



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería

Potencial nutracéutico del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en función de las condiciones de producción y procesado culinario

TESIS

que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ingeniería

presenta:

M. en T.A. Lina García Mier

Dirigida por:

Dr. Irineo Torres Pacheco

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo 2015
México



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería

Potencial nutracéutico del pimiento (*Capsicum annum* L.) en función de las condiciones de producción y procesado culinario

TESIS

que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ingeniería

presenta:

M. en T.A. Lina García Mier

Dirigida por:

Dr. Irineo Torres Pacheco

SINODALES

Dr. Irineo Torres Pacheco
Presidente

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Secretario

Firma

Dr. Enrique Rico García
Vocal

Firma

Dra. Rosalía Virginia Ocampo Velázquez
Suplente

Firma

Dra. Laura Mejía Teniente
Suplente

Firma

Nombre y Firma

Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad

Nombre y Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo 2015
México

RESUMEN

El pimiento morrón, en sus diferentes estadios de maduración, ha ganado popularidad por sus atributos de color, pungencia, aroma y contenido de nutrientes. Además, los fitoquímicos (varios de los cuales son metabolitos secundarios) que contiene le confieren propiedades nutraceuticas, lo cual ha generado un mayor interés en el producto. Las plantas están expuestas a un gran número de organismos patógenos, así como varios tipos de estrés abiótico; por lo cual, para combatir estos diferentes tipos de estrés, las plantas poseen mecanismos de defensa que las induce de manera natural a producir metabolitos secundarios, los cuales están implicados en su supervivencia. Los elicitores son sustancias externas que actúan como factores moduladores de metabolitos (FMM) modificando el contenido de nutrientes y/o metabolitos secundarios. Si bien, la aplicación de elicitores en plantas y frutas se ha estudiado con anterioridad, esto se ha hecho de manera unitaria y no como un coctel. Dada la naturaleza diversa de los metabolitos secundarios en el pimiento; es relevante estudiar el efecto de una mezcla de FMM, con la intención de tener la oportunidad de detonar diversas rutas metabólicas implicadas en su producción. Por lo anterior, en esta investigación se analizó el efecto de catorce cocteles de FMM (ácido jasmónico, peróxido de hidrógeno y quitosán) en el contenido de fenoles totales, taninos, flavonoides, carotenoides y capsaicinoides. Asimismo, se estudiaron las modificaciones en la actividad antioxidante e inhibición de α -amilasa. Los análisis se realizaron de manera espectrofotométrica y cromatográfica. También, se analizaron los cambios morfológicos de la planta (ancho y largo de hoja, diámetro del tallo, altura y número de nodos, flores y frutos), así como el pH, color y sólidos solubles de los frutos. Los tratamientos se aplicaron de manera foliar, a toda la planta y en postcosecha (en estado inmaduro y maduro) en el pimiento de acuerdo al diseño de tratamientos Plan Puebla. Debido a que el pimiento se consume no sólo en fresco sino después de diferentes procesos de cocción, se evaluó el efecto del hervido, microondas, asado, deshidratado y fritura en los compuestos mencionados. Los resultados indican que en general no hay diferencia significativa para las variables morfológicas al igual que para las variables fisicoquímicas. El tratamiento postcosecha en estado maduro mostró diferencia significativa con el control. En este tratamiento aumentaron el contenido de metabolitos, actividad antioxidante e inhibición de α -amilasa. Los procesos de cocción modifican de diferente manera los metabolitos, en algunos casos hay incrementos y en otros decrementos. La aplicación del coctel de FMM en el pimiento maduro en postcosecha aumentó el contenido de los metabolitos evaluados, por lo cual se sugiere realizar la aplicación del coctel en postcosecha y consumir el producto en estado maduro y cocinado de diversas maneras para obtener los mayores beneficios de su ingesta.

(Palabras clave: elicitor, agricultura orgánica, agricultura convencional, metabolitos secundarios, estrés en plantas)

SUMMARY

Sweet bell pepper has grown in popularity not only because of its properties of color, pungency, aroma and nutrient content, but also due to its phytochemicals (some of them secondary metabolites) that exhibit health-promoting properties. Plants are continuously exposed to pathogen attack as well as different kinds of abiotic stress. In order to defend themselves from these stresses, plants possess defense mechanisms that induce them to produce secondary metabolites. Elicitors are substances that behave as metabolic modulation factors (MMF) since they can modify the production of nutrients and secondary metabolites. Although the use of elicitors in plants and fruits has been studied previously, this has been done using a unique elicitor, not a mixture of them. Due to the diversity of secondary metabolites, it is important not only to study the effect of one elicitor but a cocktail of them in order to have the opportunity of enhancing several metabolic routes involved in their production. Therefore, this research analyzed the effect of fourteen MMF-cocktails (jasmonic acid, hydrogen peroxide and chitosan) on phenol, tannin, flavonoid, carotenoid and capsaicinoid content. Besides, the antioxidant activity and α -amylase inhibitory activity were also studied. The analyses were performed spectrophotometrically and chromatographically. In addition, morphological changes (length and width of the leaves, stem perimeter, plant height and number of fruits, nodes and flowers), as well as pH, color and solid soluble content of fruits were studied. The MMF-cocktails were sprayed on the leaves, on the whole plant and postharvest (ripen and immature fruit). Treatments were designed according to the statistical design Plan Puebla. Sweet bell peppers are not only consumed fresh but also after cooking. For this reason, the analyses were also performed after boiling, grilling, microwaving and stir-frying processes. Generally, no significant differences were found on both, the morphological variables and the physicochemical variables. Postharvest treatment on the ripen pepper displayed significant differences with control regarding metabolite content, antioxidant activity and α -amylase inhibitory activity. Results suggest that the application of the MMF-cocktail should be made postharvest to the ripen pepper. Moreover, bell peppers should be consumed in this maturity state in order to obtain the highest benefits of its intake.

