UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

Efecto de aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno en *Capsicum chinense* para determinar su capacidad antimicrobiana.

TESIS DE LICENCIATURA

Que para obtener el título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Presenta:

Diego Vargas Hernández

Dirigida por:

M.I.A. Sandra Neli Jiménez García

28 de mayo de 2015

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE INGENIERÍA

Efecto de aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno en *Capsicum chinense* para determinar su capacidad antimicrobiana.

TESIS DE LICENCIATURA

Que para obtener el título de:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Presenta:

Diego Vargas Hernández

Dirigida por:

M.I.A. Sandra Neli Jiménez García

SINODALES:

M.I.A. Sandra Neli Jiménez García: _____

Dra., Angélica Feregrino Pérez: _____

Dr. Ramón G. Guevara González: _____

M. en *C.* Arturo Arana Juaristi: _____

28 de mayo de 2015

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de chile habanero (*Capsicum chinense*), contra distintos tipos de bacterias de importancia médica. El tratamiento consistió en asperjar quincenalmente hasta el punto de rocío, una solución de peróxido de hidrógeno a una concentración de 18 miliMolar (mM), las plantas de chile habanero, desde su transplante hasta el día de la cosecha de los frutos, los cuales fueron usados para la elaboración de los extractos metanólicos. Posteriormente se cuantifico la concentración de compuestos bioactivos (fenoles totales, flavonoides y capsaicinoides) así como la actividad antimicrobiana por el método de difusión en discos contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 51813), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Salmonella Thompson* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes Scot A.*, *Streptococcus faecalis* y *Candida albicans.* Los resultados obtenidos muestran un aumento en el contenido de flavonoides, fenoles totales y capsaicinoides en los chiles habaneros bajo tratamiento, comparándolos con el control. De la misma forma, la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos bajo tratamiento de peróxido de hidrógeno, contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas, muestran claramente una actividad antimicrobiana mejorada para todas las bacterias, comparado con el extracto del control. En conclusión el presente estudio confirma que el tratamiento foliar de peróxido de hidrógeno aumenta la síntesis de metabolitos secundarios y con ello la actividad antimicrobiana de los frutos de chile habanero.

Palabras clave: peróxido de hidrógeno, actividad antimicrobiana, *Capsicum chinense*, compuestos bioactivos.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of foliar applications of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the antimicrobial activity of habanero pepper (*Capsicum chinense)* metanolic extracts, against various types of bacteria of medical importance. The treatment consisted of spraying every two weeks until the dew point, a solution of hydrogen peroxide at a concentration of 18 millimolar (mM), on habanero chili plant, from transplanting until the day of the harvest of the fruits, which were used for preparation of methanol extracts. Later the concentration of bioactive compounds (total phenols, flavonoids and capsaicinoids) was quantified as well as the antimicrobial activity by disc diffusion method against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 51813), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Salmonella Thompson* (ATCC 14028), Scot A. *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus faecalis* and *Candida albicans*. The results show an increase in the content of flavonoids, phenols and capsaicinoids in habanero peppers under treatment, compared to control. In the same manner, *in vitro* antimicrobial activity of the extracts under hydrogen peroxide treatment, against bacteria gram-positive and gram-negative, clearly show improved antimicrobial activity for all bacteria, compared to the control extract antimicrobial activity. In conclusion, the present study confirms that the foliar treatment of hydrogen peroxide increases the synthesis of secondary metabolites and thus the antimicrobial activity of the fruits habanero.

Keywords: hydrogen peroxide, antimicrobial activity, *Capsicum chinense*, bioactive compounds.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Margarito Vargas y Avelina Hernández, gracias por el ilimitado esfuerzo por siempre darnos lo mejor a mí y mis hermanos, Sandra, Marcela, Andrea y Raúl.

A mis compañeros de Agroindustrial, gracias por compartir conmigo esta etapa de mi vida; a mis maestros; amigos, Miriam Vilchis y demás personas que creyeron en mí.

A Dios, gracias por todo lo que me ha dado.

INDICE GENERAL

RESUMEN ii
SUMMARY iv
AGRADECIMIENTOS v
INDICE GENERAL vi
INDICE DE CUADROS viii
INDICE DE FIGURAS ix
1. INTRODUCCIÓN. 1
2. REVISION DE LA LITERATURA 4
2.1. Los metabolitos secundarios en las plantas 4
2.1.1. La propiedad benéfica de los metabolitos secundarios en la salud 4
2.2. El chile habanero "*Capsicum chinense*" 6
2.2.1. Compuestos bioactivos en el chile habanero 9
2.2.1.1. Capsaicinoides 9
2.2.1.2. Flavonoides 11
2.2.1.3. Vitaminas y minerales 12
2.3. Capacidad antimicrobiana 15
2.3.1. Capacidad antimicrobiana de plantas del género *Capsicum* 15
2.3.2. Capacidad antimicrobiana del chile habanero 16
2.4. Factores inductores de metabolitos (FIMs) 17
2.4.1. Las especies reactivas de oxigeno (EROs) 18
2.4.1.1. El peróxido de hidrógeno como elicitor 21
3. HIPÓTESIS 23
4. OBJETIVOS 23
4.1. Objetivo general. 23
4.2. Objetivos específicos 23
5. METODOLOGÍA. 24
5.1. Materiales 24
5.1.1. Material biológico 24
5.1.2. Material Químico 24
5.2. Cultivo de chile habanero 24
5.2.1. Plantación de las semillas 24
5.2.2. Crecimiento de la planta en Invernadero 25
5.2.3. Fertirriego 25

5.3. Aplicación de los tratamientos 26
5.4. Recolección de los chiles habaneros 27
5.5. Preparación del extracto 27
5.6. Cuantificación de compuestos bioactivos 28
5.6.1. Cuantificación de fenoles totales 28
5.6.2. Cuantificación de flavonoides 28
5.6.3. Cuantificación de capsaicinoides 29
5.7. Actividad antimicrobiana 29
5.7.1. Crecimiento del inoculo 29
5.7.2. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* 29
5.8. Diseño experimental 30
5.9. Análisis estadístico 31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 32
6.1. Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y capsaicinoides. 32
6.1.1. Cuantificación de fenoles 32
6.1.2. Cuantificación de flavonoides 34
6.1.3. Cuantificación de capsaicinoides 36
6.2. Actividad antimicrobiana 37
7. CONCLUSIÓN 41
8. REFERENCIAS 42
9. ANEXOS 50
9.1. Anexo 1. Modificación en las soluciones nutritivas utilizadas para la nutrición de las plantas a partir de la formulación de Steiner. 50
9.2. Anexo 2. Obtención de las soluciones de peróxido de hidrógeno a 18 mM. 51

INDICE DE CUADROS

Tabla 1. Cuantificación de fenoles totales en los frutos y el incremento dado. Los resultados están expresados en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra fresca. 33

Tabla 2. Cuantificación de flavonoides en los frutos y el incremento dado. Los resultados están expresados en miligramos de equivalentes de rutina por gramo de muestra fresca. 35

Tabla 3. Cuantificación de capsaicinoides en los frutos y el incremento dado. Los resultados están expresados en miligramos por gramo de muestra fresca. 36

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los extractos contra las bacterias gram-positivas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). 38

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los extractos contra las bacterias gram-negativas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05). 39

Tabla 6. Solución nutritiva Steiner para la etapa de crecimiento. 50

Tabla 7. Solución nutritiva Steiner para la etapa de floración. 50

Tabla 8. Solución nutritiva Steiner para la etapa de fructificación. 51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de las diferentes formas en que los metabolitos secundarios pueden afectar las células de microorganismos patógenos (Radulović y col., 2013). 5

Figura 2. Planta de chile habanero. 7

Figura 3. La especie *Capsicum chinense* alberga una gran cantidad de variedades de chiles de todas formas y colores. 8

Figura 4. Estructuras químicas y masa molecular de los principales capsaicinoides. 10

Figura 5. Estructura general de los flavonoides. En los alimentos generalmente R4'=H, R5'=OH y R6=H. 11

Figura 6. Representación esquemática de la generación de las especies reactivas de oxigeno (EROs). 19

Figura 7. Las EROs como mensajeros secundarios de diversas respuestas hormonales..... 20

Figura 8. Configuración de las filas dentro del invernadero. 25

Figura 9. Suministro de la solución nutritiva a las plantas. 26

Figura 10. Se muestran los frutos de la planta de chile habanero, aun en color verde, los cuales serán recolectados para el posterior análisis experimental. 27

Figura 11. Disposición de los sujetos experimentales en el invernadero. C= variedad Chichen Itzá; J= var. Jaguar; cC= Control var. Chichen Itzá; cJ= control de var. Jaguar. 30

1. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades infecciosas son el principal problema de salud pública con gran impacto físico, económico, psicológico y social para los pacientes (Espinosa y col., 2009), así como para las instituciones dedicadas a su atención por sus altas tasas de morbilidad y mortalidad, además del incremento en los días de hospitalización y el coste de los insumos en general (Hayek y col., 2013; WHO, 2014).

De acuerdo con las últimas publicaciones las enfermedades infecciosas fueron responsables de la muerte de más de 8,7 millones de personas alrededor del mundo en 2008 (Radulović y col., 2013), de estas en el continente americano suceden alrededor de un millón de muertes cada año (Roses, 2011) y específicamente en México alrededor de 38 000 personas pierden la vida anualmente por la misma causa (PAHO, 2012). Igualmente en Europa se estima que 25 000 personas mueren cada año por la resistencia bacteriana a los tratamientos con antibióticos y en Norteamérica se estima que al menos hay 2 millones de enfermos y 23 000 personas mueren por la misma causa (Laxminarayan y col., 2013). Por citar un ejemplo, cepas de tuberculosis que han desarrollado resistencia a los principales antimicrobianos, cada año aparecen en más de 400 000 personas alrededor del mundo con un 35% de defunciones (Radulović y col., 2013), en América latina, por su parte, la tuberculosis afecta 200 000 personas y 25% de estas pierde la vida (WHO, 2007).

Actualmente los microorganismos causantes de las principales enfermedades infecciosas a nivel mundial, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*; ahora muestran resistencia al uso común de antibióticos específicos que hoy en día excede el 50% (WHO, 2014).

El problema de la resistencia microbiana se debe al uso inapropiado de los antibióticos (Espinosa y col., 2009), ya sea porque el paciente los consume frecuentemente (Hayek y col., 2013; Sirohi y col., 2013) o porque su diagnóstico y prescripción fueron equivocados (Ogbodo y col., 2011; Laxminarayan y col., 2013); y por la práctica de la automedicación, principalmente (Cheaito y col., 2013). En Nuestro país, por ejemplo, hasta el pasado 2010, era posible comprar medicamentos sin receta médica; y diversos estudios revelaron que alrededor del 40% de las personas practicaban activamente la automedicación y además que de las personas

recetadas por un médico, se calculó que la mitad de pacientes no recibían el tratamiento adecuado (Espinosa y col., 2009; Sosa y col., 2010).

Esta resistencia a los antibióticos se desarrolla por microorganismos que han perfeccionado la capacidad de sobrevivir ante la acción de un medicamento, y puede ser adquirida por la transferencia horizontal de genes o mutaciones (Ogbodo y col., 2011; Laxminarayan y col., 2013). Muchos de estos genes de resistencia pueden residir en plásmidos, permanecer dentro de las bacterias y finalmente ser expresada por su descendencia generando colonias resistentes (Ogbodo y col., 2011).

Hoy en día las enfermedades infecciosas, causadas por patógenos resistentes, hacen necesario usar medicamentos de nueva generación, los cuales son más caros, tienen severos efectos secundarios y necesitan de un monitoreo durante el tratamiento lo que igualmente incrementa los costos (WHO, 2014). Esta situación no es problema en países de altos ingresos, mientras que en el caso de países de bajos ingresos sería complicado tan solo tener acceso a antibióticos de segunda generación (Laxminarayan y col., 2013). Por lo anterior la incidencia de infecciones adquiridas en cuidados intensivos es tres veces mayor en los pacientes, y nueve veces mayor para recién nacidos, en países en desarrollo que en países desarrollados (Laxminarayan y col., 2013); donde 2/3 de la mortalidad en niños menores de 5 años está relacionada a las enfermedades infecciosas (Radulović y col., 2013). El aumento de estas bacterias resistentes a antibióticos causan sepsis en recién nacidos, meningitis, neumonía, diarrea, tifoidea, etc. (Namita y Mukesh, 2012; Laxminarayan y col., 2013). Una consecuencia adicional de la resistencia antimicrobiana es la imposibilidad de realizar cirugías mayores, transplantes, quimioterapias, etc. ya que se ha estimado que sin antibióticos adecuados del 30-40% de los pacientes podrán sufrir infecciones postoperatorias con resultados fatales del 30% (Laxminarayan y col., 2013).

El normal proceso evolutivo de los microorganismos sugiere que las bacterias tienden a generar resistencia a los fármacos con el paso del tiempo, el problema es el aceleramiento por los factores generadores de resistencia antes expuestos (WHO, 2014). Expertos advierten que una época post-antibióticos, en la que infecciones comunes y lesiones menores pueden matar, es una posibilidad muy real para este siglo (Laxminarayan y col., 2013; WHO, 2014).

Una de las alternativas más prometedoras hoy en día contra la resistencia microbiana son los fitoquímicos, muchos de estos se han investigado científicamente (Radulović y col., 2013) y han demostrado inhibir el crecimiento de patógenos. Estos compuestos tienen estructuras y modos de acción diferentes a los antibióticos convencionales por lo que se asume no generaran resistencia; aunque es necesario un estudio previo para prescribir algún tratamiento (Ogbodo y col., 2011; Namita y Mukesh, 2012; Jinukuty y Giri, 2013; Sirohi y col., 2013).

2. REVISION DE LA LITERATURA

2.1. Los metabolitos secundarios en las plantas

Las plantas además de producir sustancias esenciales para su sobrevivencia, crecimiento y reproducción, sintetizan otros compuestos llamados “fitoquímicos”, “bioactivos” y “metabolitos secundarios” (Veberič, 2010; Ruiz-Lau y col., 2011), los cuales son usados por la planta para protegerla de los perjudiciales rayos UV, contra el ataque de herbívoros, patógenos e insectos (Ferrari, 2010; Doughari, 2012); para atraer a polinizadores, brindar colores característicos a la planta y algunas características organolépticas de los frutos, etc. (Mazid y col., 2011; Baenas y col., 2014). La biosíntesis de estos compuestos en las plantas suele estar limitada a estados específicos del desarrollo, tanto del organismo como de las células, al igual varía en relación a periodos de estrés causados por deficiencias nutritivas, hídricas, factores ambientales o por el ataque de organismos antagónicos (Ruiz-Lau y col., 2011).

