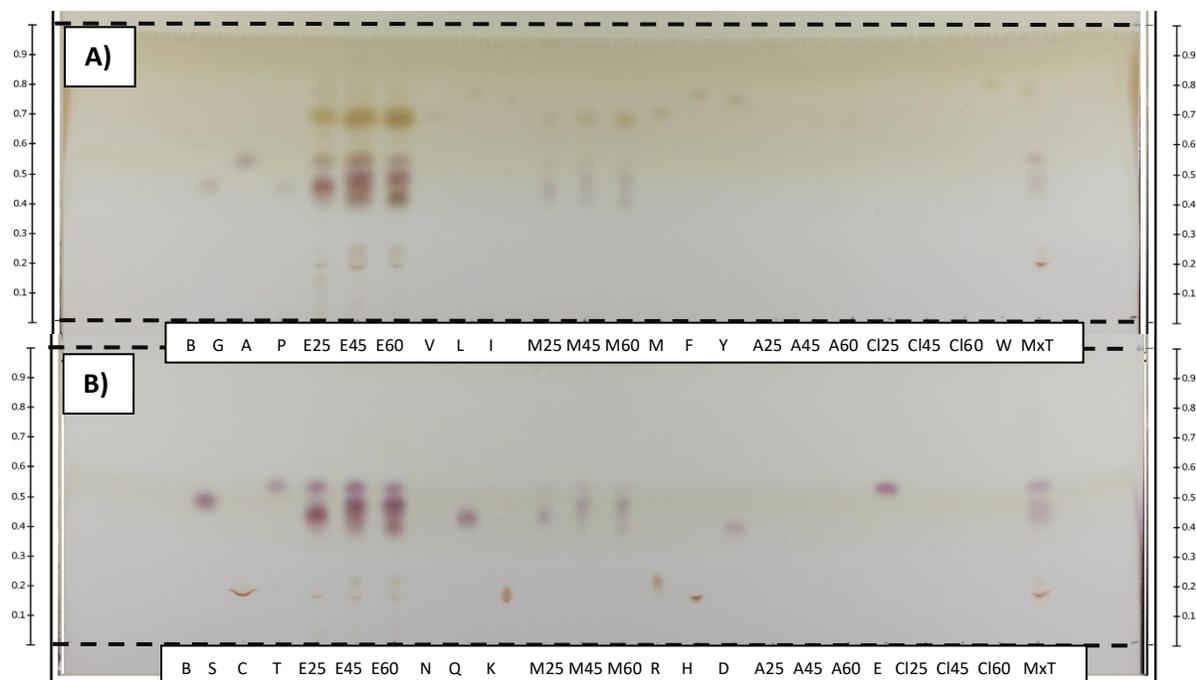


**Figura 3.18** Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60  $F_{254}$  n-Butanol:ácido acético:agua (7:1:2)

Para el perfil de frutos con 60 DPA, se registraron bandas en los  $R_f$ s 0.14, 0.3, 0.36 y 0.44, coincidiendo en la mayoría de los AA's sugeridos para los frutos de 45 DPA, en este caso la coloración ligeramente más intensa, evoca a una mayor cantidad de estos últimos tres AA's (glutamina, ácido glutámico y aspártico).

Por otro lado, las fases móviles n-propanol:ácido acético:agua, 6:2:2 y 7:1:2 se muestran en las Figuras 3.19 y 3.20, respectivamente.



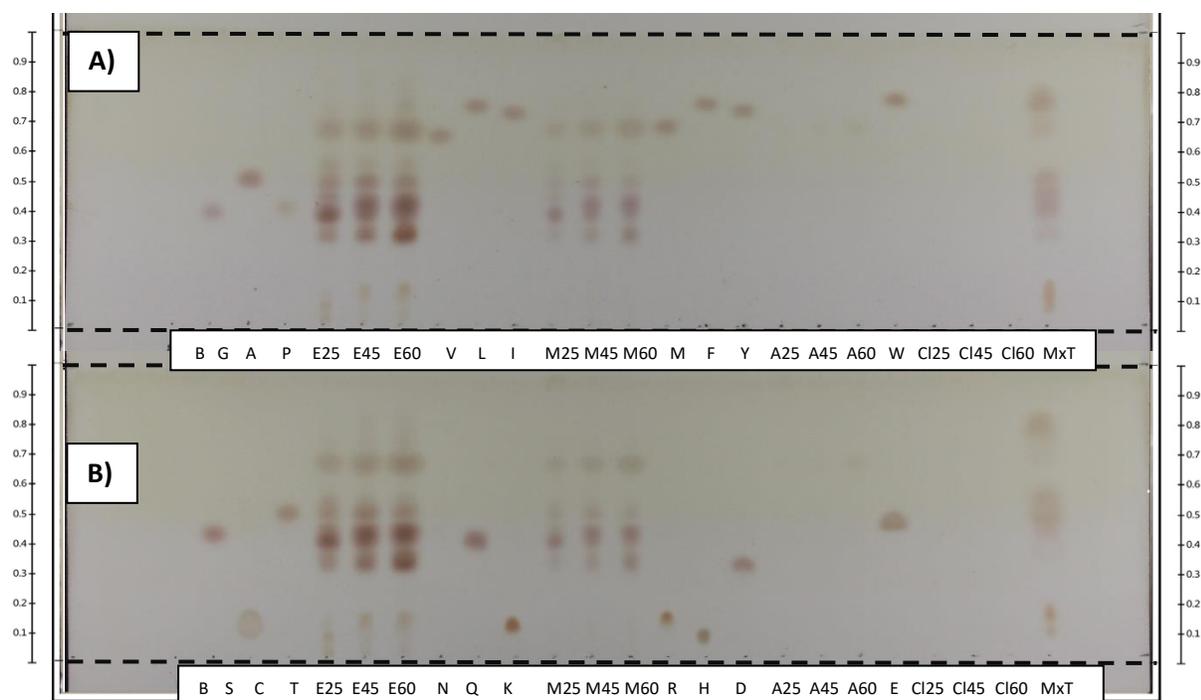
**Figura 3.19** Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Propanol:ácido acético:agua (6:2:2)