(Keywords: elicitor, organic agriculture, conventional agriculture, secondary metabolite, plant stress)

A mi madre

A mi esposo

“...que cualquiera que pueda hacer que crezcan dos espigas de cereal o dos hojas de hierba en un suelo donde antes solamente crecía una, merecerá mayor agradecimiento de la humanidad y hará mejor servicio a su país que toda la raza de políticos juntos”

JONATHAN SWIFT, 1667-1745. Escritor irlandés.

"La cultura engendra progreso y sin ella no cabe exigir de los pueblos ninguna conducta moral"

JOSÉ VASCONCELOS, 1882-1959. Escritor, filósofo y político mexicano.

“No hay razas inferiores; todas ellas están destinadas a alcanzar la libertad”

ALEXANDER VON HUMBOLDT, 1769-1859. Geógrafo y naturalista alemán.

AGRADECIMIENTOS

Vuelvo a mencionar lo dicho en alguna otra ocasión, al concluir un trabajo tan exhaustivo como el desarrollo de una tesis, es inevitable que me aborde un muy humano desplante de egocentrismo; sin embargo, una cuidadosa y objetiva reflexión me enseña que este aporte hubiese sido imposible; y que esta tesis no sería hoy una realidad sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a término. Por lo tanto, es para mí un verdadero gusto utilizar las siguientes líneas para expresar mi agradecimiento y reconocer sinceramente su colaboración.

A Dios por iluminarme el camino a seguir y que siempre está conmigo en los buenos y, sobre todo en los malos momentos.

Quisiera agradecer el trabajo realizado por mi director de tesis, Dr. Irineo Torres Pacheco, a quien agradezco que me haya brindado la oportunidad de trabajar con él.

Gracias a mi codirector de tesis, Dr. Ramón Gerardo Guevara González por el tiempo que dedicó al desarrollo de este proyecto.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que me brindó para realizar mis estudios de doctorado.

Debo agradecer a los miembros de los Laboratorios de Biosistemas por la ayuda que me han ofrecido y por soportar la licuadora y el sonicador. Asimismo, mi sincero agradecimiento a los alumnos de la especialidad en invernaderos y la maestría en biosistemas del campus Amazcala, por la ayuda prestada durante el desarrollo del cultivo.

A los sinodales, gracias por dedicar su valioso tiempo a la revisión de esta tesis y por las ideas aportadas.

A todos mis profesores gracias por la paciencia y esfuerzo en compartir sus conocimientos conmigo.

Gracias a la maestra Elvia Olvera Olvera por conducirme en la realización del cultivo de pimiento. A Ismael Urrutia Anaya y Hugo Jesús Mendoza Landeros por su valioso apoyo en esta etapa.

Dr. Rufino Nava Mendoza quiero agradecerle por haberme informado sobre el departamento de biosistemas, porque así fue como llegué a él.

Dr. Juan Carlos Jáuregui Correa, muchas gracias por el apoyo para la realización de mi estancia en Alemania.

También me complace agradecer la acogida, el apoyo y los medios recibidos en los distintos centros y laboratorios donde he desarrollado parte de mi doctorado: CINESTAV Irapuato, el Laboratorio de Frutas y Hortalizas del PROPAC (UAQ) y al Leibniz Institute of Vegetable and Ornamental Crops (Großbeeren, Alemania); en particular, a mi asesora en este centro de investigación, la Dra. Susanne Baldermann, así como a la Dra. Susanne Neugart y al Dr. Dietmar Schwarz.

Gracias también a la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez, mi tutora adoptiva, quien estuvo apoyándome en todo momento. Gracias por estar siempre al pendiente de todo.

A los amigos y compañeros que he conocido en estos años quienes dieron un toque muy especial a esta travesía... Luis -Luisinho-, el camarada Duarte-Galván -Carlitos-, Arturo -sunshine-, Jan -Janis- y todos aquellos nombres que se me escapan, pero con los que he compartido trabajo y compañerismo, tanto dentro como fuera del laboratorio, les agradezco la paciencia que han tenido conmigo.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi compañera de muchas batallas: mi amiga Sandra Neli -Neli María- gracias por todo el tiempo juntas, por compartir tantas experiencias de vida. Mejor compañera no pude tener. Gracias por no desfallecer cuando estábamos ocupadas 24/7, llegamos a estar más de 16 horas juntas y el respeto y cordialidad siempre imperaron entre nosotras.