Existe gran cantidad de tipos de metabolitos en las plantas, no obstante los principales grupos son alcaloides, glucósidos, flavonoides, fenoles, saponinas, taninos y terpenos (Mazid y col., 2011; Doughari, 2012). Toda esta gama de compuestos son de gran interés para los seres humanos por su uso potencial como materiales industriales, tintes, perfumes, nutrientes, aditivos en alimentos, biopesticidas, fertilizantes orgánicos y medicamentos principalmente (Ferrari, 2010; García-Mier y col., 2013; Patel y Krishnamurthy, 2013; Hemalatha y Dhasarathan, 2013; Baenas y col., 2014).

2.1.1. La propiedad benéfica de los metabolitos secundarios en la salud

En el campo de la medicina, estos compuestos además de preservar la salud integral del organismo, son efectivos en el tratamiento de múltiples enfermedades y padecimientos (Silva, 2012; Siddiqui y col., 2013 b; Baenas y col., 2014). También se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que tienen propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos patógenos (Ramproshad y col., 2012; Sapkota y col., 2012; Hayek y col., 2013) con diferentes mecanismos de acción (Figura 1) (Castro y col., 2013; Radulović y col., 2013). En general su efecto inhibidor es mucho más potente contra bacterias gram-positivas que contra gram-negativas (Hayek y col., 2013).

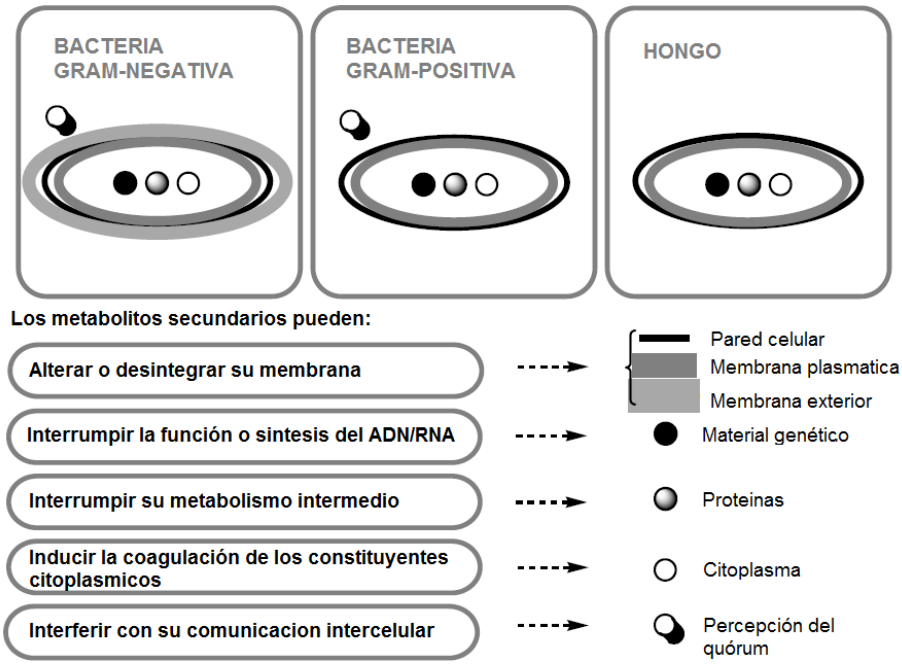

Figura 1. Representación de las diferentes formas en que los metabolitos secundarios pueden afectar las células de microorganismos patógenos (Radulović y col., 2013).

De acuerdo con datos de la organización mundial de la salud (WHO) el 80% de la población del planeta depende principalmente de las propiedades de plantas medicinales para tratar enfermedades y padecimientos (Namita y Mukesh, 2012; Radulović y col., 2013; Sirohi y col., 2013), esto es común en áreas rurales donde no hay tratamientos disponibles o no hay manera de pagarlos (Jinukuty y Giri, 2013). Este tipo de productos medicinales de origen natural han sido utilizados desde milenios para el tratamiento de múltiples trastornos de la salud (Doughari, 2012; Ramproshad y col., 2012; Jinukuty y Giri, 2013) y a través de todo ese tiempo los conocimientos de sus propiedades se fueron perfeccionando y transmitiendo de generación en generación (Jinukuty y Giri, 2013).

Desde hace tiempo existen motivos suficientes que justifiquen una mayor investigación en sustancias de origen vegetal, uno de los más importantes tiene que ver con los factores negativos de los fármacos convencionales como que poseen algún grado de toxicidad para el organismo, la capacidad de dañar la flora intestinal, provocan lesiones renales (Namita y Mukesh, 2012; Sirohi y col., 2013), causan efectos secundarios como hipersensibilidad, inmunosupresión y reacciones alérgicas; o el hecho de que los patógenos pueden crear resistencia a estos, haciéndolos ineficaces, la cual es la más destacada preocupación (Al-Fartosy y Zearah, 2013; Castro y col., 2013; Hayek y col., 2013; Saranraj y Sivasakthi, 2014).

Actualmente hay más de 1 340 plantas con actividad antimicrobiana y más de 30 000 compuestos antimicrobianos han sido aislados de estas, siendo los compuestos fenólicos (alcaloides, fenoles y flavonoides) los que muestran mayor capacidad antimicrobiana (Hayek y col., 2013). Al igual se sabe que una cuarta parte de los productos farmacéuticos en países industrializados contienen compuestos que son directa o indirectamente sintetizados por plantas (Namdeo, 2007; Hayek y col., 2013).

2.2. El chile habanero "*Capsicum chinense*"

El habanero es una especie perteneciente al género *Capsicum*, descrito por Carlos Linneo y que lo publicó en el año 1753 en su monumental obra *Species Plantarum*. Se cree que el nombre del género deriva del griego "*kapto*", que significa "picar" que es su principal característica (Waizel-Bucay y Camacho, 2011).

El género *Capsicum*, se incluye en la familia botánica de las solanáceas (Nuez, 1996; Mongkolporn y Taylor, 2011). Esta familia la forman aproximadamente 90 géneros, los cuales se dividen en dos subfamilias: *Solanoideae Y Cestroideae* (Nuez, 1996). Esta familia tiene gran importancia económica por tener a otros representantes como la papa, el tomate, el tabaco, la Petunia, etc. (Nuez, 1996; Mongkolporn y Taylor, 2011; Omolo y col., 2014). Las especies *Capsicum* fueron domesticadas aproximadamente en el año 7 500 A.*C.* y son junto con las cucurbitáceas (*Cucurbitaceae*), el frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) y el maíz (*Zea mays L.*) las primeras plantas cultivadas en América (Segura y col., 2013), asimismo hoy en día representan la especia más cultivada en el mundo y un ingrediente importante en la mayoría de las cocinas mundiales (Omolo y col., 2014).

Capsicum chinense fue originado en el amazonas e introducido en América central, la región yucateca y la zona de las islas caribeñas; sitio donde fue cultivada por muchos siglos atrás (Lim, 2013). Geográficamente el centro de origen se ubica entre el sur de Brasil y el este de Bolivia, el oeste de Paraguay y el norte de Argentina, en esta región se observa la mayor distribución de especies silvestres en el mundo (Ruiz-Lau y col., 2011; Teodoro y col., 2013). Esta especie fue usada en la dieta de las culturas americanas precolombinas generalmente como especia o en forma de salsas (Teodoro y col., 2013). También se sabe, que los antiguos mayas utilizaban diferentes partes del chile habanero para combatir infecciones en la piel,

dentadura, lesiones del estómago, problemas respiratorios, llagas y quemaduras (Brito-Argáez y col., 2009; Omolo y col., 2014). Fue mal llamada *Capsicum chinense* (proveniente de china) por Niko-laus von Jaquin, un médico holandés, el cual las colecto en el caribe en 1977 (Lim, 2013).

En Yucatán el *C. chinense* es comúnmente llamado “habanero” y se encuentra distribuido por toda la península donde se observan diferentes formas, colores y tamaños de fruto. Tiene gran importancia económica como hortaliza y ocupa el segundo lugar después del tomate en superficie cultivada (Ruiz-Lau y col., 2011).

La especie es de porte pequeño, muy ramificado, principalmente erguido, sub-arbusto anual o perenne de 30 a 120 cm de alto. Tiene hojas verdes vivas en forma oval y un poco arrugadas como rasgo distintivo (Figura 2) (Lim, 2013).

Figura 2. Planta de chile habanero.

Su raíz es pivotante y profunda de 40 a 120 cm con un sistema radicular bien desarrollado. La floración inicia cuando la planta comienza a ramificarse con flores apareciendo en las axilas (Ruiz-Lau y col., 2011). Las flores se producen de 2 a 3 por

nodo, rasgo que las distingue en la familia *Capsicum*, con corolas blancas, un poco verdosas y anteras purpuras sin manchas difusas en la base de los lóbulos. Pedicelos erectos o disminución en la antesis. Los chiles varían mucho en tamaño y forma que van desde las bayas tamaño chiltepín de 0,5 cm de diámetro, globoso y cilíndrico; hasta 10 cm de largo, arrugado, generalmente colgante, rojo, naranja, amarillo o blanco cuando están maduros (Figura 3) (Lim, 2013).

Figura 3. La especie *Capsicum chinense* alberga una gran cantidad de variedades de chiles de todas formas y colores.

El chile habanero para su cultivo demanda una cantidad de agua de 550 a 700 mm por ciclo, sobretodo en floración y llenado de fruto. Se desarrolla mejor a temperaturas superiores a 24 °C con poca variación entre el día y la noche, no tolera temperaturas menores a 15 °C y necesita humedad aprovechable del suelo entre 80 y 90% (Ruiz-Lau y col., 2011).

El chile habanero tiene gran demanda en el mercado, ya que se considera dentro de los más picantes y aromáticos; se comercializa generalmente en forma de pasta para ser utilizada en la industria de los alimentos, aunque igualmente son

utilizados en la medicina, debido a su riqueza en capsaicinoides (Ruiz-Lau y col., 2011). Los principales en exportarlo son Belice y México; y son distribuidos en el mercado nacional, Estados Unidos y Canadá; además de que se abren nuevos mercados en Europa donde tienen una muy alta demanda (Teodoro y col., 2013).

2.2.1. Compuestos bioactivos en el chile habanero

Muchas sustancias bioactivas están presentes en los chiles incluyendo el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles (vitamina E), carotenoides (provitamina A), compuestos fenólicos, flavonoides y minerales, además de sus constituyentes característicos, los capsaicinoides (Segura y col., 2013; Teodoro y col., 2013; Wahyuni y col., 2013). La cantidad de cada uno de ellos en la planta y frutos está influenciada por muchos factores: la genética, el clima, el grado de exposición a la luz, prácticas culturales y organismos en su entorno (Pistelli y Giorgi, 2012; Wahyuni y col., 2013). Se ha demostrado que los chiles habaneros presentan mayor contenido de compuestos fenólicos que el presente en fresas, tomates o algunos pimientos, con una interesante fuente de compuestos antimicrobianos y antifúngicos (Castro-Concha y col., 2014; Omolo y col., 2014) y también se han reconocido sus propiedades benéficas en la prevención de numerosas enfermedades crónico degenerativas, infecciosas y cáncer si es consumido en cantidades adecuadas (Kouassi y col., 2012; Siddiqui y col., 2013 b).

2.2.1.1. Capsaicinoides

Los compuestos fenólicos en habanero incluyen a los capsaicinoides, un grupo de oleorresinas que proveen al fruto el picor que solo son encontradas en frutos del género *Capsicum* (Waizel-Bucay y Camacho, 2011). La capsaicina e hidrocapsaicina son los dos más grandes miembros este grupo y usualmente representan el 90% del picor de los frutos, el 10% restante lo constituyen otros compuestos análogos (Canto-Flick y col., 2008; Wahyuni y col., 2013; Sganzerla y col., 2014). Son producidos por una reacción de condensación entre una mitad aromática y un ácido graso de cadena ramificada C9-C11 (Garcés-Claver y col., 2006; Wahyuni y col., 2013) (Figura 4).

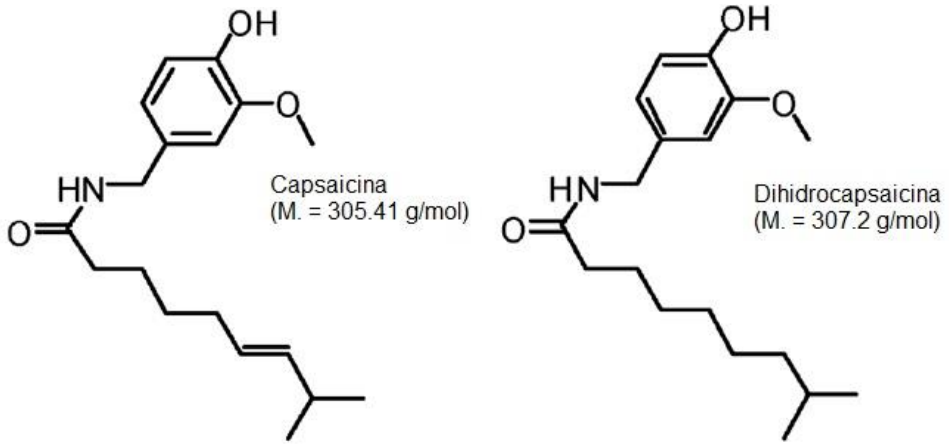

Figura 4. Estructuras químicas y masa molecular de los principales capsaicinoides.

La pungencia (contenido de capsaicinoides) en el habanero es uno de los rasgos característicos que definen su calidad comercial (Siddiqui y col., 2013 b). Según la escala de Scoville, método empleado para representar el nivel de pungencia de los chiles (Garcés-Claver y col., 2006; Wahyuni y col., 2013), el nivel de pungencia del habanero en unidades SHU es variable. Giuffrida y col., (2013) encontraron rangos en chiles habaneros que van de 100 000 a 867 000 unidades SHU, aunque existen otras variedades producto de hibridación con especies *C. chinense* que son más picosas como el Carolina Reaper (con más de 2 200 000 SHU) (Canto-Flick y col., 2008).