Al evaluar los perfiles de los frutos de 25 DPA con la fase móvil n-propanol:ácido acético:agua (6:2:2) se obtuvieron bandas registradas en los  $R_f$ s 0.16, 0.43, 0.51, 0.6, 0.66 y 0.75. El registro de estas señales, junto con la apreciación de los perfiles, permite sugerir que se encuentran presentes los AA's glicina, prolina, treonina, alanina, ácido glutámico, con mayor intensidad de color serina, glutamina y ácido aspártico y con menor intensidad aquellos que tienen  $R_f$ s similares a valina, leucina, cisteína, lisina e histidina.

En los frutos de 45 DPA se registraron bandas en los  $R_f$ s 0.17, 0.21, 0.45, 0.51 y 0.66, con estas distancias se sugiere la presencia de glicina, treonina, glutamina, ácido glutámico y aspártico, en menor proporción lisina, cisteína e histidina; en este caso la coloración más intensa aparece en un  $R_f$  similar al estándar de alanina, prolina y serina.

Por último, los frutos de 60 DPA muestran bandas con  $R_f$ s 0.17, 0.22, 0.4, 0.46, 0.5 y 0.65, los cuales asemejan a los obtenidos con frutos de 45 DPA, permitiendo sugerir el mismo conjunto de AA's presentes que en los perfiles del tiempo anterior, en este caso la mayor intensidad de señal detectada, como se observa en la Fig. 4.3, aparece en un  $R_f$  similar al del estándar glicina, alanina, glutamina y serina.



**Figura 3.20** Perfil de aminoácidos libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (25 DPA, 45 DPA y 60 DPA). En el panel A) se muestran los perfiles junto con los estándares G, A, P, V, L, I, M, F, Y, W; en el panel B) se muestran los perfiles junto con los estándares S, C, T, N, Q, K, R, H, D y E.

Fase estacionaria: Sílica-gel 60 F<sub>254</sub> n-Propanol:ácido acético:agua (7:1:2)

Con la última fase móvil evaluada, para los frutos de 25 DPA, se logran detectar al menos seis bandas, correspondiendo a los  $R_f$ s 0.07, 0.32, 0.36, 0.46, 0.48 y 0.64 que se aproximan a las distancias recorridas por los estándares de glicina, alanina, prolina, valina, metionina, isoleucina, tirosina, serina, treonina, ácido aspártico, glutámico e histidina. En la figura se aprecia con una intensidad baja, y glutamina, con intensidad mayor.

Los frutos de 45 DPA presentaron señales en los  $R_f$ s 0.11, 0.3, 0.39, 0.46 y 0.64; que comparando con los estándares podría tratarse de los AA's alanina, valina, metionina, treonina, serina, ácido aspártico, ácido glutámico, con mayor intensidad, glicina, prolina, glutamina; y con

una menor intensidad, cisteína, lisina e histidina. Finalmente, los frutos de 60 DPA presentaron la mayor cantidad de señales correspondientes a los  $R_f$ s 0.11, 0.31, 0.39, 0.41, 0.46, 0.64 y 0.71; los cuales sugieren la presencia de glicina, alanina, prolina, leucina, metionina, fenilalanina, leucina, tirosina. Se aprecian con una tonalidad más intensa, bandas con  $R_f$ s semejantes a los AA's serina, glutamina y ácido aspártico, así como una menor intensidad en las señales de las bandas con distancias próximas a los estándares de treonina, cisteína, lisina, arginina e histidina. En este análisis de perfiles en frutos, también se presentó una muy ligera señal, en los extractos de metanol (carriles con letra inicial "M"), aunque solamente se aprecia una menor intensidad de la señal producida en las bandas detectadas y algunos casos en los que ciertas bandas ya no aparecen distinguibles a simple vista, como las que se registraban por debajo del  $R_f$  0.2. Esto podría explicarse por el método de extracción elegido, al ser extracciones subsecuentes del mismo material vegetal de partida, la gran mayoría de esos compuestos se extrajo con el primer disolvente aplicado.



