



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE EL
METABOLISMO DE CAPSAICINOIDES EN FRUTOS
DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)**

Tesis que presenta

ENID ZAMUDIO MORENO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2013



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 titulado EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE EL METABOLISMO DE CAPSAICINOIDES EN FRUTOS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez y del Dr. Graciano Calva Calva, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida Yucatán, México, 21 de Octubre del 2013.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Nombre: M. en C. ENID ZAMUDIO MORENO

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE EL METABOLISMO DE CAPSAICINOIDES EN FRUTOS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo la dirección del Dr. Manuel Martínez Estévez.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (No. de registro 167384).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Dr. Manuel Martínez Estévez, por haberme permitido pertenecer a su grupo de trabajo, por todo su apoyo y paciencia que me brindo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Graciano Calva Calva por todo su apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al comité predoctoral integrado por el Dr. Felipe Vázquez Flota, la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, la Dra. Ileana Echavarría Machado, el Dr. Sergio Peraza Sánchez, el Dr. Enrique Sauri Duch. Por la evaluación y sugerencias para mi formación profesional.

Al Dr. Armando Ariza Castolo del CINVESTAV por la identificación del compuesto 5,5'-dicapsaicina.

A los M. en C. Fátima Medina Lara, Adolfo Guzmán Antonio, Francisco Javier García Villalobos, Luis W. Torres Tapia, por su amistad y apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A las M. en C. Lucila Sánchez Cach y Ángela Kú González por su amistad durante mi estancia en la unidad.

A la Dra. Nancy Ruiz Lau por su amistad y sugerencias para este trabajo.

A mis amigos Luis F., J. Emanuel de Atocha y Gladys por su apoyo en la realización de este trabajo, y por los momentos agradables que pasamos en el laboratorio.

A Garnica por ser mi amigo incondicional.

A todos mis amigos de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de estar en esta vida

A mis Padres

Daniel Zamudio Zetina y Narcisa Moreno Gómez

A mis hermanos

Remy, Redy, Emily, Reid y Javier

A mis princesas

Yumi y Eymi

CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS	vii
LISTADO DE CUADROS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. ESTRÉS HÍDRICO.....	3
1.2. ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS DE <i>CAPSICUM</i>	3
1.3. GÉNERO <i>CAPSICUM</i>	4
1.4. <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ. (CHILE HABANERO)	4
1.5. CAPSAICINOIDES EN EL FRUTO DE <i>CAPSICUM</i>.....	5
1.6. PROPIEDADES Y USOS DE LOS CAPSAICINOIDES	5
1.7. PERCEPCIÓN DEL PICOR MEDIADA POR RECEPTORES DE CAPSAICINA	7
1.8. LOCALIZACIÓN DE LOS CAPSAICINOIDES EN EL FRUTO	7
1.8.1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LOS CAPSAICINOIDES.....	8
1.9. RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LOS CAPSAICINOIDES	9
1.10. CAPSAICINOIDES EN ÓRGANOS VEGETATIVOS.....	10

1.11. CONJUGACIÓN Y CATABOLISMO.....	12
1.12. PEROXIDASAS	12
1.12.1. CLASES DE PEROXIDASAS EN PLANTAS.....	13
1.12.2. REACCIÓN GENERAL DE LAS PEROXIDASAS.....	14
1.13. PAPEL DE LAS PEROXIDASAS EN LA OXIDACIÓN DE CAPSAICINOIDES	16
1.13.1. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PEROXIDASAS DEGRADADORAS DE CAPSAICINOIDES.....	16
1.13.2. OXIDACIÓN DE LOS CAPSAICINOIDES POR LA PEROXIDASAS B ₆	17
1.13.3. PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE LOS CAPSAICINOIDES POR PEROXIDASA DE FRUTOS DE CHILE.....	17
1.14. EFECTO DE FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN FRUTOS DE CHILE	18
1.15. HIPÓTESIS	20
1.16. OBJETIVO GENERAL.....	20
1.17. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
1.18. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
1.19. REFERENCIAS.....	22
CAPÍTULO II	29
EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN PLANTAS DE <i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.....	29
2.1. INTRODUCCIÓN	29

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	29
2.2.2. TRASPLANTES Y CONDICIONES EN EL INVERNADERO.....	29
2.2.3. TRATAMIENTO DE ESTRÉS HÍDRICO	30
2.2.4. MARCAJE DE FLORES Y COSECHA DE FRUTOS	30
2.2.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES	30
2.3. RESULTADOS	31
2.3.1. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE LA FLORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN EN PLANTAS DE CHILE HABANERO	31
2.3.2. CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO DEL CHILE HABANERO.....	33
2.3.3. PERFIL DE CAPSAICINOIDES EN FRUTO DE CHILE HABANERO DE PLANTAS CRECIDAS EN ESTRÉS HÍDRICO	35
2.4. CONCLUSIONES	36
2.5. REFERENCIAS.....	37
CAPÍTULO III	39
EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA Y CAPSAICINOIDE SINTETASA DE FRUTOS DE <i>CAPSICUM</i>	39
3.1. INTRODUCCIÓN	39
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	39

3.2.2. LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE LAS PEROXIDASAS EN PLACENTA DE CHILE HABANERO	40
3.2.3. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES A PARTIR DE PLACENTAS DE FRUTOS DE CHILE HABANERO	40
3.2.4. OXIDACIÓN DE CAPSAICINA MEDIADA POR PEROXIDASAS	40
3.2.5. CONDICIONES PARA ENSAYO DE LA PEROXIDASA QUE DEGRADA LA CAPSAICINA	41
3.2.5.1. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS PARA EL ENSAYO DE PEROXIDASA.	41
3.2.5.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PH SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS	41
3.2.6. ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD DE CAPSAICINA SINTETASA (CS)	41
3.2.7. CUANTIFICACIÓN DE CAPSAICINOIDES	42
3.2.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE).....	42
3.2.8.1. DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS BAJO CONDICIONES DESNATURALIZANTES	42
3.2.8.2. DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS BAJO CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES	43
3.2.8.3. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNA EN LOS GELES DE ACRILAMIDA.....	43
3.2.8.4. ZIMOGRAMAS CONTRA GUAYACOL EN GELES NO DESNATURALIZANTES	43
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.3.1. LOCALIZACIÓN HISTOQUÍMICA DE LAS PEROXIDASAS EN PLACENTA	44
3.3.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN PLACENTAS DE CHILE HABANERO	45
3.3.3. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS PEROXIDASAS CONTRA CAPSAICINA	46

3.3.3.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	46
3.3.4. ESTABLECIMIENTO DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN ADECUADO PARA LA TRANSFORMACIÓN DE LA CAPSAICINA EN PRESENCIA DE EXTRACTOS PROTEICOS DE TEJIDO PLACENTARIO DE CHILE HABANERO	48
3.3.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN Y PH DE LA REACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PEROXIDASAS DE TEJIDO PLACENTARIO DE CHILE HABANERO	49
3.3.6. ANÁLISIS CUALITATIVO DE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS UTILIZANDO GUAYACOL COMO SUSTRATO	51
3.3.7. CAMBIOS EN LA CONCENTRACIÓN DE CAPSAICINOIDES CON RESPECTO A LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CAPSAICINA SINTETASA Y DE LAS PEROXIDASAS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE PLACENTAS DE FRUTOS DE CHILE HABANERO	52
3.3.8 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE LAS PROTEÍNAS DE TEJIDO PLACENTARIO DE LAS PLANTAS SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO.....	55
3.4. INHIBICIÓN DE LA FORMACIÓN DEL DÍMERO 5,5´ -DICAPSAICINA POR EL ANTICUERPO LEVANTADO CONTRA PEROXIDASA DE RÁBANO	57
3.5. CONCLUSIONES	59
3.6. REFERENCIAS.....	60
CAPITULO IV	63
5,5'-DICAPSAICINA ES UN PRODUCTO DE LA OXIDACIÓN DE CAPSAICINA EN PLACENTAS DE FRUTOS DE CHILE HABANERO (<i>CAPSICUM CHINENSE</i> JACQ.)	63
4.1. INTRODUCCIÓN	63
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	63
4.2.1. ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASAS	63

4.2.2. ANÁLISIS DE LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS POR HPLC	64
4.2.3. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE TRANSFORMACIÓN DE LA CAPSAICINA	64
4.2.4. ANÁLISIS DE RMN Y HSQC	64
4.3. RESULTADOS	65
4.3.1. ESTUDIO SOBRE EL DÍMERO 5,5'-DICAPSAICINA, PRODUCTO DE LA ACTIVIDAD DE LAS PEROXIDASAS SOBRE CAPSAICINA.....	65
4.4. ANÁLISIS DE RMN, HSQC Y MASAS DEL COMPUESTO Z	66
4.5. CONCLUSIONES	69
4.6. REFERENCIAS.....	70
CAPITULO V	71
5.1 DISCUSIÓN GENERAL	71
5.1.1. EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE LA FLORACIÓN Y FRUCTIFICACIÓN EN PLANTAS DE CHILE HABANERO	71
5.1.2. SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN PLANTAS BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.....	72
5.2. EL COMPUESTO DE DEGRADACIÓN 5,5´-DICAPSAICINA DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS DE PEROXIDASA	73
5.3. CONCLUSIONES GENERALES	75
5.4. PERSPECTIVAS	76
5.5. REFERENCIAS.....	77

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Biosíntesis subcelular de capsaicinoides.....	9
Figura 1.2. Vía propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides.	11
Figura 1.3. Resumen del mecanismo del ciclo de las peroxidasa	15
Figura 1.4. Esquema de reacción para la formación de 5,5'-dicapsaicina y el dímero éter 4'-O-5 dicapsaicina	18
Figura 1.5. Diagrama de la estrategia experimental para la realización de este trabajo.	21
Figura 2.1. Plantas de chile habanero en ausencia de agua	32
Figura 2.3. Curso temporal del contenido de capsaicinoides en placentas de fruto de chile habanero sometidas a estrés hídrico.	36
Figura 3.1. Localización histoquímica de las peroxidasa en chile habanero.	45
Figura 3.2. Contenido de proteína soluble en la placenta de los frutos de plantas de chile sometidas a estrés hídrico.	46
Figura 3.3. Consumo de capsaicina (500 μ M) en presencia de diferentes concentraciones de proteína de tejido placentario de chile habanero.....	47
Figura 3.4. Consumo de capsaicina (500 μ M) a diferentes tiempos de incubación de tejidos placentario de chile habanero..	48
Figura 3.5. Efecto de la temperatura de incubación en la transformación de la capsaicina por peroxidasa en un extracto proteico de placenta de chile habanero.....	50
Figura 3.6. Efecto del pH en la transformación de la capsaicina de un extracto proteico de chile habanero.	51
Figura 3.7. Actividad de peroxidasa en extractos proteicos.....	52
Figura 3.8. A) Contenido de capsaicinoides, B) Actividad de la capsaicinoide sintetasa y C) Actividad de las peroxidasa.	54

Figura 3.9. Electroforesis SDS- PAGE.....	56
Figura 3.10. Gel de electroforesis Nativo-PAGE.....	56
Figura 3.11. Inmunoinhibición de la oxidación de la capsaicina con anticuerpo de conejo levantado contra peroxidasa de rábano.....	57
Figura 3.12. Inmunoinhibición de la oxidación de la capsaicina por peroxidasas de extractos proteicos de frutos de plantas sometidas a estrés hídrico.....	58
Figura 4.1. Cromatograma a 230 nm de del producto de reacción del extracto proteico de frutos de plantas de <i>Capsicum</i> sometidas e estrés contra capsaicina. .	65
Figura 4.2. Cromatograma a 230 nm del dímero 5,5'-dicapsaicina y con su respectivo espectro de absorción, el pico pequeño lateral no fue identificado.	66
Figura 4.3. Espectro de RMN ^1H y HSQC del compuesto Z.	68

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Descripción taxonómica de la especie *Capsicum chinense* 4

Cuadro 1.2. Estructuras de capsaicinoides y capsinoides 6

Cuadro 2.1. Número de flores y frutos de plantas en estrés hídrico. 31

Cuadro 2.2. Distribución de capsaicinoides en frutos de chile habanero de plantas crecidas bajo estrés hídrico. 33

ABREVIATURAS

Capsaicina	Cap
Capsaicinoide sintetasa	CS
Capsaicinoides	CAPs
Cromatografía Líquida de Alta Resolución	HPLC
Días después de la antesis	DDA
Dihidrocapsaicina	DHC
Peroxidasas	Prxs
Riego cada nueve días	R9
Riego cada siete días	R7
Testigo	C

RESUMEN

Los frutos de *Capsicum chinense*, comúnmente conocidos como chile habanero, es uno de los más picantes aunque se ha estudiado el efecto del déficit hídrico sobre la síntesis de capsaicinoides, pero la degradación de estos compuestos en condiciones de estrés es un tema poco estudiado. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto del déficit hídrico sobre el desarrollo de plantas de *Capsicum chinense*, flores, el contenido y degradación de capsaicinoides así como la relación de estos procesos con la actividad de peroxidasas y la capsaicinoide sintetasa (CS). Se encontró que aunque el déficit hídrico reducía la floración hasta un 50% dependiendo de las condiciones de riego, el porcentaje de fructificación podría mantenerse sin diferencias significativas entre los testigos y las plantas sometidas a estrés.

Los resultados sobre el contenido de capsaicinoides, la actividad de la CS y peroxidasas permitieron concluir que si bien las peroxidasas están implicadas en el proceso de degradación de capsaicinoides, el estrés hídrico modificó el patrón normal de degradación permitiendo que estos compuestos continúen su acumulación aún cuando se detecta alta actividad de peroxidasas en este tejido. Es decir, los resultados indican que bajo estrés hídrico las peroxidasas no parecen tener un papel fundamental en el proceso de degradación de capsaicinoides en los frutos de chile habanero.

ABSTRACT

The fruits of *Capsicum chinense*, commonly known as habanero chili is one of the most spicy but has studied the effect of water deficit on synthesis of capsaicinoids, but the degradation of these compounds under stress conditions has not been extensively studied. The aim of this study was to investigate the effect of water stress on the development of *Capsicum chinense* plants, flowers, and degradation of capsaicinoids content and the relationship of these processes with the activity of peroxidases and the capsaicinoid synthetase. We found that although the flowering water deficit reduced up to 50% depending on water conditions, the percentage of fruit could be maintained without significant difference between the controls and the stressed plants.

The results on the capsaicinoid content, the activity of CS and peroxidases to the conclusion that although peroxidases are involved in the degradation process of capsaicinoids, water stress modified normal degradation pattern enabling these compounds even when continuing accumulation high activity is detected in this tissue peroxidases. That is, the results indicate that under water stress peroxidases seem to have a fundamental role in the process of degradation of capsaicinoids in habanero chili fruit.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense*) es uno de los más picosos, y tiene gran importancia en el estado de Yucatán por su variabilidad y diferentes niveles de picor. El picor se debe a unos compuestos pseudo-alcaloides llamados amidas de vainillilamina con ácido grasos de C₉-C₁₁ metilados en el penúltimo carbono y con presencia/ausencia de un doble enlace *trans*. Entre estos compuestos está la capsaicina y la dihidrocapsaicina contribuyen con más del 90% del picor de los frutos del género *Capsicum*. Diversos estudios sugieren que la biosíntesis y acumulación de capsaicinoides ocurre específicamente en las células epidérmicas del septo interocular de la placenta del fruto (Stewart *et al.*, 2007). En contraste con la biosíntesis, hay pocos reportes acerca de su catabolismo. Por ejemplo, las peroxidasas aisladas de los frutos de *Capsicum annum* oxidan la dihidrocapsaicina (Bernal *et al.*, 1993a) y la capsaicina (Bernal *et al.*, 1993b, 1995) en 5,5'-dicapsaicina y 4'-O-5-dicapsaicina (Bernal y Ros-Barceló, 1996). Las peroxidasas son eficientes catalizadores en las oxidaciones *in vitro* de capsaicina y dihidrocapsaicina. Los productos de oxidación de la capsaicina por peroxidasas han sido reportadas en los frutos de *Capsicum* (Díaz *et al.*, 2004; Martínez-Juárez *et al.*, 2004). La biosíntesis o degradación de capsaicinoides en los frutos de *Capsicum* está influenciada por factores genéticos y ambientales, como puede ser el tipo de suelo, las propiedades osmóticas, los componentes nutricionales y las deficiencias hídricas (Sung *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 1997). Las alteraciones producidas por el déficit hídrico sobre la cantidad de metabolitos secundarios son complejas, debido a que estas afectan la adquisición de carbono y nutrientes, así como transporte de solutos en la planta. De esta manera, la concentración de metabolitos secundarios puede disminuir o aumentar (Estrada *et al.*, 2000). Ruíz-Lau y colaboradores (Ruíz-Lau *et al.*, 2011) observaron un aumento en la concentración de capsaicina en plantas de *C. chinense* bajo condiciones de estrés hídrico con la disminución de la actividad de la capsaicina sintetasa, enzima que condensa vainillilamina y el ácido graso para formar capsaicina. Por esto es necesario estudiar la relación entre estas enzimas, peroxidasas y capsaicinoide sintetasa, con el contenido de capsaicinoides. Así, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el papel del déficit hídrico sobre el metabolismo de los capsaicinoides en frutos de chile habanero.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Estrés hídrico

El agua, es el componente más importante de la vida, esencial para los seres humanos y la producción agrícola. Las plantas están expuestas con frecuencias a los problemas ambientales, tales como la sequía y las altas temperaturas. El estrés hídrico es una de las principales limitaciones para el sector agrícola. Los efectos del estrés hídrico sobre el crecimiento de las plantas varían entre las especies. Los mecanismos morfológicos que le permiten a las plantas adaptarse a la escasez de agua incluyen la reducción en el tamaño de la hoja y la biomasa aérea, el llenado de las semillas, el control de los estomas, el ajuste osmótico y la tolerancia a la deshidratación celular (Pedrol *et al.*, 2000, Turner y Begg, 1998). En diferentes especies vegetales se ha observado que las respuestas fisiológicas por estrés hídrico son variadas y es factible incrementar la eficiencia en el uso del agua, disminuyendo la humedad aprovechable hasta cierto nivel sin afectar rendimiento (López *et al.*, 2008). El estrés por falta de agua se traduce principalmente en pérdida del color verde de las hojas, aumento de temperatura foliar e incremento de la reflectancia de la luz infrarroja entre otros efectos (Mattson y Haack, 1987).

1.2. Estrés hídrico en plantas de *Capsicum*

Borges *et al.* (2008) reportaron el rendimiento del chile habanero como resultado de la aplicación de N, P₂O₅ y K₂O y de la suficiente disponibilidad de agua en la solución del suelo. Otros reportes (Jaimez, 2000; Pire y Colmenarez, 1994) señalan que el rendimiento disminuye a medida que la nutrición o la humedad aprovechable se reduce, como una respuesta fisiológica ante esta condición, indicando esto último que la traslocación de asimilados hacia los frutos disminuye a medida que aumenta el déficit de agua.

Por otro lado, existe una correlación positiva entre la humedad aprovechable y potencial hídrico foliar en chile habanero; regar con el 60% de humedad aprovechable cada dos días, incrementa el tamaño de la planta y su producción foliar (May-Lara *et al.*, 2011).

1.3. Género *Capsicum*

Los chiles pertenecen al género *Capsicum* y son miembros de la familia de las solanáceas. Estos presentan características que los distinguen, como la forma, tamaño y color, así como los niveles de picor entre cada una de sus especies. Se han reportado alrededor de 20-30 especies (Govindarajan, 1985). De esas, la FAO (Organización para la Agricultura y la Alimentación, USA) ha reconocido con base en las características morfológicas cinco especies domesticadas, las cuales son: *C. chinense* Jacq., *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L. y *C. pubescens*.

1.4. *Capsicum chinense* Jacq. (Chile habanero)

El chile habanero es uno de los cultivares con mayor intensidad de sabor y más picante del género *Capsicum*, causado, como mencionamos anteriormente, por la presencia de capsaicinoides. Los chiles habaneros inmaduros son verdes, pero su color varía en la madurez. El estado de Yucatán cuenta con la mayor diversidad de chiles criollos en el país, el chile habanero tiene su origen en el continente americano, donde fue introducido a Cuba (Canul, 1996). Esta especie fue colectada por el taxónomo Nikolaus von Jacquin en el Caribe. La clasificación taxonómica de esta especie se muestra en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Descripción taxonómica de la especie *Capsicum chinense* (Tun, 2001).

Reino	Vegetal
Subreino	Embriophyta
División	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Metachlamidea
Orden	Tubiflorea
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.

El chile habanero se encuentra distribuido en toda la Península de Yucatán, en donde sus frutos presentan diferentes formas, colores y tamaños del fruto (Zapata Castillo, 2005).

El Diario Oficial de la Federación publicó el 4 de junio de 2010 la denominación de origen del chile habanero a los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) como "Chile Habanero de la península de Yucatán". De acuerdo con cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2009 las tres entidades sumaron 445 hectáreas sembradas con este producto, siendo Yucatán la de mayor extensión.