Muchísimas gracias a la UAQ por ser mi casa durante estos años y darme las facilidades para crecer. A toda las personas que conforman y le dan vida a este posgrado muchas gracias por las atenciones brindadas.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional y personal a las que me encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos complicados de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón, sin importar en donde estén quiero darles las gracias.

Gracias familia, especialmente a mi tíos por mostrar en todo momento interés y apoyo.

Héctor, nuevamente gracias por tu infinita paciencia, por tu tierna compañía y tu inagotable apoyo. Finalizar este trabajo no hubiera sido posible sin tu ayuda, eres un gran referente de perseverancia.

Por último, como lo he dicho en alguna ocasión previa, quisiera agradecer a mi madre, a quien dedico de manera especial este trabajo, todo el apoyo que me ha dado, ya que su sacrificio diario ha hecho posible que hoy en día yo pueda estar donde estoy. Gracias mamá por tu apoyo incondicional, por tu comprensión, por ser mi mejor aliada, mi ejemplo. Este logro es tuyo.

Con todo cariño *Lina... Lina María*

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Justificación</i>	1
1.2 <i>Planteamiento del problema</i>	3
1.3 <i>Hipótesis y objetivos</i>	4
1.3.1 Hipótesis.....	4
1.3.2 Objetivo general	5
1.3.2.1 <i>Objetivos específicos</i>	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 <i>Pimiento</i>	6
2.2 <i>Potencial nutracéutico</i>	7
2.2.1 Ácido ascórbico	8
2.2.2 Polifenoles.....	10
2.2.3 Carotenoides	11
2.2.4 Capsaicinoides	12
2.2.5 Actividad antioxidante.....	14
2.3 <i>Manejo postcosecha</i>	16
2.4 <i>Condiciones de producción</i>	17
2.4.1 Manejo de cultivo.....	19
2.4.2 FMMs (elicitores) y metabolitos secundarios.....	20
2.4.2.1 <i>Quitósán</i>	24
2.4.2.2 <i>Peróxido de hidrógeno</i>	24
2.4.2.3 <i>Ácido jasmónico</i>	25
2.4.3 Metabolitos secundarios	26
2.5 <i>Procesado</i>	28
III. METODOLOGÍA.....	30
3.1 <i>Materiales</i>	30
3.1.1 Equipo	30

3.1.2	Materia prima	30
3.1.3	Reactivos.....	30
3.2	<i>Métodos</i>	31
3.2.1	Cultivo de pimiento	32
3.2.2	Jugo de suelo	37
3.2.3	Análisis de suelo.....	37
3.2.4	Mediciones morfológicas	37
3.2.5	Colecta y conservación de materia vegetal	37
3.2.6	Procesado culinario	38
3.2.7	Extracción metanólica.....	38
3.2.8	Evaluación de la calidad del fruto	39
3.2.9	Análisis espectrofotométricos	39
3.2.9.1	<i>Taninos condensados</i>	39
3.2.9.2	<i>Fenoles totales</i>	40
3.2.9.3	<i>Flavonoides</i>	41
3.2.9.4	<i>Carotenoides</i>	42
3.2.9.5	<i>Actividad antioxidante: DPPH</i>	42
3.2.9.6	<i>Actividad antioxidante: ABTS</i>	43
3.2.9.7	<i>Ensayo de inhibición de α-amilasa</i>	44
3.2.10	Análisis cromatográficos.....	45
3.2.10.1	<i>Capsaicinoides</i>	45
3.2.10.2	<i>Ácido ascórbico</i>	45
3.2.10.3	<i>Flavonoides</i>	46
3.2.10.4	<i>Carotenoides</i>	47
3.2.10.5	<i>Análisis no específico de metabolitos</i>	48
3.2.11	<i>Análisis estadístico</i>	49
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1	<i>Aptitud del suelo para la elaboración del jugo de suelo</i>	50
4.2	<i>Características morfológicas del pimiento morrón</i>	51
4.3	<i>Análisis en pimiento fresco</i>	55
4.3.1	Color	55
4.3.2	Grados Brix y pH	57
4.3.3	Análisis proximal.....	59
4.4	<i>Metabolitos-pimiento fresco</i>	61

4.4.1	Flavonoides, taninos y fenoles	61
4.4.2	Actividad antioxidante-DPPH y ABTS	70
4.4.3	Carotenoides	72
4.4.4	Vitamina C	78
4.4.5	Capsaicinoides	81
4.4.6	Análisis no específico de metabolitos.....	82
4.4.7	Inhibición de α -amilasa.....	89
4.5	<i>Análisis en pimiento cocinado</i>	91
4.5.1	Color del pimiento cocinado	91
4.5.2	Grados Brix y pH del pimiento cocinado.....	93
4.6	<i>Metabolitos-pimiento cocinado</i>	95
4.6.1	Flavonoides, taninos y fenoles en pimiento cocinado	96
4.6.2	Actividad antioxidante (DPPH y ABTS) en pimiento cocinado	99
4.6.3	Carotenoides en pimiento cocinado	100
V.	CONCLUSIONES.....	103
	LITERATURA CITADA.....	104
	APÉNDICES.....	121
	APÉNDICE I.....	122
	APÉNDICE II.....	123
	APÉNDICE III.....	125
	APÉNDICE IV.....	129
	APÉNDICE V.....	135