Dentro del fruto, los capsaicinoides se sintetizan principalmente en las células epidérmicas de la placenta, que define los lóculos de frutas y se conducen por la conexión de tejido de la placenta hasta el pericarpio, justo en el momento que comienza la maduración (Garcés-Claver y col., 2006; Canto-Flick y col., 2008; Wahyuni y col., 2013).

Los capsaicinoides han sido ampliamente estudiados y comúnmente son usados en la industria de los alimentos, para propósitos médicos por sus propiedades antibacterianas, antidiabéticas y analgésicas; además de algunas otras como en sprays para defensa (Garcés-Claver y col., 2006; Silva, 2012). Igualmente existe evidencia de los potenciales efectos benéficos de los capsaicinoides en el sistema cardiovascular (Luo y col., 2011), en el sistema gastrointestinal, matando bacterias que producen ulceras estomacales (Lou y col., 2011; Silva, 2012; Wahyuni y col., 2013); en el tratamiento contra el cáncer, avalando su actividad en pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* (Luo y col., 2011; Segura y col., 2013; Simonovska y col., 2014);

además tiene la propiedad de evitar mutaciones en el ADN (Segura y col., 2013; Sganzerla y col., 2014), es también un ingrediente de cremas para tratar el dolor crónico tales como dolores musculares, dolores dentales, neuropatía diabética, osteoartritis, erupciones de la piel y artritis reumatoide (Luo y col., 2011; Ruiz-Lau y col., 2011; Silva, 2012; Wahyuni y col., 2013); además, el impacto en la reducción de la grasa corporal a través del proceso de termogénesis y por tanto en la regulación del peso corporal, fue comprobado (Luo y col., 2011; Gorelick y Bernstein, 2014; Sganzerla y col., 2014; Simonovska y col., 2014). La capsaicina también posee propiedades antimicrobianas, por lo que se usa como un inhibidor natural de microorganismos patógenos en los alimentos (Nascimento y col., 2014; Sganzerla y col., 2014; Simonovska y col., 2014) y se ha investigado sobre su posible uso contra distintos patógenos de importancia médica (Nascimento y col., 2014; Omolo y col., 2014; Sganzerla y col., 2014).

2.2.1.2. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que comprenden quince carbonos con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos (Wahyuni y col., 2013) (Figura 5). Son compuestos polifenólicos, hechos de más de un anillo de benceno (Doughari, 2012), de bajo peso molecular y disponible prácticamente en todas las plantas alimenticias (Hada y Sharma, 2014). Son derivados de la ruta biosintéticos de los fenilpropanoides por la actividad de un complejo multi-enzimático (Wahyuni y col., 2013).

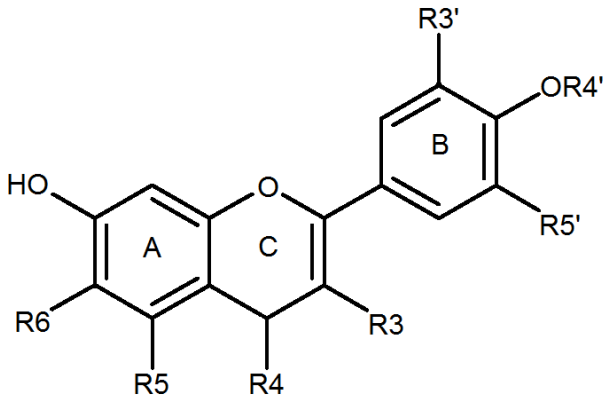

Figura 5. Estructura general de los flavonoides. En los alimentos generalmente R4'=H, R5'=OH y R6=H.

Representan un amplio grupo de derivados fenólicos hidrosolubles (Hada y Sharma, 2014), en su mayoría de colores vivos con más de 4 mil tipos de flavonoides conocidos (Doughari, 2012; Hada y Sharma, 2014). Las principales subclases de flavonoides son flavonas, isoflavonas, flavanos, flavonoles y antocianinas (Veberič, 2010; Doughari, 2012; Wahyuni y col., 2013); estos últimos son responsables de los colores rojos, morados y azules encontrados en algunos tipos de chiles habaneros (Wahyuni y col., 2013).

Los flavonoides son uno de los grupos más extensos de metabolitos secundarios y están ampliamente distribuidos entre las especies vegetales; estos protegen a la planta de la radiación UV y otros factores del medio ambiente que son dañinos; atraen polinizadores y dispersores de semillas; son compuestos alelopáticos (Pistelli y Giorgi, 2012), también poseen muchas propiedades antioxidantes (Siddiqui y col., 2013 b), además de ser potentes agentes antimicrobianos (Al-Fartosy y Zearah, 2013; Nascimento y col., 2014), liberándose naturalmente en las plantas en respuesta ante alguna infección microbiana, formando complejos con proteínas extracelulares y solubles del microorganismo, promoviendo la ruptura de su membrana celular (Hemalatha y Dhasarathan, 2013; Hada y Sharma, 2014); igualmente contra diversos microorganismos patógenos para los seres humanos se ha probado y comprobado su potente capacidad antimicrobiana (Pistelli y Giorgi, 2012). Algunos estudios también han demostrado su eficacia como antioxidantes (Doughari, 2012), sus roles benignos contra enfermedades del corazón, ataque cerebral y algunas formas de cáncer (Nascimento y col., 2013); además tienen la propiedad de no ser citotóxicos contra glóbulos rojos de sangre humana (Al-Fartosy y Zearah, 2013).

2.2.1.3. Vitaminas y minerales

El ácido ascórbico o vitamina C, es una importante vitamina hidrosoluble presente en los chiles habaneros, tiene un rol importante como antioxidante y cofactor de enzimas que componen el metabolismo humano (Wahyuni y col., 2013). También previene enfermedades crónicas y relacionadas con el envejecimiento, incluyendo padecimientos del corazón, colesterol alto, cataratas, presión alta y cáncer (Segura y col., 2013; Teodoro y col., 2013); ayuda a reducir la inflamación presentada en artritis y asma, también sirve como refuerzo del sistema inmunológico (Silva, 2012; Wahyuni y col., 2013). Además la vitamina C actúa como agente quelante, el cual forma

complejos con los metales pesados y evita la toxicidad de estos al cuerpo humano (Gorelick y Bernstein, 2014). El consumo de 100 g de chile fresco provee del 100% al 200% de la recomendación diaria de vitamina *C.*, más de 6 veces la concentración en las naranjas (Omolo y col., 2014). Su contenido varía de 43 a 247 mg por cada 100 g de fruto fresco (Wahyuni y col., 2013), atribuyéndole a frutos de color naranja la mayor concentración de esta sustancia (Segura y col., 2013).

En los chiles habaneros también podemos encontrar provitamina A o carotenoides, que son terpenoides formados por la condensación de 8 unidades de isopreno (Segura y col., 2013). Estas sustancias imparten el color naranja y rojo en los vegetales; y dos son exclusivos del género *Capsicum*, la capsantina y capsorubina (Kevrešan y col., 2009; Segura y col., 2013; Wahyuni y col., 2013). Sus funciones principales son atrapar la luz en longitudes de onda adecuada, apenas accesible a la clorofila pero que protegen de daño al aparato fotosintético y atenuar las especies dañinas como el oxígeno singlete; además son los responsables de los atractivos colores de variados tipos de frutas y flores lo que juega un importante rol como atracción de polinizadores y dispersadores de semillas (Kevrešan y col., 2009; Siddiqui y col., 2013 b; Wahyuni y col., 2013). Se ha encontrado que la concentración en varios genotipos de chiles habaneros varía de 1,0 a 1,26 mg por cada 100 g de muestra fresca de chiles, donde las variedades amarillas presentan mayor contenido de carotenoides que las verdes (Segura y col., 2013). Su consumo en cantidades adecuadas reduce las probabilidades de padecer distintos tipos de cáncer, enfermedades del corazón, ataque cerebral, degeneración de la piel, cataratas, debilitamiento del sistema inmune, entre otros (Giuffrida y col., 2013; Nascimento y col., 2013; Segura y col., 2013). Además que presentan propiedades antioxidantes interactuando con los radicales libres, rompiendo la cadena oxidativa y depurando el oxígeno singlete (Giuffrida y col., 2013; Siddiqui y col., 2013 b; Wahyuni y col., 2013).

Los tocoferoles son un grupo de derivados de los isoprenoides, que igualmente están presentes en los chiles habaneros, a los cuales le brindan gran relevancia por su rica fuente natural de vitamina E. En los chiles habaneros el tocoferol se acumula en el pericarpio y en las semillas. Sus niveles están influenciados por la madures del fruto y 100 g de fruto provee el 100% de sus necesidades básicas de vitamina E (Wahyuni y col., 2013).

Los chiles habaneros también son una buena fuente de minerales como el potasio, importante componente de los fluidos celulares, que ayuda a controlar el ritmo cardiaco y la presión arterial, el manganeso que es usado por el cuerpo como un cofactor por la enzima antioxidante superoxido dismutasa, además de hierro y magnesio (Silva, 2012).

2.3. Capacidad antimicrobiana

2.3.1. Capacidad antimicrobiana de plantas del género *Capsicum*

Al-Fartosy y Zearah (2013) determinaron la bioactividad de un flavonoide indeterminado (F1) extraído de las semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) usando el método de difusión con discos. El compuesto mostró mayor actividad antibacterial contra las bacterias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus aureus*) comparándolo con las gram-negativas (*Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa y Escherichia coli*). Contra *Streptococcus aureus* el extracto mostro un halo de inhibición de 40 mm a una concentración de 60 mg/mL, en comparación con *E. coli* que fue de 20 mm con la misma concentración de extracto. La concentración de 60 mg/mL mostro mayor actividad antibacterial que los extractos en concentraciones de 15 y 30 mg/mL, incrementándose el halo de inhibición proporcionalmente a la concentración de bioactivos.

Por su parte Hemalatha y Dhasarathan (2013) determinaron las propiedades antimicrobianas de extractos de *C. annuum* y *Capsicum frutescens* con diferentes solventes (hexano, butanol, etanol, cloroformo y agua) usando la técnica del método de difusión con discos, hallando que los extractos etanólicos de *C. annuum* y *C. frutescens* mostraron la más potente capacidad antimicrobiana contra todos los patógenos (*Micrococcus sp., Citrobacter sp., E. coli, P. aerogenosa* y *Bacillus Subtilis*). En los resultados, la zona de inhibición de extractos etanólicos de *C. annuum*, a una concentración de 50 µg/mL, para todos los patógenos, variaron de 12 a 14 mm, por su parte la zona de inhibición de extractos etanólicos de *C. frutescens* a la misma concentración variaron de 8 a 12 mm, respectivamente.

Nascimento y col. (2014) probaron la capacidad antimicrobiana de los extractos de acetonitrilo y metanólicos de la capsaicina, dihidrocapsaicina y crisoeriol (flavonoide bioactivo), provenientes de frutos enteros (fruta, piel y semillas) de chile malagueta (*C. frutescens*) contra siete microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, B. subtilis, E. coli, K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) encontrando que el crisoeriol fue el compuesto antimicrobiano más potente del chile, con una concentración mínima de inhibición (MIC) para todas las bacterias menor de

1 µg/mL; conjuntamente determinaron que los compuestos de acetonitrilo produjeron las cantidades más altas de bioactivos.

2.3.2. Capacidad antimicrobiana del chile habanero

En base a las potenciales actividades antimicrobianas de *C. annuum* contra diferentes patógenos, Brito-Argáez y colaboradores (2009) investigaron una fracción especifica de péptidos antimicrobianos, provenientes de semillas de chile habanero, contra diferentes patógenos en un estudio *in vitro*, las cuales a una concentración de 50 µg/mL inhibieron el crecimiento para *Xanthomonas campestris* en 8,8 mm, *Pseudomonas syringae* en 18,5 mm, *P. aeruginosa* en 13 mm, *Erwinia carotovora* en 10,3 mm, *Agreobacterium sp.,* en 10,1 mm, *Shigella flexnerii* en 10,1 mm, *E. coli* en 10,1 mm, *Staphylococcus aureus* en 8 mm y *B. subtilis* en 11,6 mm. En algunos como *P. aeruginosa, E. carotovora* y *Agrobacterium sp.,* presentaron mayor inhibición que el control positivo de Ampicilina a una concentración de 40 µg/mL. Estos resultados confirman las cualidades potenciales de las semillas chile habanero como fuente de péptidos antimicrobianos.

Dorantes y colaboradores (2000) probaron extractos de tres especies del género *Capsicum*, para determinar la capacidad antimicrobiana contra algunos microorganismos patógenos. Los resultados mostraron que *Listeria monocytogenes* fue el microorganismo más sensible a estos extractos, seguido por *Bacillus cereus*, *S. aureus* y *S. typhimurium*. El extracto de pimiento morrón fue el más efectivo en inhibir las bacterias con una zona de inhibición de 12, 11, 7 y 5 mm; respectivamente. Aunque el mayor portador de capsaicina fue el habanero, este tuvo la menor efectividad con una zona de inhibición de 8, 2, 5 y 1,5 mm, respectivamente. Posteriormente los fenilpropanoides: capsaicina, dihidrocapsaicina, acido cinámico, acido m-cumarico y acido o-cumarico fueron identificados y probados contra las bacterias por separado mostrando que los ácidos m-cumarico y cinámico fueron los responsables de inhibición de las bacterias.

En otro estudio también se determinó la capacidad antimicrobiana la capsaicina (obtenida de Sigma Aldrich), contra cuatro cultivos de microorganismos (*E. coli, Pseudomonas solanacearum, B. subtilis y Saccharomyces cerevisiae*) en cultivo líquido agar papa dextrosa (APD). Se encontró que a altas concentraciones (de hasta 300 µg/mL) de capsaicina, solo lograron retardar mínimamente el crecimiento de las

bacterias gram-negativas *E. coli y P. solanacearum*; en *B. subtilis* la capsaicina tuvo un resultado favorecedor, ya que se logró inhibir el crecimiento fuertemente desde la más baja concentración probada (25 µg/mL); y por su parte contra *S. cerevisiae*, tuvo un resultado opuesto al potenciar en un inicio el crecimiento de la bacteria (Omolo y col., 2014).