## CAPÍTULO IV

### DISCUSIONES GENERALES

Para poder estudiar las diferencias que se presentan en el perfil de los AA's libres que se producen cuando las plantas toman diferentes fuentes de N, así como las diferencias producidas por el grado de maduración, fue necesario adecuar un método que permitiera este primer objetivo.

Durante esta primera parte se abordó un enfoque de revisión bibliográfica, ya que los compuestos objetivo son bastante estudiados y conocidos, pero aún se cuenta con la problemática de encontrar condiciones de análisis universales, dada la complejidad química de los mismos (Trineeva *et al.*, 2016). A partir de este punto se encontraron las variables comúnmente evaluadas en este tipo de metodologías. Para el caso de las técnicas cromatográficas estas variables son la fase móvil y la fase estacionaria (Reich y Schibli, 2007).

Al ser un grupo de elementos con estructuras similares y algunos totalmente distintas, se ha optado por utilizar numerosas estrategias para su resolución, como el empleo de la sílice-gel y la sílice modificada (Bhawani *et al.*; 2012). Sin embargo, esta última puede no resultar la mejor opción en los casos de difícil disponibilidad o acceso; por lo cual, el uso de la primera siempre resulta en una adecuada alternativa.

La otra parte del problema, la fase móvil, también ha sido ampliamente estudiada y continúa siéndolo hasta la actualidad; sin embargo, muchos de los sistemas aplicados requieren de un alto grado de sofisticación en equipos para el estricto control de las variables analizadas o bien de reactivos de difícil acceso (Shytkov *et al.*, 2017; Polak *et al.*, 2019). El fácil acceso y variedad de los disolventes orgánicos, además de la marcada reducción de la cantidad utilizada en la TLC, los propone como la opción más sencilla y económica en estos casos.

La selección de las variables a analizar, por lo tanto, se realizó con base en las fuentes publicadas y revisadas y de igual forma para la detección de los compuestos.

En el establecimiento de la metodología de análisis se partió de una metodología base, que fuera sencilla y que presentara buenos resultados, a partir del protocolo publicado por Hudaib *et al.*, (2015) se realizaron modificaciones en la metodología para optimizar el funcionamiento del método.

Entre las variables estudiadas, estuvo la polaridad (tanto de la fase estacionaria, como del sistema de fase móvil), que se menciona en numerosos textos de cromatografía como una de las más importantes a tener en cuenta en un proceso de desarrollo/adaptación de metodologías (Reich y Schibbli, 2007; Cai, 2014).

Al estudiar diferentes proporciones de disolventes, se puede lograr un rango amplio de polaridad para ensayar; de esta manera se logró encontrar en este trabajo cuatro sistemas de fase móvil que permitieron separar diferentes AA's, de acuerdo al grado de polaridad empleado.

De los sistemas utilizados, el de n-propanol:ácido acético:agua en proporciones 7:1:2, permitió una mejor separación de AA's como valina, metionina, fenilalanina, triptófano y leucina; aunque en esta ocasión, se mantuvieron migrando juntos tirosina e isoleucina. En cambio, con el sistema modificado, n-butanol:ácido acético:agua (6:2:2), se lograron *Rf*s distintos para los aminoácidos mencionados anteriormente más la isoleucina; pero bajo estas condiciones migraron juntos tirosina y leucina.

Por otro lado, los sistemas con n-propanol:ácido acético:agua permitieron la separación de un número mayor de AA's. La proporción 7:1:2 logró separar de mejor manera AA's como lisina, histidina, arginina y cisteína (aunque en algunos casos con valores de *Rf* cercanos), así como también logró una mejor resolución del ácido aspártico, asparagina y ácido glutámico, mientras que alanina y treonina, prolina y serina, así como glutamina y glicina, migraron juntos. La proporción 6:2:2, permitió obtener *Rf*s distintos para el ácido aspártico, asparagina, serina y glutamina; mientras que los que migraron juntos fueron la glicina con la prolina y a su vez el ácido glutámico, treonina y alanina.

Se puede decir que el comportamiento observado en la realización de estos experimentos fue que, a un mayor aumento de polaridad de la fase móvil, existió una menor retención por parte de la fase estacionaria; por lo tanto, esto se reflejó en un aumento de la movilidad relativa (*Rf*) de los AA's.

Este tipo de comportamiento puede ser explicado por la naturaleza química de los compuestos estudiados, en este caso los AA's son moléculas que en su estructura cuentan con grupos funcionales distintos, entre los que se encuentran el grupo carboxilo y el grupo amino e imino, lo que les confiere un carácter de molécula polar, en mayor o menor grado, de acuerdo a su estructura (Trineeva *et al.*, 2016).