1.5. Capsaicinoides en el fruto de *Capsicum*

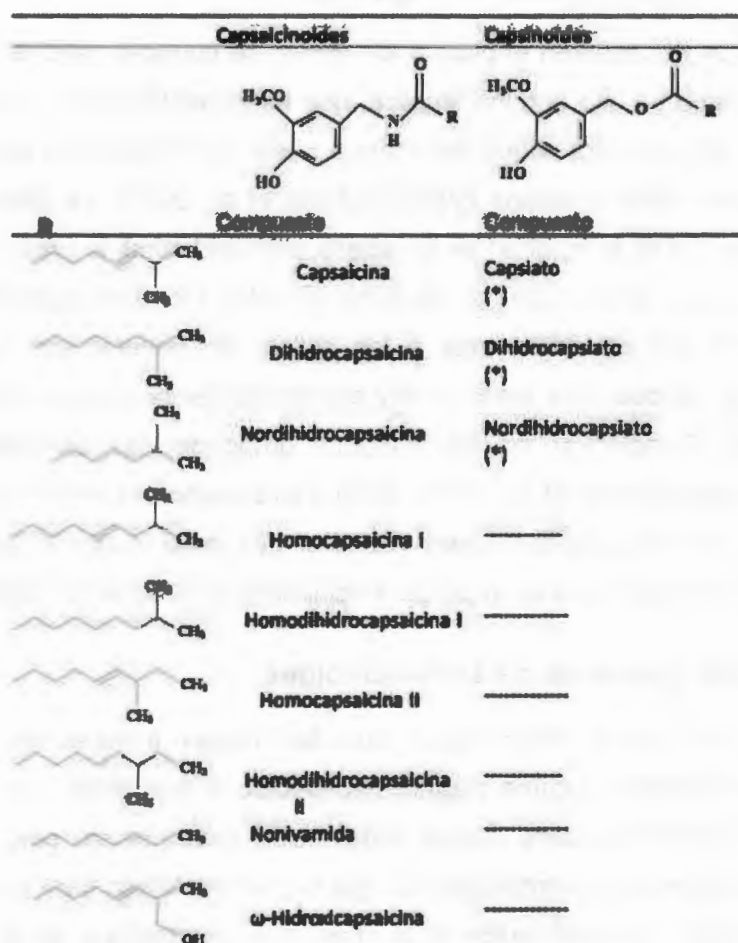
Los capsaicinoides le confieren el picor a los chiles, se conocen más de 20 estructuras, pero todas consisten en una porción fenólica, que es la vainillilamina, unida mediante un enlace amida a un ácido graso que se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina (Vázquez-Flota *et al.*, 2007). La diferencia entre los capsaicinoides radica en la longitud de la cadena alifática lateral, la presencia o ausencia de un doble enlace y el punto de ramificación (Cuadro 1.2). Los capsaicinoides que le confieren el 90% del contenido total a los chiles, en general son la capsaicina y dihidrocapsaicina. No obstante, también hay capsaicinoides no-picosos, tales como la ω -hidroxicapsaicina. También se ha reportado un grupo de capsaicinoides no picosos, llamado capsinoides (Kobata *et al.*, 1999, 1998). Los capsinoides tienen la misma cadena alifática lateral como los capsaicinoides (Cuadro 1.2), pero la estructura aromática es derivada del alcohol vainillínico en lugar de la vainillilamina (Díaz *et al.*, 2004).

1.6. Propiedades y usos de los capsaicinoides

Los capsaicinoides tienen propiedades que los hacen interesantes para su uso farmacológico, alimentario y como plaguicidas. Debido a este picor y su percepción en mamíferos, la capsaicina puede causar inflamación neurogénica, pero también tiene propiedades analgésicas y antiinflamatorias, que se han explotado para su uso en cremas y geles (Suhr, 2002). Otra aplicación de la capsaicina en medicina es el tratamiento de procesos carcinogénicos. Sin embargo, esa función es controvertida debido que se ha sugerido que la capsaicina puede tener propiedades cancerígenas (Díaz *et al.*, 2004); no

obstante, también se han mostrado efectos antitumorales (Suhr, 2002). La actividad anticancerígena de capsaicina parece ser una consecuencia de su capacidad para inducir apoptosis. Esta característica apoptogénica parece no ser mediada por el receptor vainilloide, según se ha demostrado en líneas celulares (Díaz *et al.*, 2004). Los capsaicinoides también son potentes antioxidantes (Ochi *et al.*, 2003, Henderson *et al.*, 1999). Este efecto no tiene que ver con el picor, porque tanto capsaicinoides como capsinoides demuestran tal actividad antioxidante (Ochi *et al.*, 2003, Rosa *et al.*, 2002).

Cuadro 1.2. Estructuras de capsaicinoides y capsinoides



*Compuestos no pungentes. Tabla tomada de Díaz *et al.*, 2004.

Los capsaicinoides se han utilizado en productos agroquímicos, por sus actividades antimicrobianas moderadas y antifúngicas (Molina-Torres *et al.*, 1999; Govindarajan *et al.*, 1987). Estos son capaces de inducir resistencia en plantas contra algunos hongos patógenos, aumentando los niveles de algunas enzimas involucradas en la defensa de la planta, tales como las quitinasas (Díaz *et al.*, 2004). Este papel en resistencia inducida, parece estar relacionada con el contenido de capsaicinoides (Suzuki y Iwai, 1984). Finalmente, aunque los capsaicinoides no tiene actividad insecticida, también se han reportados algunos efectos aleloquímicos (Kato-Noguchi y Tanaka, 2003).

1.7. Percepción del picor mediada por receptores de capsaicina

La capsaicina provoca dolor y ardor por la activación específica de los receptores (VR1). El receptor de la capsaicina que ha sido aislado corresponde a canal de cationes no selectivos con seis dominios transmembranales que está estructuralmente relacionado con un miembro del TRP (Transient Receptor Potential) (Tominaga y Julius, 2000). El dolor se inicia cuando las terminales periféricas de un subgrupo de neuronas sensoriales se activan por sustancias químicas nocivas o por estímulos mecánicos o térmicos. Estas neuronas, llamadas nociceptores, transmiten la información con respecto al daño del tejido a los centros de procesamiento del dolor en la médula espinal y cerebro. Los nociceptores se caracterizan, en parte, por su sensibilidad a la capsaicina (Caterina *et al.*, 1997). La exposición de los nociceptores a la capsaicina no sólo provoca la excitación de estas neuronas, pero también induce la liberación de varios mediadores inflamatorios, lo que sugiere que el objetivo de la acción de la capsaicina juega un papel importante en la detección del dolor y la inflamación de los tejidos (Tominaga y Julius, 2000).

1.8. Localización de los capsaicinoides en el fruto

Otha (1962) concluye que los capsaicinoides son secretados en el septo interocular en la placenta de los frutos de *Capsicum*. Por su parte, Iwai *et al.* (1979) y Suzuki *et al.* (1980) confirman que la placenta es el sitio de acumulación de los capsaicinoides en los frutos de Chile. Estos investigadores compararon la incorporación de fenilalanina -DL-[3-14C] en capsaicinoides, al incubar con aminoácido marcado aislados de *C. annuum*. Se observó que la incorporación de la radioactividad en los capsaicinoides fue mucho mayor en la placenta que en el pericarpio, concluyendo que la biosíntesis de los capsaicinoides

ocurría en la placenta.

1.8.1. Localización subcelular de los capsaicinoides

Fujiwake y colaboradores (1980) determinaron la localización de los capsaicinoides a nivel subcelular. Sus estudios los llevaron a la conclusión que los capsaicinoides se encuentran en su mayor parte en vesículas o vacuolas de las células epidérmicas del septo interocular de la placenta (Fujiwake *et al.*, 1980).

Zamski y colaboradores (1987) investigaron la síntesis y traslocación de los capsaicinoides en células que lo secretan. Estos autores observaron que los capsaicinoides se sintetizan en el interior del compartimento del retículo endoplásmico (ER), y que migran a través del citoplasma en algunas vesículas que se funden con el plasmalema. La cutícula de estas células se separa de las paredes durante este proceso, formando una cavidad subcuticular donde se acumulan los capsaicinoides en la fase de maduración (Zamski *et al.*, 1980).

La red genómica SOL (SNG; <http://www.sgn.cornell.edu>) es una base de datos central que integra datos bioquímicos y genómicos de la investigación sobre las solanáceas. Un componente de esta fuente de vías metabólicas de las solanáceas es SolCyc, la cual creó una fuente metabólica para CapCyc, en la base de datos específica para *Capsicum* dentro de SolCyc. Esto es fundamental para los estudios biológicos estructurales de la biosíntesis de capsaicinoides alrededor de la información metabólica que se encuentra en la literatura. El esquema metabólico de capsaicinoides no se ha actualizado en revisiones de las vías relacionadas en otros organismos. El modelo comprobable CapCyc para la biosíntesis de capsaicinoides fue desarrollado con base en la bibliografía y bases de datos metabólicos que incorpora el trabajo en *Capsicum*, relaciona géneros y organismos modelos (Figura 1.1). Este modelo combina el metabolismo de fenilpropanoides, benzenoide y la biosíntesis de los ácidos grasos de longitud de cadena ramificada, que fueron considerados clásicamente como parte de la biosíntesis capsaicinoides, e incluye más lejos la fenilalanina y la biosíntesis de cadena ramificada de aminoácidos. La síntesis de aminoácidos no se incluyó en la vía de biosíntesis de capsaicinoides, ya que los aminoácidos se consideran metabolitos "primarios" (Mazourek *et al.*, 2009).

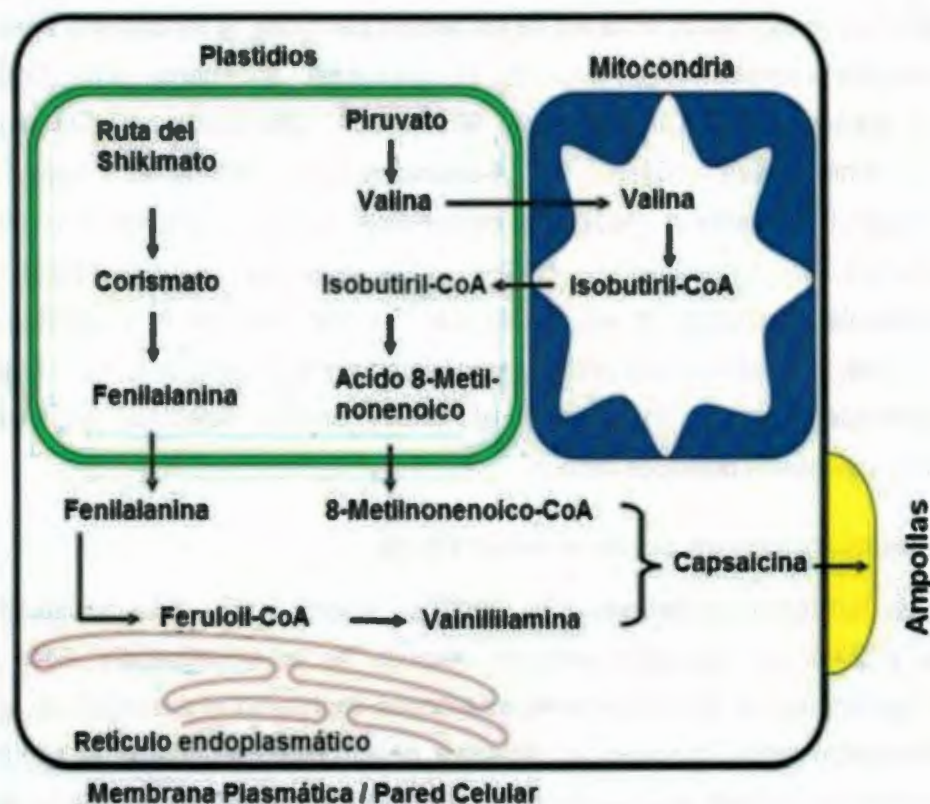


Figura 1.1 Biosíntesis subcelular de capsaicinoides. La vía de biosíntesis de capsaicinoides en la célula. Imagen modificada de Mazourek *et al.*, 2009.

1.9. Ruta de biosíntesis de los capsaicinoides

La capsaicina es una amida derivada de la vainillilamina y del ácido 8-metil 6-trans-nonenico (Bennett y Kirby, 1968). La molécula de vainillilamina en los capsaicinoides deriva de la fenilalanina, sintetizada por la ruta del shikimato/arogenato, mientras que la molécula de ramificación de los ácidos grasos se deriva de valina o leucina (Figura 1.2) (Díaz *et al.*, 2004). Stewart *et al.* (2005) y Mazourek *et al.* (2009) propusieron la participación de otras enzimas en la ruta de biosíntesis, tales como la 4-coumaroil-CoA ligasa (4CL), hidroxicinamoil transferasa (HCT), cafeoil CoA O-metiltransferasa (CCoAOMT; en lugar de la CoA e hidroxinamoil-CoA hidratasa/liasa (HCHL), la ruta de los fenilpropanoides está basada en las diferentes fuentes experimentales.

De las enzimas involucradas en la vía de los fenilpropanoides, la fenilalanina amonio liasa (PAL) convierte la fenilalanina en cinamato, el cual subsecuentemente es transformado en cumarato, 4-coumaroil-CoA, cafeoil-CoA, feruloil-CoA, vainillina y vainillilamina por la cinamato 4-hidroxilasa (C4H), la 4-coumaroil-CoA hidroxilasa ligasa (4CL), la hidroxicinamoil transferasa (HCT), la cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa (CCoAOMT), hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa (HCHL) y la presunta aminotrasferasa (pAMT), respectivamente (Mazourek *et al.*, 2009). La reacción final de la biosíntesis de los capsaicinoides, la condensación entre la vainillilamina y el ácido graso, es catalizada por la capsaicinoide sintetasa (Fujiwake *et al.*, 1980), enzima detectada en ensayos de actividad con extractos proteicos crudos.

1.10. Capsaicinoides en órganos vegetativos

En estudios realizados por Estrada *et al.* (2002) se reporta la presencia de capsaicinoides en hojas y tallos de *Capsicum annuum* después de su fructificación. Ellos también reportan que en plantas de la misma especie donde impidieron el desarrollo de los frutos, no se detectaron estos compuestos. Ishikawa *et al.* (1998) reportaron el contenido de capsaicinoides acumulado en la placenta de chile Jalapeño, también detectaron pequeñas cantidades de capsaicinoides en las hojas y tallos. Ruiz-Lau *et al.* (2010) reportaron, que a pesar de utilizar diversos métodos de detección, que no se encontraron capsaicinoides en órganos vegetativos de plantas de chile habanero en plantas regadas diariamente ni en plantas sometidas a estrés hídrico.

La fenilalanina amonio liasa es la primera enzima de la vía de los fenilpropanoides y también debe conducir a los capsaicinoides. La actividad de PAL se incrementa por diversos factores, tales como la luz, daño mecánico, invasión de microorganismos, exposición a polisacáridos fúngicos y por efectos de dilución en cultivos de células en suspensión (Martínez-Juárez, 2004). Se ha observado que la incorporación de fenilalanina a capsaicinoides es mejor cuando las actividades de PAL y C4H están debajo de su máximo nivel de actividad (Holden *et al.*, 1987). En el mismo estudio se observó que en la actividad de estas enzimas, en células inmovilizadas, fueron menores que en las células en suspensión. Dado que los cultivos de células inmovilizadas acumularon niveles más altos de capsaicinoides que los cultivos en suspensión, estos investigadores sugieren que

dichas enzimas quizás no regulan directamente la producción de esos compuestos.

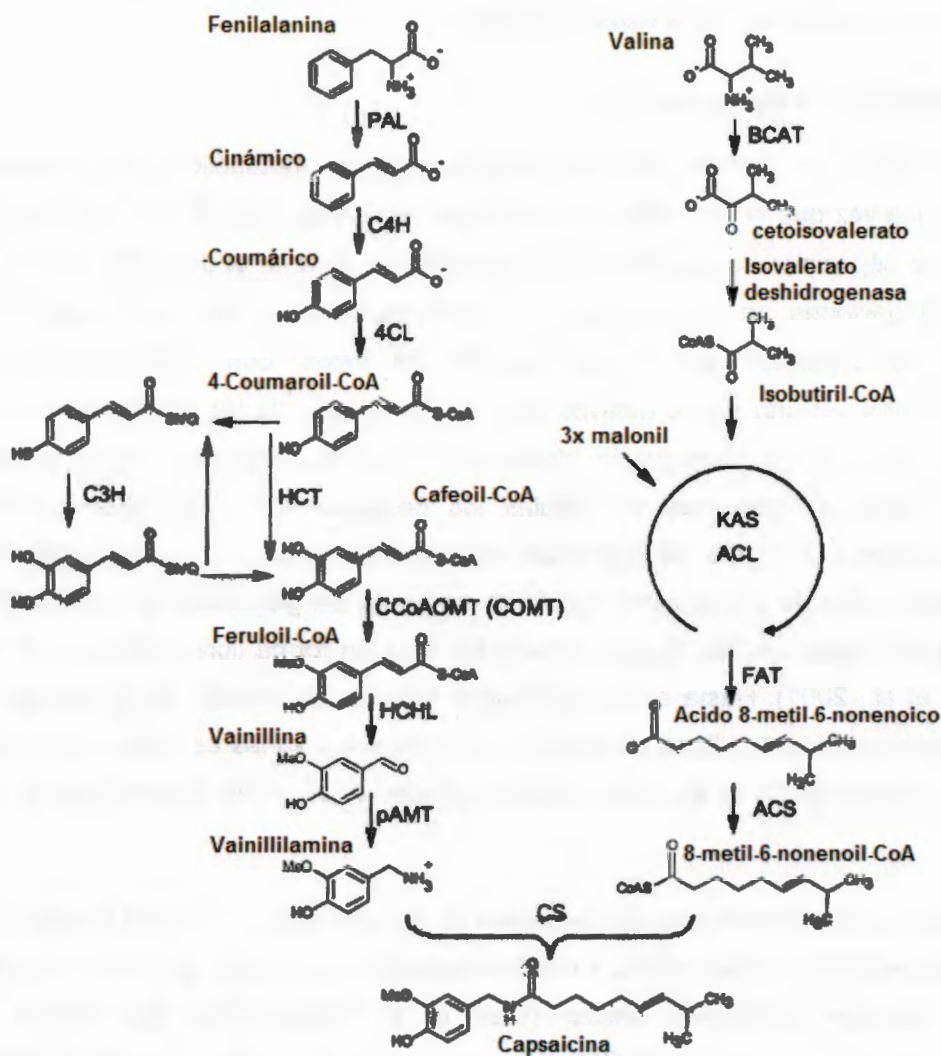


Figura 1.2. Vía propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides (Aza *et al.*, 2010); fenilalanina amonio liasa (PAL); cinamato 4-hidroxilasa (C4H); 4-coumaroil-CoA hidroxilasa ligasa (4CL); hidroxicinamoil transferasa (HCT), cafeoil-CoA 3-O-metiltransferasa (CCoAOMT), hidroxicinamoil-CoA hidratasa/liasa (HCHL) y la presunta aminotrasferasa (pAMT), transferasa rama de los amino ácidos (BCAT), ketoacil-ACP sintasa (KAS), proteína acarreadora (ACL), acil-ACP tioesterasa (FAT), acil-CoA sintetasa (ACS), capsaicinóide sintetasa (CS). COMT es indicada entre paréntesis, fue la enzima propuesta primeramente en la ruta de los capsaicinoides.

Adicionalmente, se ha reportado que la actividad de la PAL permanece constante durante el desarrollo del fruto y no cambia con el inicio de la síntesis de los capsaicinoides

(Yeoman *et al.*, 1989). Todos esos reportes sugieren que la PAL y la C4H no son limitantes para la biosíntesis de los capsaicinoides.

1.11. Conjugación y catabolismo

Los capsaicinoides se consideran productos finales de una vía metabólica y según Holden *et al.* (1987), una vez que se sintetizan en el fruto no son catabolizados. Sin embargo, es posible que los capsaicinoides puedan sufrir degradación durante el desarrollo del fruto. Algunas investigaciones en los últimos años han explicado cómo podría ocurrir el metabolismo de capsaicinoides. La conjugación de éstos, con azúcares y otros compuestos podría ser uno de los motivos para la disminución de los contenidos al final del desarrollo del fruto. La conjugación ofrece una forma de almacenar temporalmente compuestos fenólicos hasta que las células los necesiten en el metabolismo. Sin embargo, el análisis de frutos de *Capsicum annuum* var. *annuum* L. sólo revela una cantidad considerable de compuestos fenólicos en forma de glucósidos y vainillilamina mientras que los capsaicinoides fueron detectados sólo en forma libre (Materska *et al.*, 2003; Lorizzi *et al.*, 2001). Hasta ahora, los únicos reportes de síntesis del glucósido de capsaicina se han dado en cultivos de células de *Capsicum* y varias especies pungentes de *Capsicum* (Higashiguchi *et al.*, 2006; Martínez-Juárez *et al.*, 2004; Calva-Calva *et al.*, 1995).

Otra posibilidad para la disminución del contenido de capsaicinoides en frutos y cultivos *in vitro* es su degradación. La capsaicina y dihidrocapsaicina disminuyen en frutos después de que se observa destrucción celular (Díaz *et al.*, 2004). Esta disminución es aparentemente debida a la oxidación (Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002). Probablemente las células de las placentas de *Capsicum* tienen algunas enzimas capaces de oxidar capsaicinoides. Hay algunas pruebas que apunta a la peroxidasa (EC.1.11.1.7) como la enzima relacionada con el metabolismo *in vitro* de los capsaicinoides (Martínez-Juárez, 2004; Bernal *et al.*, 1993a y 1993b;).

1.12. Peroxidasas

Las Peroxidasas (Prxs) son enzimas oxidorreductasas que catalizan una reacción en la cual el peróxido de hidrógeno actúa como aceptor de hidrógeno y el otro compuesto actúa

como donador de átomos de hidrógeno (Thongsook, *et al.*, 2005). Estas enzimas frecuentemente responden al ácido salicílico, al ácido jasmónico o al etileno y se sabe que juegan un papel central en la defensa de plantas contra patógenos necrotróficos o biotróficos. Las proteínas inducidas durante la defensa de la planta juegan un papel en varias respuestas metabólicas. Las peroxidasas de plantas (clase III) (E.C.1.11.1.7; donador hidrogeno: H₂O₂ oxidorreductasa), están involucradas en un amplio rango de procesos fisiológicos en todo el ciclo de la vida de la planta, como la formación de lignina, suberina, el entrecruzamiento de la pared celular y síntesis de las fitoalexinas, participan en el metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Almagro *et al.*, 2009).