2.4. Factores inductores de metabolitos (FIMs)

Ahora es posible aumentar más eficazmente la cantidad de sustancias bioactivas presentes en los chiles habaneros, con la ayuda de Factores Inductores de Metabolitos (FIMs) (Rezaeieh y col., 2012; Thakur y Sohal, 2013). Estos elementos generan Patrones Moleculares Asociados a Estrés de Plantas (PMAEPs), los cuales siendo percibidos como extraños por la planta, encienden el sistema de defensa, lo que inicia los mecanismos producción de bioactivos (Torres-Pacheco y col., 2012), con el fin de asegurar su supervivencia y aumentar la habilidad de competir con otros organismos por los recursos del medio (Namdeo, 2007). Este sistema de defensa llamado Sistema Inmune Vegetal (SIV) puede activarse por ataques de microorganismos patógenos o herbívoros, factores de tipo abiótico como sequía, fertilización y salinidad o por la aplicación de sustancias químicas exógenas de origen diverso llamadas elicitores (Spoel y Dong, 2012; Torres-Pacheco, 2012).

Estos últimos, activando cambios fisiológicos, estrés y la defensa de las plantas (Patel y Krishnamurthy, 2013; Baenas y col., 2014); son usados principalmente para aumentar la síntesis de metabolitos secundarios (Patel y Krishnamurthy, 2013), al igual su uso ayuda a la caracterización y desarrollo de compuestos bioactivos de gran interés (Gorelick y Bernstein, 2014). Los parámetros que condicionan la cantidad de bioactivos producidos por una planta o una célula vegetal en específico son: el tipo de elicitor usado, su concentración (Hayek y col., 2013), la edad de la célula vegetal o planta, las condiciones en las que esta se desarrolla, su nutrición, etc. (Namdeo, 2007; Patel y Krishnamurthy, 2013).

Los elicitores pueden ser agentes abióticos como iones metálicos y compuestos inorgánicos; bióticos como moléculas derivadas de hongos, bacterias, virus o herbívoros; así como productos químicos derivados de plantas que se liberan en el sitio de ataque como restos de la pared celular, hormonas vegetales como ácido salicílico, jasmonatos, etc. (Ferrari, 2010; Veberič, 2010; Baenas y col., 2014).

Igualmente se pueden clasificar como físicos y químicos, o endógenos y exógenos; dependiendo si las sustancias son originadas por las plantas o son producidas por los patógenos, respectivamente (Namdeo, 2007; Patel y Krishnamurthy, 2013).

Existen diversas investigaciones que ofrecen información de los resultados positivos del uso de elicitores. Algunos refieren que elicitores abióticos hormonales como el ácido jasmónico, el ácido salicílico y sus derivados tienen grandes atributos; por ejemplo, el metil jasmonato incrementa la actividad antioxidante y la cantidad de flavonoides en moras (Wang, Bowman y Ding, 2008), estimula metabolitos secundarios como el estilbeno (polifenol antimicrobiano) en hojas y frutos de la vid; y aumenta la acumulación de antocianinas en manzanas (Gorelick y Bernstein, 2014).

Las células vegetales cuentan con receptores específicos que se encuentran en la superficie externa de la membrana plasmática (Veberič, 2010), los cuales al ser estimuladas por un elicitor desencadenan la activación de variados mecanismos de defensa y la aparición de diversos eventos (Ferrari, 2010; Patel y Krishnamurthy, 2013) que incluyen: rápidos cambios de fosforilación de proteínas de la membrana plasmática, alcalinización extracelular y acidificación citoplasmática; aumento en el flujo de iones (Ferrari, 2010; Mishra y col., 2012; Hao y col., 2014), reforzamiento de la pared celular, activación de cascadas de quinasas, inducción de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) y enzimas antioxidantes; producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) que son moléculas señalizadoras oxidativas; la inducción de sustancias señalizadoras hormonales como ácido jasmónico, ácido salicílico y etileno; (Veberič, 2010; Mishra y col., 2012; Thakur y Sohal, 2013; Baenas y col., 2014) y la activación para la biosíntesis de nuevos factores de transcripción, que a su vez regulan la expresión de los genes biosintéticos implicados en el metabolismo secundario (Ferrari, 2010) los cuales dictaminan la producción de bioactivos de defensa que incluyen terpenos, derivados simples fenilpropanoides, flavonoides e isoflavonoides, estilbenos, etc. (Ferrari, 2010; Veberič, 2010).

2.4.1. Las especies reactivas de oxigeno (EROs)

Uno de los primordiales eventos ocurridos después del reconocimiento de un elicitor es el llamado “estallido oxidativo” (Helliwell y Yang, 2009). Este evento comprende el aumento descontrolado de especies reactivas de oxigeno como el anión

superoxido (O_2-), el radical hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Singh y Tuteja, 2010; Sharma y col., 2011). Estas moléculas son inevitablemente producidas en la célula por dos motivos principales, uno por la reducción del oxígeno molecular expuesto a una alta energía y otro como consecuencia de la reacción entre el oxígeno molecular y las fugas de electrones de los procesos metabólicos celulares, llevados a cabo en la mitocondria, los cloroplastos y la membrana celular; principalmente (Singh y Tuteja, 2010; Sharma y col., 2011).

La generación de las EROs ocurre primeramente con la activación del oxígeno molecular (O_2); ya sea absorbiendo suficiente energía para cambiar el sentido de uno de los electrones, formando el oxígeno singlete ($^1O_2$), el cual puede causar peroxidación a los lípidos de la membrana y debilitamiento celular (Singh y Tuteja, 2010); o reduciéndose para convertirse en anión superoxido (O_2^-), el cual es fácilmente dismutado a H_2O_2 ya sea enzimáticamente o con ayuda del superoxido dismutasa (SOD) el cual cataliza la reacción. Este último consecuentemente puede convertirse en agua (H_2O) gracias a la acción de la catalasa (CAT), guayacol peroxidasa (GPX) y al ascorbato peroxidasa (APX) (Sharma y col., 2011). Por último por medio de la reacción Haber-Weiss en presencia de metales de transición o la reacción Fenton se produce el radical hidroxilo (OH), una de las especies más reactivas conocidas en la naturaleza (Figura 6) (Singh y Tuteja, 2010)

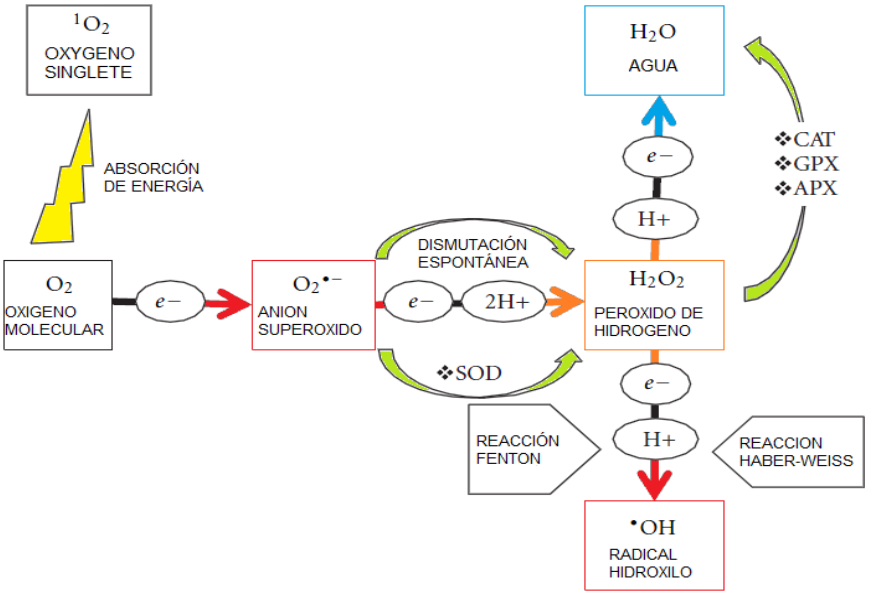

Figura 6. Representación esquemática de la generación de las especies reactivas de oxigeno (EROs).

Una alta producción de EROs supone un riesgo para la célula ya que estas moléculas reaccionan con tejidos celulares, lo que le ocasiona desde el daño a organelos hasta la muerte de la célula (Singh y Tuteja, 2010). Sin embargo, a pesar de su reactividad a altas concentraciones, estas moléculas en una moderada o baja concentración, actúan como un sistema complejo de señalización para coordinar distintos tipos de procesos del metabolismo celular, incluyendo la tolerancia al estrés medioambiental; así como servir de mensajero secundario de hormonas vegetales que intervienen en variadas respuestas de la planta (Figura 7) (Helliwell y Yang, 2009; Sharma y col., 2011).

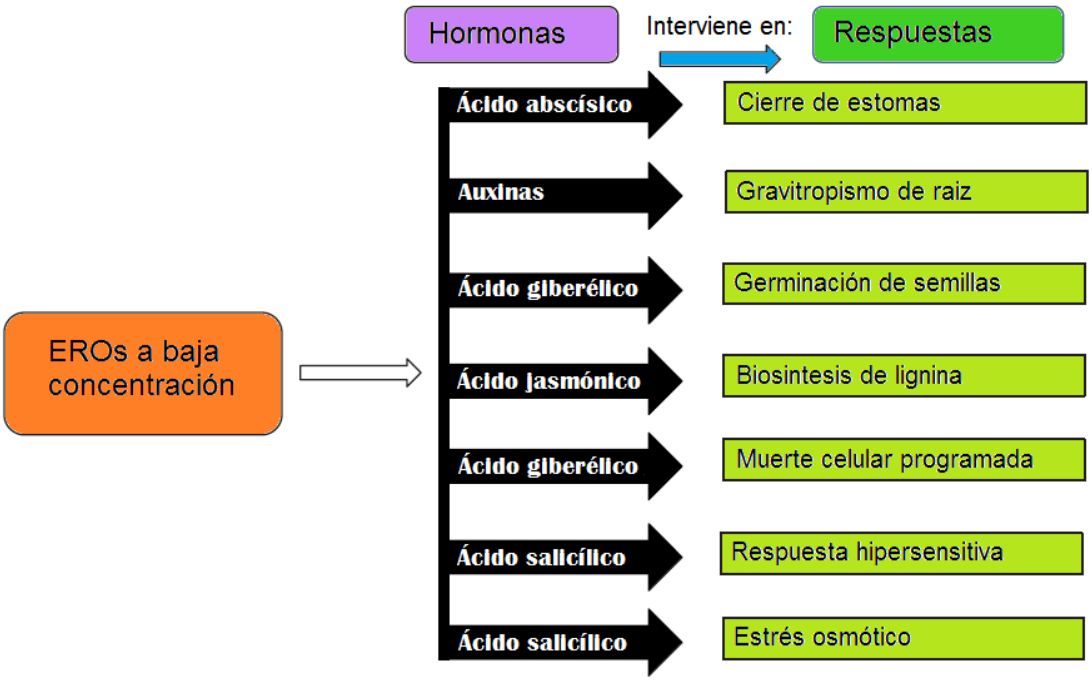

Figura 7. Las EROs como mensajeros secundarios de diversas respuestas hormonales.

La célula no puede evitar que se produzcan los peligrosos radicales libres pero si puede controlar su concentración gracias a la producción de diversas moléculas antioxidantes; de tipo enzimático como superoxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), guayacol peroxidasa (GPX), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR) principalmente; y no enzimáticos como el ascorbato (AsA), glutatión (GSH), carotenoides, tocoferoles, y compuestos fenólicos (Singh y Tuteja, 2010; Sharma y col., 2011).

Finalmente el papel que toman las EROs en la célula, ya sea actuando como sustancias señalizadoras o moléculas dañinas, es dependiente del equilibrio entre las

EROs y los compuestos antioxidantes (Singh y Tuteja, 2010). El preciso sistema celular mantiene el equilibrio entre ambos de manera muy precisa aunque factores como sequía, salinidad, toxicidad por metales pesados, radiación UV y ataque de patógenos propicia el aumento de EROs, arruinando la homeostasis celular (Singh y Tuteja, 2010; Sharma y col., 2011; Mejía-Teniente y col., 2013); que en la actualidad, para distintos fines como la producción de algún compuesto bioactivo de interés, también se puede provocar con el uso de elicitores (Mejía-Teniente y col., 2013).

2.4.1.1. El peróxido de hidrógeno como elicitor

De las EROs, el H_2O_2 es el único que no tiene electrones desapareados, lo cual le da la capacidad de salir fuera de la célula y actuar lejos del sitio de su formación (Sharma y col., 2011); esto aunado a su mayor estabilidad y larga vida media, ha recibido particular atención como una molécula señalizadora implicada en diversos procesos biológicos como el crecimiento, senescencia, fotosíntesis, el ciclo celular, señalización hormonal, la activación de mecanismos de defensa y tolerancia a factores estresantes (Singh y Tuteja, 2010; Sharma y col., 2011; Veberič, 2010; Mejía-Teniente y col., 2013; Hao y col., 2014). La respuesta de defensa en las plantas, inducidas por el peróxido de hidrógeno incluye el reforzamiento de la pared celular, respuesta hipersensitiva, así como un regulador de la expresión de genes que pueden codificar antioxidantes, proteínas de defensa, proteínas señalizadoras, metabolitos secundarios, entre otros compuestos (Mishra y col., 2012; Hao y col., 2014) finalizando con la activación de la respuesta sistemática adquirida (SAR) que consecuentemente encienden la tolerancia e inmunidad vegetal ante el posterior estrés medioambiental (Sharma y col., 2011; Torres-Pacheco y col., 2012; Mejía-Teniente y col., 2013) y contra futuros ataques por diversos tipos de patógenos incluyendo hongos, virus y bacterias (Thakur y Sohal, 2013).

Hao y col., (2014) observaron que el peróxido de hidrógeno juega un importante rol como molécula señalizadora clave en diversos estímulos y está relacionada con la producción de metabolitos secundarios. Encontraron que las aplicaciones exógenas de peróxido de hidrógeno a concentraciones de 1 a 8 mM, promueve la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) y aumenta la producción de ácido rosmarínico en *Salvia miltiorrhiza*.