---

Una vez establecidas las condiciones anteriores, se continuo con otro objetivo del trabajo, el diferenciar los componentes en los perfiles de AA's libres de órganos vegetativos que fueron expuestos a diferentes fuentes de N, así como de los perfiles de frutos con diferente grado de maduración. Para esto se requirió de material vegetal que pudiera ser analizado con las condiciones establecidas en este trabajo y que mostraran cambios en su composición.

Partiendo del trabajo realizado por Santiago-Antonio en 2014, donde se encontraron diferencias en el contenido de AA's, las plántulas de chile habanero creciendo en hidroponia y en ausencia de N por 96 horas, fueron sometidas a diferentes combinaciones de N, proporcionado en forma de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .

Otra situación que permite la obtención de material vegetal contrastante es el desarrollo mismo de la planta, como en el caso del desarrollo de frutos, que implican numerosos cambios en el metabolismo de la planta (Sorrequieta *et al.*, 2010; Zucarelli *et al.*, 2021). Se analizaron también los perfiles de AA's libres de frutos de chile habanero con diferente grado de desarrollo (crecidos en condiciones de invernadero).

Entre los órganos vegetativos estudiados, se pudo resolver una mayor cantidad de AA's en la hoja y el tallo. Esto puede explicarse por el hecho de que la hoja puede actuar como un tejido "fuente" capaz de sintetizar ciertos compuestos, en este caso algunos AA's. En cambio, el tallo constituye la principal vía de transporte a larga distancia para carga y descarga de distintos metabolitos. La raíz por otro lado es el principal órgano captador de nutrientes en la planta, que los transloca hacia otros de mayor actividad o mayor demanda (Tegeeder y Hammes, 2018). A su vez, los frutos son órganos con una tasa metabólica altamente activa y en constante cambio (Sorrequieta *et al.*, 2010).

Los diferentes tratamientos impuestos en los órganos vegetativos y el grado de desarrollo en los frutos permitieron encontrar algunas diferencias en los perfiles de estos compuestos. Por ejemplo, los AA's aromáticos y algunos de cadena ramificada solamente pudieron ser detectados en el análisis de los perfiles de fruto (todas las condiciones establecidas) y en hoja, aunque en este último órgano solamente pudo apreciarse en una condición establecida, lo cual se puede deber a una inadecuada condición de separación cromatográfica para este AA particular.

De igual manera sucedió con el AA cisteína y los que cuentan con carga parcial positiva como la lisina, arginina e histidina, que solo se detectaron de nueva cuenta en los frutos y en algunos casos en los perfiles de raíz. Sin embargo, no se puede descartar que éstos no se encuentren en

aquellos órganos evaluados, ya que se puede deber a que se encuentran en un nivel mínimo, incluso que sea por debajo del límite de detección de la metodología utilizada.

Los resultados a partir de este trabajo permitirán profundizar en el análisis de estos metabolitos tan importantes como fuentes de N y carbono, además de su función como moléculas señal.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir del análisis del material vegetal se encontraron al menos cuatro sistemas de fase móvil que pueden resolver un número cercano a 9 AA's diferentes, aunque debido a la similitud y complejidad estructural de éstos, todavía existen problemas para la resolución de algunos en particular (como cisteína e histidina, isoleucina y tirosina). Una alternativa para abordar esta problemática podría ser el adecuar el método para resolver un grupo reducido de AA's en específico. Los tratamientos aplicados a los órganos vegetativos y el grado de desarrollo del fruto produjeron diferencias suficientemente contrastantes en los perfiles de AA's libres, que permitieron poner a prueba los diferentes sistemas que se proponen en este trabajo. Este estudio es un primer acercamiento para lograr una mejor comprensión del papel que desarrollan estos compuestos en procesos clave como lo es la disponibilidad de N y el desarrollo de la planta. Con un enfoque más profundo, también permitiría el desarrollo de un método para el análisis de los AA's en diferentes contextos de investigación.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Alhadi, F. A., Al-Asbahi, A. A., Alhammadi, A. S. y Abdullah, A. A. (2012). The effects of free amino acids profiles on seeds germination/dormancy and seedlings development of two genetically different cultivars of Yemeni Pomegranates. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8, 114-137.
- American Chemical Society (ACS), 2012. What Do Analytical Chemists Do? [Online]  
Disponibile en:  
<https://www.acs.org/content/acs/en/careers/college-to-career/areas-of-chemistry/analytical-chemistry.html>  
[Acceso 14 de Diciembre 2019]
- Ángeles-López, Y. I., Rivera-Bustamante, R., & Heil, M. (2018). Fatal attraction of non-vector impairs fitness of manipulating plant virus. *Journal of Ecology*, 106(1), 391-400.
- Ángeles-López, Y. I., Rivera-Bustamante, R. F., & Heil, M. (2016). Colonization by phloem-feeding herbivore overrides effects of plant virus on amino acid composition in phloem of chili plants. *Journal of chemical ecology*, 42(10), 985-988.
- Atilio, B. & Causin, H. F. (1996). The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *Journal of Plant Physiology*, 149(3-4), 358-362.
- Basu, S., C Dey, M., Kundu, S., y Sinhababu, A. (2016). Recent development of spray reagents for the detection of amino acids on thin layer chromatography plates: an overview. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 13, 3-30.
- Bhawani, S. A., Mohamad Ibrahim, M. N., Sulaiman, O., Hashim, R., Mohammad, A., & Hena, S. (2012). Thin-layer chromatography of amino acids: a review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(11), 1497-1516.
- Bhushan, R., Ali, I., y Sharma, S. (1996). A comparative study of HPLC and TLC separation of amino acids using Cu (II) ion. *Biomedical Chromatography*, 10(1), 37-39.
- Bhushan, R., y Arora, M. (2001). Resolution of enantiomers of DL-amino acids on silica gel plates impregnated with optically pure (—)-quinine. *Biomedical Chromatography*, 15(7), 433-436.