La mayoría de las peroxidasas son glucoproteínas que contienen un grupo hemo en el sitio activo, tienen la función primaria de oxidar compuestos a expensas de peróxido de hidrógeno y se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos vivos. Con frecuencia se presentan en un gran número de isoenzimas, las cuales extienden su rango de actividad. Se localizan generalmente en el citoplasma y/o en membranas, y en la mayoría de los casos se ha determinado que estas isoenzimas son productos de diferentes genes. También se han observado en ellas modificaciones postraduccionales, por lo cual se pueden encontrar diferentes peroxidasas en diferentes partes de la planta durante el crecimiento y desarrollo, durante los cambios ambientales; además, se pueden producir alteraciones en la especificidad por el sustrato debido a la interacción con fenoles (Campa, 1991).

1.12.1. Clases de peroxidasas en plantas

Las peroxidasas se encuentran en una gran variedad de organismos y se pueden clasificar en tres superfamilias en función de sus diferencias estructurales y propiedades catalíticas (Jouili *et al.*, 2011): entre las *peroxidasas animales* están la glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9), mieloperoxidasa (EC. 1.11.2.2) y peroxidasa tiroidea (EC.1.11.1.8); la *catalasa* (EC 1.11.1.6); y la *superfamilia peroxidasa de plantas*, estas últimas se pueden encontrar tanto en plantas, como en hongos, bacterias y levaduras (Welinder 1992). Basados en diferentes estructuras primarias, esta última superfamilia se puede dividir a su vez en tres clases bien diferenciadas; Welinder (1992) clasifica a las

hemoperoxidasas en tres clases tomando en cuenta su secuencia de aminoácidos y origen biológico, y tienen diferentes funciones y mecanismos de reacción (Cosio y Dunand 2009). La *clase I* incluye peroxidasas intracelulares de plantas y bacterias, encontradas en citosol o cloroplasto. La *clase II* está constituida por peroxidasas secretadas por hongos; son glucoproteínas monoméricas con cuatro puentes disulfuro y dos sitios conservados de unión a calcio. La *clase III* se integra por las peroxidasas de plantas; las cuales son glucoproteínas monoméricas con cuatro puentes disulfuro conservados y con dos sitios de unión a calcio (Schuller *et al.*, 1996).

1.12.2. Reacción general de las peroxidasas

La reacción general de las peroxidasas es la siguiente:



Existen tres tipos de reacciones en las que puede intervenir: reacciones peroxidativas, oxidativas e hidroxilativas.

La reacción catalizada por hemoperoxidasas clásicas es de deshidrogenación oxidativa. Aunque también catalizan una variedad de reacciones relacionadas, incluyendo la transferencia de oxígeno, la ruptura de peróxido de hidrógeno y halogenaciones peroxidativa.

La deshidrogenación oxidativa involucra el procesos de la transferencia de un electrón entre un oxo-hierro (IV) basados de las porfirinas – radical libre (ruta 2 en la Figura 1.3) o un oxo-porfirina (IV) (ruta 3 en la Figura 1.3) y una diversidad de sustratos orgánicos e inorgánicos, como peróxido de hidrógeno, hidroperóxidos orgánicos, perácidos, o los óxidos inorgánicos, tales como peryodato y el clorito. Como ejemplo de esta reacción es la polimerización espontánea de fenol y radical libre de anilina (Valderrama *et al.*, 2002).



La transferencia de oxígeno es desde el punto de vista de la síntesis, la transformación oxidativa catalizada por peroxidasas. Esta oxidación es comparable a las realizadas por monooxigenasas, tales como el citocromo P450. Las oxidaciones incluyen la oxidación heteroátomo (S-oxidación y N-oxidación), epoxidación, y enlace C-H oxidación (ruta 9 y

10 en Figura 1.3) (Valderrama *et al.*, 2002).

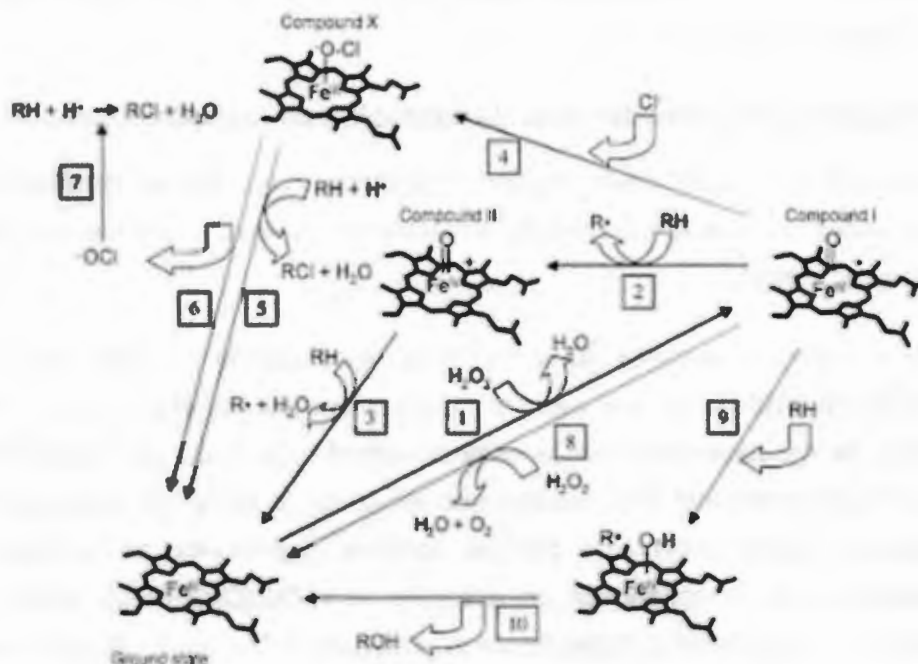


Figura 1.3. Resumen del mecanismo del ciclo de las peroxidasa (Valderrama *et al.*, 2002).

La descomposición del peróxido de hidrógeno se logra a través de la ruptura heterolítica de peróxido de hidrógeno, para formar agua (ruta 1 y 8 en la Figura 1.3). Las cloroperoxidasa exhiben una sustancial actividad de catalasa cuando el hidrógeno o peróxidos orgánicos son los reductores sólo está presente en la mezcla de reacción (Valderrama *et al.*, 2002). En los últimos años, una nueva clase de enzimas relacionadas con peroxidasa, el grupo de catalasa-peroxidasa, ha sido descubierta.



Por último, la halogenación peroxidativa es catalizada por una clase especial de peroxidasa llamada haloperoxidasas, que median la halogenación de sustratos orgánicos (rutas de 4-7 en la Figura 1.3). La halogenación peroxidativa no está limitada por hemoperoxidasas sino que también es catalizada por vanadio haloperoxidasas y otras enzimas no-hemo. Cloroperoxidasa de *Fumago caldariomyces* es la más activa contienen

hemo-haloperoxidasa.



Hemoproteínas no enzimáticas son capaz de catalizar reacciones como las peroxidasas (Valderrama *et al.*, 2002).

1.13. Papel de las peroxidasas en la oxidación de capsaicinoides

Las peroxidasas pueden estar relacionadas directamente con el metabolismo de los capsaicinoides, ya que la molécula de vainillina es fácilmente oxidada por esta enzima (Zapata *et al.*, 1992).

Uno de los primeros reportes de la oxidación de capsaicina por peroxidasas fue el de Boersch *et al.* (1991). En ese estudio, la capsaicina se transformó en un dímero. La oxidación de capsaicinoides por la enzima extraída de frutos de *Capsicum*, seguido espectrofotométricamente fue estrictamente dependiente de la presencia de H_2O_2 . Esto fue seguido experimentalmente por los cambios espectrales en la reacción y los capsaicinoides no se observaron en ausencia de H_2O_2 (Díaz *et al.*, 2004). En frutos también se ha observado la oxidación de capsaicinoides. Los cambios en el contenido de capsaicinoides en relación con la actividad de peroxidasa en los frutos fueron reportados por Contreras-Padilla y Yahia (1998), quienes describieron el aumento de capsaicinoides durante el desarrollo de frutos en chiles. Ellos observaron que las peroxidasas aumentaron su actividad cuando la concentración de capsaicinoides disminuyó al final de la maduración de los frutos. Esto sugiere que estas enzimas están involucradas en la degradación de la capsaicina. Poco después, Estrada *et al.* (2000) encontraron que el aumento en el contenido de capsaicinoides durante el desarrollo del fruto (42 días) no está sólo relacionado con el cambio en la actividad de peroxidasas, sino que también está relacionado con cambios de otras isoenzimas de peroxidasas.

1.13.1. Localización subcelular de las peroxidasas degradadoras de capsaicinoides

Dos grupos importantes de isoenzimas peroxidasas pueden distinguirse en frutos de *Capsicum*. El primer grupo está compuesto por peroxidasas ácidas (APrx) y el segundo grupo corresponde a isoenzimas básico (BPrx) (Bernal *et al.*, 1993c). En estas últimas se

encuentran dos subgrupos las peroxidasas de punto isoelectrico bajo (BPrx Lpl) y el segundo grupo de peroxidasas de alto punto isoelectrico (BPrx Hpl). Las peroxidasas APrx se encuentran unidas a la pared celular y en el espacio libre de la pared celular. El subgrupo de las peroxidasas BPrx Lpl, está localizada exclusivamente en pared celular, mientras el segundo subgrupo (BPrx Hpl) está localizado tanto en la pared celular y vacuola. Sin embargo, Pomar *et al.* (1997) demostraron *in vitro* que peroxidasas ácidas oxidaron capsaicina y es buen sustrato para esta enzima. Los ensayos histoquímicos de peroxidasas han mostrado que la enzima está principalmente localizada en la placenta y en la capa celular epidérmica de los frutos de chile (Bernal *et al.*, 1993c).

1.13.2. Oxidación de los capsaicinoides por la peroxidasas B₆

Los frutos de chile contienen una peroxidasa básica B₆ localizada en vacuolas, la cual fue principalmente medida por Bernal *et al.* (1994). La oxidación de la capsaicina por la peroxidasa B₆ de *Capsicum* fue monitoreada por la medición en el incremento de absorbancia a 262 nm. La peroxidasa B₆ es también capaz de oxidar los precursores fenólicos de capsaicina: ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico y vainillina (Bernal *et al.*, 1995).

1.13.3. Productos de oxidación de los capsaicinoides por peroxidasa de frutos de chile

Bernal y Ros Barceló (1996) investigaron los productos de oxidación de la capsaicina por peroxidasa B₆ de frutos de chile. Los tres principales de productos de oxidación que se identificaron fueron los dímeros de la capsaicina, 5,5'-dicapsaicina, el éter 4-O-5 dicapsaicina y un producto polimérico con 15 unidades con un copolímero de proteína y capsaicina. El grupo de ingeniería metabólica del CINVESTAV-IPN sólo identificó el dímero 5,5'-dicapsaicina en cultivos celulares de *Capsicum annuum* (Jalapeño Chigol) (Martínez-Juárez *et al.*, 2004). Además, un nuevo dímero no pungente derivado de capsaicina, el 6'', 7''-dihidro-5,5'-dicapsaicina, se aisló de frutos de *Capsicum annuum* (Ochi *et al.*, 2003). La estructura del dímero que ocurre naturalmente es similar al 5,5'-dicapsaicina y sólo difiere en que la primera es aparentemente un dímero de una molécula de capsaicina y el otro es de dihidrocapsaicina, y el segundo son dos moléculas de capsaicina. En cualquier caso, tanto el 6'', 7''-dihidro-5,5'-dicapsaicina como la 5,5'-

dicapsaicina estarían formadas por una reacción catalizada por peroxidasa.

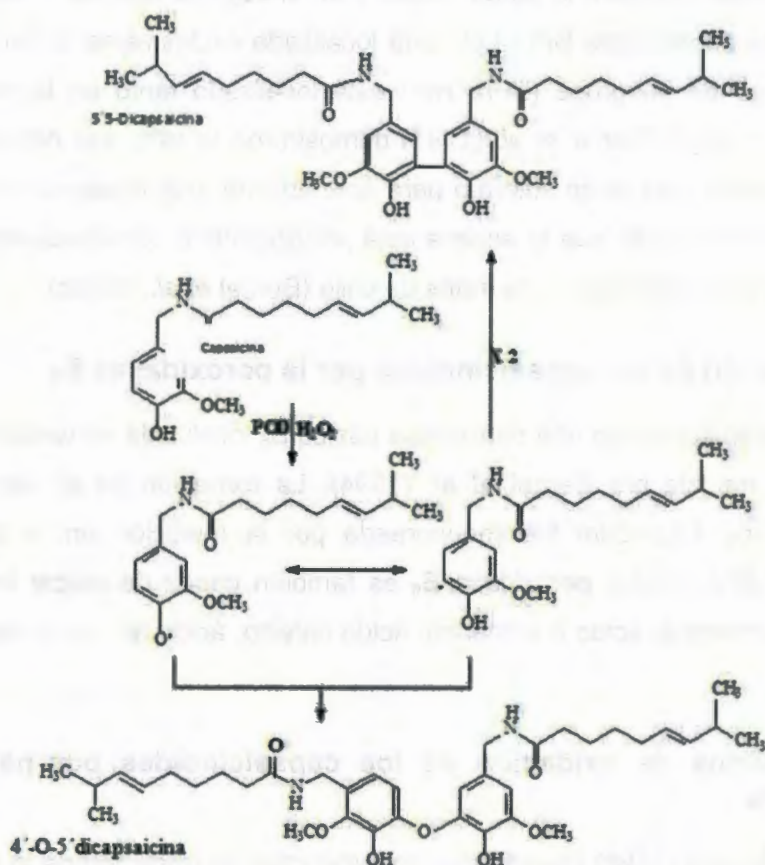


Figura 1.4. Esquema de reacción para la formación de 5,5'-dicapsaicina y el dímero éter 4'-O-5' dicapsaicina (Bernal y Ros Barceló 1996).

1.14. Efecto de factores ambientales sobre el contenido de capsaicinoides en frutos de chile

Asociado al comportamiento genético, el de picor en los frutos de *Capsicum*, depende de factores ambientales (Díaz *et al.*, 2004), como el tipo de suelo, propiedades osmóticas, componentes nutricionales y las deficiencias hídricas (Sung *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 1997). Las alteraciones producidas por el déficit hídrico en los metabolitos secundarios son complejas, porque afectan la adquisición de carbono y nutrientes así como el transporte de solutos. De esta manera la concentración de metabolitos secundarios puede disminuir o aumentar (Estrada *et al.*, 2000). De igual forma lo reportan Ruíz-Lau *et al.* (2010), observaron una mayor concentración de capsaicina en plantas de *Capsicum*

chinense Jacq., bajo condiciones de estrés hídrico cuando éstas se encontraban a 45 días en déficit hídrico después de la antesis; y una disminución en la actividad de la capsaicinoide sintetasa.

1.15. Hipótesis

Si el contenido de capsaicina en frutos de chile habanero sometidos a estrés hídrico es elevado, aún con una menor actividad de capsaicinoide sintetasa, entonces es posible que la actividad de las enzimas peroxidasas esté modificada en los frutos de las plantas estresadas.

1.16. Objetivo general

Estudiar el efecto del estrés hídrico sobre el metabolismo de capsaicinoides en frutos de chile habanero.

1.17. Objetivos específicos

1. Determinar el perfil del contenido de capsaicinoides en frutos de plantas de chile habanero sometidas a estrés hídrico.
2. Caracterizar las peroxidasas presentes en fruto de chile habanero relacionadas con el metabolismo de los capsaicinoides y la síntesis de la capsaicinoide sintetasa.
3. Dilucidar el papel de estas peroxidasas en la degradación de capsaicinoides en frutos de plantas de chile habanero sometidas a estrés hídrico.

1.18. Estrategia experimental

Para la obtención del material vegetal se trasplantaron 60 plantas de chile habanero de cuatro semanas de edad en condiciones semi-controladas en invernadero (radiación solar y plagas), donde se aplicó dos regímenes de riego (riego cada siete días y riego cada nueve días) cuando se inició la primera antesis, posteriormente se cosecharon los frutos a tres diferentes edades 25, 45 y 60 días después de la antesis, para los análisis de localización histoquímica de las peroxidasa, contenido de capsaicinoides, las actividades de peroxidasas y capsaicinoide sintetasa. La estrategia general se describe en la figura 1.5.

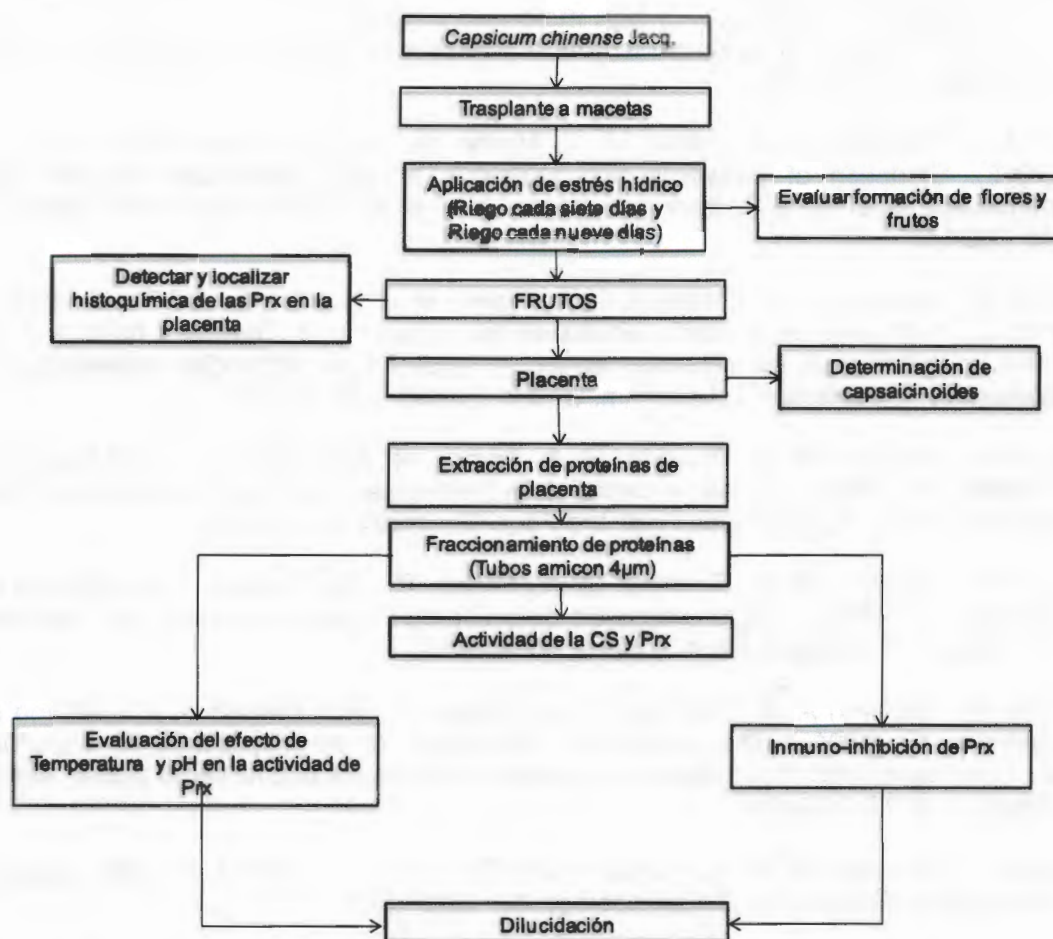


Figura 1.5. Diagrama de la estrategia experimental para la realización de este trabajo. CS, capsaicinoide sintetasa; Prx, Peroxidasa.

1.19. Referencias

- Almagro L., Gómez Ros L., Belchi- Navarro S., Bru R., Ros Barceló A., Pedreño M. (2009). Clase III peroxidases in plant defence reactions. *Journal Experimental Botany* Vol. 60 No. 2 pp. 377-390.
- Aza-González C., Nuñez-Pañuelos H., Ochoa-Alejo N. (2010). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports*, 30(5):695-706
- Bennett, D. J. and Kirby, G. W. (1968). Constitution and biosynthesis of capsaicin. *Journal Chemical Society*, 442-446.
- Bernal, M. A. and Ros-Barceló A. (1996). 5,5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3085-89.
- Bernal, M. A., Calderón, A. A., Ferrer, M. A., Merino de Cáceres, F. and Ros-Barceló, A. (1995). Oxidation of capsaicin and capsaicin phenolic precursors by the basic peroxidase isoenzyme B₆ from hot pepper. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 43: 352-55.
- Bernal, M. A., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Ferrer, M. A., Merino, F. and Ros-Barceló A. (1994). Purification of a basic peroxidase isoenzyme from *Capsicum* fruits and the immunoinhibition of its capsaicin oxidation capacity by antibodies raised against horseradish peroxidase. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199: 240-242.
- Bernal, M. A., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. and Merino de Cáceres, F. (1993a). Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (Var. *annuum*) fruits. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1041-44.
- Bernal, M. A., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. and Merino de Cáceres, F. (1993b). Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase. *Journal and Food Science*, 58: 611-613.
- Bernal, M. A., Calderón A. A., Pedreño, M. A., Muñoz, R., Ros Barceló A. and Merino de Cáceres, F. (1993c) The subcellular localization of isoperoxidases in *Capsicum annuum* leaves and their different expression in vegetative and flowered plants. *Annals Botany*, Vol. 72, 415-421.
- Boersch, A., Callingham, B. A., Lembeck, F. and Sharman D. F. (1991). Enzymic oxidation of capsaicin. *Biochemistry Pharmacology*, 41: 1863-1869.
- Borges-Gómez, L., Cervantes, C. L., Ruiz, N. J., Soria, F.M., Reyes, O.V., Villanueva, E. (2008). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. *Terra Latinoamericana* Vol. 28, 35-41.