Los elicitores en el pasado se usaban para hacer más resistentes a las plantas contra determinados patógenos principalmente, en la actualidad se utilizan para hacer que las plantas produzcan bioactivos específicos (Gorelick y Bernstein, 2014). Se conoce que el uso de los elicitores aumenta considerablemente la producción de bioactivos, al igual reduce el tiempo en producirlos (Rezaeieh y col., 2012) y ahora también se adoptan nuevas tecnologías como cultivos de células y tejido, aunque la producción en plantas intactas tienen la posibilidad de generar mayor diversidad de sustancias activas (Namdeo, 2007).

3. HIPÓTESIS

La aplicación de peróxido de hidrógeno a plantas de habanero (*Capsicum chinense*) incrementa la síntesis de compuestos bioactivos y por lo tanto aumentará la capacidad antimicrobiana in vitro de los frutos contra distintos tipos de bacterias de importancia médica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Determinar la capacidad antimicrobiana in vitro de extractos metanólicos de frutos de habanero (*Capsicum chinense*) var. Jaguar y Chichen Itzá en condiciones protegidas sometidos a un tratamiento de elicitación con peróxido de hidrógeno.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el incremento de flavonoides, fenoles totales y capsaicinoides presentes en el fruto de chile habanero (*Capsicum chinense*) después de someter a las plantas a un tratamiento de elicitación con peróxido de hidrógeno.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana *in vitro* de los frutos de habanero (*Capsicum chinense*) contra 6 especies de bacterias de importancia médica y de una levadura.

5. METODOLOGÍA.

5.1. Materiales

5.1.1. Material biológico

Semillas de *Capsicum chinense* var. Jaguar y Chichen Itzá, que fueron compradas en la empresa Agro Guanajuato S.A de C.V. Cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), Escherichia coli (ATCC 51813), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Salmonella Thompson* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* Scot A., la bacteria aislada medicamente *Streptococcus faecalis* y *Candida albicans* las cuales fueron provistas por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.1.2. Material Químico

Nitrato de potasio (KNO_3), rutina, ácido gálico, agente Folin, carbonato de sodio (CO_3Na_2), 2-aminoetildipentilborato, ácido fórmico, acetonitrilo, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), agar soya tripticaseína, Agar papa Dextrosa, peptona, Agar base sangre, agar Muller Hilton, todos comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis Missouri, USA).

5.2. Cultivo de chile habanero

La plantación, desarrollo y cosecha de los chiles habaneros se llevó a cabo gracias al trabajo de De los Santos (2013).

5.2.1. Plantación de las semillas

Las semillas de chile habanero para su desinfección, se sumergieron en una solución de nitrato de potasio (200 ppm) por 24 horas y posteriormente se secaron sobre papel absorbente; es muy importante usar guantes de látex, bata y tapabocas en todo momento de la experimentación. Tras 48 horas fueron sembradas en un sustrato compuesto por peat moss y vermiculita, previamente desinfectado en una proporción de 4:1 en recipientes de unicel (medida JM-29) y fueron regadas cada tercer día con una solución Steiner al 100%.

5.2.2. Crecimiento de la planta en Invernadero

Siete meses después de la germinación de las semillas, las plantas de chile habanero se trasplantaron en un invernadero experimental ubicado en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Querétaro, campus Amazcala, que se encuentra en la comunidad de Amazcala, Municipio del Márquez, Querétaro. Este invernadero es de plástico (Polietileno) con estructura metálica tipo túnel de 12 metros de lado y 9 metros de ancho (108 m^2). Durante tres días las plantas se mantuvieron en el interior del invernadero para aclimatarlas, al cuarto día se trasplantaron en bolsas negras de 10 kg de volumen, usando tezontle previamente lavado como sustrato. El total de 56 plantas se acomodaron en 4 hileras de 11 individuos y la quinta se integró de 12 plantas (Figura 8).

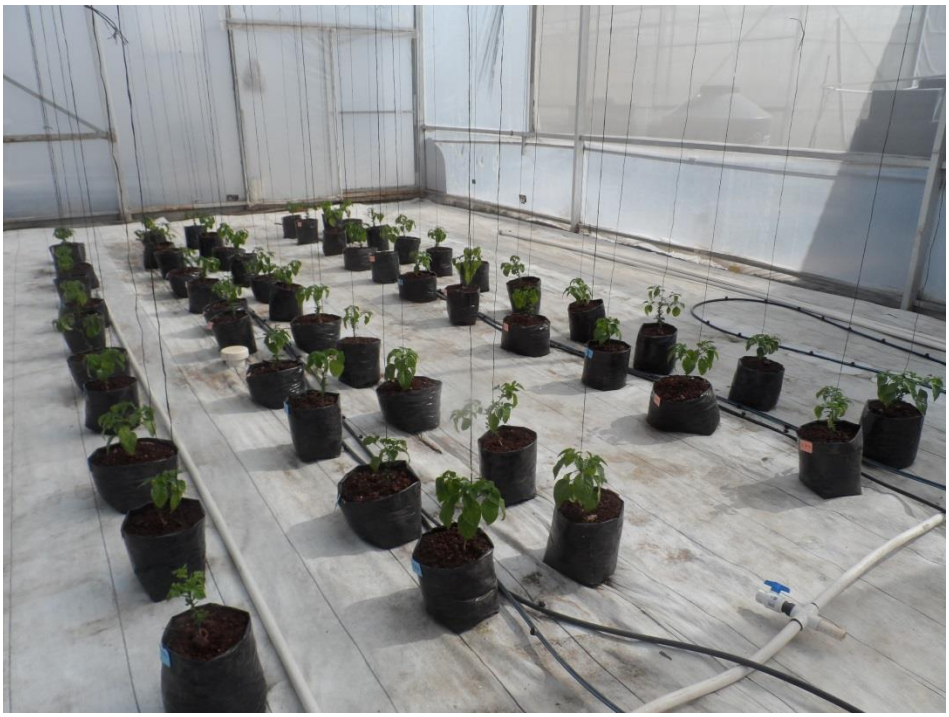

Figura 8. Configuración de las filas dentro del invernadero.

5.2.3. Fertirriego

Se nutrieron las plantas por medio del agua de riego, método comúnmente conocido como hidroponía. Se utilizó una solución Steiner con algunas variaciones dependiendo del estado fenológico, las cuales se detallan en el anexo 1. Antes de la ubicación de las plantas en el invernadero se había preparado la solución madre en

un volumen de 10 litros y esta era disuelta posteriormente en un tinaco de 2 500 litros de capacidad de manera manual.

La conductividad eléctrica se manejó en un rango de 1,2 a 2,0 dS/m^2 y el pH en un rango de 5,5 a 6,5. Este último era regulado con el uso de ácido sulfúrico para bajar su valor e hidróxido de calcio para aumentarlo. Durante el desarrollo de la planta de chile habanero en el invernadero, esta se rego con una cantidad de 6 litros por planta, cada semana, aproximadamente; con riegos frecuentes para garantizar la estabilidad de humedad aprovechable en el sustrato (Figura 9).

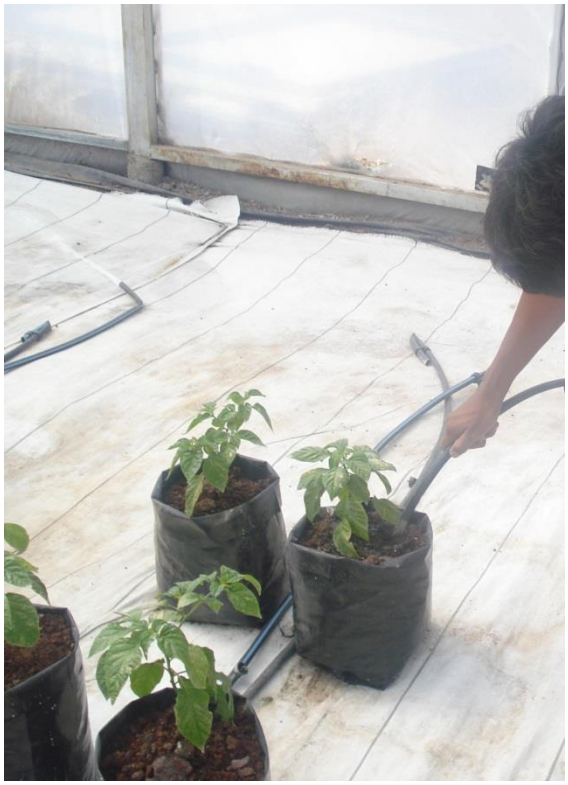

Figura 9. Suministro de la solución nutritiva a las plantas.

5.3. Aplicación de los tratamientos

Se usó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como elicitor para inducir el metabolismo secundario de las plantas de chile habanero. Las recomendaciones de la concentración se basaron en el trabajo de Landeta (2011) en la que se encontró que la concentración de 18 mM (miliMolar) fue la que indujo una mayor actividad fisiológica en la planta de chile habanero, variedad Chichén Itzá. La manera de obtener la solución de peróxido de hidrógeno a 18 mM se detalla en el anexo 2.

Las aplicaciones se realizaron de manera foliar, asperjando la solución de peróxido de hidrógeno a la planta hasta alcanzar el punto de rocío, cada quincena a partir del transplante por 105 días, hasta la cosecha el día 114 después del transplante (Figura 10).

Figura 10. Se muestran los frutos de la planta de chile habanero, aun en color verde, los cuales serán recolectados para el posterior análisis experimental.

5.4. Recolección de los chiles habaneros

Los frutos de las plantas de chile habanero fueron recolectados en estado maduro 114 días después del transplante, cortándolos con cuidado con tijeras desinfectadas en la zona media del pedúnculo, alejados por lo menos a 1 cm del tallo para evitar alguna infección patológica. Los frutos posteriormente fueron almacenados a -70 °C en un ultracongelador (Nuaire, modelo ILS-DF8513N) hasta el momento de la preparación de los extractos.

5.5. Preparación del extracto

En el momento de hacer los extractos del fruto de chile habanero, retiramos primeramente el pedúnculo del fruto manualmente, congelamos los chiles habaneros en nitrógeno líquido y posteriormente se molieron en una licuadora industrial hasta obtener un polvo fino. La extracción de compuestos fenólicos se llevó a cabo mezclando muestras frescas con metanol en una proporción de 1:10 respectivamente. Las muestras fueron protegidas de la luz en todo momento y agitadas (Orbit 1000 modelo s2030-1000; Labnet, Woodbridge, NJ, USA) a 200 revoluciones por minuto

por 24 horas a 25 °C. Después de la incubación, los extractos metanólicos fueron centrifugados (Sorvall Biofuge Primo R., modelo 75005448; Thermo Scientific, Osterode Germany) a 6 793 xg por 10 minutos. El sobrenadante se filtró en un papel filtro grado 41 (Whatman®) para retirar el sedimento y posteriormente se destilo en rotavapor (Schwalbach, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) a 40 °C hasta obtener un líquido viscoso y obscuro, este fue guardado en un frasco y posteriormente refrigerado.

5.6. Cuantificación de compuestos bioactivos

5.6.1. Cuantificación de fenoles totales

El contenido fenólico se midió usando el método Folin-Ciocalteu con algunas modificaciones (Dewanto y col., 2002). De esta manera 40 µL de extracto metanólico fueron diluidos con 460 µL de agua destilada. Esta solución fue oxidada con 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y después de 5 minutos, 1,25 mL de una solución de carbonato de sodio al 20%, fue añadida para neutralizarla, por 2 horas a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida contra un blanco a 760 nm en un lector de microplacas Multiskan Go, modelo 51119300 (Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra fresca (GAE/g FW).

5.6.2. Cuantificación de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó de acuerdo al procedimiento de Oomah y col. (2005). Un volumen de 50 µL de extracto metanólico fue mezclado con 180 µL de agua destilada y 20 µL de una solución 2-aminoetildipentilborato al 1% en una placa de 96 pozos. La absorbancia fue medida contra un blanco a 404 nm en un lector de microplacas (Multiskan Go, modelo 51119300; Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Los resultados se compararon con una curva estándar de solución de rutina. El contenido de flavonoides fue posteriormente expresado como microgramos equivalentes de rutina por gramo de muestra fresca (RE/g FW).

5.6.3. Cuantificación de capsaicinoides

El contenido de capsaicinoides fue identificado y cuantificado por HPLC (Waters 600, HPLC-DAD System) equipado con un sistema de muestreo automático (Waters 717 plus) y un detector UV/Vis (Waters 2487, Milford, MA, USA). La separación se llevó a cabo en un equipo Phenomenex (ODS-C18), columna 250 mm x 4,6 mm, 5 µm. Las muestras (10 µL) fueron analizadas en una columna de fase inversa (Phenomenex C18, 250 mm x 4,6 mm), a una velocidad de flujo de 1mL/min. La fase móvil consistió en dos solventes: solución formica acido-agua, 99:1 v/v, (A); y acetonitrilo (B), en una razón de (A/B) de 98/2 a 0 min, 68/32 a 30 min, 45/55 a 48 min, 5/95 a 53 min, 98/2 a 57 min, y el tiempo total fue de 67 minutos. Las medidas de absorbancia variaron de 260-320 nm, Las muestras para el análisis fueron liofilizadas y 5 mg fueron extraídas con 1 mL de metanol.

5.7. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana in vitro se determinó por el método de difusión con discos en agar de acuerdo a los lineamientos del comité nacional de estándares clínicos de laboratorio (NCCLS, 1997), ahora llamado instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI).

5.7.1. Crecimiento del inoculo

Las cepas *S. aureus* (ATCC 6538)*, E. coli* (ATCC 51813)*, S. mutans* (ATCC 25175)*, S. Thompson* (ATCC 14028)*, L. monocytogenes* Scot A y las bacterias aisladas medicamente *S. faecalis* y *C. albicans,* se activaron en medio caldo soya tripticaseina por 24 h a 37 ºC. Después se estrió en agar soya tripticaseina y se incubo por 24 horas a 37 ºC. Posteriormente se aíslo y se traspasó a agar sangre, y nuevamente fueron incubadas 24 horas a 37 ºC. Las cepas crecidas son las que se utilizaron para el ensayo antimicrobiano, manteniéndolas a 4 ºC hasta su posterior uso.