- 
- Campanella, L., Crescentini, G., & Avino, P. (1999). Simultaneous determination of cysteine, cystine and 18 other amino acids in various matrices by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 833(2), 137-145.
- Cao, P., Kim, S. J., Xing, A., Schenck, C. A., Liu, L., Jiang, N., Wang, J., Last, R. L. & Brandizzi, F. (2019). Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in *Arabidopsis*. *Elife*, 8, e50747.
- Caterina, M., Schumacher, M., Tominaga, M., Rosen, T., Levine, J., y Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.
- Chakraborty, G. S. (2010). Phytochemical screening of *Calendula officinalis* Linn leaf extract by TLC. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy (IJRAP)*, 1, 131-134.
- Csapó, J., Albert, C., y Csapo-Kiss, Z. (2009). The D-amino acid content of foodstuffs (a review). *Acta Univ Sapientiae, Aliment*, 1, 5-30.
- Das, S., Teja, K. C., Duary, B., Agrawal, P. K., y Bhattacharya, S. S. (2016). Impact of nutrient management, soil type and location on the accumulation of capsaicin in *Capsicum chinense* (Jacq.): One of the hottest chili in the world. *Scientia horticultrae*, 213, 354-366.
- Dee DUNCAN, J., y Armstrong, D. W. (1991). A study of the effects of the degree of substitution of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin used as a chiral mobile phase additive in TLC. *JPC. Journal of planar chromatography, modern TLC*, 4(3), 204-206.
- Dodds, W. K., y Whiles, M. R. (2010). Chapter 14-Nitrogen, sulfur, phosphorus, and other nutrients, en: *Freshwater ecology*. pp. 345-373.
- DOF, D., 2010. Declaratoria General de Protección de la Denominación de Origen Chile Habanero de la Península de Yucatán. México [Online]  
Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5145315&fecha=04/06/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5145315&fecha=04/06/2010)  
[Acceso 29 de mayo 2019]
- Eurachem, Guía. (2005). Métodos analíticos adecuados a su propósito. Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Centro Nacional de metrología.
-

---

Feduchi, E., Blasco, I., Romero, C. S., y Yáñez, E. (2011). *Bioquímica: Conceptos esenciales*. Médica Panamericana.

FIRCO. (2017). Chile habanero con denominación de origen. [online]

Disponible en: <https://www.gob.mx/firco/articulos/chile-habanero-condenominacion-de-origen?idiom=es>

[Acceso: 30 Diciembre 2020]

Florencio-Ortiz, V., Sellés-Marchart, S., Zubcoff-Vallejo, J., Jander, G., y Casas, J. L. (2018). Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. *PLoS one*, 13(6), e0198093.

Franklin, O., Cambui, C. A., Gruffman, L., Palmroth, S., Oren, R., y Näsholm, T. (2017). The carbon bonus of organic nitrogen enhances nitrogen use efficiency of plants. *Plant, cell & environment*, 40, 25-35.

García-Laynes, F. (2019). Identificación de transcritos de Receptores de Glutamato en etapas ontogénicas de flores y frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones ambientales (Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán).

Genchi, G. (2017). An overview on D-amino acids. *Amino Acids*, 49, 1521-1533.

Gómez-García, M., y Ochoa-Alejo, N. (2013). Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (*Capsicum* spp.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 19025-19053.

González-Estrada, T., Zúñiga-Aguilar, J. y Vázquez-Flota, F. (2018). Mejoramiento genético del chile habanero. México, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Gördes, D., Kolukisaoglu, Ü., & Thurow, K. (2011). Uptake and conversion of D-amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Amino acids*, 40(2), 553-563.