-
- Calva-Calva, G., Narbad, A., Eagles, J., Parr, E. J. C., Rhodes, M. J., Walton, N. J., Amiot, M. J. and Robins R. J. (1995). Phenolic transformation by *Capsicum* spp. In: "Current trends in fruit and vegetables phytochemistry" (eds. Garcia-Viguera, C., Castañer, M., Gil, M. I., Ferreres, F. and Tomas-Barberan, F. A.) pp. 205-209. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain.
- Campa, A. (1991). Biological roles of plant peroxidase: Known and potencial function. En L. Everse, K. E. everse & M. B. Grisham, (Eds.). Peroxidases in chemistry and Biology. CRC Press. Boca Raton, pp.26-43
- Canul, N. L. G. (1996). Estudio sobre la primera fase, del cultivo *in vitro* de meristemos de chile habanero (*Capsicum chinense* L.). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2 "Ing. José Alberto Navarrete Ruiz". Conkal, Yucatán, México, pp. 4-5.
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., and Julius D. (1987). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389: 816-824.
- Contreras-Padilla, M. and Yahia E. M. (1998). Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chile pepper and relation with peroxidase activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46:2075–2079.
- Cosio, C., and Dunand C. (2009). Specific functions of individual class III peroxidase genes, *Journal Experimental Botany* Vol. 60, No. 2, pp. 391-408.
- Díaz, J., Pomar, F., Bernal, A., Merino, F. (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry, Reviews* 3: 141-157.
- Estrada B., Pomar F., Merino F., Bernal M. (1997). Effects of mineral fertilizer supplementation of fruit development and pungency in Padrón peppers. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology*, 73 (4): 493-497
- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F. and Merino, F. (2002). Capsaicinoids in Vegetative Organs of *Capsicum annuum* L. in Relation to Fruiting to Fruit. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1188-1191.
- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F. and Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6234-6239.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. and Iwai, K. (1980). Enzymatic formation of capsaicinoid from vanillylamine and Iso-type fatty acids by cell-free extracts of *Capsicum annuum* var. cv. Karatsubusa. *Agriculture Biology Chemistry*, 44: 2907-2912.
- Govindarajan V. S., Rajalakshmi, D. and Chand, N. (1987). *Capsicum*-production, technology, chemistry, and quality. Parte IV. Evaluation of quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 25: 185-282.
-

- Govindarajan, V. S. (1985). *Capsicum*: production, technology, chemistry, and quality. Part I: History, botany, cultivation, and primary processing. CRC. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 22: 109-176.
- Henderson, D. E., Slickman, A. M. and S. K. (1999). Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: a comparative study against BHT and melatonin. Journal Agricultural Food Chemistry, 47: 2563-2570.
- Higashiguchi, F., Nakumara, H., Hayashi, H. and Kometani T. (2006). Purification and structure determination of glucosides of capsaicin and dihydrocapsaicin from various *Capsicum* Fruits. Journal Agricultural Food Chemistry, 54: 5948-5953.
- Holden, M.A., Hall, R. D., Lindsey, K. and Yeoman, M. M. (1987). Capsaicin biosynthesis in cell cultures of *Capsicum frutescens*. In: Webb C, Mavituna F & Faria JJ (ed) Process Possibilities for Plant and Animal Cell Cultures, (pp. 46–63). Institute of Chemical Engineers, Pub. : Ellis Horwood, Chichester, England
- Ishika, K., Janos, T., Sakamoto, S., Nunomura, O. (1998). The contents of capsaicinoids and their phenolic intermediates in various tissues of the plants of *Capsicum annuum* L. *Capsicum*. Eggplant News, 17: 222-225.
- Iwai, K., Suzuki, T. and Fujiwake, H. (1979). Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. Agriculture Biology Chemical, 43: 2493-98.
- Jaimez, R. E. (2000). Crecimiento y distribución de la materia seca en ají dulce bajo condiciones de déficit de agua. Agronomía Tropical, 50: 189-200.
- Joulli, H., Bouazizi, H., and El Ferjani, E. (2011) Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. Acta Physiology Plant, 33: 2075-2082.
- Kato-Noguchi H. and Tanaka Y. (2003). Effects of capsaicin on plant growth. Biology Plantarum, 47: 157-159.
- Kobata, K., Sutoh, K., Todo T., Yazawa, S., Iwai, K. and Watanabe, T. (1999). Nordihydrocapsiate, a new capsinopid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*, Journal of Natural Products, 62: 335-336.
- Kobata, K., Todo T., Yazawa, S., Iwai, K. and Watanabe T. (1998). Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal Agricultural and Food Chemistry, 46:1695-1697.
- Krischbaum-Titze, P., Mueller-Seitz, E., Petz, M. (2002). Pungency in paprika (*Capsicum annuum*. 1. Decrease in capsaicinoids content following cellular disruption. Journal Agricultural and Food Chemistry, 50: 1260-1263.

- López, O. A., Trejo, L. C., Peña, V. C., Ramírez, A. C., Tijerina, C. L., Carrillo, S. J. (2008). Secado parcial de la raíz de jitomate: efectos en la fisiología de la planta y calidad del fruto. *Agricultura Técnica de México*, 34(3):297-302.
- Lorizzi, M., Lanzotti, V., De Marino, S., Zollo, F., Blanco-Molina, M., Macho, A. and Muñoz, E. (2001). New glycoside from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2022-2029.
- Martínez-Juárez, (2004). Tesis, Formación de 5,5'-dicapsaicina en cultivos de células de *Capsicum* sp. CINVESTAV- Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.
- Martínez-Juárez, Ochoa-Alejo; Lozoya-Gloria, Villareal-Ortega, Ariza-Castolo, Esparza-García, Calva-Calva (2004) Specific síntesis of 5,5'-dicapsaicin by cell suspension cultures of *Capsicum annuum* var. *annuum* (Chili Jalapeño Chigol) and Their Soluble and NaCl-Extracted cell wall protein fractions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52:972-979.
- Materska, M., Piacente, S., Stochmal, A., Pizza, C., Oleszek, W. and Perucka, I. (2003). Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot peeper fruit *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry*, 63: 893–898.
- Mattson, W., Haack, R. (1987). The role of Drought in the outbreak of the plant-eating insects *Bioscience* 37:110-118.
- May-Lara, C., Pérez-Gutiérrez, A., Ruiz-Sánchez, E., Ic-Caamal, E., García-Ramírez, A. (2011). Effect of moisture levels on growth and water potential of *Capsicum chinense* Jacq. and their relationship to the development of *Bemisia tabaci* genn. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 1039-1045
- Mazourek, M., Pujar, A., Borovsky, Y., Paran, I., Mueller, L., and Jahn, M. (2009). A Dynamic Interface for Capsaicinoid Systems Biology. *Plant Physiology*, Vol. 150, pp. 1806-1821.
- Molina-Torres, J., García-Chávez, A., and Ramírez-Chavez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used en Mesoamérica: affinin and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 241-248.
- Ochi, T., Takaishi, Y., Kogure, K. and Yamauti, I. (2003). Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products*, 66: 1094-1096.
- Otha, Y. (1962). Physiological and genetical studies on the pungency of *Capsicum*. IV. Secretory organs, receptacles and distribution of capsaicin in the *Capsicum* fruit. *Japanese Journal of Breeding*, 12: 179–183.
- Pedrol, N., Ramos, P., Reigosa, M. J., (2000). Phenotypic plasticity and acclimation to water deficits in velvetgrass: A ongterm greenhouse experiment. Changes in leaf

morphology, photosynthesis and stress-induced metabolites. *Journal of Plant Physiology*, 157:383-393.

Pire, R. y Colmenarez O. (1994). Extracción y eficiencia de recuperación de nitrógeno por plantas de pimentón sometidas a diferentes dosis y fraccionamientos del elemento. *Agronomía Tropical*, 46: 353-369.

Pomar, F., Bernal, A., Díaz, J., Merino, F. (1997). Purification, characterization and kinetic Properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46, 1313-1317.

Rosa, A. Deiana, M. Casu, V., Paccag, Nini, S., Appendino G, Ballero M and Dessi MA (2002). Antioxidant activity of capsinoids. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7396-7401.

Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., Minero-García, Y., Zamudio-Moreno, E., Guzmán-Antonio, A., Echevarría-Machado, I., and Martínez-Estévez, M. (2011). Water Deficit Affects the Accumulation of Capsaicinoids in Fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience*, Vol. 46 (3):487–492.

Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., Minero-García, Y., Torres-Tapia, L., Peraza-Sánchez, S., Martínez-Estévez, M. (2010). Capsaicinoids are in Habanero Pepper Vegetative Organs (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience*, Vol. 45:2 1-4.

Schuller, D., Bon N., Van Huystee R., McPherson A and Poulus T.,(1996). The cristal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4: 311-321.

Stewart, C., Kang, B. C., Liu, K., Mezourek, M., Moore, S. L., Yoo, E. Y., Kim, B. D., Paran, I., Jahn, M., (2005). The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant Journal*, 42:675-688.

Stewart, Jr. C., Mezourek, M., Stellari, G. Connell, M., Jahn, M., (2007) Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany* 58(5): 979-991.

Sung, Y., Chang, Y., Ting, N., (2005). Capsaicin biosynthesis in wáter-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46:42.

Surh, Y. J. (2002) More tan spice: Capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 1263-1265.

Suzuki, T. and Iwai, K. (1984) Constituents of red pepper species: Chemistry, biochemistry, pharmacology and food science of the pungent principle of *Capsicum* species. In Brossi A (ed.) *The Alkaloids*. Vol. 23, pages 227–299, Academic Press Inc. Orlando, Florida.

Suzuki, T., Fujiwake, H. and Iwai, K. (1980). Intracellular localization of capsaicin and its analogues, capsaicinoid, in *Capsicum* fruit 1. Microscopic investigation of the structure of the placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. *Plant Cell*

-
- Physiology, 21: 839–853.
- Thongsook, T., and Barrett, D. M. (2005). Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 3206-3214.
- Tominaga, M. and Julius D.(2000). Capsaicin Receptor in the Pain Pathway. *Japanese Journal Pharmacology*, 83: 20 – 24.
- Tun, J. (2001). Chile Habanero, Características y Tecnología de Producción. SAGARPA, INIFAP, Investigador del Campo Experimental Zona Henequenera, Mocochoá, Yucatán, México., pp. 74.
- Turner, N. C., Begg, J. E., (1981) Plant-water relations and adaptation to stress. *Plant Soil* 58, 97-131.
- Valderrama, B., Ayala, M., and Vazquez-Duhalt, R., (2002). Suicide inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chemistry & Biology*, Vol 9, 555-565.
- Vázquez-Flota, F., Miranda-Ham, Ma. L., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., Nieto-Pelayo, Y. (2007). La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Fitotecnica Mexicana*, Vol.30 (4):353-360.
- Welinder, K., (1992). Superfamily of plant fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2: 388-393.
- Yeoman, M. M., Holden, M. A., Hall, R. D., Holden, P. R. and Holland, S. S. (1989). Regulation of capsaicin synthesis in cultured cells of *Capsicum frutescens*. In: "Primary and secondary metabolism of plant cell cultures" (ed. Kurz, W. G. W.) pp. 162-174. Springer-Verlag, Berlin.
- Zamski, E., Shaoham, O., Palevitch, D. and Levy, A. (1987). Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cell in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivares. *Bot. Gaz*: 148:1-6.
- Zapata, J. Calderón, A. A., Muñoz, R. and Ros Barceló (1992). Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetics characteristics and substrate specificity. *American Journal Enology and Viticulture*, 43: 134–138.
- Zapata-Castillo P. (2005). Estudio sobre la morfogénesis *in vitro* del Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán.

CAPÍTULO II

EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE EL CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN PLANTAS DE *Capsicum chinense* Jacq.

2.1. Introducción

Los capsaicinoides son compuestos clasificados como pseudo-alcaloides y son amidas de C₉-C₁₁ provenientes de la condensación de ácidos grasos y de vainillilamina. Entre los más importantes, por su abundancia relativa, están la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Estos representan alrededor del 90% del total de los capsaicinoides (Ishimov *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la acumulación de los capsaicinoides inicia en las primeras etapas de desarrollo del fruto y alcanza su máxima acumulación al final de la fase de crecimiento (Zhen *et al.*, 2008; Contreras Padilla y Yahia 1998). Sung *et al.* (2005) reportan que el picor del fruto de *Capsicum annum*, var. Beauty Zest es afectado por el estrés hídrico, ocasionando un aumento en el contenido de capsaicinoides. Sin embargo, esto depende de la variedad. Ruiz-Lau *et al.* (2011) reportaron una mayor acumulación de capsaicinoides en frutos de plantas de chile habanero sometidas a estrés hídrico en dos etapas del desarrollo del fruto; 25 y 45 días posteriores a la antesis. Por lo tanto el objetivo de este capítulo es evaluar el efecto del estrés hídrico sobre el contenido de capsaicinoides a lo largo del proceso de desarrollo del fruto.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material biológico

Se utilizaron plantas de chile habanero (variedad seminis) de cuatro semanas de edad que presentaban una altura de 15 cm. Esta planta provenían del invernadero de Chicxulub, Yucatán, México (lat.21 °0.1' N; long. 89°34' W)

2.2.2. Trasplantes y condiciones en el invernadero

Las plantas de chile habanero de cuatro semanas fueron transferidas a bolsas negras con capacidad para 6 kg de suelo, con una mezcla de suelo y sustrato orgánico a base de turba (peat moss) (2:1 v/v). Posteriormente se colocaron en condiciones semi-controladas

de invernadero (radiación solar, riego y plagas).

2.2.3. Tratamiento de estrés hídrico

Para el experimento de estrés hídrico se utilizaron 20 plantas por tratamiento en bolsas independientes. El estrés hídrico se aplicó mediante la suspensión del riego. Se evaluaron dos tratamientos: riego cada siete (R7) y cada nueve días (R9). El riego fue de 1 L de agua por planta y como testigo las plantas fueron sometidas a riego diario. Los tratamientos se iniciaron después de la antesis.

2.2.4. Marcaje de flores y cosecha de frutos

Las flores se marcaron para registrar el día de la antesis y los frutos se cosecharon 10, 20, 25, 30, 40, 45, 50 y 60 días después de la antesis

El porcentaje de formación de frutos se calculó a partir del número de flores que se convirtieron en fruto, durante un lapso de 150 días de tratamiento.

2.2.5. Extracción y cuantificación de capsaicinoides

La placenta, extraída de los frutos cosechados a diferentes días después de la antesis fueron liofilizados y usados para la extracción de capsaicinoides donde se utilizó el protocolo de Ruiz-Lau *et al.* (2011), donde se pesó 0.1 g de placenta liofilizada, se adicionó 10 mL de acetonitrilo y se colocó a baño María a 80 °C durante 4 h, el sobrenadante se colectó y filtró utilizando filtros Millex-HV PVDF de 0.45 µm con jeringas de 10 mL, el filtrado se inyectó en el cromatógrafo líquido de alta resolución con luz ultravioleta (HPLC-UV).

Para la cuantificación de capsaicinoides se utilizó la metodología reportada Zamudio-Moreno (2007) donde se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de bomba cuaternaria, marca Agilent Technologies Series 1200, con detector de arreglo de diodos. La separación se efectuó en una columna Phenomenex ODS2 (5 µm), de 250 × 4.6 mm i.d. (Cheshire, England). Se realizó la elución en gradiente con dos fases móviles de ácido trifluoroacético (TFA) (A) y acetonitrilo (B), como sigue [Tiempo (min), 1 mM de TFA (%]): 0:70; 10:10; 15:10; 20:70; 25:70. La velocidad de flujo se mantuvo a 1 mL/minuto, y el detector se fijó en 230, 260 o 280 nm. Se registraron los espectros de

absorción del pico de la capsaicina. La integración del área bajo la curva se fijó en 230, 260 y 280 nm. Para la cuantificación de los capsaicinoides se realizó una curva estándar de capsaicina y dihidrocapsaicina en un rango de 50 a 1,500 μM .

2.3. Resultados

2.3.1. Efecto del estrés hídrico sobre la floración y fructificación en plantas de chile habanero

El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar la floración y fructificación en las plantas de chile habanero, que crecieron bajo condiciones de riego normal y de estrés hídrico. Con relación al efecto del estrés hídrico la sobrevivencia de las plantas de chile habanero, se observó que estas toleran la falta de agua hasta los nueve días ya que recuperan la turgencia en las 5 horas posteriores al riego. Sin embargo con respecto a la floración por planta se observa un efecto negativo de un 46 y 65% en los tratamientos de riego cada siete días y riego cada nueve días, respectivamente (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Número de flores y frutos de plantas en estrés hídrico.

	Testigo	R7	R9
Número de flores por planta	291.0 \pm 24.1	158.0 \pm 19.3	101.5 \pm 8.5
Floración (%)	100	54.29	34.7
Número de frutos por planta	80.0 \pm 7.4	40.0 \pm 5.2	12.5 \pm 3.5
Fructificación (%)	27.4	25.3	12.3

Testigo (C), Riego cada 7 días (R7), Riego cada 9 días (R9); n=20.

Las plantas sometidas a déficit hídrico en riego cada nueve días pudieron recuperarse debido a que no llegan a un punto de marchitez permanente (Figura 2.1). Esto ocurrió en las plantas regadas cada nueve días.



Figura 2.1. A) Plantas de chile habanero en ausencia de agua por nueve días, B) plantas que fueron regadas con 1 L de agua (5 horas después de su riego). Nótese la recuperación de turgencia en las plantas después del riego.

En las plantas testigo se etiquetaron 291 flores por planta y las sometidas a tratamientos riego cada siete días y riego cada nueve días se etiquetaron 158, y 101, respectivamente, obteniendo en fructificación un 27% del testigo con respecto a las flores etiquetadas, 25% y 12% a los tratamientos de riego cada siete días y cada nueve días, respectivamente .

Aquí podemos observar que el déficit hídrico reducen significativamente el número de flores y fruto por planta, lo que concuerda con el reporte de Jaimez *et al.* (2000), donde sugieren que la baja disponibilidad de agua en *Capsicum chinense* reduce el número de flores producidas y retarda la ocurrencia máxima de floración. Sin embargo, en el caso de la formación de frutos se observó que el estrés por siete días no tuvo efecto, pero después de nueve días el porcentaje de conversión de flores a frutos disminuyó notablemente con respecto al control (12 contra 27).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Ruiz-Lau (2008), donde la máxima producción de flores se registró en plantas regadas diariamente con un total de 183 flores por planta, mientras en estrés hídrico la producción fue de 130-140 flores/planta. La diferencia con nuestros resultados es probablemente a que se observan diferencias con

respecto al testigo, esto probablemente es debido a que los experimentos se llevaron a cabo en temporadas diferentes. Así, al igual que en el trabajo reportado por Jaimez *et al.* (2000), el estrés hídrico produce una clara reducción en la producción de flores y frutos por las plantas de *Capsicum chinense*.

2.3.2. Contenido de capsaicinoides en diferentes etapas de desarrollo del chile habanero

Los capsaicinoides se detectaron mayormente en placenta y en menores cantidades en pericarpio y semilla, tanto en los frutos de las plantas control como de las sometidas a estrés hídrico y a cualquier etapa de maduración (Cuadro 2.2). En pericarpio y semilla se encontró una mínima cantidad de capsaicinoides. Un hallazgo interesante fue que el estrés hídrico afectó negativamente la acumulación de capsaicina pero favoreció la de dihidrocapsaicina. Así, en promedio, la relación capsaicina/dihidrocapsaicina cambió de 3.04 en placenta de los frutos de plantas control a 1.55 en los frutos de plantas regadas cada siete días y a 1.42 en los frutos de plantas regadas cada nueve días. Es decir, el porcentaje de dihidrocapsaicina con respecto a capsaicina cambió de 32.9% en los frutos control a 64.5% y 70.4% en los frutos de plantas con riego cada siete y cada nueve días, respectivamente.

Cuadro 2.2. Distribución de capsaicinoides en frutos de chile habanero de plantas crecidas bajo estrés hídrico.

Testigo			Riego cada siete días			Riego cada nueve días		
Muestras	Cap (mg/g PS)	DHC (mg/g PS)	Muestras	Cap (mg/g PS)	DHC (mg/g PS)	Muestras	Cap (mg/g PS)	DHC (mg/g PS)
V Per	0.41	0.17	V Per	0	0	V Per	0.40	0.18
V Sem	0.65	0.29	V Sem	0.47	0.27	V Sem	1.18	1.06
V Pla	32.41	10.26	V Pla	30.30	22.81	V Pla	30.96	22.53
NV Per	0.38	0.16	NV Per	0.13	0	NV Per	0.29	0.09
NV Sem	0.97	0.66	NV Sem	0.46	0.22	NV Sem	0.96	0.64
NV Pla	38.54	13.15	NV Pla	29.25	17.29	NV Pla	24.09	17.96
M Per	0.65	0.26	M Per	0.12	0	M Per	0.311	0.1
M Sem	0.68	0.37	M Sem	0.58	0.42	M Sem	0.36	0.16
M Pla	34.96	11.45	M Pla	45.87	27.75	M Pla	24.78	15.75

Per, pericarpio; Sem, semilla; Pla, placenta; Cap, capsaicina; DHC, dihidrocapsaicina; PS, peso seco. V, verde; NV, naranja-verde; M, maduro.

Estos resultados no concuerdan con los reportes de Zhen *et al.* (2008) quienes cuantificaron el contenido de capsaicina en pericarpio y placenta en *Capsicum annuum* L., encontrando un alto contenido de capsaicina en placenta con 0.668 mg/g a los 22 días después de la floración, y en pericarpio con un 0.479 mg/g a los 29 días después de la floración. Aunque debe señalarse que los capsaicinoides detectados en semilla y pericarpio puede deberse a contaminación de estos tejidos durante el proceso de separación de las placentas del fruto. Por ejemplo Ruiz-Lau (2008), encontró mayor concentración de capsaicina en placentas de *Capsicum chinense* Jacq. con un valor de 62.90 mg/g PS a los 25 días de la anthesis y una mínima concentración en semilla de 0.67 mg/g PS y en pericarpio se encontró 4.14 mg/g PS. Pero estos compuestos se encontraron en estos tejidos posiblemente por una separación imperfecta entre el septo interlocular y el pericarpio. Así, los resultados en este trabajo concuerdan con Ruíz-Lau *et al.* (2011) donde encontraron mayor concentración de capsaicina en placenta y por lo tanto en los seguimientos experimentales sólo se trabajó con esta parte del tejido.