5.7.2. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

Las cepas crecidas en el agar sangre se inocularon en medio caldo soya tripticaseina por 24 horas a 37 °C. El caldo de cultivo fue diluido en agua peptonada hasta obtener una concentración de 1x108 UFC (correspondiente a la turbidez del

estándar de McFarland 0,5). Posteriormente 100 µL se sembraron en cajas Petri con agar Muller Hilton y se colocaron discos con 20 µL del extracto a las concentraciones de 100, 200 y 400 mg/mL, y posteriormente se dejaron incubar a 37 °C. El extracto de cada tratamiento se suspendió en DMSO. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

5.8. Diseño experimental

El tratamiento de elicitación con peróxido de hidrógeno para ambas variedades (Chichén Itzá y Jaguar) se conformó de 7 individuos cada uno, distribuidos totalmente al azar con sus respectivos controles que igualmente se conformaron cada uno de 7 individuos haciendo un total de 28 plantas bajo tratamiento, sumadas a otras 28 que no fueron parte de este estudio, para sumar un total de 56 plantas dentro del invernadero, distribuidas como ya se mencionó en 4 hileras de 11 individuos y una más con 12 individuos (Figura 11).

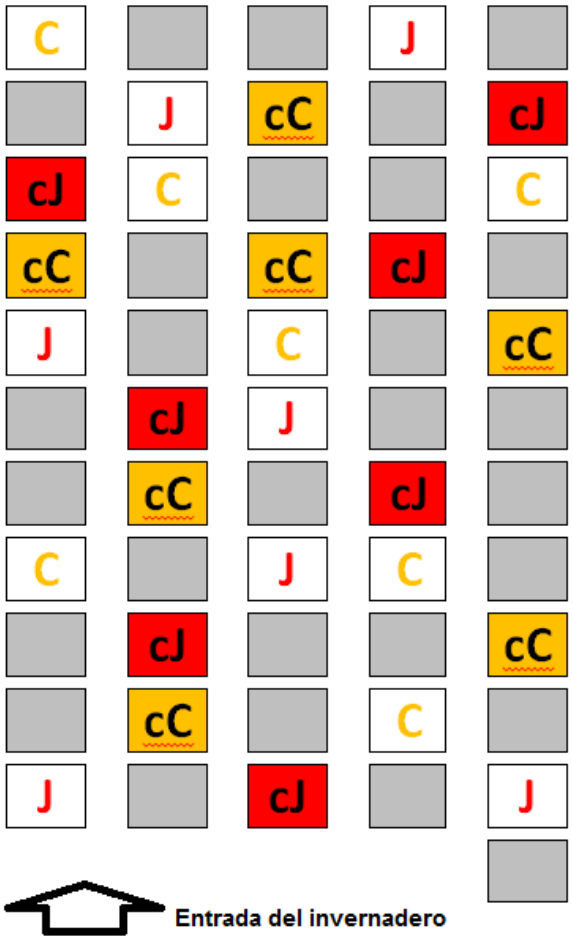

Figura 11. Disposición de los sujetos experimentales en el invernadero. C= variedad Chichen Itzá; J= var. Jaguar; cC= Control var. Chichen Itzá; cJ= control de var. Jaguar.

5.9. Análisis estadístico

El análisis de varianza se llevó a cabo para detectar diferencias entre tratamientos por los modelos generales lineares (GLM). La prueba Tukey fue aplicada con un nivel de probabilidad de $p<0,05$. Los datos fueron posteriormente analizados en el software Centurion XV (Stategraphics).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cuantificación de fenoles totales, flavonoides y capsaicinoides.

Existen diversos estudios que muestran las propiedades nutracéuticas de los chiles habaneros (Kouassi y col., 2012; Silva, 2012; Siddiqui y col., 2013 b; Wahyuni y col., 2013; Castro-Concha y col., 2014; Nascimento y col., 2014; Sganzerla y col., 2014; Simonovska y col., 2014), para medir estas propiedades es necesario medir la concentración de sus componentes bioactivos. En este trabajo se aplicaron tratamientos de elicitación con peróxido de hidrógeno con el fin de demostrar que estas sustancias pueden encender el sistema de defensa de la planta, respondiendo con la activación de variadas rutas metabólicas para la producción de diversos metabolitos secundarios de interés.

En las tablas siguientes se expone el contenido de flavonoides, fenoles totales y capsaicinoides; encontrados en los chiles habaneros Jaguar y Chichén Itzá sometidos al tratamiento foliar de peróxido de hidrógeno, así como los chiles habaneros de control, que permitan evaluar la diferencia con los tratamientos anteriores.

Los resultados muestran un aumento en la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y capsaicinoides en los extractos de las especies elicitadas, comparándolas con los extractos de las plantas que representan nuestro control. El aumento en la cantidad de flavonoides y capsaicinoides entre los distintos tratamientos es significativo, en cuanto al aumento de fenoles totales el aumento es mucho mayor comparado con el aumento de flavonoides y capsaicinoides. La variedad Chichén Itzá muestra un aumento de bioactivos en comparación con la variedad Jaguar, pero sin diferencia significante.

6.1.1. Cuantificación de fenoles

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 1 podemos observar que hubo un aumento de concentración de compuestos fenólicos en los extractos de plantas que fueron elicitadas, ya que en la variedad Jaguar encontramos 0,96 mg GAE/g de muestra fresca (FW) y en la variedad Chichén Itzá encontramos 1 mg GAE/g de muestra fresca; comparando estos resultados con los provenientes de los extractos de plantas que no fueron elicitadas donde se obtuvo 0,12 mg GAE/g FW.

Tratamiento	Fenoles totales (mg GAE/g FW)	Aumento con respecto al control (mg GAE/g FW)
H_2O_2 18 Mm (var. Jaguar)	$0,96_a$	0,84
H_2O_2 18 Mm (var. Chichén Itzá)	1_a	0,88
Control (agua destilada)	$0,12_a$	-

Tabla 1. Cuantificación de fenoles totales en los frutos y el incremento dado. Los resultados están expresados en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra fresca.

El contenido de compuestos fenólicos en chiles habaneros puede variar dependiendo de distintas variables tanto genéticas como medioambientales (Ornelas-Paz y col., 2010). Sin embargo diversos estudios nos brindan una base de concentración de estas sustancias. En sus estudios Rodríguez-Maturino y col. (2012) encontraron en frutos de chile habanero un contenido de fenoles totales de 0,592 (mg GAE/g FW) (tomando en cuenta un porcentaje de humedad del 90% en el chile habanero (Lobato y Gerónimo, 2014)); al igual Cerón-Carrillo y col. (2014) encontraron en chiles habaneros con tres distintos niveles de coloración de amarillo a naranja intenso una concentración de fenoles totales de 0,294, 0,277 y 0,211 (mg GAE/g FW) respectivamente (tomando en cuenta el mismo porcentaje de humedad en habanero). En estos datos el contenido fenólico en los chiles habaneros es mayor que el encontrado en nuestras muestras de chiles habaneros pertenecientes al control pero son menores a los encontrados en los frutos de chiles habaneros elicitados reportados en este estudio.

En cuanto al incremento de fenoles totales por efecto del peróxido de hidrógeno otros estudios exponen aumento de sus compuestos fenólicos con el uso de otro tipo de elicitores, por ejemplo en semillas de plantas de garbanzo, War y col. (2011) encontraron que aplicaciones foliares de ácido salicílico a concentración 1, 1,5 y 2 mM, aumentan el contenido de fenoles totales al pasar de una concentración de 24,2 µg GAE/g FW en el control a 34,5, 58 y 30 µg GAE/g FW; respectivamente. De la misma forma Figueroa y col. (2014) encontró que aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno en hojas de menta a concentraciones de 0,1 y 0,5 mM aumentan la concentración de fenoles totales al pasar de 30,3 mg GAE/g de muestra seca (DW) en

el control a 34 y 32,3 mg GAE/g DW; respectivamente; mientras que aplicaciones de ácido salicílico a concentraciones de 0,5, 1 y 2 mM aumentan la concentración de fenoles totales al pasar de 29,4 mg GAE/g DW en el control a 48,6, 39,8 y 38,7 mg GAE/g DW; respectivamente. También Saini y col. (2013) demostraron que las aplicaciones de ácido salicílico y metil jasmonato a concentraciones de 0,1 y 0,5 mM cada una, en las flores de soya aumentan la concentración de fenoles totales en las semillas de soya al pasar de una concentración de 7,5 mg GAE/g en el control a concentraciones de 9,7, 8,2, 7,8 y 8,4 mg GAE/g; respectivamente. Igualmente Wang, Bowman y Ding (2007) encontraron que aplicaciones foliares de metil jasmonato a concentraciones de 0,01 y 0,1 mM en tres variedades de moras diferentes aumentan el contenido de fenoles totales en las bayas; por ejemplo en la variedad Chester hubo un aumento al pasar de 1,8 mg GAE/g FW en el control a 2,15 y 2,5 mg GAE/g FW, respectivamente; en la variedad Hull thornless paso de 2,1 mg GAE/g FW en el control a 2,65 y 3,17 mg GAE/g FW, respectivamente; y finalmente en la variedad Triple Crown un aumento al pasar de 1,89 mg GAE/g FW a concentraciones de 2,42 y 2,61 mg GAE/g FW, respectivamente. Estas investigaciones muestran un aumento en la concentración de fenoles totales de las especies tratadas con un elicitor, en comparación con las especies no elicitadas; sin embargo, en este trabajo se mostró un aumento significativamente superior en la cantidad de compuestos fenólicos en los chiles habaneros de plantas elicitadas con respecto a los frutos de las plantas usadas como control.

6.1.2. Cuantificación de flavonoides

En la tabla 2 se puede observar que los tratamientos de peróxido de hidrógeno aumentaron la concentración de flavonoides en los frutos de plantas tratadas con peróxido de hidrógeno en comparación con los frutos provenientes de las plantas control, aumentando de 24,42 mg RE/g FW, a concentraciones de 28,32 mg RE/g FW en la variedad Chichén Itzá elicitada y 27,83 mg RE/g FW en la variedad Jaguar elicitada.

Tratamiento	Flavonoides (mg RE/g FW)	Aumento con respecto al control (mg RE/g FW)
H_2O_2 18 Mm (var. Jaguar)	27,86$_a$	3,44
H_2O_2 18 Mm (var. Chichén Itzá)	28,32$_a$	3,9
Control (agua destilada)	24,42$_b$	-

Tabla 2. Cuantificación de flavonoides en los frutos y el incremento dado. Los resultados están expresados en miligramos de equivalentes de rutina por gramo de muestra fresca.

El contenido de flavonoides en los frutos define la calidad nutracéutica de estos y con ello eleva su valor comercial por sus propiedades antioxidantes (Doughari, 2012; Siddiqui y col., 2013 b; Wahyuni y col., 2013) y su potencial efecto antimicrobiano (Pistelli y Giorgi, 2012; Nascimento y col., 2014), contra el cáncer, contra enfermedades crónico-degenerativas, entre otras cualidades (Nascimento y col., 2013). En su investigación Siddiqui y col. (2013 a) investigaron la concentración de flavonoides en distintas especies de chiles habaneros y encontraron concentraciones de hasta 1,35 mg RE/g FW, niveles muy por debajo de los hallados en este trabajo.

En el estudio de Jiménez-García y col. (2014) con chiles pimientos (*Capsicum annuum*) se cuantificaron los niveles de flavonoides en los extractos metanólicos de los frutos, de plantas a las cuales se les administraron tratamientos con elicitores abióticos; estos consistieron en aplicaciones foliares de ácido salicílico a concentración de 0,1, 6,7 y 10 mM; y aplicaciones de peróxido de hidrógeno a 6, 14 y 18 mM por separado; subsecuentemente fueron expuestos a bajas temperaturas (10 y 0°C) por 2 lapsos de tiempo de 90 minutos, respectivamente. Los resultados mostraron que la mayor concentración de flavonoides se encuentra en los frutos cosechados 24 horas después de aplicado cada tratamiento con concentraciones de 9 a 10.6 mg equivalentes de rutina/g de muestra fresca; comparados con el control el cual tenía una concentración de 8.7 mg de equivalentes de rutina/g de muestra fresca. La concentración de flavonoides en los chiles pimientos del estudio de Jiménez-García y col., son menores comparados con los obtenidos en chiles habaneros de este estudio ya que además de ser variedades diferentes, se demostró que los

tratamientos desiguales también intervienen en la concentración de flavonoides. De la misma forma podemos observar una concordancia con el ligero aumento de flavonoides en el estudio de Jiménez-García, con el aumento presentado en este estudio, después de su inducción con elicitores.

6.1.3. Cuantificación de capsaicinoides

De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 3 podemos observar que los tratamientos de elicitación con peróxido de hidrógenos aumentaron significativamente la cantidad de capsaicinoides en el fruto de chile habanero, al pasar de una concentración de 0,9 mg/g FW proveniente de los frutos de las plantas control, a una concentración de 1,9 y 2 mg/g FW, provenientes de los frutos de las plantas de chile habanero variedad Chichén Itzá y Jaguar bajo tratamiento, respectivamente.

Tratamiento	Capsaicinoides (mg/g FW)	Aumento con respecto al control (mg/g FW)
H_2O_2 18 Mm (var. Jaguar)	2_a	1,1
H_2O_2 18 Mm (var. Chichén Itzá)	$1,9_a$	1
Control (agua destilada)	$0,9_b$	-

Tabla 3. Cuantificación de capsaicinoides en los frutos y el incremento dado. Los resultados están expresados en miligramos por gramo de muestra fresca.

La cantidad de capsaicinoides en los chiles habaneros es la principal cualidad que define su calidad comercial (Siddiqui 2013 a), su cantidad en el fruto es variable dependiendo de diversos factores, pero principalmente por las condiciones medioambientales donde la planta se desarrolla (Butcher, 2012) y la genética de la planta; aunque el estado de maduración del fruto también es importante (Wahyuni y col., 2013).