Götz, K. P., Chmielewski, F. M., Gödeke, K., Wolf, K., Jander, E., Sievers, S., Homman, t., Huschek, G. & Rawel, H. M. (2017). Assessment of amino acids during winter rest and ontogenetic development in sweet cherry buds (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 222, 102-110.

---

- 
- Guo, L., Su, Q., Yin, J., Yang, Z., Xie, W., Wang, S., Wu, K., Cui, H. & Zhang, Y. (2019). Amino acid utilization may explain why *Bemisia tabaci* Q and B differ in their performance on plants infected by the Tomato yellow leaf curl virus. *Frontiers in physiology*, 10, 489.
- Hao, A. Y., Tong, L. H., Zhang, F. S., Gao, X. M., & Inoue, Y. (1995). Direct Thin-Layer Chromatographic Separation of Enantiomers of Six selected Amino Acids Using 2-O-[(R)-2-Hydroxypropyl]- $\beta$ -CD as a Mobile Phase Additive. *Polymer—Plastics Technology and Engineering*, 28(11), 2041-2048.
- Hener, C., Hummel, S., Suarez, J., Stahl, M., y Kolukisaoglu, Ü. (2018). D-Amino Acids Are Exuded by *Arabidopsis thaliana* Roots to the Rhizosphere. *International journal of molecular sciences*, 19, 1109.
- Hildebrandt, T. M., Nesi, A. N., Araújo, W. L., y Braun, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, 8, 1563-1579.
- Hill, P. W., Quilliam, R. S., DeLuca, T. H., Farrar, J., Farrell, M., Roberts, P., Newsham, K. K., Hopkins, D. W., Bardgett, R. D. y Jones, D. L. (2011). Acquisition and assimilation of nitrogen as peptide-bound and D-enantiomers of amino acids by wheat. *PLOS One*, 6, e19220.
- Hill, E. J., Jones, D. L., Paterson, E., y Hill, P. W. (2019). Hotspots and hot moments of amino acid N in soil: Real-time insights using continuous microdialysis sampling. *Soil Biology and Biochemistry*, 131, 40-43.
- Hudaib, T., Brown, S., Wilson, D., & Eady, P. E. (2015). Identification of free amino acids in several crude extracts of two legumes using thin-layer chromatography. *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 29(2), 145-147.
- Jing, Y., Zhang, B., Yuan, X., Gao, Y., Lu, P., Wang, W., & Xu, M. (2016). Determination of free amino acids in burley tobacco by high performance liquid chromatography. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), S64-S68.
- Johnson, B., y Goldblatt, C. (2015). The nitrogen budget of Earth. *Earth-Science Reviews*, 148, 150-173.
- Jones, D. L., y Kielland, K. (2002). Soil amino acid turnover dominates the nitrogen flux in permafrost-dominated taiga forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(2), 209-219.
-

- 
- Kantar, M. B., Anderson, J. E., Lucht, S. A., Mercer, K., Bernau, V., Case, K. A., Le, N. C., Frederiksen, M. K., DeKeyser, H. C., Wong, Z., Hastings, J. C. y Baumler, D. J. (2016). Vitamin variation in *Capsicum* spp. provides opportunities to improve nutritional value of human diets. *PloS one*, 11(8), e0161464.
- Kim, E. H., Lee, S. Y., Baek, D. Y., Park, S. Y., Lee, S. G., Ryu, T. H., Lee, S. K., Kang, H. J., Kwon, O. H., Kil, M. y Oh, S. W. (2019). A comparison of the nutrient composition and statistical profile in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) based on genetic and environmental factors. *Applied Biological Chemistry*, 62(1), 48.
- Koga, R., Miyoshi, Y., Todoroki, K., y Hamase, K. (2017). Amino acid and bioamine separations. In *Liquid Chromatography* (pp. 87-106). Elsevier.
- Kong, D., Ju, C., Parihar, A., Kim, S., Cho, D., & Kwak, J. M. (2015). Arabidopsis glutamate receptor homolog3. 5 modulates cytosolic Ca<sup>2+</sup> level to counteract effect of abscisic acid in seed germination. *Plant physiology*, 167(4), 1630-1642.
- Krishna De, A. (2004). *Capsicum: Historical & botanical perspectives*. New York, Taylor & Francis.
- Lambers, H., Raven, j., Shaver, g., y Smith, s. (2008). Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 95–103.
- Latournerie M. L., J. S. López V., G. Castañón N., J. O. Mijangos C., G. Espadas V., A. Pérez G. y E. Ruiz S. (2015). Evaluación agronómica de germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agroproductividad*, 1, 24-29.
- Lee, G., Shin, M., Yoon, D., Kim, A., Yu, R., Park, N., y Han, I. (2013). Topical application of capsaicin reduces visceral adipose fat by affecting adipokine levels in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity*, 21, 115-122.
- León-García, F. G. (2019). Identificación de la presencia y actividad de posibles receptores ionotrópicos de glutamato en raíces de *Capsicum annuum* a través de un acercamiento farmacológico y molecular (Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
- Li, Z. G., Ye, X. Y., & Qiu, X. M. (2019). Glutamate signaling enhances the heat tolerance of maize seedlings by plant glutamate receptor-like channels-mediated calcium signaling. *Protoplasma*, 256(4), 1165-1169.
-