Por otro lado se reportado en la literatura que la concentración de metabolitos secundarios en las plantas depende de la edad, el estado nutricional y de los factores abióticos y además se han encontrado alteraciones en la producción de metabolitos secundarios en las plantas estresadas, produciendo un aumento en la síntesis y acumulación de estos metabolitos (Estrada *et al.*, 2000). En este trabajo se encontró que el estrés hídrico abate la producción de capsaicina pero estimula la de dihidrocapsaicina, lo que concuerda parcialmente con lo reportado por Estrada *et al.* (1999) y quienes encontraron que el estrés hídrico en plantas de *Capsicum* produjo un aumento en el contenido de capsaicinoides.

Reportes de Estrada *et al.* (1999) y Sung *et al.* (2005), encontraron que las condiciones ambientales y el estrés hídrico puede producir un aumento en la concentración de capsaicinoides en los primeros días de floración con 0.98 mg/g PS en frutos en déficit hídrico y 0.06 mg/g en frutos en tratamiento testigo en la variedad Beauty Zest, comparada con otras variedades como Hungarian y el Home Flavor, donde no hubo diferencia entre tratamientos.

2.3.3. Perfil de capsaicinoides en fruto de chile habanero de plantas crecidas en estrés hídrico

La capsaicina recambia y se degrada a otros productos debido a la actividad de peroxidases presentes en la placenta y epidermis del pericarpio (Bernal y Ros Barceló, 1996). Así, Contreras-Padilla y Yahia (1998) observaron un aumento de actividad de la peroxidasa en el momento que la concentración de los capsaicinoides empezó a disminuir, por ello se sugiere que algunas peroxidases de los frutos de *Capsicum* pudieran estar involucradas en la degradación y recambio de capsaicinoides, desempeñando un papel central en el catabolismo natural de estos compuestos y por lo tanto en el contenido total en los frutos testigo y sometidas a estrés hídrico (Figura 2.3); asimismo, mostraron que el contenido de capsaicinoides llega a un máximo independiente del tratamiento hídrico, después del cual parece mantenerse constante. La síntesis inició alrededor de los 20 días después de la antesis, pero a los 25 días el contenido de capsaicinoides en los frutos de plantas sometidas a estrés hídrico cada nueve días fue dos veces en comparación con las plantas testigos. Los resultados para las plantas regadas cada siete días fueron similares a los del testigo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Sung *et al.* (2005), donde al inicio de la floración y en plantas sometidas a déficit hídrico se observó un alto contenido de capsaicinoides comparados con el testigo. A los 45 días después de la antesis, el contenido en el testigo fue menor con 105.98 mg/g PS comparado con los tratamientos de riego cada siete días y de riego cada nueve días, pero a los 50 días en el testigo y el riego cada nueve días no se obtuvieron diferencias, y en este punto el estrés con riego cada siete días mostró un aumento del contenido de capsaicinoides, posteriormente el testigo y el tratamiento de riego cada siete días mostraron una caída, estos resultados concuerdan con lo reportado por Contreras-Padilla (1998) y Zhen *et al.* (2008), quienes observaron la disminución de capsaicina en los días 50 después de la floración en plantas de *Capsicum*.

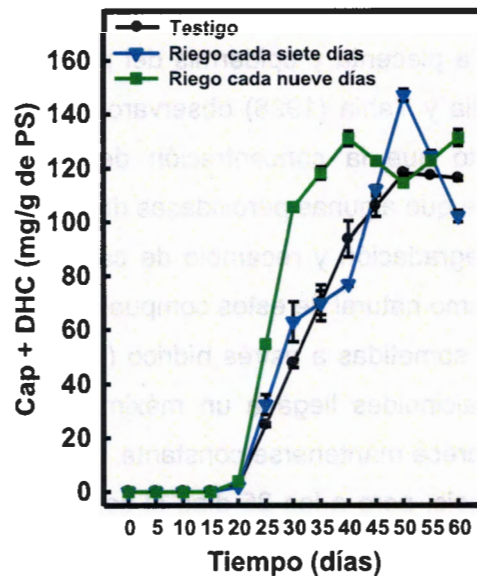


Figura 2.3. Curso temporal del contenido de capsaicinoides en placentas de fruto de chile habanero sometidas a estrés hídrico. Capsaicinoides (Cap + DHC). Las barras verticales indican el error estándar, n=3.

2.4. Conclusiones

El estrés hídrico afectó la producción de flores de chile habanero en los tratamientos riego cada siete y nueve días en un 45.7 y 75.3%, respectivamente.

El estrés hídrico no afectó el porcentaje de flores que se convirtieron en frutos.

El estrés hídrico afectó negativamente la acumulación de capsaicina pero favoreció la de dihidrocapsaicina, en plantas sometidas a estrés.

2.5. Referencias

- Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez, O. J. L. (1998). Respuesta de plantas de aguacate cv Hass bajo condiciones de sequía. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 2: 191-198.
- Bernal, M. A. and Ros-Barceló, A. (1996). 5,5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3085-89.
- Contreras-Padilla, M. and Yahia, E. M. (1998). Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chile pepper and relation with peroxidase activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46:2075–2079.
- Estrada, B., Pomar, F., Díaz, J., Merino, F., Bernal, M. A. (1999). Pungency level in fruits of the Padrón pepper with different water supply. *Scientia Horticulture* 81: 385-396.
- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F. and Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6234-6239.
- García, A., Florido, M., Regla, M. (2003). Estudios bioquímicos para la selección in vitro de variedades de arroz con tolerancia a estrés hídrico. *Biotecnología Vegetal*, 3: 181-186.
- Ishimov, U. Zh., Ziyavitdinov, Zh. F., and Sagdiev, N. Zh. (2011). Minor constituents of total capsaicinoids from *Capsicum annuum*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 46 No. 6.
- Jaimez, R., Vielma, O., Rada, F. and García-Núñez, C.(2000). Effects of water deficit on the dynamics of flowering and fruit Production in *Capsicum chinense* Jacq in a Tropical Semiarid Region of Venezuela. *Journal Agronomy & Crop Science* 185: 113-119.
- Plaut, Z., (1995). Sensitivity of crop plants to water stress at specific developmental stages: Reevaluation of experimental findings. *Israel Journal Plant Sciences*, 43: 99-111.
- Ruiz-Lau N., (2008). Efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo de capsaicinoides en frutos y órganos vegetativos en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Tesis de Maestría, CICY.
- Ruiz-Lau N., Medina-Lara F., Minero-García Y., Zamudio-Moreno E., Guzmán-Antonio A., Echevarría-Machado I., and Martínez-Estévez M.,(2011). Water Deficit Affects the Accumulation of Capsaicinoids in Fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience* Vol. 46 (3):487–492.
- Sung, Y., Chang, Y., Ting, N., (2005). Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper

fruits. Botanical Bulletin of Academia Sinica 46:42.

Zamudio-Moreno, E. (2007). Tesis de Maestría. Dimerización enzimática de capsaicinoides por proteína enlazada iónicamente a pared de células de *Capsicum* spp. crecidas *in vitro*. TESE y CINVESTAV-IPN (Departamento de Biotecnología y Bioingeniería).

Zhen-Zhang, Liu Shi-qi, Qi Lian-dong and Xu Li, (2008). Changes in Capsaicin, Flavonoid, Free Phenolics and Enzyme Activity during Development of Pepper Fruit. Acta Horticulture, 768.

CAPÍTULO III

EFFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO SOBRE LA ACTIVIDAD DE PEROXIDASA Y CAPSAICINOIDE SINTETASA DE FRUTOS DE *Capsicum*

3.1. Introducción

Las peroxidasas (EC.1.11.1.7) de *Capsicum* son capaces de oxidar capsaicinoides, y están relacionadas directamente con el metabolismo de éstos. El primer reporte de la oxidación de la capsaicina por una enzima peroxidasa fue por Boersch *et al.* (1991), quienes encontraron un dímero; posteriormente, Bernal y Ros Barceló (1996), reportaron la oxidación de la capsaicina y dihidrocapsaicina por peroxidasas de *Capsicum annuum*. Estos autores detectaron los dímeros de la capsaicina 5,5'-dicapsaicina, el éter 4'-O-5 dicapsaicina y un copolímero de grado 15. Estos autores mencionan que las peroxidasas de *Capsicum* están situadas en el lugar adecuado para la oxidación de los capsaicinoides, estableciendo el mejor pH de la oxidación cerca de 6.0 donde mostraron una buena adaptación de la reacción enzimática a la acidez encontrada en vacuolas. Bernal *et al.* (1993a) reportaron dos tipos de peroxidasas encontradas en *Capsicum*, las peroxidasas ácidas (APrx) y las peroxidasas básicas (BPrx), subdividiéndose esta última en peroxidasa básicas con alto punto isoeléctrico (BPrx Hpl) y con bajo punto isoeléctrico (BPrx Lpl), logrado demostrar que una peroxidasa del tipo BPrx Hpl oxidaba a los capsaicinoides a la cual denominaron B₆.

El objetivo de esta sección fue evaluar el efecto del estrés hídrico sobre la actividad de peroxidasas y capsaicinoide sintetasa de frutos de *Capsicum chinense* Jacq.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material biológico

Se utilizaron plantas de chile habanero cultivadas bajo estrés hídrico, véase acápite 2.2.2, 2.2.3 y las flores fueron contadas y etiquetadas para registrar el día de la antesis. Los frutos se colectaron a los días 25, 45 y 60 días después de la antesis (DDA), se separó la placenta, se pesó 1 g mismo que se almacenó a -80 °C para posterior extracción de proteínas.

3.2.2. Localización histoquímica de las peroxidasas en placenta de chile habanero

La localización histoquímica de las peroxidasas en frutos de chile se realizó por impresión del tejido en membranas de nitrocelulosa, siguiendo la metodología de Bernal *et al.* (1994b). Para ello se redujo la extremidad del pedúnculo de chiles congelados. Los cortes descongelados de frutos se colocaron sobre una membrana de nitrocelulosa y se presionaron por 30 s. Posteriormente, la membrana se reveló en una disolución que contenía 1.0 mmol/L de 4-metoxi- α -naftol, 0.1 mmol/L H_2O_2 , y 50 mmol/L de buffer Tris acetato (tris [hidroximetil] aminometano) (pH 5.0), por 10 minutos a temperatura ambiente. Los controles se llevaron a cabo en ausencia de H_2O_2 . Después de la tinción, las membranas se enjuagaron con agua destilada secaron al aire y fueron fotografiada.

3.2.3. Extracción y cuantificación de proteínas totales a partir de placentas de frutos de chile habanero

Para la extracción de proteínas totales se basó en el método de Zamudio-Moreno (2007). Se tomó 1 g de tejido fresco de placenta, se maceró en un amortiguador 50 mM de Tris-HCl pH 7 y 1 M NaCl, 1 mM ditioneitol (DTT), 5% glicerol, 0.1 mM fenilmetilsulfofluoruro (PMSF), 40 mM EDTA, 0.2% de polivinilpirrolidona (PVPP), por 30 minutos a 4 °C, en una proporción de 1 g de biomasa con 3 mL de amortiguador. Posteriormente, el homogenado se centrifugó 8000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante conteniendo las proteínas totales fue colectado. Este extracto proteico fue concentrado en un tubo Amicon ultra-0.5 mL 3K para retirar la capsaicina endógena del extracto, el concentrado proteico se usó para los análisis enzimáticos.

La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford (1976) utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

3.2.4. Oxidación de capsaicina mediada por peroxidasas

Para desarrollar el ensayo de la actividad de peroxidasas la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 1 mL conteniendo capsaicina 250 μ M, H_2O_2 150 μ M, extracto de proteína 10 μ g, amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, la mezcla de reacción se incubó por 2 h a 30 °C y se detuvo con la adición de acetato de etilo (3 veces), que a la vez sirvió

para extraer los productos de reacción. El acetato de etilo se evaporó con una corriente de N₂ libre de oxígeno y el residuo se resuspendió con 500 µL de etanol absoluto grado HPLC se filtró utilizando filtros Millex-HV PVDF de 0.45 µm, en jeringa de 3 mL. Para la cuantificación de capsaicina se utilizó el equipo HPLC-UV.

3.2.5. Condiciones para ensayo de la peroxidasa que degrada la capsaicina

3.2.5.1. Determinación de la cantidad de proteínas para el ensayo de peroxidasa.

En este caso se utilizó en los ensayos concentraciones del extracto proteico de 10 a 100 µg de proteína. La actividad de peroxidasa se realizó en Tris-HCl 50 mM a pH 7, que contenía 500 µM de capsaicina y 150 µM de H₂O₂ en un tiempo de reacción de 120 minutos a 30 °C, la concentración de enzima adecuada se utiliza para los ensayos posteriores (Martínez-Juárez *et al.*, 2004).

El tiempo se varió desde 20 a 120 minutos en intervalos de 20 minutos con la finalidad de encontrar el tiempo donde había una actividad enzimática máxima y esta condición se tomó como el tiempo necesario para la actividad.

3.2.5.2. Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de peroxidases

La temperatura se varió desde 10 hasta 60 °C, en intervalos de 10 °C con la finalidad de encontrar la temperatura estable para una actividad enzimática máxima y estableciéndose que la °C es la condición adecuada de temperatura para ensayo de actividad. Para evaluar el efecto del pH, se utilizó amortiguador de citrato en un rango de pH de 3.0 - 6.0 a 100 mM y amortiguador de fosfato en un rango de pH de 6.0 - 8.0 100 mM, al encontrar la región de máxima actividad esta condición se tomó como el pH óptimo.

3.2.6. Ensayo para la actividad de capsaicina sintetasa (CS)

Para el ensayo de la enzima CS se empleó el método de Govindaswan y Ravishankar (2003), utilizando la siguiente mezcla de reacción: amortiguador de fosfato 0.5 mM, pH 6.8, MgCl₂ 1 µM, ATP 1 µM, clorhidrato de vainillilamina 5 µM, ácido 8-metil - nonenoico 5 µM, en volumen final de 500 µL. Se tomaron 200 µL de la mezcla y 62 µg de proteína, aforando con agua destilada a un volumen final de 500 µL. La reacción se llevó a cabo en

baño María a 37 °C durante 2 h y se detuvo con etanol frío al 98%. La extracción del producto formado durante la reacción (capsaicina) se realizó por cuatro veces sucesivas con 500 µL de acetato de etilo. Después se evaporó con una corriente de N₂, libre de oxígeno y el residuo se resuspendió con 500 µL de etanol absoluto grado HPLC, se filtró utilizando filtros Millex-HV PVDF de 0.45 µm, en jeringa de 3 mL para la cuantificación se utilizó el equipo HPLC-UV.

3.2.7. Cuantificación de capsaicoides

Se utilizó la metodología reportada por Zamudio-Moreno (2007) donde se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de bomba cuaternaria, marca Agilent Technologies Series 1200, con detector de arreglo de diodos. La separación se efectuó en una columna Phenomenex ODS2 (5 µm), de 250 × 4.6 mm i.d. (Cheshire, England). Se realizó la elución en gradiente con dos fases móviles ácido trifluoroacético (TFA) (A) y acetonitrilo (B), como sigue [Tiempo (min), 1 mM de TFA (%): 0:70; 10:10; 15:10; 20:70; 25:70. La velocidad de flujo se mantuvo a 1 ml/minuto, y el detector se fijó en 230, 260, o 280 nm. Se registraron los espectros de absorción del pico de la capsaicina. La integración se fijó en 230, 260 y 280 nm. Para la cuantificación de los capsaicoides se realizó una curva estándar de capsaicina y dihidrocapsaicina en un rango de 10 a 300 µM.

3.2.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)

3.2.8.1. Desarrollo de la electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes

Se siguió la técnica descrita por Laemmli (1970), preparando los geles al 10%, donde el gel separador contenía: H₂O destilada, 4.1 mL; Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 2.5 mL; SDS 20% (w/v), 0.05 mL; Acrilamida/Bisacrilamida (30:0.8), 3.3 mL; Persulfato de amonio (10%), 0.05 mL; y por ultimo TEMED 0.01 mL. Después de 20 minutos aproximadamente se realizó el gel concentrador que contenía: H₂O destilada, 3.075 mL; Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8, 1.25 mL; SDS 20% (w/v), 0.025 mL; Acrilamida/Bisacrilamida (30:0.8), 0.67 mL; Persulfato de amonio (10%), 0.025 mL; y por ultimo TEMED 0.01 mL.

El gel separador se cargó con 60 µL de muestra (20 µg de proteína), se calentó a 100 °C por 5 min y se diluyó 1:4 con buffer de carga. La muestra se corrió a voltaje constante por 20 minutos a 40 V seguido de 1 h a 100 V.

La composición del buffer de corrida 5X, pH 8.3, para un litro contenía: Tris Base 15 g,

glicina 72 g, SDS 5 g.

3.2.8.2. Desarrollo de la electroforesis bajo condiciones no desnaturizantes

Se siguió la metodología de Martínez-Juárez (2004), donde la preparación del gel contenía: H₂O destilada, 4.6 mL; Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 2.25 mL; Acrilamida/Bisacrilamida (30:0.8), 2.088 mL; Persulfato de amonio (10%), 0.05 mL; y por último TEMED 0.01 mL. Después de 20 minutos aproximadamente se realizó el gel concentrador que contenía: H₂O destilada, 1.5 mL; Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8, 0.68 mL; Acrilamida/Bisacrilamida (30:0.8), 0.025 mL; Persulfato de amonio (10%), 0.025 mL; y por último TEMED 0.01 mL.

El gel preparado se cargó con 60 µL de muestra (20 µg de proteína), con buffer de carga 1x. La muestra se corrió a voltaje constante por 20 min a 50 V seguido de 1 h a 115 V. El buffer de corrida 5X, a pH 8.3 para un litro: Tris Base 15 g, Glicina 72 g, y se ajusta a un litro.

3.2.8.3. Identificación de proteína en los geles de acrilamida

Una vez concluida la corrida del gel, se procedió a la tinción por método azul de Coomassie donde se fijó el gel en una solución que contenía 50% de Metanol, 7% ácido acético, posteriormente fue teñido durante una hora con 0.2% de azul coomassie, 25% de metanol y 10% de ácido acético y para desteñirlo se adiciono una solución que contenía 10% ácido acético y 25% de metanol esta las veces necesarias hasta observar bandas. Después fotografía el gel y se seca con papel celofán dulce para conservación.

3.2.8.4. Zimogramas contra guayacol en geles no desnaturizantes

Para la zimografía el gel se hidrató con una disolución de 50 mM Tris-HCl a pH 7, durante 30 minutos. Después de retirar esta disolución, se le adicionó la disolución para detectar la actividad de peroxidasas (Tris-HCl 50 mM pH 7 con guayacol 80 mM y H₂O₂ 80 mM) en gel.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Localización histoquímica de las peroxidasas en placenta

Las peroxidasas se localizaron en la placenta y en el pericarpio de todas las plantas independientemente del tratamiento (Figura 3.1). Se percibió un aumento en la tinción en los frutos de aquellas plantas sometidas al estrés. También, la tinción se observó en las orillas del pericarpio, esto es debido a que hay peroxidasas en todo el fruto. En el testigo donde no se utilizó H₂O₂, la tinción no fue observada (Figura 3.1).

Los frutos de chile (*C. annuum var. annuum*) contienen peroxidasas B₆, localizadas en la vacuola. Bernal *et al.* (1994b) observaron la localización histoquímica de la actividad de las peroxidasas donde los resultados revelaron que al igual que la capsaicina, las peroxidasas se encuentran en la placenta y en las capas externas de las células epidérmicas. Sung *et al.* (2005) reportaron una alta tinción del producto de la actividad de peroxidasas en las placentas de los chiles Beauty Zest en los tiempos 40 y 50 días después de la floración. Así el objetivo del presente experimento fue corroborar la presencia de la tinción del producto de la actividad de las peroxidasas en el mismo lugar donde se ha reportado la presencia de capsaicinoides en frutos de plantas pertenecientes al género *Capsicum*, lo que nos sugiere que las peroxidasas pudieran estar involucradas en la degradación de capsaicinoides.