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición de la solución nutritiva.	33
2	Concentración de la solución nutritiva por elemento en ppm.	34
3	Tratamientos aplicados al cultivo (coctel de FMM).	35
4	Distribución de tratamientos en el invernadero.	36
5	Distribución de compuestos para la curva de calibración para la determinación de fenoles totales.	41
6	Características del suelo utilizado para la obtención de jugo de suelo.	51
7	Características morfológicas del pimiento morrón como respuesta a diferentes cocteles de FMMs.	53
8	Variables de color de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	56
9	pH y grados Brix de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	58
10	Contenido de humedad, proteínas, lípidos, cenizas y fibra de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	60
11	Flavonoides, taninos y fenoles totales medidos a diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	63
12	Perfil de flavonoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón_parte 1.	65
13	Perfil de flavonoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón_parte 2.	66
14	Perfil de flavonoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón_parte 3.	68
15	Actividad antioxidante medida por DPPH y ABTS a diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	71
16	Contenido de carotenoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	73
17	Perfil de carotenoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	77
18	Vitamina C de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	80
19	Metabolitos de bajo peso molecular encontrados en el pimiento asperjados con diferentes cocteles de FMM.	83
20	Inhibición de α -amilasa de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.	90
21	Incrementos o decrementos en porcentaje de diferentes variables medidas en pimientos cocidos en comparación con el fresco.	102
22	Masa molecular de reactivos utilizados.	126
23	Preparación de soluciones de Trolox para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH.	129

24	Esquema de llenado de microplaca para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH.	130
25	Preparación de las soluciones de Trolox para la determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS.	132
26	Esquema de llenado de la microplaca para la determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS.	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diferentes tipos de pimiento (Lamuyo, California y Dulce Italiano -de izquierda a derecha-).	7
2	Ruta biosintética de los capsaicinoides.	14
3	Estructura química del quitosán.	24
4	Estructura química del ácido jasmónico.	26
5	Escala CIELAB.	39
6	Actividad antiradical DPPH.	43
7	Correlación lineal entre número de nodos y altura de la planta de pimiento morrón.	54
8	Correlación lineal entre cantidad de taninos y flavonoides del pimiento fresco.	64
9	Biosíntesis de carotenoides.	76
10	Heat map de 28 metabolitos encontrados en el pimiento.	87
11	Impacto de diferentes rutas metabólicas considerando los 28 metabolitos encontrados en el pimiento.	88
12	Medición de color L, a* y b* de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.	92
13	pH de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.	94
14	Grados Brix de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón	95
15	Contenido de fenoles de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.	97
16	Contenido de flavonoides de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.	98
17	Contenido de taninos de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.	98
18	Actividad antioxidante (medida por DPPH y ABTS) de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.	100
19	Carotenoides totales de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.	101
20	Condensación de la vainillina con (-)-epicatequina.	124

CAPÍTULO 1

I. INTRODUCCIÓN

De origen mexicano y signo de la identidad nacional, el cultivo de chile se encuentra entre las hortalizas más cultivadas en el mundo. El chile ha representado desde tiempo inmemoriales, un elemento básico dentro de la dieta de los mexicanos, adicionalmente tiene beneficios extranutricionales y se utiliza con fines industriales. El cultivo de esta fruta es una práctica generalizada en todo el territorio nacional, además, el producto ha encontrado buena demanda en algunos de los más importantes mercados a nivel mundial (SIAP, 2010).

La producción de chile, no se garantiza por un elemento en sí mismo sino por la conjunción de factores de diversa índole y, es el aprovechamiento de éstos lo que convierte a México en una potencia. La modernización y conocimiento de la producción de un cultivo esencial para la economía e identidad nacional involucra que se requiera profundizar en los factores que inciden en su producción y consumo. De ahí que la presente investigación sea de relevancia ya que propone áreas de oportunidad que consideran la aplicación de factores moduladores de metabolitos (FMM) en el manejo agronómico o en postcosecha.

Con esta investigación, se pretende contribuir a un adecuado manejo de sustancias bioactivas en el pimiento, mediante la evaluación de las condiciones de producción, manejo postcosecha y proceso culinario. Adicionalmente, se espera evidenciar los beneficios derivados de la ingesta de pimiento tanto crudo como procesado.

1.1 Justificación

Las recomendaciones dietéticas recientes plantean el incremento del consumo de frutas y verduras, que contienen fitoquímicos, ya que éstos proveen

efectos benéficos para la salud humana y desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas.