- 
- Luo, X. J., Peng, J., y Li, Y. J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European journal of pharmacology*, 650, 1-7.
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 250-258.
- Meher, H. C., Gajbhiye, V. T., & Singh, G. (2011). A GC-ECD method for estimation of free and bound amino acids,  $\gamma$ -aminobutyric acid, salicylic acid, and acetyl salicylic acid from *Solanum lycopersicum* (L.). *Journal of AOAC International*, 94(1), 232-242.
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H., y Appel, T. (2001). *Principles of plant nutrition*. Springer, Dordrecht.
- Merck, 2019. Historia de la cromatografía [Online] Disponible en: <http://www.merckmillipore.com/MX/es/analytcs-sample-preparation/learning-center-thin-layer-chromatography/tlc-history/bSGb.qB.xO4AAAFVQRxDx07D.nav> [Acceso 05 de Junio de 2020]
- Michard, E., Lima, P. T., Borges, F., Silva, A. C., Portes, M. T., Carvalho, J. E., Matthew, G., Lai\_Hua, L., Gerhard, O. y Feijó, J. A. (2011). Glutamate receptor-like genes form  $Ca^{2+}$  channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science*, 332, 434-437.
- Mohammad, A., Moheman, A., y El-Desoky, G. (2012). Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC: review of the current state. *Open Chemistry*, 10, 731-750.
- Morlock, G., y Schwack, W. (2010). Hyphenations in planar chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6600-6609.
- Nelson, D. L., y Cox, M. M. (2006). *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4ª edición. Ed Omega. Barcelona.
- Ortiz-Lopez, A., Chang, H. C., y Bush, D. R. (2000). Amino acid transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 275-280.
- Ouellette, R. J., y Rawn, J. D. (2015). *Amino Acids, Peptides, and Proteins. Organic Chemistry Study Guide*, 569–586.
- Pan, M., Bonness, MS y Mabry, TJ (1995). Non-protein amino acids from *Gymnocladus dioica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 5(23), 575-576.
-

- 
- 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.
- Piñero, M. C., Porras, M. E., López-Marín, J., Sánchez-Guerrero, M. C., Medrano, E., Lorenzo, P., & Del Amor, F. M. (2019). Differential nitrogen nutrition modifies polyamines and the amino-acid profile of sweet pepper under salinity stress. *Frontiers in plant science*, 10.
- Polak, B., Traczuk, A., & Misztal, S. (2019). Separation of 9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino acid derivatives in micellar systems of high-performance thin-layer chromatography and pressurized planar electrochromatography. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Pratelli, R., & Pilot, G. (2014). Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5535-5556.
- Qiu, X. M., Sun, Y. Y., Ye, X. Y., & Li, Z. G. (2020). Signaling role of glutamate in plants. *Frontiers in plant science*, 10, 1743.
- Rai, V. K. (2002). Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia plantarum*, 45, 481-487.
- Ramírez Ruíz, G. S. (2017). Análisis de la producción del chile habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.) en los principales estados productores de México durante 2006-2015. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Coahuila. México. pp. 25-27
- Reich, E., Schibli, A., Widmer, V., Jorns, R., Wolfram, E., y De Batt, A. (2006). HPTLC methods for identification of green tea and green tea extract. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 29, 2141-2151.
- Reich, E., y Schibli, A. (2007). Validation. En E. Reich, & A. Schibli, *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants* (págs. 193-196). New York: Thieme.
- Ruiz Lau, N., Medina Lara , F. y Martínez Estévez, M., 2011. El chile habanero: Su origen y usos. *Ciencia*, pp. 70-77.
- Santiago-Antonio, G., Lizama-Gasca, M. G., Carrillo-Pech, M., & Echevarría-Machado, I. (2014). Natural variation in response to nitrate starvation among varieties of habanero pepper ('*Capsicum chinense*' Jacq.). *Australian Journal of Crop Science*, 8(4), 523-535.
-