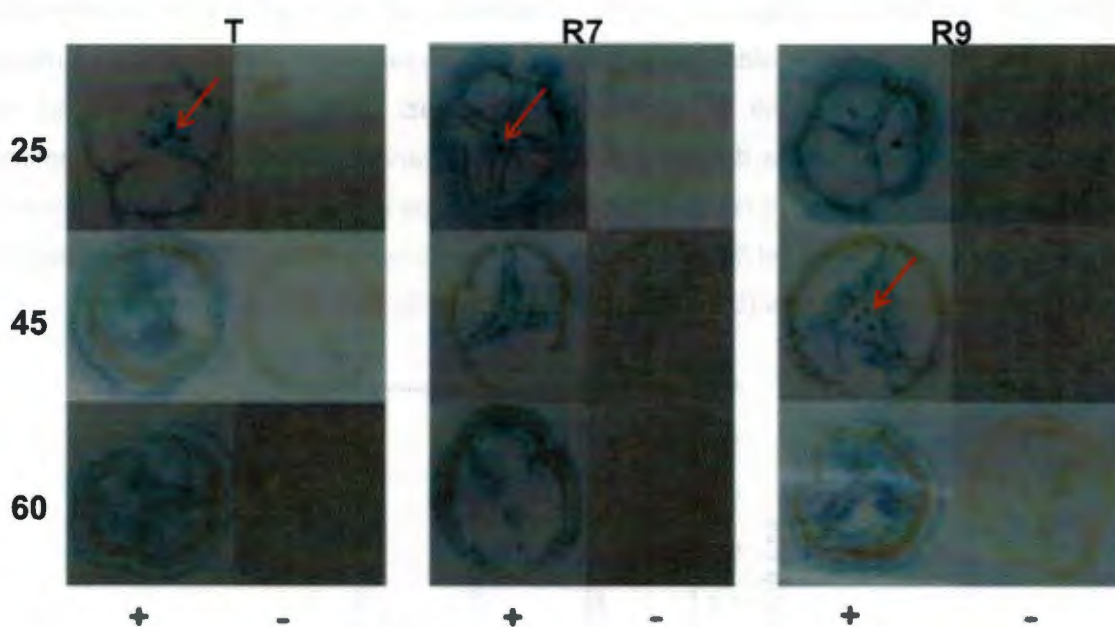


Figura 3.1. Localización histoquímica de las peroxidasa en chile habanero. Las flechas indican la localización de las peroxidasa; se utilizaron frutos de 25, 45 y 60 días después de la antesis. T, testigo; R7, riego cada 7 días; R9, riego cada 9; +, presencia de H_2O_2 ; -, ausencia de H_2O_2

3.3.2. Determinación de proteínas totales en placentas de chile habanero

El mayor contenido de proteína se observó en las plantas sometidas a estrés a riego cada nueve días en los tiempos 25 y 45 días después de la antesis, muestra que el menor contenido de proteína se obtuvo en plantas regadas cada siete días en el tiempo 25 días después de la antesis. Los contenidos de proteínas presentes en las plantas testigo disminuyeron con el tiempo de cultivo, lo que es lógico por la necesidad de los frutos de producir semillas fértiles y la fuente de proteínas para el desarrollo de estas en la placenta.

Como se menciona anteriormente, la tendencia del contenido de proteínas en las placentas de los frutos de las plantas estresadas es al aumento, lo que nos indicaría la capacidad de la planta de movilizar o incrementar la síntesis de proteínas en las zonas más vulnerables y apoyar el desarrollo de las semillas como fuente de material genético para perpetuar la especie ante condiciones de estrés.

Como la disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes para determinar la supervivencia de las plántulas, las semillas pueden responder al cambio en el medio ambiente hídrico, así como a la temperatura, la luz, gases, y la disponibilidad de nutrientes. Los mecanismos de latencia complejos y variados exhibidos por las semillas son el resultado evolutivo de la selección de semillas que con éxito se puede interpretar la información ambiental con el fin de iniciar el crecimiento en un momento favorable para el establecimiento de plántulas (Elberse and Breman, 1990).

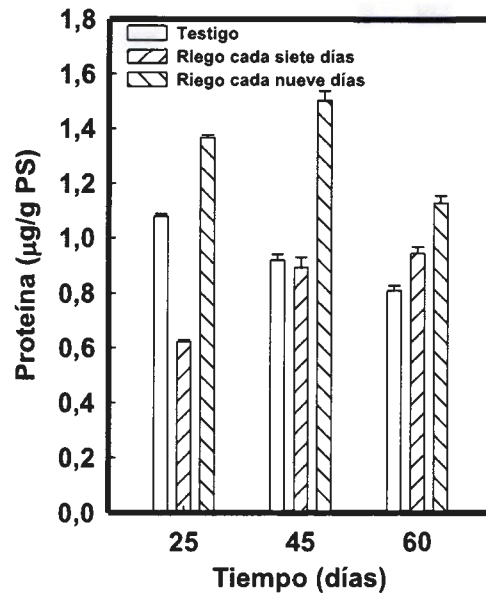


Figura 3.2. Contenido de proteína soluble en la placenta de los frutos de plantas de chile sometidas a estrés hídrico.

En los resultados se observa un mayor estímulo de proteína en las plantas sometidas a un régimen de riego de cada nueve días; este resultado es similar al reportado por Ahmad Anjum *et al.* (2012), donde cuantifican proteína en dos variedades de *Capsicum annuum* y observa que a mayor estrés hídrico hay un aumento en el contenido de proteína.

3.3.3. Establecimiento de las condiciones para la determinación de la actividad de las peroxidasas contra capsaicina

3.3.3.1. Efecto de la concentración de proteína

La mayor cantidad de capsaicina consumida en la mezcla de reacción se obtuvo a los 60 µg de proteína, este valor fue mayor, significativamente obteniendo 40 µg. Por lo tanto, se

utilizó 60 μg de proteína para los ensayos enzimáticos para peroxidasas y para la evaluación de los siguientes parámetros: tiempo de reacción, temperatura y pH.

Con respecto a la concentración del extracto proteico para los ensayos enzimáticos de peroxidasa en la literatura no reportan este dato que utilizan para dichas reacciones (Zhen *et al.*, 2008; Contreras-Padilla y Yahia, 1998; Bernal y Ros Barceló 1996). En un estudio previo (Zamudio-Moreno, 2007), se reportó la actividad de la peroxidasa de proteína iónicamente enlazada a pared de *Capsicum annuum* var. Chigol donde utilizan 10 μg de un extracto proteico parcialmente purificado para las actividades de peroxidasas con 500 μM de capsaicina y en un tiempo de reacción de 120 minutos, donde se observaron un consumo de capsaicina de hasta el 90% (Figura 3.3).

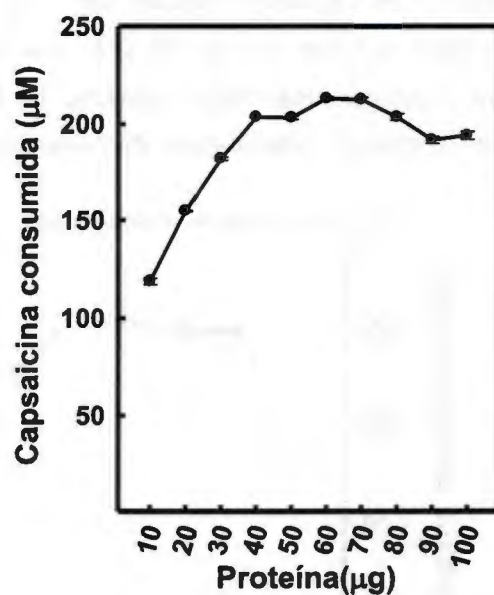


Figura 3.3. Consumo de capsaicina (500 μM) en presencia de diferentes concentraciones de proteína de tejido placentario de chile habanero. Los valores representan la media de tres repeticiones y las barras son el error estándar, $n=3$.

3.3.4. Establecimiento del tiempo de incubación adecuado para la transformación de la capsaicina en presencia de extractos proteicos de tejido placentario de chile habanero

Se realizaron diferentes reacciones enzimáticas usando 60 μg de proteína, en presencia de un amortiguador que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7, 500 μM de capsaicina, 150 μM H_2O_2 , variando los tiempos de incubación de la reacción de 20 a 120 minutos con intervalos de tiempo de 20 minutos. Se observó que la máxima transformación de la capsaicina fue a los 40 minutos con un consumo de 196 μM , después de ese tiempo no se observó consumo de capsaicina hasta los 100 minutos donde se observa una leve caída del consumo de capsaicina (Figura 3.4).

Estos resultados tienen un comportamiento similar a los reportados por Zamudio-Moreno (2007), al realizar la actividad *in situ* de un extracto de proteína iónicamente enlazada a pared de células en suspensión de *Capsicum annuum*, donde los 50 minutos se obtuvo el mayor consumo de capsaicina el cual fue de 95 μM . Los extractos de proteína de placentas de chile habanero tuvieron una mayor actividad de transformación en menos tiempo, comparada con los resultados obtenidos por Zamudio-Moreno, (2007).

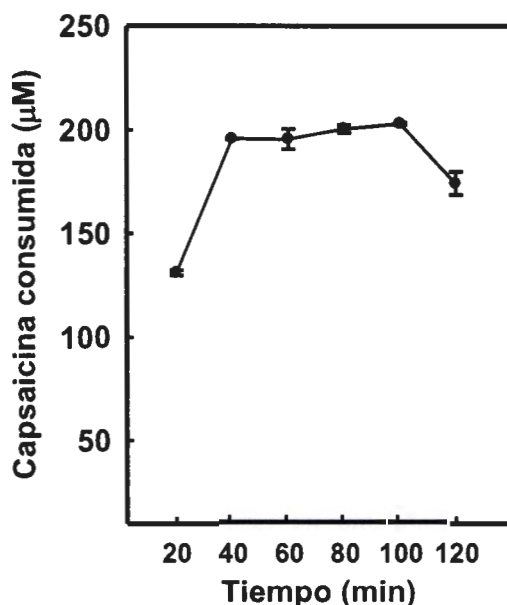


Figura 3.4. Consumo de capsaicina (500 μM) a diferentes tiempos de incubación de tejidos placentarios de chile habanero. Las barras indican el error estándar de la media, $n=3$.

3.3.5. Efecto de la temperatura de incubación y pH de la reacción sobre la actividad de las enzimas peroxidasas de tejido placentario de chile habanero

Muchas reacciones químicas transcurren a una velocidad mayor si la temperatura aumenta. Un aumento en la temperatura les confiere más energía cinética a las moléculas del reactivo, dando más colisiones eficaces por unidad de tiempo. Las reacciones catalizadas enzimáticamente se comportan similarmente hasta cierto punto (Segel 1975).

El estudio se realizó mediante el seguimiento de la cinética enzimática de transformación de capsaicina por el extracto proteico de placenta de chile habanero. En los ensayos se modificó la temperatura de 10 a 60 °C, con intervalos de tiempo de 10 °C en un tiempo de reacción de 100 minutos. Se utilizó 60 µg de proteína, en un amortiguador de 50 mM Tris-HCl pH 7 y 150 µM de H₂O₂. Se observó una caída a 40 °C, posteriormente el mayor consumo de capsaicina se observó a los 50 y 60 °C con un consumo de 265 y 270 µM, respectivamente (Figura 3.4). Estos datos concuerdan con los reportados por Yemenicioglu y Cemeroglu (1998), donde el máximo de actividad de peroxidasa se obtuvo a 60 °C en frutos frescos de *Hibiscus esculentum*, y Guida *et al.* (2010) reportan la máxima actividad de la peroxidasa a los 50 °C en hojas de *Phytolacca dioica* L.

Después de estudiar el efecto de la temperatura de incubación se determinó el efecto del pH de la reacción, ya que la actividad de la enzima depende de la concentración de iones hidrógeno (pH) en el medio porque esto afecta el grado de ionización del sustrato y de los aminoácidos del sitio activo de la enzima que debe mantener su conformación para que se una a los sustratos y lleve a cabo la catálisis de la reacción (Vivar 2005).

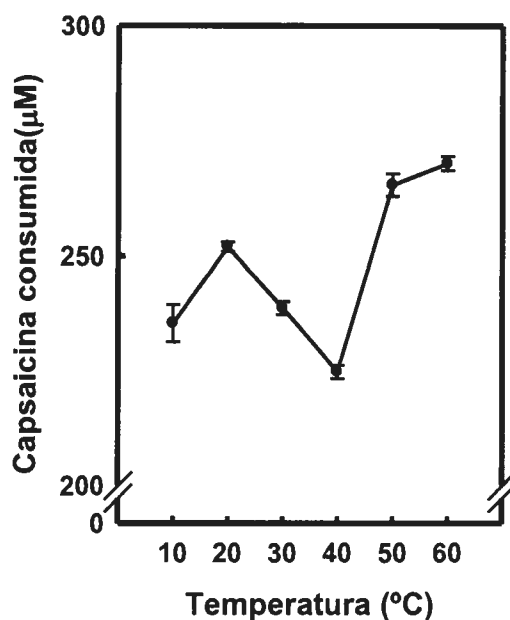


Figura 3.5. Efecto de la temperatura de incubación en la transformación de la capsaicina por peroxidasa en un extracto proteico de placenta de chile habanero.

En la mezcla de reacción de peroxidasas se varió el pH (3 - 8), para observar el mayor consumo de capsaicina. Los datos obtenidos mostraron mayor actividad a pH 5 (Figura 3.5) donde hubo un consumo de capsaicina de 196 µM. Zamudio-Moreno (2007), usando en extractos de proteína iónicamente enlazada a pared de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* var. Jalapeño Chigol se obtuvo mayor actividad de peroxidasa a pH 7. Bernal (1993 b) y Contreras Padilla y Yahia (1998) obtuvieron mayor actividad de la peroxidasa a pH 6, localizada en las placentas de frutos. Estos investigadores también encontraron que las peroxidasas básicas de alto *pI* podrían estar relacionadas con el metabolismo de capsaicinoides, porque la capsaicina y dihidrocapsaicina son fácilmente oxidadas por esta enzima.

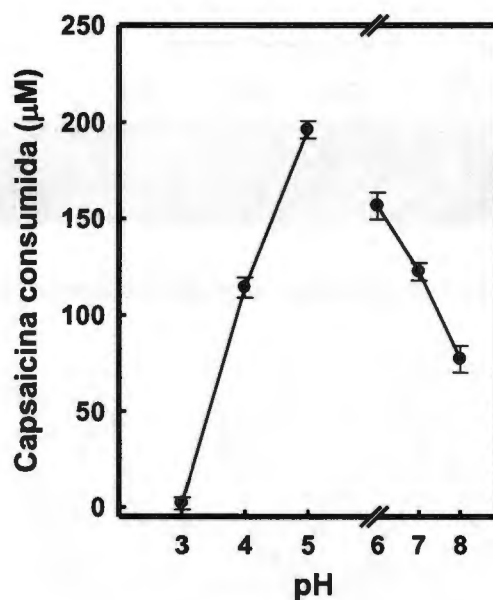
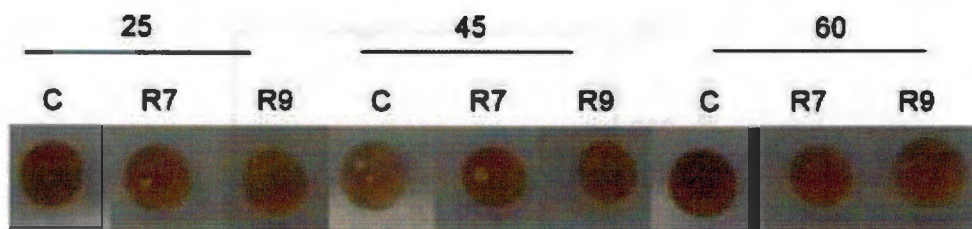


Figura 3.6. Efecto del pH en la transformación de la capsaicina de un extracto proteico de chile habanero.

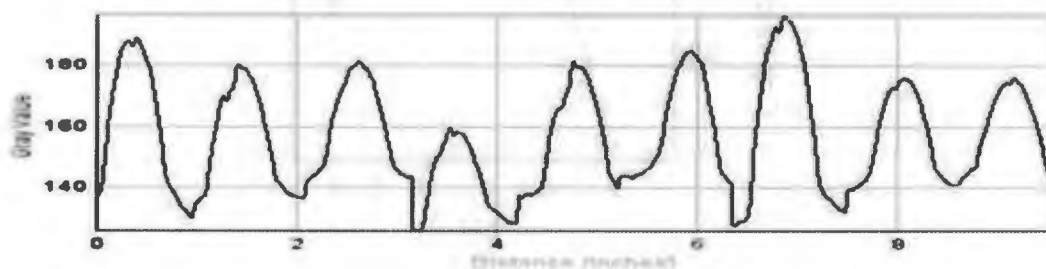
3.3.6. Análisis cualitativo de la actividad de peroxidasas utilizando guayacol como sustrato

Como hemos comentado anteriormente, las peroxidasas son las enzimas que catalizan la oxidación de un gran número de estructuras aromáticas a expensas de H_2O_2 . Las peroxidasas están ampliamente distribuidas en plantas y están implicadas en numerosos procesos fisiológicos (Zhen *et al.*, 2008).

Se realizó un análisis cualitativo de las peroxidasas en los extractos proteicos de placentas; éstos fueron confrontados contra guayacol y en presencia de H_2O_2 tanto en las plantas testigos y regadas diariamente como en los tratamientos en estrés hídrico (R7 y R9). En conclusión se observó una mayor actividad en el testigo a los 60 días (Figura 3.7).



A) Actividad de peroxidasas en los tratamientos en estrés hídrico.



B) Análisis densitométrico de las muestras superiores.

Figura 3.7. A) Actividad de peroxidasas en extractos proteicos; riego cada siete días, R7; riego cada nueve días, R9; testigo, C; riego cada siete días, R7; riego cada nueve días, R9; B) Análisis densitométrico de las actividades de peroxidasas de los tratamientos en estrés hídrico.

De este análisis cualitativo se realizó posteriormente un análisis densitométrico por medio del programa Imagen J, donde se observó de manera clara que la máxima actividad se localizaba en el tratamiento testigo a los 60 días después de la antesis, y observando con la actividad catalítica en estos momentos después de la antesis confrontados con capsaicina se cuantificó una actividad de $166.64 \mu\text{kat}/\text{mg}$ proteína, para la degradación de capsaicina.

3.3.7. Cambios en la concentración de capsaicinoides con respecto a la actividad enzimática de la capsaicina sintetasa y de las peroxidasas en extractos proteicos de placentas de frutos de chile habanero

La capsaicina sintetasa (CS) cataliza la formación de capsaicina a partir de vainillilamina y el ácido 8-metil-6-*trans*-nonenoico que es el paso final en la vía biosintética de la capsaicina (Fujiwake *et al.*, 1980). Reportes previos mencionan que las peroxidasas son enzimas que se encuentran involucradas en la degradación de capsaicinoides (Zhen *et*

al., 2008; Contreras padilla y Yahia, 1998). La oxidación *in vitro* de la capsaicina es estrictamente dependiente del H₂O₂ (Martínez-Juárez *et al.*, 2004 y Bernal *et al.*, 1993a).

La metodología utilizada para los ensayos enzimáticos de la capsaicina sintetasa fue la reportada por Govindaswan y Ravishankar (2003) y la metodología para peroxidasa fue la reportada por Zamudio-Moreno (2007).

En la Figura 3.7 se muestran las concentraciones de capsaicinoides, la actividad de la capsaicinoide sintetasa, y a la actividad de peroxidasa, durante tres edades fisiológicas (25, 45, 60 DDA) en frutos de plantas de chile habanero sometidos a diferentes regímenes de riego (diario, cada siete y cada nueve días). Se puede observar que en cuanto a las concentraciones de capsaicinoides totales en todos los casos la tendencia es a aumentar a medida que las plantas están más estresadas, esto concuerda con lo reportado por Ruíz-Lau *et al.* (2011), quienes encontraron que el estrés hídrico incrementa la concentración de estos compuestos. Es importante resaltar que si comparamos las concentraciones dentro de las diferentes edades de los frutos observamos que la cantidad de veces que aumenta las concentraciones es de orden 1 y 2 veces a excepción de riego cada siete días a los 60 DDA, mientras que si analizamos las concentraciones entre DDA, observamos que los incrementos están entre 2 y 4 veces dependiendo de la severidad del estrés (Cuadro 3.1). Estos resultados demuestran que el incremento del tiempo sin riego induce una mayor concentración de capsaicinoides (Figura 3.8 A).

En el caso de la actividad de capsaicinoide sintetasa (Figura 3.8 B) se observa una tendencia al aumento de la actividad a medida que incrementan las condiciones de estrés, lo cual se correlaciona positivamente con las concentraciones de capsaicinoides totales. Solamente en los frutos de 60 días después de la antesis de las plantas tratadas con un riego cada nueve días no se pudo encontrar actividad de esta enzima. Curiosamente es que a ese tiempo y régimen de riego es donde se puede medir la mayor concentración de capsaicinoides totales.

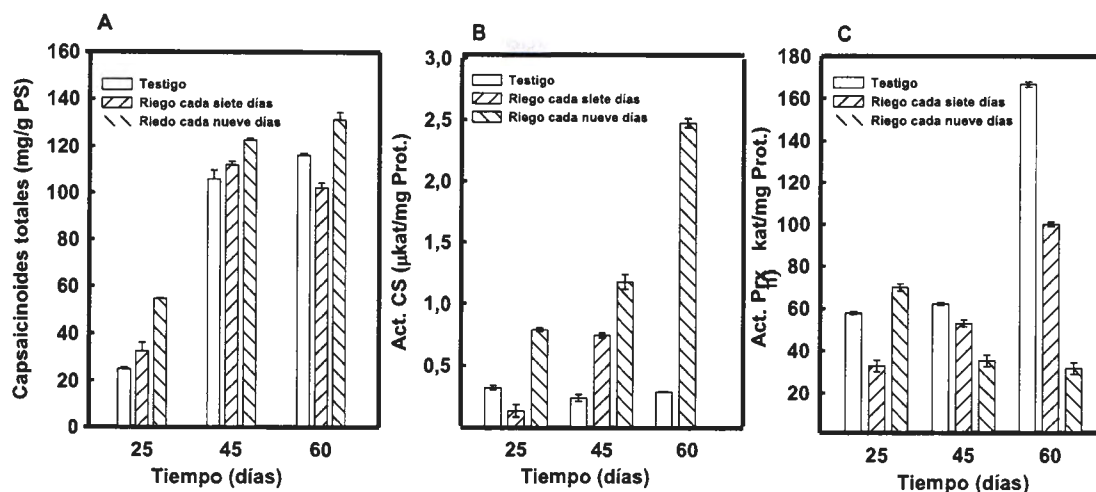


Figura 3.8. A) Contenido de capsaicinoides, B) Actividad de la capsaicinoide sintetasa y C) Actividad de las peroxididasas. Las barras indican el error estándar, n=3.

Se observa además que la actividad de la capsaicinoide sintetasa aumenta entre 3 y 5 veces en frutos de 45 días después de la antesis de plantas con riego cada siete y nueve días, respectivamente; y entre 6 y 19 veces los frutos de 45 y 60 días después de la antesis dentro de las plantas sometidas a riego cada siete días. Otro dato interesante es que aunque las concentraciones de capsaicinoides totales en el testigo regado diariamente aumentaron a medida que aumentó la edad fisiológica del fruto, la actividad de la enzima capsaicinoide sintetasa, no varía significativamente su actividad, lo que nos pudiera estar indicando que la relación entre anabolismo y catabolismo está favorecida a la primera.