El pimiento, en sus diferentes estadios de maduración, es una fruta que ha ganado popularidad, además de por sus atributos de color, pungencia y aroma, por la abundancia y tipo de fitoquímicos que contiene, los cuales se ven afectados por los tratamientos culinarios. En este contexto, es relevante identificar el impacto del manejo agronómico utilizando cocteles de FMMs (en particular peróxido de hidrógeno, ácido jasmónico y quitosán) sobre los compuestos benéficos para la salud presentes en el chile pimiento. Asimismo, es importante conocer la concentración de éstos y la actividad antioxidante (AOX) que repercute en un efecto benéfico para la salud. No obstante, siendo más rigurosos, no sólo interesa conocer los beneficios del producto en crudo, sino también una vez procesado culinariamente.

Si bien Heredia y Cisneros-Zevallos (2009) evaluaron el efecto de la aplicación de dos elicitores, etileno (ET) y metiljasmonato (MJ) en el contenido de compuestos fenólicos en pimiento; este estudio fue realizado en el producto rebanado como tratamiento postcosecha y de forma independiente. Igualmente, no evalúa el efecto de diversos procesos culinarios en el producto. Ramírez *et al.* (2009) estudiaron la influencia de la prohexadiona de calcio (PCa) y de PCa con dos combinaciones, una con ácido benzoico (AB) y otra con ácido salicílico (AS), en el rendimiento y en los niveles de capsaicina y de vitamina C en chile jalapeño, concluyendo que estos elicitores aumentan el contenido de capsaicina, vitamina C y rendimiento en chile, pero no realizaron ninguna evaluación de caracteres morfológicos o de algún indicador de bioactividad como es la medición de la AOX.

Un sinnúmero de estudios, entre los que se encuentran los realizados por Benavides-Mendoza *et al.* (2007), Warabieda y Olszak (2010), Bi *et al.* (2011), Parađiković *et al.* (2011), Tierranegra-García *et al.* (2011) en diversos cultivos como tomate, garbanzo, maíz, jitomate, fresa, pimiento y lechuga determinaron el efecto

de diferentes elicitores en el contenido de metabolitos secundarios, incidencia de plagas, morfología y/o bioactividad, pero ninguno de ellos evalúa el efecto combinado de los elicitores en estos factores. Incluso, la presente investigación propone sustituir el término elicitor por el de FMM (García-Mier *et al.*, 2014), pues no sólo se puede alterar el metabolismo secundario de las plantas sino también el primario.

Por lo anterior, se requiere una investigación que fundamente las modificaciones de los sistemas de cultivo o manejo postcosecha utilizando combinaciones de factores moduladores de metabolitos (FMM), destinada a aumentar la producción de compuestos bioactivos, que explore la funcionalidad del producto en sus diferentes formas de ingesta y dilucide su influencia en las características fisicoquímicas. Por lo tanto, la presente investigación es de suma relevancia para mejorar las perspectivas de producción y consumo de este alimento requerido no sólo local sino también internacionalmente y establecer su proceso de cultivo dentro de un marco de agricultura sustentable.

1.2 *Planteamiento del problema*

México posee la mayor variedad genética de *Capsicum*; sin embargo, no es el productor más importante (Rubio-Pino *et al.*, 2010). Los rendimientos en México son de 9 ton/ha mientras que en Estados Unidos rebasan las 31 ton/ha (FAOstat, 2009). El bajo rendimiento del cultivo se debe a la precaria tecnología utilizada y al uso de cultivos criollos que son más sensibles a plagas y enfermedades. La situación anterior repercute en los costos de producción, así como en el precio del producto, lo que hace imposible competir con productores como Estados Unidos o China, país donde el precio del producto equivale a la mitad del precio en México.

El chile pimiento es ampliamente cultivado en México, su producción ha tenido un crecimiento sostenido en los últimos años; sin embargo, a pesar de que el país se sitúa en una posición importante a nivel mundial en el cultivo de esta hortaliza, se encuentra muy por detrás de China que ocupa el primer lugar de

producción (FAOstat, 2009). Debido a los bajos rendimientos del cultivo por hectárea en el país, México dedica una mayor área de cultivo con la intención de atenuar este problema de producción.

El chile pimiento, además de la relevancia que cobra para el país por producción y exportaciones (FAOstat, 2009), ha despertado gran interés no sólo por su composición de nutrientes sino también por su contenido de bioactivos y su importancia como antioxidantes. No obstante, este producto, cultivado bajo condiciones de invernadero puede tener un menor contenido de metabolitos secundarios que aquéllos cultivados a cielo abierto, por el hecho de que su nivel de confort es mayor y estos compuestos se producen en respuesta al estrés (Schreiner, 2005).

Aunque los efectos sobre la salud del chile pimiento se han dilucidado con anterioridad (Galvez Ranilla *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2010) no se ha evaluado este producto *a posteriori* de un manejo agronómico ordenado, que considere la activación simultánea de varias rutas metabólicas, a través de la aplicación de FMM y enfocado a aumentar la producción de metabolitos secundarios. Asimismo, no se ha revisado el efecto del procesado culinario en la cantidad de bioactivos, resultado de un manejo agronómico especial.

1.3 Hipótesis y objetivos

1.3.1 Hipótesis

La aplicación de factores moduladores de metabolitos en postcosecha o en el proceso productivo del pimiento y, posteriormente, el procesado culinario, afectan significativamente el potencial nutracéutico del pimiento; no obstante, la aplicación de factores moduladores de metabolitos no afecta la morfología del cultivo.