Antonious y col. (2006) determinaron la concentración de capsaicinoides en frutos de plantas de chile habanero, provenientes del banco de semillas del departamento de agricultura de Estados Unidos, y encontró en las cuatro variedades estudiadas concentraciones de 1,1, 0,49, 1,24 y 0,23 mg/g de fruto fresco; las cuales rondan los valores que obtuvimos en los frutos de las plantas control y son menores a

los obtenidos en frutos elicitados. Encontramos valores de concentración similares en variedades de chile habanero analizadas por Nwokem y col. (2010) quienes encontraron concentraciones de 0,55, 0,64, 0,67, 0,12 y 0,81 mg/g de fruto fresco para las cinco variedades estudiadas; que están por debajo de los niveles de capsaicinoides encontrados en las especies de este estudio sometidas al tratamiento con peróxido de hidrógeno. De la misma forma Ornelas-Paz y col. (2010) analizo la concentración de capsaicinoides en chiles habaneros provenientes en el estado de Chihuahua, México y hallo concentraciones de 1,25 y 1,67 mg/g de fruto fresco, los cuales son más altos que los que obtuvimos en los frutos de plantas que no fueron elicitadas, debido principalmente a la diferencia de variedad y el origen de los frutos. Por otro lado Menichini y col. (2009) encontraron en chiles habaneros producidos en Italia concentraciones de 1,43 mg/g de materia fresca para habaneros en estado inmaduro y de 6,86 mg/g de materia fresca para chiles habaneros maduros; esta concentración es significativamente superior a la encontrada en habaneros de este estudio donde los autores indican que la elevada pungencia de los ejemplares se debe a el tipo de variedad y las condiciones climatológicas de aquel país.

6.2. Actividad antimicrobiana

Existen diversos estudios que han probado la capacidad de extractos del género *Capsicum* inhibiendo el crecimiento de bacterias, ya sea experimentando con algún bioactivo por separado o en forma de extractos. Trabajos como el de Al-Fartosy y Zearah (2013), muestran la capacidad antimicrobiana de los flavonoides presentes en las semillas de los chiles pimientos (*Capsicum annuum*). Hemalatha y Dhasarathan (2013) presentan mejor capacidad antimicrobiana de extractos etanólicos de *C. annuum* y *C. frutescens* a concentraciones muy bajas (hasta 50 µg/mL) con diámetros del halo de inhibición de 12 a 14 mm. Nascimento y col. (2014) demostraron la gran capacidad del flavonoide crisoeriol que tiene concentraciones mínimas de inhibición de hasta 1 µg/mL para diversos microorganismos patógenos.

La actividad antimicrobiana de los extractos probados en este estudio contra las bacterias gram-positivas y gram-negativas, se presentan en la tabla 4 y 5; respectivamente, con los resultados expresados en milímetros de inhibición.

Contra *Staphylococcus aureus* los extractos de la variedad Jaguar elicitada son los más eficaces mostrando un halo de inhibición de 13,07 y 13,22 mm a

concentraciones de 100 y 200 mg/mL; respectivamente. Otra sobresaliente respuesta la obtuvimos contra la bacteria *Escherichia coli* donde los extractos de las variedades Chichén Itzá elicitadas muestran halos de inhibición de 13,16 y 13,23 mm para las concentraciones más altas; por su parte la variedad Jaguar obtuvo un halo mayor a 13 mm solo a concentraciones de 200 mg/mL de extracto. Con respecto al bacilo gram-negativo *Salmonella Thompson* obtuvimos mejor respuesta de parte de los extractos elicitados de la variedad Jaguar elicitada, con un halo de 12,58 y otro de casi 14 mm de inhibición a concentraciones de 100 y 200 mg/mL de extracto. Finalmente los halos de inhibición más grandes del experimento los obtuvimos con los extractos de la variedad Jaguar elicitada con halos de 15,61 y 15,82 mm contra la levadura *Candida Albicans*.

	Bacterias Gram-positivas							
	Staphylococcus aureus		*Listeria monocytogenes*		*Enterococcus faecalis*		*Streptococcus mutans*	
	Control	H_2O_2, 18 mM	Control	H_2O_2, 18 mM	Control	H_2O_2, 18 mM	Control	H_2O_2, 18 mM
Extracto (mg/mL)	**Var. Jaguar**							
200	12,23^{b}	13,22^{a}	12,1^{a}	11,39^{ab}	10,5^{a}	12,4^{a}	10,77^{b}	12,24^{a}
100	11,56^{b}	13,07^{a}	10,46^{b}	10,83^{ab}	-	10,64^{b}	-	9,72^{c}
50	10,83^{bc}	12,33^{b}	-	9,22^{c}	-	-	-	9,21^{c}
25	10,15^{c}	11,6^{b}	-	-	-	-	-	-
10	-	9,21^{c}	-	-	-	-	-	-
Extracto (mg/mL)	**Var. Chichén Itzá**							
200	10,87^{ab}	11,97^{a}	10,94^{ab}	12,22^{a}	9,28^{b}	12,33^{a}	10,57^{a}	11,11^{a}
100	10,69^{ab}	10,89^{ab}	10,14^{b}	11,87^{a}	9^{b}	11,44^{ab}	9,79^{b}	10,88^{a}
50	10,13^{b}	10,05^{b}	-	9,64^{b}	-	9,86^{b}	-	7,68^{c}
25	7,76^{c}	8,14^{c}	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los extractos contra las bacterias gram-positivas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

	Bacterias Gram-negativas				Levadura	
Bacterias	*Escherichia coli*		*Salmonella thompson*		*Candida albicans*	
	Control	H_2O_2, 18 mM	Control	H_2O_2, 18 mM	Control	H_2O_2, 18 mM
Extracto (mg/mL)	**Var. Jaguar**					
200	10,75[b]	13,25[a]	13,11[a]	13,94[a]	14,97[a]	15,82[a]
100	9,41[c]	10,85[b]	10,65[b]	12,58[a]	11,57[b]	15,61[a]
50	-	10,75[b]	-	8,82[c]	11,76[b]	12[b]
25	-	-	-	-	-	9,74[c]
10	-	-	-	-	-	-
Extracto (mg/mL)	**Var. Chichén Itzá**					
200	11,47[b]	13,23[a]	11,46[b]	12,22[a]	6,22[b]	10,58[a]
100	9,09[c]	13,16[a]	10,39[bc]	11,29[b]	-	10,22[a]
50	-	9,44[c]	9,79[c]	10,02[bc]	-	10,07[a]
25	-	8,38[c]	-	-	-	10,69[a]
10	-	-	-	-	-	-

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los extractos contra las bacterias gram-negativas. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05).

Con respecto a los resultados obtenidos contra las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus mutans* se puede apreciar igualmente un aumento con respecto a la capacidad antimicrobiana de los extractos de frutos elicitados. Aunque los resultados mencionados inicialmente fueron los más significativos, el cotejo de los datos en las tablas; muestran una capacidad de antimicrobiana mejorada en todas las pruebas.

Dorantes (2000) probo la actividad antimicrobiana de los extractos de chile habanero (*Capsicum chinense*), serrano y pimiento (*Capsicum annuum*); encontrando que la bacteria gram-positiva *Listeria monocytogenes* fue la más sensible a los extractos de chile habanero (8 mm de inhibición), seguida de la bacteria *Staphylococcus aureus* (5 mm)*, Bacillus cereus* (2 mm) y finalmente *Salmonella typhimurium* (1,5 mm); estos resultados con respecto a los mismos patógenos probados en este estudio (*L. monocytogenes* y *S. aureus)* concuerdan con los que obtuvimos, aunque por desgracia en ese trabajo no se muestra información acerca de la concentración de los extractos. En este estudio también se probó la actividad antimicrobiana contra estas bacterias, de la capsaicina, la dihidrocapsaicina, el ácido

m-cumarico y ácido cinámico por separado, encontrando que los ácidos m-cumarico y cinámico fueron los compuestos que influyeron mayormente con la inhibición de las bacterias, mientras los capsaicinoides no tuvieron efecto significativo. Los datos obtenidos gracias al trabajo de Molina-Torres y col. (1999) complementan esta información al descubrir que la capsaicina tiene un efecto diferente dependiendo de la bacteria, ya que en algunas puede alentar su crecimiento mientras en otras inhibirlo, encontrando mejores resultados de inhibición contra bacterias gram-positivas.

Brito-Argáez y col. (2009) exploraron el potencial antimicrobiano de las semillas de frutos de chile habanero y encontraron que los extractos de péptidos antimicrobianos de las semillas a una concentración de 50 µg/mL inhibieron exitosamente las bacterias. Los halos de inhibición en *E. coli* y *S. aureus* son parecidos a los que nosotros obtuvimos, solo que ellos usaron una menor concentración; por lo que se aprecia la alta capacidad antimicrobiana de bioactivos contenidos en las semillas del chile habanero.

7. CONCLUSIÓN

Los resultados que obtuvimos fueron positivos, comprobando que la aplicación del tratamiento con peróxido de hidrógeno en 18 mM activaron el sistema de defensa de las plantas, finalizando con la síntesis de los metabolitos secundarios, entre ellos los capsaicinoides, flavonoides y fenoles totales. Al igual se encontró un aumento en la capacidad antimicrobiana de los extractos de chile habanero elicitadas, producto del aumento de la concentración de metabolitos secundarios en los frutos por lo que la hipótesis es comprobada. La capacidad antimicrobiana de los extractos de chile habanero no se considera tan efectiva como la de otras especies de plantas para su uso comercial, aunque su concentración de diversas sustancias bioactivas como carotenoides, flavonoides, vitaminas y capsaicinoides lo convierten en una especie con altas propiedades nutracéuticas.

8. REFERENCIAS

1 Al-Fartosy, A.J. M., & Zearah, S.A. (2013). Antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of flavonoid extract from *Capsicum annuum L.* seeds. *Iraqi national journal of chemistry*. 49, 100-112.

2 Antonious, G.F., Kochhar, T.S., Jarret, R.L., & Snyder, J.C. (2006). Antioxidants in hot pepper: variation among accessions. *Journal of environmental science and health*, 41, 1237-1243.

3 Baenas, N., García-Vigueroa, *C.*, & Moreno, D.A. (2014). Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19, 13541-13563.

4 Brito-Argáez, L., Moguel-Salazar, F., Zamudio, F., González-Estrada T., & Islas-Flores, I. (2009). Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. *Asian journal of biochemistry*, 4(3), 77-87.

5 Butcher, J.D., Crosby, K.M., Yoo, K.S., & Patil, B.S. (2012). Environmental and genotypic variation of capsaicinoid and flavonoid concentrations in habanero (*Capsicum chinense*) peppers. *Hortscience*, 47(5), 574-579.

6 Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Bello-Bello, J.J., Lecona-Guzmán, *C.*, Solís-Marroquín, D., Avilés-Viñas, S., y col. (2008). Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense Jacq.*): Hottest known cultivars. *Hortscience*, 43(5), 1344-1349.

7 Castro, M.P., Torres, *C.*A., Nuñez, M.B., & González A.M. (2013). Phytochemicals: new weapons against new enemies. En: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Microbiology book series. Argentina: A. Méndez-Vilas Editorial.

8 Castro-Concha, L.A., Tuyub-Che, J., Moo-Mukul, A., Vázquez-Flota, F.A., Miranda-Ham, M.L. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense Jacq.* (Habanero pepper) at different stages of ripening. *The scientific world journal,* 1-5.

9 Cerón-Carrillo, T., Munguía-Pérez, R., García, S., & Santiesteban-López, N.A. (2014). *Revista iberoamericana de ciencias*, 1(2), 213-221.

10 Cheaito, L., Azizi, S., Saleh. N. (2013). Assessment of self-medication in population buying antibiotics in pharmacies: a pilot study from Beirut and its suburbs. *International journal of public health*, DOI 10.1007/s00038-013-0493-y.

11 De los santos, A.G. (2013). Evaluación de la expresión de genes relacionados con síntesis de capsaicinoides y capsinoides bajo estrés inducido con peróxido de hidrógeno en chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*) (tesis de grado). Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

12 Dewanto, V., Wu, X., Adom, K., & Liu, R. (2002) Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50, 3010–3014.

13 Dorantes, L., Colmenero, R., Hernández, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., Fernández, E., & Solano, *C.* (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annuum* extracts. *International journal of food microbiology*, 57, 125-128.

14 Doughari, J.M. (2012). Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. En: Venketeshwer, R. (Ed.), *A global perspective of their role in nutrition and health* (pp. 1-32). Rijeka, Croatia: Intech.

15 Espinosa, B.F., Altagracia, M.M., Sánchez, M.A.R., & Wertheimer, A.I. (2009). The determinants of the antibiotic resistance process. *Infection and drug resistance*, 2, 1-11.

16 Ferrari, S. (2010) Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuti*cs.* En: Giardi, M.T., Rea, G., Berra, B., ed. *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*. (Vol. 698, Chapter 12, pp. 152-166). USA: Springer.

17 Garcés-Claver, A., Arnedo-Andrés, S., Abadía, J., Gil-Ortega, R., & Álvarez-Fernández A. (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectometry. *Journal of agricultural and food chemistry,* 54, 9303-9311.

18 Giuffrida, D., Dugo, P., Torre, G., Bignardi, *C.*, Cavazza, A., Corradini, *C.*, & Dugo, G. (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry,* 140, 794-802.

19 Gorelick, J., & Bernstein N. (2014) Chapter Five - Elicitation: An Underutilized Tool in the Development of Medicinal Plants as a Source of Therapeutic Secondary Metabolites. En: Donald, L.S., *Advances in Agronomy* (1er. Ed., pp. 201-230). USA: Academic Press.

20 Hada, D., & Sharma, K. (2014). A review: plant extracts a new source of antimicrobial potential. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(3), 597-628.

21 Hao, W., Guo, H., Zhang, J., Hu, G., Yao, Y., & Dong, J. (2014). Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *The scientific world journal*, 2014, 1-7.

22 Hayek, S.A., Gyawali, R., & Ibrahim, S.A. (2013). Antimicrobial natural products. En: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Microbiology book series. Argentina: A. Méndez-Vilas Editorial. USA.

23 Helliwell, E.E., & Yang, Y. (2009). Systemic signaling in plant defense. *Encyclopedia of life sciences*, *John Wiley & sons,* 1, 1-9.

24 Hemalatha, N., & Dhasarathan, P. (2013). Comparative study on the antimicrobial activity of *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*. *International Journal of Ethnomedicine and Pharmacological Research*, 1, 142-147.

25 Jiménez-García, S.N., Vázquez-Cruz, M.A., García-Mier, L., Guevara-González, R.G., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R.V., y col. (2014). Changes in the quantity of phenolic compounds in peppers (*Capsicum annuum* L.) sprinkled with elicitors under cold stress. *Journal of chemical, biological and physical sciences*, 4(5), 11-17.