Es importante destacar que en el caso de los frutos sometidos a estrés sí hay una correlación positiva entre la actividad de la capsaicinoide sintetasa y la concentración de capsaicinoides en todos los casos, a excepción como ya dijimos de los frutos de 60 días después de la antesis de plantas regadas cada nueve días, donde no se detectó actividad de capsaicinoide sintetasa, aun mostrando la mayor concentración de capsaicinoides.

Por último, se analizó la actividad de las enzimas peroxididasas en frutos de chile habanero (Figura 3.8 C), donde se destaca que al contrario de la concentración de capsaicinoides totales y de la actividad de capsaicinoide sintetasa, se observó una disminución en la

actividad de las peroxidases, a medida que aumentan la severidad del estrés a excepción de los frutos de 25 días después de la antesis.

Además, se puede observar que dentro de los tratamientos a diferentes días después de la antesis la actividad de las peroxidases aumenta, en un rango de 1 a 2 veces su actividad en 45 y 60 días después de la antesis, respectivamente. Excepto del riego cada nueve días donde a medida que aumentan las edades fisiológicas la actividad de peroxidases disminuye. Esto concuerda con lo que se observó anteriormente con una alta concentración de capsaicinoides sin actividad de capsaicinoide sintetasa. Lo que nos hace pensar que a diferencia de los tiempos 25 y 45 días después de la antesis la actividad de peroxidasa pudiera estar involucrada en la modificación de las concentraciones de capsaicinoides totales. En el tiempo de 60 días después de la antesis a nueve días sin riego esta actividad de peroxidasa no está involucrada directamente en la degradación de estos compuestos.

3.3.8 Análisis electroforético de las proteínas de tejido placentario de las plantas sometidas a estrés hídrico

Se desarrolló una corrida en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) con el objetivo de observar el patrón de bandeo de las proteínas presentes en las plantas de los frutos de las plantas sometidas a estrés hídrico. Este nos mostró las diferencias en las cantidades de proteínas entre tratamientos (Figura 3.9), una banda de aproximadamente 31 kDa fue observada en el testigo, a los 45 y 60 días después de la antesis; y otra banda de 35 kDa se pudo observar en mayor intensidad en las plantas estresadas, a los 25, 45 y 60 días después de la antesis, existe otra banda que no se expresa en el tiempo de 45 días después de la antesis, observándose en los otros tratamientos y tiempos después de la antesis (Figura 3.9). En la literatura se pudo encontrar que hay enzimas que se expresan en estrés hídrico en dos variedades de maíz (Espinoza *et al.*, 2001).

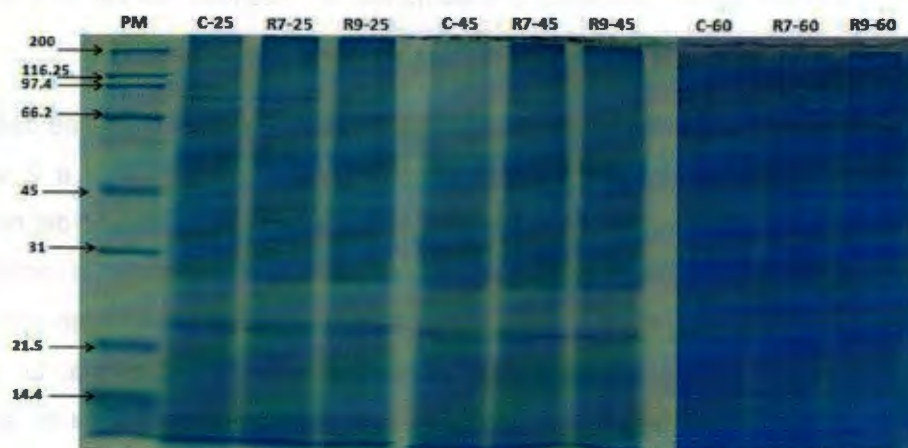


Figura 3.9. Electroforesis SDS- PAGE; de los extractos proteicos en estrés hídrico; PM, Marcador molecular; C-25, control tiempo 25; C-45, control tiempo 45; C-60, control tiempo 60; R7-25, riego cada 7 días, 25 días después de la antesis; R7-45, riego cada 7 días, 45 días después de la antesis; R7-60, riego cada 7 días, 60 días después de la antesis; R9-25, riego cada nueve días, 25 días después de la antesis; R9-45, riego cada 9 días, 45 días después de la antesis; R9-60, riego cada nueve días, 60 días después de la antesis.

Para complementar el análisis por SDS-PAGE anterior, se desarrolló un gel no desnaturante para observar la actividad de peroxidasa por zimografía de acuerdo a la metodología reportada por Martínez-Juárez (2004) y utilizando guayacol como sustrato (Figura 3.10).



Figura 3.10. Gel de electroforesis Nativo-PAGE; Actividad de las peroxidases en los diferentes tratamientos de extractos proteicos de tejido placentario de chile habanero; C-25, control tiempo 25; C-45, control tiempo 45; C-60, control tiempo 60; R7-25, riego cada 7 días, 25 días después de la antesis; R7-45, riego cada 7 días, 45 días después de la antesis; R7-60, riego cada 7 días, 60 días después de la antesis; R9-25, riego cada nueve días, 25 días después de la antesis; R9-45, riego cada 9 días, 45 días después de la antesis; R9-60, riego cada nueve días, 60 días después de la antesis.

Nuestros resultados mostraron que la reacción con mayor intensidad de color se obtuvo en los frutos de 45 y 60 días de edad de las plantas sometidos a estrés hídrico, contra los frutos de 60 días de edad de plantas testigo. Estos resultados concuerdan con los de las actividades de peroxidasas en presencia de capsaicina como sustrato (Figura 3.8.C).

3.4. Inhibición de la formación del dímero 5,5'-dicapsaicina por el anticuerpo levantado contra peroxidasa de rábano

Con el objetivo de evaluar la inmunoinhibición de la oxidación de la capsaicina por un anticuerpo levantado contra peroxidasa de rábano y en los diferentes tratamientos en estrés hídrico, se realizaron reacciones de peroxidasas con las condiciones establecidas y se adicionó anticuerpo de conejo (No. P-7899 de SIGMA) levantado contra peroxidasa de rábano. Para ello, primero se realizó una curva de oxidación de la capsaicina para observar la formación del dímero 5,5'-dicapsaicina (Figura 3.11).

Los resultados muestran una disminución de la oxidación de capsaicina con un incremento en la cantidad adicionada de anticuerpo. De estos resultados se seleccionó una cantidad de anticuerpo de 2 mg/ml.

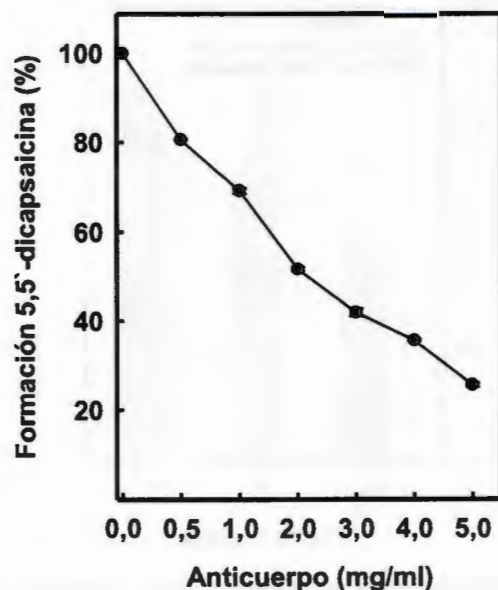


Figura 3.11. Inmunoinhibición de la oxidación de la capsaicina con anticuerpo de conejo levantado contra peroxidasa de rábano.

Posteriormente, se utilizó la concentración de anticuerpo de 2 mg/mL para realizar los experimentos de inmunoinhibición de la oxidación de la capsaicina de las peroxidases extraídas de los frutos de plantas sometidas a estrés hídrico. En los resultados se observó que el anticuerpo produjo una inhibición de la oxidación de la capsaicina en los tratamientos de riego cada siete días y riego cada nueve días en frutos de 25 días después de la antesis (Figura 3.12). Este comportamiento fue similar en frutos de planta de 45 días después de la antesis, sometida a riego cada 9 días, sin embargo los frutos de plantas de 45 días después de la antesis en tratamiento de riego cada siete días no mostraron diferencias con respecto al testigo. Un dato interesante es que en los frutos de las plantas de 60 días después de la antesis no se observó un efecto inhibitorio de los anticuerpos, por el contrario se muestra que la oxidación de la capsaicina incrementa a medida que incrementa el tiempo de déficit hídrico. Estos resultados sugieren que en los frutos de 60 días la degradación de capsaicina no está mediada por la actividad de las enzimas peroxidases y el resto se puede deber a transformación por otras vías de degradación de la capsaicina que probablemente puede ser una hidrólisis o una glucosilación.

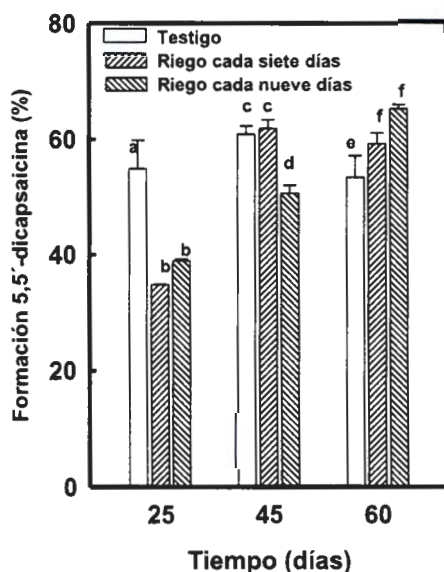


Figura 3.12. Inmunoinhibición de la oxidación de la capsaicina por peroxidases de extractos proteicos de frutos de plantas sometidas a estrés hídrico. Testigo, T; riego cada siete días, R7; riego cada nueve días, R9. Las letras indican las diferencias entre tratamiento.

Estos datos son muy interesantes, ya que sólo hay reportes por Bernal *et al.* (1994) quienes observaron la oxidación de la capsaicina por peroxidasa, pero siempre se refieren al consumo de capsaicina y no a la formación del dímero 5,5'-dicapsaicina. Debe notarse que para estimar el dímero en esta investigación cuantificamos el área de absorción, ya que no contamos con estándares para cuantificar el producto 5,5'-dicapsaicina en las reacciones *in vitro*.

3.5. Conclusiones

A través de una localización histoquímica se detectó actividad de peroxidasas en la placenta de chile habanero.

La actividad de peroxidasas disminuyó en la placenta de los frutos sometidos a estrés hídrico y esta disminución fue dependiente de la severidad del estrés.

La concentración de la enzima necesaria para el consumo de capsaicina fue 60 µg, con un tiempo de reacción de 100 minutos, a una temperatura de 50 °C y un pH óptimo de 5.

No se detectó actividad de capsaicinoide sintetasa en extractos de riego cada nueve días a los 60 días después de la antesis.

Se observó que la degradación de la capsaicina en frutos de plántulas de 60 días después de la antesis ocurre por otra vía diferente a las peroxidasas, pudiendo ser por hidrólisis o glucosilación.

3.6. Referencias

- Ahmad, Anjum, S., Farooq, M., Xie Xio-yu, Liu Xio-jian, Furqan Ijaz M. (2012). Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia Horticulturae* 140:66–73.
- Bernal, M. A., Merino de Cáceres, F. and Ros Barceló, A. (1994b). Histochemical localization of peroxidase in *Capsicum* fruits. *Lebensm-Wiss u. Technology* 27: 197-198.
- Bernal, M. A. and Ros-Barceló, A. (1996). 5,5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3085-89.
- Bernal, M. A., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Ferrer, M. A., Merino, F. and Ros-Barceló, A. (1994). Purification of a basic peroxidase isoenzyme from *Capsicum* fruits and the immunoinhibition of its capsaicin oxidation capacity by antibodies raised against horseradish peroxidase. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 199: 240-242.
- Bernal, M. A., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. and Merino de Cáceres, F. (1993b). Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase. *Journal Food Science*, 58: 611-613.
- Bernal, M. A., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Muñoz, R., Ros Barceló, A. and Merino de Cáceres, F. (1993a). Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (Var. *annuum*) fruits. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 41: 1041-44.
- Boersch, A., Callingham, B. A., Lembeck, F. and Sharman, D. F. (1991). Enzymic oxidation of capsaicin. *Biochemistry Pharmacology*, 41: 1863–1869.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the detection of microgram amounts of protein utilizing the principle of dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 7: 248-526.
- Contreras-Padilla, M. and Yahia, E. M. (1998). Changes in capsaicinoids during development, maturation and senescence of chile pepper and relation with peroxidase activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46:2075–2079.
- Elberse, W. Th., and Breman, (1990). Germination and establishment of Sahelian rangeland species. II. Effects of water availability. *Oecologia* 85:32-40.
- Espinoza-Paz, N., Montiel-Aguirre, F., Rodríguez-Ontiveros, J. L., (2001). Drought stress effect on the electrophoretic patterns of total proteins in two maize varieties. *Revista Fitotecnica Mexicana*, Vol 24(1): 121-128.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. and Iwai, K. (1980). Enzymatic formation of capsaicinoid from vanillylamine and iso-type fatty acids by cell-free extracts of *Capsicum annuum* var.

-
- cv. Karatsubusa. *Agriculture Biology Chemistry*, 44: 2907-2912.
- Govindaswam, S., Ravishabcar, G., (2003). Putrescina facilitated enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens*. *Journal of Plant Physiology*, 160:339-346.
- Guida, V., Criscuolo, G., Tamburino, R., Malorni, L., Parente, A., Di Maro, A., (2010). Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *BMB reports*.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Martínez-Juárez, (2004). Formación de 5,5'-dicapsaicina en cultivos de células de *Capsicum* sp. Tesis de Doctorado, CINVESTAV- Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.
- Martínez-Juárez, Ochoa-Alejo, Lozoya-Gloria, Villareal-Ortega, Ariza-Castolo, Esparza-García, Calva-Calva (2004). Specific síntesis of 5,5'-dicapsaicin by cell suspension cultures of *Capsicum annuum* var. *annuum* (Chili Jalapeño Chigol) and Their Soluble and NaCl-Extracted cell wall protein fractions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52:972-979.
- Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., Minero-García, Y., Zamudio-Moreno, E., Guzmán-Antonio, A., Echevarría-Machado, I., and Martínez-Estévez, M. (2011). Water Deficit Affects the Accumulation of Capsaicinoids in Fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience* Vol. 46 (3):487-492.
- Segel, H. (1975). *Enzimas en: Cálculos de Bioquímica*. Acribia. España. Pp. 275-417.
- Sung, Y., Chang, Y., Ting, N., (2005). Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46:42.
- Vivar Vera, M. (2005). Obtención de Pectinas de tejocote (*Crataegus pubescens*) de bajo metoxilo por vía enzimática y su caracterización. Tesis de Doctorado. CINVESTAV, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.
- Yemenicioglu, A. Özkan, M. and Cemeroglu, B. (1998). Partial Purification and Thermal Characterization of Peroxidase from Okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4158-4163.
- Zamudio-Moreno, E. (2007). Dimerización enzimática de capsaicinoides por proteína enlazada iónicamente a pared de células de *Capsicum* spp crecidas in vitro. Tesis de Maestría. TESE y CINVESTAV-IPN (Departamento de Biotecnología y Bioingeniería).
- Zapata, J., Calderón, A. A., Muñoz, R. and Ros Barceló, (1992). Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetics characteristics and

substrate specificity. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43: 134–138.

Zhen Zhang, Liu Shi-qi, Qi Lian-dong and Xu Li, (2008). Changes in Capsaicin, Flavonoid, Free Phenolics and Enzyme Activity during Development of Pepper Fruit. *Technology In global. Acta Horticulture*, 768.

CAPITULO IV

5,5'-DICAPSAICINA ES UN PRODUCTO DE LA OXIDACIÓN DE CAPSAICINA EN PLACENTAS DE FRUTOS DE CHILE HABANERO (*Capsicum chinense* Jacq.)

4.1. Introducción

El primer reporte de la oxidación de la capsaicina es la formación de un dímero (Boersch *et al.*, 1991). La mayoría de los reportes de la transformación de la capsaicina mencionan a las peroxidasas, las cuales dan tres productos de transformación, el dímero 5,5'-dicapsaicina, el éter 4'-O-5 dicapsaicina y un polímero de capsaicina y proteína de grado 15 (Bernal y Ros Barceló, 1996).

Se ha reportado que la peroxidasa B₆ que está presente en los frutos de chile y las involucradas en suspensiones celulares de *Capsicum annuum* var. Chigol producen el dímero 5,5'-dicapsaicina (Martínez-Juárez *et al.*, 2004).

Otro reporte de producto de transformación de la capsaicina es el glucósido de capsaicina por medio de la enzima glucosil transferasa (Calva-Calva, 1997). También, se ha reportado un nuevo dímero no picoso derivado de la capsaicina, el 6",7"-dihidro-5,5'-dicapsaicina el cual fue aislado de frutos de *Capsicum* y se sugiere que su formación podría estar catalizada por la peroxidasa (Díaz *et al.*, 2004).

El objetivo de este capítulo fue identificar el producto formado por actividad de las peroxidasas.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Ensayo para la actividad de peroxidasas

Para desarrollar el ensayo de la actividad de peroxidasas la mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 1 mL conteniendo capsaicina 250 μ M, H₂O₂ 150 μ M, extracto de proteína 60 μ g, amortiguador 100 mM de citrato de sodio, pH 5, la mezcla de reacción se incubó por 100 minutos a 50 °C y se detuvo con la adición de acetato de etilo (3 veces), que a la vez sirvió para extraer los productos de reacción. El acetato de etilo se

evaporó con una corriente de N₂ libre de oxígeno y el residuo se resuspendió con 500 µL de etanol absoluto grado HPLC. El extracto se filtró utilizando filtros Millex-HV PVDF de 0.45 µm, en jeringa de 3 mL. Para la cuantificación se utilizó el equipo HPLC-UV.

4.2.2. Análisis de los ensayos enzimáticos por HPLC

Para la cuantificación de capsaicina se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de bomba cuaternaria marca Agilent Technologies Series 1200 con detector de arreglo de diodos. Para la separación del compuesto Z se realizó como los acápites 3.2.7.

4.2.3. Purificación del producto de transformación de la capsaicina

La separación y análisis del producto de dimerización de la capsaicina llamado producto Z se logró mediante HPLC en 10 corridas repetidas en una columna semi-preparativa Alltima de 5 micras (250 mm × 10.0 mm i.d.). La elución se realizó con un gradiente de 1 mM de ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo (ACN), se sigue [Tiempo (minuto), 1 mM TFA (%]): 0:70; 10:10; 15:10; 20:10; 25:70. La velocidad de flujo se mantuvo a 2 mL/minuto, y el detector se fijó en 230, 260 y 280 nm. Después de la recolección, las fracciones se combinaron (≈ 20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (1:1, v/v). El disolvente se evaporó bajo una corriente de nitrógeno libre de oxígeno y la muestra se resuspendió en 500 µL de etanol. La pureza de las fracciones se verificó mediante HPLC-UV. Posteriormente, esta muestra se utilizó para los análisis de RMN y HSQC.

4.2.4. Análisis de RMN y HSQC

Los espectros de RMN para el compuesto se obtuvieron a 21 ± 1 °C usando un espectrómetro Jeol ECA 500 equipado con una sonda multinuclear de 5 mm de pulsos de gradiente de campo, con un tubo de muestra de 5 mm microsonda RMN 1.7 W / mm. Los espectros se obtuvieron usando cloroformo deuterado (CDCl₃). Los desplazamientos químicos fueron referenciados con respecto al estándar interno (CH₃)₄Si (δ ¹H = 0, δ ¹³C = 0). Los espectros de ¹H-RMN se registraron a 500 MHz, usando un ancho espectral de 9384.3 Hz, tiempo de adquisición de 6.98 s, puntos 65,536, las exploraciones de 16 y un retardo de relación de 1 s. Los parámetros HSQC en la dimensión ¹H fueron como sigue: desplazamiento, 3.87 ppm; barrido, 8.22 ppm, 1,024 puntos de datos, resolución digital de

4.017 Hz, mientras que en la dimensión ^{13}C fueron como sigue: desplazamiento 82.43 ppm; barrido, 150.6 ppm; exploraciones, 4,096 para cada uno de los 512 incrementos usando la secuencia de pulsos JEOL en fase sensible PFG-HSQC. Los espectros de masas se registraron en un espectrómetro Agilent G1969 LC / MSD TOF acoplado a HPLC con ionización por electrospray.

4.3. Resultados

4.3.1. Estudio sobre el dímero 5,5'-dicapsaicina, producto de la actividad de las peroxidasas sobre capsaicina

En los productos de las reacciones enzimáticas de extractos proteicos de frutos de las plantas sometidas a estrés hídrico se observó un pico en un tiempo de retención de 19.04 minutos en la columna semi-preparativa, el cual se nombró producto Z (Figura 4.1). La muestra correspondiente a este pico se sometió a varios análisis para la identificación de su estructura y se comparó con los reportes de Bernal y Ros Barceló (1996) y por Martínez-Juárez (2004).