1.3.2 Objetivo general

Determinar el efecto del manejo de los factores moduladores de metabolitos y procesado culinario en el potencial nutracéutico del pimiento al igual que el efecto de éstos en la morfología del cultivo.

1.3.2.1 Objetivos específicos

1. Diseñar e implementar el experimento de campo bajo condiciones de invernadero para la aplicación de FMM y mantenimiento del cultivo.
2. Diseñar e implementar el experimento para la aplicación de FMM en postcosecha.
3. Evaluar las características morfológicas del pimiento sometido a diferentes FMM.
4. Evaluar las propiedades fisicoquímicas del pimiento crudo y sometido a diferentes procesados culinarios.
5. Determinar el efecto de la aplicación de FMM en el pimiento en por lo menos una enfermedad de interés público.

CAPÍTULO 2

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Pimiento

En México el cultivo del chile es toda una tradición, apenas comparada con el maíz y el frijol. Ha cumplido diversas funciones de carácter alimentario y económico, que le han permitido trascender hasta hoy día. El chile pertenece a la familia de las solanáceas y al género *Capsicum*. Su producción y consumo ha aumentado en el mundo por su utilización como vegetal y especia en la cocina internacional. Existen varias especies y una gran cantidad de variedades de chile; pero sin duda, la más cultivada es la especie *annuum*. Hay 27 especies de *Capsicum*, pero sólo cinco han sido domesticadas y son las que actualmente se cultivan: *C. annum* Linné, *C. baccatum* Linné, *C. chinense* Jacquin, *C. frutescens* Linné, y *C. pubescens* (Bosland y Votava, 2012). Uno de los chiles que despierta cada vez más interés en diversos estudios es el pimiento (perteneciente a la especie *annuum*), porque es el condimento de mayor consumo a nivel mundial. Los usos del pimiento son básicamente cuatro: 1) en fresco, 2) desecado como pimentón, 3) como oleorresina y 4) en conservas (Everhart *et al.*, 2009).

El fruto de pimiento se define botánicamente como una baya, constituida por un pericarpio grueso y jugoso, así como un tejido placentario al que se le unen las semillas dando lugar a una estructura de superficie tersa, hueca, voluminosa, llena de aire y con forma de cápsula. Existen muchos tipos de pimientos de acuerdo a su forma, color, sabor, grosor, tamaño, aptitud, etc. Respecto a los colores, los más solicitados son los verdes y rojos, aunque existe un mercado minoritario que demanda el color amarillo (**Figura 1**) (De Rada *et al.*, 2004).

Los chiles son ampliamente consumidos alrededor del mundo por su sabor, aroma y color en diferentes platillos. Además, tienen relevancia en la prevención de enfermedades debido a su contenido de fitoquímicos con actividad biológica como

el ácido ascórbico, carotenoides, capsaicinoides y polifenoles (Chuah *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2007).



Figura 1. Diferentes tipos de pimiento (Lamuyo, California y Dulce Italiano -de izquierda a derecha-).

2.2 Potencial nutracéutico

La humanidad ha creído que determinados alimentos, hierbas, especias y condimentos naturales poseen propiedades preventivo/curativas frente a diversos procesos patológicos. Por tal razón, además de la importancia del pimiento como comida, también ha despertado interés por su potencial como nutracéutico, atribuible a su contenido de fitoquímicos (flavonoides, carotenoides, ácido ascórbico, compuestos fenólicos y capsinoides), en la prevención de diversas enfermedades crónico-degenerativas como hipertensión y diabetes (Galvez Ranilla *et al.*, 2010). Los beneficios de estos fitoquímicos son debidos principalmente a que actúan como antioxidantes y antimutagénicos (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2010; Galvez Ranilla *et al.*, 2010; Menichini *et al.*, 2009; Ornelas-Paz *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2010; Yahia y Ornelas Paz, 2010).

Las recomendaciones dietéticas en los últimos años plantean el incremento del consumo de alimentos, especialmente frutas y verduras, que contienen fitoquímicos, ya que éstos proveen efectos benéficos para la salud y desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (Schreiner, 2005) relacionadas con la presencia de radicales libres. Los radicales libres pueden ser perjudiciales induciendo el desarrollo de al menos cien diferentes enfermedades, incluyendo cáncer, aterosclerosis, artritis reumatoide, inflamación y

cataratas. Los seres humanos utilizan varios mecanismos de defensa contra los radicales libres, ya sea producción de enzimas endógenas, consumo de antioxidantes y proteínas presentes en la dieta (Yahia y Ornelas Paz, 2010).

El pimiento contiene ácido ascórbico (100 g del producto proveen 100% del RDA) (Castro *et al.*, 2011; Deepa *et al.*, 2007). Los colores del fruto se deben a su contenido de carotenoides como β -caroteno, el cual, al igual que el ácido ascórbico actúa como secuestrante de radicales libres. Además, se reporta, que el pimiento contiene capsinoides y compuestos fenólicos como quercetina y luteolina que exhiben potencial como antioxidantes (Deepa *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, el pimiento es cosechado cuando el color es verde, ya que en este punto el fruto ha alcanzado su máxima talla; sin embargo, en los últimos años, el consumo del producto con los colores rojo, naranja, amarillo e incluso blanco y negro ha ganado gran aceptación entre los consumidores (Serrano *et al.*, 2010), dando lugar a estudios de las diferencias en el contenido de sustancias bioactivas en los diversos estadios de maduración del fruto (Ghasemnezhad *et al.*, 2011; Serrano *et al.*, 2010).