26 Jinukuty, M.G., & Giri, A. (2013). Antimicrobial activity of phytopharmaceuticals for prevention and cure of disease. *Annals of phytomedicine*, 2(2), 28-46.

27 Kalachova, T.A., Iakovenko, O.M., Kretinin, S.V., & Kravets, V.S. (2012). Effects of salicylic and jasmonic acid on phospholipase D activity and the level of active oxygen species in soybean seedlings. *Biochemistry (moscow) supplement series a: membrane and cell biology*, 6(3), 243-248.

28 Kevrešan, Ž., Mandiç, A.P., Kuhajda, K.N., & Sakač, M.B. (2009). Carotenoid content in fresh and dry pepper (*Capsicum annuum L.*) fruits for paprika production. *Food processing, quality and safety*, 1(2), 21-27.

29 Landeta-Riverol, R.R. (2011). Efecto del Peróxido de hidrógeno sobre la pungencia del chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*) bajo condiciones de invernadero. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, Querétaro, México.

30 Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, *C.*, Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., y col. (2013), Antibiotic resistance- the need for global solutions. *The lancet infectious diseases commission,* 13, 1-42.

31 Lim, T. K. (2013). *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants Volume 6, Fruits.* (Ed. 2012). Canberra, Australia: Springer.

32 Lobato, C.C., & Gerónimo, A.I. (2014). *Manual de procedimiento para la extracción de capsaicina de chile habanero*. Recuperado el 11 de mayo de 2015, de http://siproduce.sifupro.org.mx/seguimiento/archivero/23/2013/anuales/anu_2339-25-2014-05-2.pdf

33 Luo, X., Peng, J., & Li, Y. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European journal of pharmacology,* 650, 1-7.

34 Figueroa, M.P., Rocha-Guzmán, N.E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2014). Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. *Food chemistry*, 156(2014), 273-278.

35 Mazid, M., Khan T.A., & Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and medicine*, 3(2), 232-249.

36 Mejía-Teniente, L., Dúran-Flores, F.D., Chapa-Oliver, A.M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M.M., y col. (2013). Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum L.* after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International journal of molecular sciences*, 14, 10178-10196.

37 Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M.R., Conforti, F., Statti, G., & col. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* jacq. cv. habanero. *Food chemistry*, 114(2009), 553-560.

38 Mishra, A.K., Sharma, K., & Misra R.S. (2012). Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants. *Journal of plant interactions*, 7(2), 95-120.

39 Molina-Torres, J., García-Chávez, A., & Ramírez-Chávez, E. (1999). Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. *Journal of ethnopharmacology*, 64(1999), 241-248.

40 Mongkolporn, O., & Taylor, P. (2011). *Capsicum*. En: Chittaranjan, K. (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Vegetables* (pp.43-57), Berlin: Springer.

41 Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy reviews*, 1(1), 69-79.

42 Namita, P., & Mukesh, R. (2012). Medicinal plants used as antimicrobial agents: A review. *International research journal of pharmacy*. 3(1). 31-40.

43 Nascimento, P.L.A., Nascimento, T.C.E.S., Ramos, N.S.M., Silva, G.R., Galindo, J.E.G., Falcão, R.E.A., y col. (2014). Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *capsicum frutescens* (pimenta malagueta). *Molecules*, 19, 5434-5447.

44 Nascimento, P.L.A., Nascimento, T.*C.*E.S., Ramos, N.S.M., Silva, G.R.D., Amorim, *C.C.*, Silva, T.M.S., y col. (2013). Antimicrobial and Antioxidant activities of pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*). *African Journal of microbiology research*, 7(27), 3526-3533.

45 NCCLS. (1997). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard M2-A7*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania, USA.

46 Nuez, F., Gil, R. & Costa, J. (1996). *El cultivo de pimientos chiles y ajíes*. España: Mundi-prensa.

47 Nwokem, C.O., Agbaji, E.B., Kagbu, J.A., & Ekanem, E.J. (2010). Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. *New York science journal*, 3(9), 17-21.

48 Ogbodo, S.O., Okeke, A.*C.*, Ugwuoru, *C.*D.*C.*, & Chukwurah, E.F. (2011). Possible alternatives to reduce antibiotic resistance. *Life sciences and medicine research*, 24, 1-9.

49 Omolo, M.A., Wong, Z., Mergen A.K., Hastings, J.*C.*, Le, N.*C.*, Reiland, H.A. Case, K.A., & Baumier, D.J. (2014). *Infectious diseases & therapy*, 2(4), 1-8.

50 Oomah, B.D., Cardador-Martínez, A., Loarca-Pina, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal of science of food and agriculture*, 85, 935–42.

51 Ornelas-Paz, J.J., Martínez-Burrola, J.M., Ruiz-Cruz, S., Santana-Rodríguez, V., Ibarra-Junquera, V., Olivas, G.I. & Pérez-Martínez, D. (2010). Effect of cooking on

the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. *Food chemistry*, 119 (2010), 1619-1625.

52 Pan American Health Organization. (2012). Health situation in the Americas, basic indicators 2012. Washington DC, United States of America: World Health Organization.

53 Patel, H., & Krishnamurthy, R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 2(2), 60-65.

54 Pistelli, L., & Giorgi, I. (2012). Antimicrobial properties of flavonoids. Patra, A.K. En: *Dietary phytochemicals and microbes*. Springer: India.

55 Radulović, N.S., Blagojević, P.D., Stojanović-Radić, Z.Z., & Stojanović, N.M. (2013). Antimicrobial plant metabolites: Structural diversity and mechanism of action. *Current medicinal chemistry*, 20, 932-952.

56 Ramproshad, S., Afroz, T., Mondal, B., Khan, R., & Ahmed, S. (2012). Screening of phytochemical and pharmacological activities of leaves of medicinal plant *Plumeria rubra*. *International journal of research in pharmacy and chemistry*, 2(4), 1001-1007.

57 Rezaeieh, K.A.P., Gürbüz, B., & Uyanik, M. (2012). Biotic and abiotic stresses mediated changes in secondary metabolites induction of medicinal plants. *Tibbi ve aromatic bitkiler sempozyumu*, 13, 218-222.

58 Rodríguez-Maturino, A., Valenzuela-Solorio, A., Troncoso-Rojas, R., González-Mendoza, D., Grimaldo-Juárez, O., Aviles-Marin, M., & Cervantes-Díaz L. (2012). *Journal of medicinal plants research*, 6(9), 1758-1763.

59 Roses, M.P. (2011). La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas. *Revista panamericana de salud pública*, 30(6), 507-508.

60 Ruiz-Lau, N., Medina, F.L., Martínez M.E. (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*, 70-77.

61 Saini, R.K., Akitha, M.K.D., Giridhar, P., & Ravichankar, G.A. (2013). Aumentation of major isoflavones in *Glycine max* L. through the elicitor-mediated approach. *Acta botanica Croatica*, 72(2), 311-322.

62 Sapkota, R., Dasgupta, R., Rawat N. & DS. (2012). Antibacterial effects of plants extracts on human microbial pathogens & microbial limit tests. *International journal of research in pharmacy and chemistry*, 2(4), 926-936.

63 Saranraj, P., & Sivasakthi, S. (2014). Medicinal plants and its antimicrobial properties: A review. *Global journal of pharmacology*, 8(3), 316-327.

64 Segura, M.R.*C.*, Ramírez, K.G., Moguel, Y.O., & Betancur, D.A. (2013). Polyphenols, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruit. *Food and nutrition sciences*, 4, 47-54.

65 Sganzerla, M., Pereira, J.*C.*, Marchi, A.T.M., & Teixeira, H.G. (2014). Fast method for capsaicinoids analysis from *Capsicum chinense* fruits. *Food research international*, 64, 718-725.

66 Sharma, P., Bhushan, A.J., Shanker, R.D., & Pessarakli, M. (2011). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012, 1-26.

67 Siddiqui, M.G., Momin, C.M., Acharya, P., Kabir, J., Kanti, M.D., & Dhua, R.S. (2013). Dynamics of changes in bioactive molecules and antioxidant potential of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Habanero at nine maturity stages. *Acta physiology of plant*, 35, 1141-1148.

68 Siddiqui, Z.H., Mujib, A., Aslam, J., Hakeem K.R., & Parween, T. (2013). In vitro production of secondary metabolites using elicitor in *Catharanthus roseus*: A case study. *Springer*, 1, 401-419.

69 Silva, D.J. (2012). Nutritional quality and health benefits of vegetables: a review. *Food and nutrition sciences*, 3, 1354-1374.

70 Simonovska, J., Rafajlovska, V., Kavrakovski, Z., & Srbinoska, M. (2014). Nutritional and bioactive compounds in hot fruits of *Capsicum annuum l.* from Macedonia. *Macedonian journal of chemistry and chemical engineering,* 33(1), 97-104.

71 Singh, S.G., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(2010), 909-930.

72 Sirohi, P., Ranghar, S., Khandelwal, A., Poonia, A., Sirohi, A., & Singh, D. (2013). Herbal product based remedies against microbial infections and resistance. *Weekly science research journal*, 1(8), 1-30.

73 Sosa, A.J., Byarugaba, D.K., Amábile-Cuevas, *C.*F., Hsueh, P.R., Kariuki, S., & Okeke, I.N. (2010). *Antimicrobial resistance in developing countries.* Boston, Massachusetts: Springer.

74 Spoel, S.H., & Dong, X. (2012). How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 12, 89-100.

75 Teodoro, A.F.P., Alves, R.B.N., Ribeiro, L.B., Reis, K., Reifschneider, F.J.B., Fonseca, M.E.N., y col. (2013). Vitamin C content in habanero pepper accessions (*Capsicum chinense*). *Horticultura Brasileira*, 31, 59-62.

76 Thakur, M., & Sohal, B.S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A review. *ISRN Biochemistry*, 20, 1155-1165.

77 Torres-Pacheco, I., Guevara-González G.R., & Mejía-Teniente, L. (2012). Relación de la inmunología vegetal y la producción de alimentos. *Cienci@uaq*, 1-7.

78 Veberič, R. (2010). Bioactive compounds in fruit plants. Ljubljana, Eslovenia: Facultad de biotecnología.

79 Wahyuni, Y., Ballester, A., Sudarmonowati. E., Bino, R.J., & Bovy, A.G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in human diet. *Journal of natural products*, 76, 783-793.

80 Waizel-Bucay, J., & Camacho, R.M. (2011). El género *Capsicum* spp. (“chile”). Una versión panorámica. *Aleph zero*, 60, 67-79.

81 Wang, S.Y., Bowman, L.M., & Ding, M. (2008). Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus sp.*) and promotes antiproliferation of human cancer cells. *Food Chemistry*, 107(2008), 1261–1269.

82 War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y., & Ignacimuthu, S. (2011). Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1787-1792.

83 World Health Organization. (2007). *Health in the Americas: an overview of regional health.* Geneva, Switzerland: World Health Organization.

84 World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Modificación en las soluciones nutritivas utilizadas para la nutrición de las plantas a partir de la formulación de Steiner.

	Para 10 litros de agua (g)	Para 100 litros de agua (g)
$Ca(NO_3)_2$	6,76	67,6
$MgSO_4$	4,95	49,5
KNO_3	2,57	25,7
KH_2PO_4	3,07	30,7
Quelato de Fe (EDTA)	0,49	4,9
$MnSO_4$	0,00606	0,0606
H_3BO_3	0,004	0,04
$CuSO_4$	0,0026	0,026

Tabla 6. Solución nutritiva Steiner para la etapa de crecimiento.

	Para 500 litros de agua (g)	Para 1 000 litros de agua (g)
$NH_4H_2PO_4$	69	138
K_2SO_4	104,7	209,4
$Ca(NO_3)_2$ - $7H_2O$	420	840
KNO_3	65,2	130,4
$MgSO_4$ – $7H_2O$	295	590
Quelato de Fe (13%)	5,98	11,96
Quelato de Mn (13%)	1,83	3,67
Quelato de Cu (14%)	0,11	0,21
Quelato de Zn (14%)	0,32	0,65
H_3BO_3	1,25	2,5
H_2SO_4, 98%	15,4	30,8
HNO_3, 55%	40,5	81

Tabla 7. Solución nutritiva Steiner para la etapa de floración.

	Para 500 litros de agua (g)	Para 1 000 litros de agua (g)
KH_2PO_4	98	196

K_2SO_4	135,7	271,4
$Ca(NO_3)_2$ - $7H_2O$	425	850
KNO_3	282,8	565,6
$Mg(NO_3)$ – $6H_2O$	32	64
$MgSO_4$ – $7H_2O$	307,5	615
Quelato de Fe (13%)	7,31	14,61
Quelato de Mn (13%)	2,38	4,76
Quelato de Cu (14%)	0,09	0,18
Quelato de Zn (14%)	0,37	0,74
H_3BO_3	1,25	2,5
H_2SO_4, 98%	15,4	30,8
HNO_3, 55%	40,5	81

Tabla 8. Solución nutritiva Steiner para la etapa de fructificación.

9.2. Anexo 2. Obtención de las soluciones de peróxido de hidrógeno a 18 mM.

Datos generales:

- Peso molecular / Masa molar del H_2O_2: 34,0147 g/mol
- Concentración de la disolución deseada: 18 mM = 0,018 M = 0,018 g/mol.

Vamos a calcular la masa "*m*" del soluto (H_2O_2), para preparar un volumen "*v*" (1 litro) de disolución, de concentración "*c*" Molar (0,018 Molar), de un soluto de masa molar "M" (34,0147 g/mol)

La fórmula es: $m = c \times v \times M$; [(mol/L) x (L) x (g/mol) = g]

Sustituyendo: m = (0.018 mol/L) x (1 L) x (34,0147 g/mol); m = 0,61227 g.

Esto significa que para tener una concentración de 18 mM en un volumen de disolución de un litro, se necesitan 0.61227 g de H_2O_2 y el resto de agua destilada.

En el experimento se utilizó Agua oxigenada (peróxido de hidrógeno) al 3% ®Jaloma, por lo tanto para preparar un litro de disolución es necesario hacer la siguiente operación:

[(0,61227 g) x (1 000 mL)] / (3 g) = 204,09 mL

Lo que quiere decir que para preparar 1 litro de disolución de peróxido de hidrógeno a una concentración de 18 mM, necesitamos 204.09 mL de agua oxigenada al 3% y 795.91 mL de agua destilada.