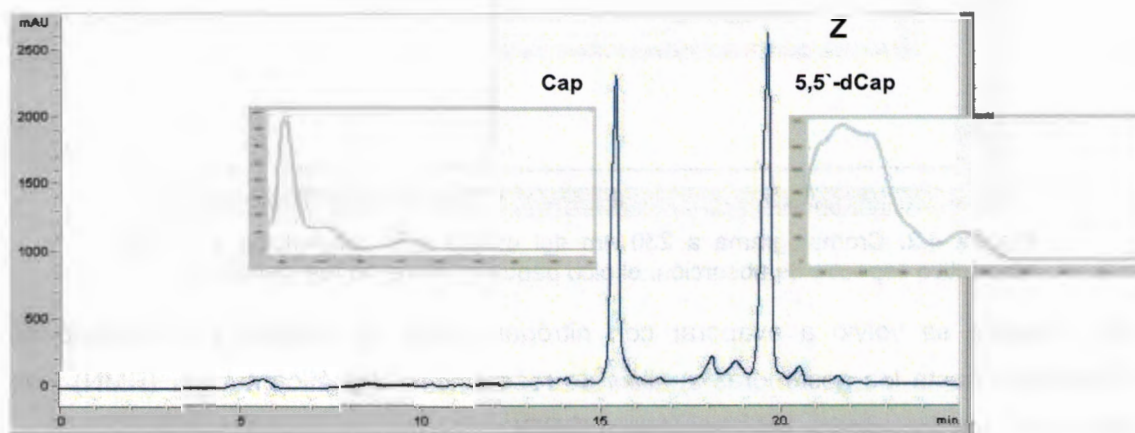


Figura 4.1. Cromatograma a 230 nm de del producto de reacción del extracto proteico de frutos de plantas de *Capsicum* sometidas e estrés contra capsaicina. El producto de reacción fue recuperado de una corrida en HPLC con una columna semi-preparativa. Los picos a 15.5 y 19.5 minutos fueron identificados por sus espectros como capsaicina y el dímero 5,5'-dicapsaicina, respectivamente.

Para el análisis del compuesto Z se realizó una colecta de esta fracción, previamente analizada en el HPLC, donde se realizaron varias corridas en una columna semi-preparativa para poder obtener mayor cantidad de este compuesto. Posteriormente, la fracción obtenida del HPLC se secó con una corriente de nitrógeno gaseoso y la muestra se resuspendió en etanol grado HPLC.

Para observar si se había obtenido el compuesto puro, posteriormente se volvió a correr en el HPLC en una columna analítica, observando sólo este compuesto y corroborando su espectro de absorción (Figura 4.2).

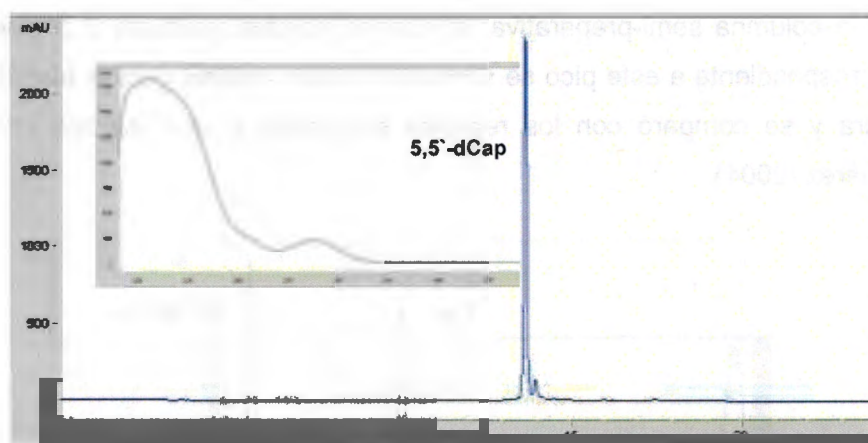


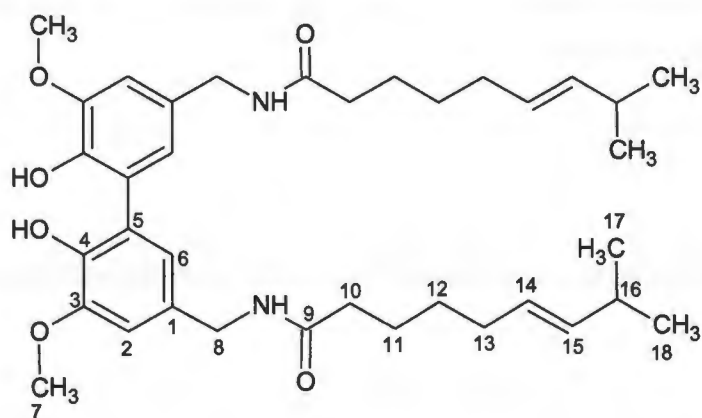
Figura 4.2. Cromatograma a 230 nm del dímero 5,5'-dicapsaicina y con su respectivo espectro de absorción, el pico pequeño lateral no fue identificado.

Esta muestra se volvió a evaporar con nitrógeno libre de oxígeno y se guardó en congelación hasta los posteriores análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) y de correlación simple cuántica heteronuclear (HSQC).

4.4. Análisis de RMN, HSQC y masas del compuesto Z

Al analizar el compuesto colectado (1.6 mg) en el espectrómetro de masas se observó como el pico más alto al de la masa exacta de la 5,5'-dicapsaicina (calculada para $C_{36}H_{53}N_2O_8$: m/z 609.3904 ($M + 1$), que experimentalmente presentó un peso molecular de 609.3907 uma, con lo cual se tiene una diferencia entre la masa teórica y la experimental de sólo -0.0003 . Este resultado está totalmente de acuerdo con lo esperado.

En los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) se observaron señales que están de acuerdo con la siguiente estructura:



Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$^nJ_{\text{H,H}}$ (Hz)
2	110.2	6.86	1.7 (d)
6	122.8	6.83	1.7 (d)
7	56.4	3.93	(s)
8	43.5	4.40	5.6 (d)
10	36.8	2.19	7.0 (t)
11	25.4	1.66	7.0 (tt)
12	29.8	1.37	7.0 (tt)
13	32.3	1.98	7.0 (dt)
14	no	5.34	6.8, 15.5 (dt)
15	no	5.37	15.5, 6.8 (dt)
16	no	2.21	6.8 (m)
17	22.8	0.94	6.8 (d)
18	22.8	0.94	6.8 (d)
OH		6.03	(s)
NH		5.69	(sa)

Debe observarse que las señales para los carbonos 1, 3, 4, 5, 9 no fueron incluidas en la tabla porque no contienen H y no son útiles para la asignación de hidrógenos. No, no observadas; s, singulete; d, doblete; t, triplete; m, multiplete; sa, singulete ancho.

La asignación y los desplazamientos químicos de los protones unidos a los ^{13}C fueron determinados por HSQC (Figura 4.3). En el espectro de color se observó las señales rojas correspondientes a los CH_2 , mientras que las verdes son de CH y CH_3 . Estos resultados

espectrales de RMN ^1H se compararon con el reporte de Martínez-Juárez *et al.* (2004), quienes encuentran este dímero en suspensiones celulares de *Capsicum annum* var. Chigol y es idéntico al dímero 5,5'-dicapsaicina. Por lo tanto, los extractos proteicos de los frutos de plantas sometidas a estrés hídrico son capaces de transformar la capsaicina en su dímero 5,5'-dicapsaicina.

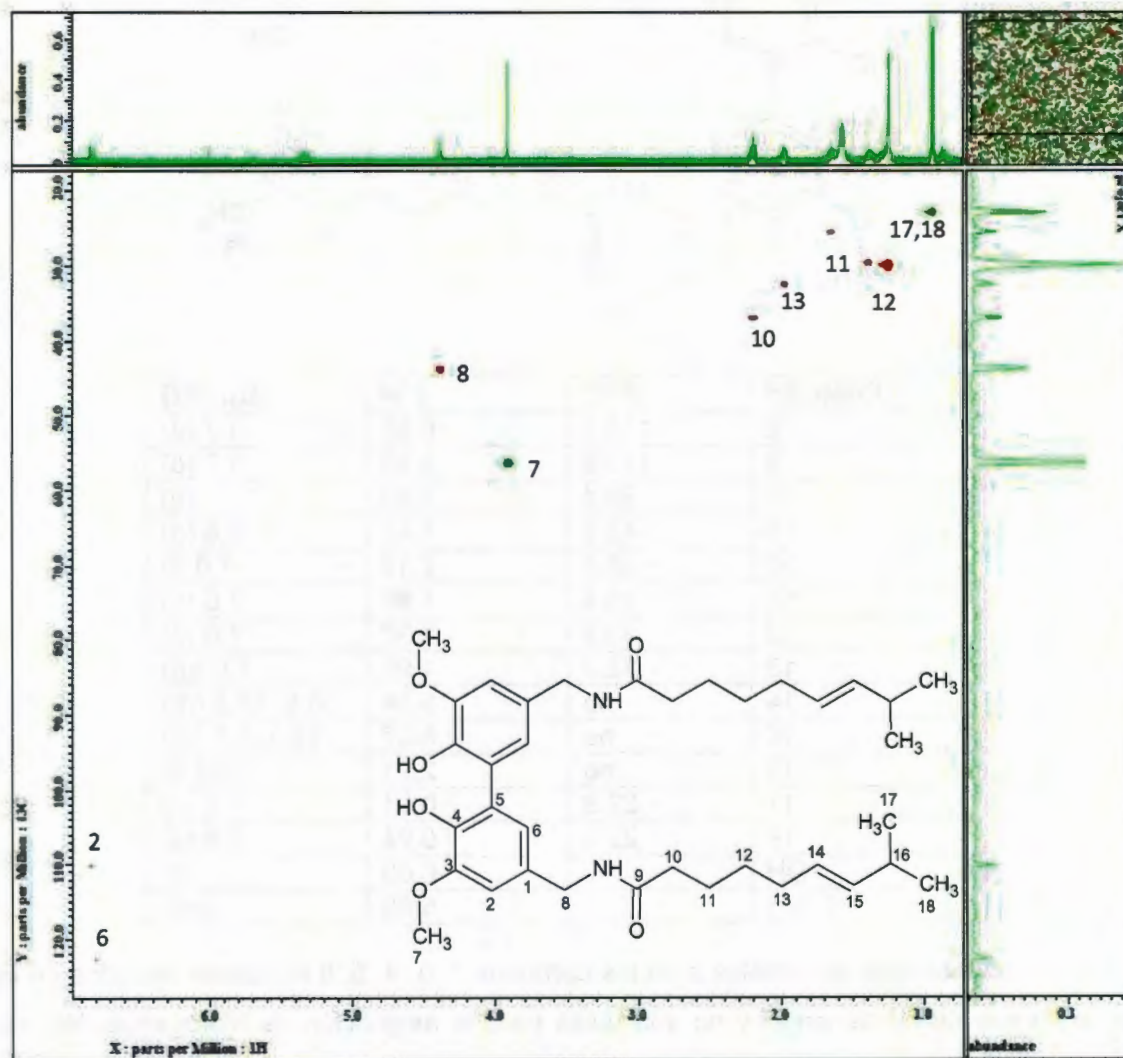


Figura 4.3. Espectro de RMN ^1H y HSQC del compuesto Z.

4.5. Conclusiones

Se identificó el compuesto de transformación de la capsaicina por extractos proteicos de frutos de plantas sometidas a estrés hídrico como el dímero 5,5'-dicapsaicina, cuya masa es de 609.3904 uma.

4.6. Referencias

- Bernal, M. A. and Ros-Barceló, A. (1996). 5,5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3085-89.
- Boersch, A., Callingham, B. A., Lembeck, F. and Sharman, D. F. (1991). Enzymic oxidation of capsaicin. *Biochemistry Pharmacology*, 41: 1863–1869.
- Calva-Calva, G. (1997). Glycosilation and synthesis of capsaicin in cell cultures and fruits of *Capsicum* spp. Ph. D. Thesis, Biological School, University of East Anglia, Norwich, U. K.
- Díaz, J., Pomar, F., Bernal, A., Merino, F. (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L. *Phytochemistry Reviews* 3: 141-157.
- Martínez-Juárez, Ochoa-Alejo; Lozoya-Gloria, Villareal-Ortega, Ariza-Castolo, Esparza-García, Calva-Calva. (2004). Specific síntesis of 5,5'-dicapsaicin by cell suspensión cultures of *Capsicum annuum* var. *annuum* (Chili Jalapeño Chigol) and Their Soluble and NaCl-Extracted cell wall protein fractions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52:972-979.

CAPITULO V

5.1 Discusión general

5.1.1. Efecto del estrés hídrico sobre la floración y fructificación en plantas de chile habanero

Las plantas del género *Capsicum* que sintetizan capsaicinoides bajo condiciones de estrés hídrico, tanto por exceso como por falta de agua, producen frutos más picantes (Sung *et al.*, 2005; Estrada *et al.*, 2000). En otro reporte se sugiere que en *C. chinense*, la baja disponibilidad de agua reduce el número de producción de flores y retarda la floración máxima (Jaimez *et al.*, 2000). Con relación al efecto del estrés hídrico sobre las plantas de chile habanero, observamos que éstas toleran la falta de agua hasta los nueve días y que son capaces de recuperar la turgencia a las 5 horas posteriores de su riego.

Las plantas sometidas a déficit hídrico pueden recuperarse debido a que nunca llegan al punto de marchitez permanente (Barrientos-Priego y Rodríguez, 1998). También se observó que los tratamientos reducen significativamente el número de flores por planta lo que concuerda con el reporte de Jaimez *et al.* (2000); ellos sugieren que la baja disponibilidad de agua en *Capsicum chinense* reduce el número de flores producidas y retarda la ocurrencia máxima de floración.

En el caso de la formación de frutos en las plantas sometidas a nueve días sin riego sí se observó una afectación significativa en cuanto al número de frutos totales. Jaimez *et al.* (2000) reportan que la baja disponibilidad de agua durante el periodo de floración y desarrollo del fruto reduce la producción final.

En plantas bajo estrés hídrico, tanto en riego cada siete días y riego cada nueve días, se observó un aumento en el contenido de capsaicinoides, principalmente de la dihidrocapsaicina. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ruiz-Lau *et al.* (2011) y Sung *et al.* (2005).

5.1.2. Síntesis y degradación de capsaicinoides en plantas bajo condiciones de estrés hídrico

En los frutos de las plantas regadas diariamente se observó una actividad constante de la capsaicinoide sintetasa en los tres momentos después de la antesis, y con respecto a los tratamientos se observó una alta actividad en el tratamiento de riego cada siete días a los 60 días después de la antesis y en el tratamiento de riego cada nueve días no se detectó actividad de CS, comparadas con el testigo que fue menor a la actividad.

Los datos obtenidos no concuerdan con los reportados por Zhen *et al.* (2008), donde reportan que el testigo tiene una alta actividad de CS de 0.95 nmol/mg proteína/hr en placenta y pericarpio de *Capsicum annuum* L., a los 36 días después de la floración y nuestros resultados no tienen diferencia en los tiempos 25, 45 y 60 días después de la antesis.

El reporte de Sung *et al.* (2005) de actividad de CS concuerdan con nuestros resultados porque su comportamiento de la actividad de CS en déficit hídrico a los 40 días después de la floración tienen mayor actividad (0.180 mmol/min/proteína) que el testigo.

Esto se observó con nuestros resultados obteniendo una actividad en riego cada siete días de 0.74 μ kat/mg proteína a los 45 y a los 60 días después de la antesis con 2.47 μ kat/mg proteína (Figura 3.7 B) lo interesante fue que en el tratamiento de riego cada nueve días no se detectó actividad de capsaicinoide sintetasa a los 60 días después de la antesis. Este resultado concuerda con el reporte Ruiz-Lau *et al.* (2011), donde no detectan actividad de capsaicinoide sintetasa a los 45 días después de la antesis en placentas de *Capsicum chinense* Jacq., en plantas sometidas a estrés hídrico, en donde hay una disminución de la actividad de la enzima y un aumento en la concentración de capsaicina conforme aumenta el estrés, esto sucede en nuestros resultados a los 60 días después de la antesis. La actividad de la CS con relación al contenido de capsaicinoides en el tiempo 25 días después de la antesis del tratamiento riego cada nueve días hay un alto contenido de capsaicinoides de 54.758 mg/g de PS comparado con el testigo y riego cada siete días. Con respecto a la actividad de CS se detectó una alta actividad de 0.7909 μ kat/mg proteína, comparada con el testigo y en riego cada siete días se detectó menor actividad.

El análisis de las peroxidasas en el testigo tiene un comportamiento ascendente en los tres momentos después de la antesis. Este comportamiento se observó en el tratamiento riego cada siete días, y este comportamiento concuerdan con los reportes de Zhen *et al.*, (2008); Sung *et al.*, (2005), donde observaron la actividad de la peroxidasa aumenta a medida que transcurre el tiempo después de la antesis.

Al estudiar el compuesto de transformación de la capsaicina en extractos proteicos de placenta de chile habanero se detectó el dímero 5,5'-dicapsaicina, específico de las reacciones de las peroxidasas. Los únicos reportes donde mencionan de este compuesto es el de Bernal y Ros Barceló (1994b y 1996), el de Martínez-Juárez *et al.* (2004) y el de Boersch *et al.* (1991) solo menciona la transformación de un dímero. Sin embargo, se realizaron ensayos de peroxidasas adicionándole anticuerpo de conejo levantado contra peroxidasas de rábano, donde se observó que el dímero se inhibe y con respecto a la capsaicina se consume y esto no es debido por las peroxidasas, entonces llegamos a la conclusión que el compuesto se está transformando por otra vía.

5.2. El compuesto de degradación 5,5'-dicapsaicina de las reacciones enzimáticas de peroxidasa

Hay pocos reportes del compuesto 5,5'-dicapsaicina; así, al compararse el espectro de RMN ^1H con el reportado por Martínez-Juárez *et al.* (2004), donde encuentran este dímero en suspensiones celulares de *Capsicum annum* var. Chigol, se observó que es similar al dímero 5,5'-dicapsaicina. Otro estudio es el de Bernal y Ros Barceló (1996) en el que reportan este dímero, sin embargo, ellos lo detectan por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas; nosotros también lo estudiamos por este método, pero no se pudo identificar.

5.3. Conclusiones generales

El estrés hídrico afectó la producción de flores de chile habanero en los tratamientos riego siete y riego nueve en un 45.71 y 75.3%, respectivamente.

El estrés hídrico no afectó la producción de frutos de chile habanero con respecto a las flores marcadas.

El estrés hídrico aumentó el contenido de capsaicinoides en la placenta alrededor de un 123% a los 30 días después de la antesis y un 40% a los 40 días después de la antesis en riego cada nueve días; sin embargo, sólo en riego cada siete días aumentó un 24% a los 50 días después de la antesis.

La concentración de la enzima necesaria para el consumo de capsaicina fue 60 µg, con un tiempo de reacción de 100 minutos a una temperatura de 50 °C y un pH óptimo de 5.

No se detectó actividad de capsaicinoide sintetasa en extractos de riego cada nueve días a los 60 días después de la antesis.

Se observó que la degradación de las capsaicina en frutos de plántulas de 60 días después de la antesis se está dando por otra vía diferente a las peroxidasas.

Estos resultados sugieren que tanto la vía de biosíntesis como la del catabolismo de los capsaicinoides pueden ser blancos de regulación ante condiciones de estrés hídrico; en esta regulación al parecer las peroxidasas no están involucradas en el catabolismo de los capsaicinoides.

Se identificó el compuesto de dimerización de la capsaicina como el dímero 5,5'-dicapsaicina, con una masa molecular de 609.3904 uma.

5.4. Perspectivas

Estudiar la disminución de la capsaicina e incremento de la dihidrocapsaicina por efecto del estrés hídrico.

Estudiar las diferentes vías catabólicas de los capsaicinoides.

Analizar la actividad de la enzima peroxidasa, usando como sustratos una mezcla de capsaicina y dihidrocapsaicina.

Evaluar los respectivos productos de degradación de la mezcla capsaicina y dihidrocapsaicina.

5.5. Referencias

- Ahmad, Anjum, S., Farooq, M., Xie, Xio-yu, Liu, Xio-jian, Furqan, Ijaz M. (2012). Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. *Scientia Horticulture* 140:66–73.
- Barrientos-Priego, A. F., Rodríguez, O. J. L. (1998). Respuesta de plantas de aguacate cv Hass bajo condiciones de sequía. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 2: 191-198.
- Bernal, M. A. and Ros-Barceló, A. (1996). 5,5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3085-89.
- Bernal, M. A., Merino de Cáceres, F. and Ros Barceló, A. (1994b). Histochemical Localization of Peroxidase in *Capsicum* fruits. *Lebensm-Wiss u. Technolgy*, 27, 197-198.
- Boersch, A., Callingham, B. A., Lembeck, F. and Sharman, D. F. (1991). Enzymic oxidation of capsaicin. *Biochemistry Pharmacology*, 41: 1863–1869.
- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F. and Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annuum*: changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48: 6234-6239.
- Jaimez, R. E. (2000). Crecimiento y distribución de la materia seca en ají dulce bajo condiciones de déficit de agua. *Agronomía Tropical*, 50: 189-200.
- Martínez-Juárez, Ochoa-Alejo; Lozoya-Gloria, Villareal-Ortega, Ariza-Castolo, Esparza-García, Calva-Calva. (2004). Specific síntesis of 5,5'-dicapsaicin by cell suspensión cultures of *Capsicum annuum* var. *annuum* (Chili Jalapeño Chigol) and Their Soluble and NaCl-Extracted cell wall protein fractions. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 52:972-979.
- Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., Minero-García, Y., Zamudio-Moreno, E., Guzmán-Antonio A., Echevarría-Machado, I., and Martínez-Estévez, M. (2011). Water Deficit Affects the Accumulation of Capsaicinoids in Fruits of *Capsicum chinense* Jacq. *HortScience* Vol. 46 (3):487–492.
- Sung, Y., Chang, Y., Ting, N., (2005). Capsaicin biosynthesis in wáter-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46:42
- Zhen, Zhang, Liu, Shi-qi, Qi, Lian-dong and Xu Li, (2008). Changes in Capsaicin, Flavonoid, Free Phenolics and Enzyme Activity during Development of Pepper Fruit. *Acta Horticulture*, 768.