En México, los chiles son una tradición tanto culinaria como cultural, su ingesta se estima de 20 g/persona/día. Asimismo constituyen una fuente importante de ingreso (Ornelas-Paz *et al.*, 2010). Este producto se consume tanto crudo como procesado por diferentes técnicas: asado, hervido convencional y en microondas, freído, deshidratado, escabeche, etc. Estos diferentes procesos de acondicionamiento impactan sus atributos sensoriales, contenido de nutrientes y actividad antioxidante (Chuah *et al.*, 2008). Los pimientos, dependiendo de la variedad, aportan 11.3 a 19.5 Kcal/100 g y tienen la siguiente composición: 89.4-94.7% de agua, 0.63-1.12% de proteínas, 1.34-3.08% de carbohidratos, 0.19-0.95% de lípidos, 1.04-2.05% de fibra y 1.02-2.07% de cenizas (Guil-Guerrero *et al.*, 2006).

2.2.1 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico (AA) es susceptible a la oxidación química y enzimática que ocurre durante el procesado y almacenamiento de los chiles (Castro *et al.*, 2011). El contenido de AA se modifica a lo largo de la maduración; siendo mayor en el estado maduro que cuando está verde (Ghasemnezhad *et al.*, 2011; Guil-Guerrero *et al.*, 2006; Marín *et al.*, 2008; Ornelas-Paz *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2010). Yahia y Ornelas Paz (2010), demostraron que las variaciones en el contenido de ácido ascórbico durante la maduración están relacionadas con la actividad de la enzima ascorbato oxidasa; no obstante, el incremento a la exposición de la luz solar y el aumento en el contenido de glucosa en los chiles rojos comparado con los verdes puede también influir en tal comportamiento (Chuah *et al.*, 2008). Deepa *et al.* (2007) indican que el contenido de AA se reduce al transcurrir el proceso de maduración expresado en base seca, observándose el comportamiento contrario cuando los resultados se expresan en base húmeda.

Las variaciones en el contenido de ácido ascórbico en los chiles crudos de la misma variedad se atribuyen a factores como el cultivo en invernadero o a cielo abierto, región geográfica, temporada de cosecha y manejo postcosecha (Deepa *et al.*, 2006; Ghasemnezhad *et al.*, 2011). Wahyuni *et al.* (2011), mencionan que la diversidad genética también está implicada.

El hervido reduce el contenido de AA de los chiles, el cual varía de acuerdo al estado de maduración, siendo los verdes los que experimentan las mayores pérdidas en comparación con los rojos y amarillos (Castro *et al.*, 2008; Ornelas-Paz *et al.*, 2013). Los chiles maduros, rojos y amarillos, muestran un contenido mayor de carotenoides, capsaicinoides y fenoles que los verdes, situación que puede tener un efecto antioxidante en el AA (Castro *et al.*, 2008). El asado, provoca mayores pérdidas en el AA que el hervido; no obstante, las diferencias debido al estado de maduración son las mismas (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

El AA que se pierde durante el hervido se lixivia en el agua de proceso. Otros factores que se ha sugerido influyen las pérdidas de vitamina C durante

los tratamientos de cocción son: la temperatura, área superficial expuesta al aire, pH, presencia de metales de transición, acción de enzimas y grosor del pericarpio (Chuah *et al.*, 2008).

2.2.2 Polifenoles

Los polifenoles que influyen la actividad antioxidante de los chiles, se caracterizan por tener más de un grupo fenol por molécula; a mayor cantidad de polifenoles mayor actividad antioxidante (Chuah *et al.*, 2008). Los chiles rojos tienen el mayor contenido de polifenoles (594 μmol equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco), seguidos por los naranjas, amarillos y verdes. El genotipo de los chiles influye el contenido de polifenoles. Deepa *et al.* (2007) reportan valores de 186 a 1122 mg/100 g de producto en base seca (bs) para diferentes variedades de pimiento verde y para los pimientos maduros rojos el contenido de polifenoles se encuentra entre 323 y 852 mg/100 g de producto bs. En algunos artículos, los polifenoles, contrariamente a lo usualmente reportado, no se expresan en base húmeda sino en seca con la intención de discernir si las fluctuaciones en el contenido de estos compuestos se relacionan con pérdida de humedad o por efecto del metabolismo de la planta. El contenido de fenoles totales reportado en base húmeda se encuentra entre 12.5 y 66.25 mg/100 g.

El contenido de compuestos fenólicos varía de un año a otro para una misma variedad, de acuerdo a la condición de estrés (Deepa *et al.*, 2006) y al material utilizado (pulpa, semillas o ambos) para realizar la determinación de estos compuestos (Deepa *et al.*, 2007; Hervert-Hernández *et al.*, 2010).