- 
- Segura-Campos, M. R., Ruiz-Ruiz, J. C., Chel-Guerrero, L. A., y Betancur-Ancona, D. A. (2016). *Capsicum chinense*: Composition and Functional Properties. In *Functional Properties of Traditional Foods*. Springer. pp. 289-292.
- Serralta-Interián, A. A. (2014). Estudio del efecto de los O-aminoácidos sobre el crecimiento de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) (Tesis Doctoral, Centro de Investigación Científica de Yucatán).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2010. Un panorama del cultivo del chile [Online]  
Disponible en:  
<http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>  
[Acceso 29 de mayo 2019]
- Sharma, S. K., Vij, A. S., y Sharma, M. (2013). Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European Journal of Pharmacology*, 720, 55-62.
- Sherma, J. (2000). Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 129–147.
- Shtykov, S. N., Sumina, E. G., Uglanova, V. Z., & Sorokina, O. N. (2017). Thin-layer chromatography of some amino acids on silica in aqueous–organic and modified micellar mobile phases. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(8), 870-878.
- Silva, B. M., Casal, S., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Oliveira, M. B., & Ferreira, M. A. (2003). Development and evaluation of a GC/FID method for the analysis of free amino acids in quince fruit and jam. *Analytical Sciences*, 19(9), 1285-1290.
- Sobhani, Z., Emami, S. A., & Rajabi, O. (2020). Comparison between HPLC and HPTLC densitometry for the determination of spinosin from *Ziziphus jujuba* Mill. fruit extracts. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 43(1-2), 10-16.
- Sorrequeta, A., Ferraro, G., Boggio, S. B., & Valle, E. M. (2010). Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate. *Amino acids*, 38(5), 1523-1532.
- 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, 979–991.
-

- 
- Szabados, L., y Savoure, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15, 89-97.
- Su, Q., Preisser, E. L., Zhou, X. M., Xie, W., Liu, B. M., Wang, S. L., Wu, Q. J. & Zhang, Y. J. (2015). Manipulation of host quality and defense by a plant virus improves performance of whitefly vectors. *Journal of Economic Entomology*, 108(1), 11-19.
- Tegeder, M., y Rentsch, D. (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular plant*, 3, 997-1011.
- Tegeder, M., & Hammes, U. Z. (2018). The way out and in: phloem loading and unloading of amino acids. *Current Opinion in Plant Biology*, 43, 16-21.
- Themelis, T., Gotti, R., Orlandini, S., y Gatti, R. (2019). Quantitative amino acids profile of monofloral bee pollens by microwave hydrolysis and fluorimetric high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 173, 144-153.
- Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A. J., Howe, G. A. & Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science*, 361(6407), 1112-1115.
- Villa Castorena, M., Catalán Valencia, E., Inzunza Ibarra, M., Román López, A., Macías Rodríguez, H., y Cabrera Rodarte, D. (2014). Producción hidropónica de chile habanero en invernadero. México. INIFAP. Folleto Técnico Núm. 34, 1-45
- Vincill, E. D., Clarin, A. E., Molenda, J. N., & Spalding, E. P. (2013). Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(4), 1304-1313.
- 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, 783-793.
- Wayne, W. (2012). A reliable methodology for quantitative extraction of fruit and vegetable physiological amino acids and their subsequent analysis with commonly available HPLC systems. *Food and Nutrition Sciences*, 2012.
- Werdin-Pfisterer, N. R., Kielland, K., y Boone, R. D. (2009). Soil amino acid composition across a boreal forest successional sequence. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 1210-1220.
-

- 
- Xu, Y., Xiao, H., Guan, H., Wang, Y., Long, C., & Zhao, J. (2018). Variations in free amino acid concentrations in mosses and different parts of *Cinnamomum camphora* along an urban-to-rural gradient. *Ecological Indicators*, 93, 813-821.
- Yao, X., Nie, J., Bai, R., & Sui, X. (2020). Amino Acid Transporters in Plants: Identification and Function. *Plants*, 9(8), 972.
- Yemm, E. W., Cocking, E. C., & Ricketts, R. E. (1955). The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 80(948), 209-214.
- Yoshioka, M., St-Pierre, S., Suzuki, M., y Tremblay, A. (1998). Effects of red pepper added to high-fat and high-carbohydrate meals on energy metabolism and substrate utilization in Japanese women. *The British journal of nutrition*, 80, 503-510.
- Zaikin, V., y Halket, J. M. (2009). *A handbook of derivatives for mass spectrometry*. IM publications.
- Ziglioli, F., Frattini, A., Maestroni, U., Dinale, F., Ciuffieda, M., y Cortellini, P. (2009). Vanilloid-mediated apoptosis in prostate cancer cells through a TRPV-1 dependent and a TRPV-1-independent mechanism. *Acta Biomédica*, 80, 13-20.
- Zou, Y., Ma, K., & Tian, M. (2015). Chemical composition and nutritive value of hot pepper seed (*Capsicum annuum*) grown in Northeast Region of China. *Food science and technology*, 35(4), 659-663.
- Zuccarelli, R., Rodríguez-Ruiz, M., Lopes-Oliveira, P. J., Pascoal, G. B., Andrade, S. C., Furlan, C. M., Purgatto, E., Palma, J. M., Corpass, F. j., Rossi, M. & Freschi, L. (2021). Multifaceted roles of nitric oxide in tomato fruit ripening: NO-induced metabolic rewiring and consequences for fruit quality traits. *Journal of Experimental Botany*, 72(3), 941-958.