Los métodos de cocción reducen en cierta medida el contenido de polifenoles de los chiles; sin embargo, Chuah *et al.* (2008) reportan que no hay diferencias significativas entre los chiles crudos, los hervidos en microondas y los freídos, posiblemente debido a la inactivación de la enzima polifenoloxidasas. El hervido convencional reduce el contenido de polifenoles después de cinco minutos y esta reducción se acentúa después de media hora de cocción; posiblemente

debido a la disolución de estos compuestos en el agua de remojo. Castro *et al.* (2011) indican que la polifenoloxidasas disminuye después del blanqueo del pimiento amarillo (70, 80 y 98°C por 60 o 15 s). El tiempo de cocción, así como el tamaño de corte de los vegetales influyen en las pérdidas de polifenoles en los productos (Sikora *et al.*, 2008).

Se considera que la mayor parte de los polifenoles se absorben en el intestino al ser hidrolizados por enzimas o por la flora del colon. Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren grandes modificaciones, de hecho se conjugan en las células intestinales y posteriormente en el hígado por metilación, sulfatación y/o glucuronidación. Como consecuencia, las formas de estos compuestos al llegar a la sangre y tejidos son diferentes de las presentes en los alimentos y es muy difícil identificar todos los metabolitos, así como evaluar su actividad biológica, por lo cual, se considera que más que la concentración de polifenoles ingerida, lo que influye en su absorción es su conformación química (D'Archivio *et al.*, 2007).

2.2.3 Carotenoides

El contenido total de carotenoides (CTC) de los chiles picosos y no picosos varía de 1 a 156 µg/g (Ornelas-Paz *et al.*, 2013) y es mayor en los chiles rojos que en los verdes (Chuah *et al.*, 2008; Deepa *et al.*, 2007). El pimiento rojo tiene más CTC y β-caroteno que el amarillo y el verde y se incrementa hasta tres veces más entre el estado inmaduro y maduro (Marín *et al.*, 2008); no obstante, la cantidad de carotenoides se reduce después del hervido y asado. Dependiendo de la variedad, el contenido de β-caroteno puede fluctuar entre 660.03 y 105.33 µg/100 g. Las características intrínsecas del cultivo, así como la expresión de los genes que controlan la carotenogénesis y las condiciones de cultivo impactan en el contenido de carotenoides (Deepa *et al.*, 2006). Además, la manera de expresar los resultados: base húmeda o seca, también impactan en los resultados obtenidos (Deepa *et al.*, 2007).

El CTC se reduce después del hervido, siendo los chiles no picosos, como el pimiento, los que presentan las mayores pérdidas. Este fenómeno se puede explicar por la presencia de capsaicinoides en las variedades picosas, los cuales son solubles en grasa, al igual que los carotenoides y los protege de la oxidación. El asado también reduce el CTC. La actividad antioxidante de los vegetales se reduce por el procesado térmico en medio acuoso lo cual se atribuye a la pérdida de antioxidantes como el ácido ascórbico y polifenoles, en el agua de cocción. No obstante, el hervido aumenta la actividad antioxidante de los chiles no picosos o dulces (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

El proceso metabólico para la conversión de los carotenoides con actividad de pro vitamina A a retinol, ocurre mediante un proceso oxidativo catalizado por la enzima β , β -caroteno 15,15'-mono-oxigenasa, la cual es localizada en el citosol de la células y cuya actividad preponderante ocurre en el intestino. Asimismo, la presencia de grasas facilita la absorción de estos compuestos (Fernández-García *et al.*, 2012).

2.2.4 Capsaicinoides

El contenido de capsaicinoides se relaciona con la sensación de picor de los chiles y son biosintetizados por la condensación de ácidos grasos y vainillinamina, acumulándose más en la placenta que en el pericarpio y semillas. Su contenido varía en las diferentes especies. Ornelas-Paz *et al.* (2010) indican que en el pimiento no se detectan capsaicinoides; no obstante, Wahyuni *et al.* (2011) mencionan que si bien los niveles no son detectables en el pericarpio, sí contiene niveles reducidos en la placenta con semillas. Para los chiles picosos, este compuesto es mayor en los amarillos y rojos que en los verdes (Ornelas-Paz *et al.*, 2010). El hervido reduce generalmente el contenido de estos compuestos; sin embargo, en algunas variedades como el jalapeño aumentan después del hervido y enlatado. El asado suele incrementar la presencia de capsaicinoides.

En los chiles no picosos, el capsinoide vainillinalcohol en lugar de vainillinamida, es usado como sustrato para el ácido graso, originando un éster en

lugar de una amida, la cual es precursora de los capsaicinoides en los chiles picosos (**Figura 2**). El pimiento tiene un gen recesivo que elimina la presencia de capsaicina (Faustino *et al.*, 2007), aunque Deepa *et al.* (2007) reportan valores de capsaicina entre 776 y 1440 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de producto en base seca para pimientos verdes y de 277 a 1529 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ para rojos. El contenido de capsaicina en el pimiento, para la mayoría de las variedades, disminuye conforme avance el estado de maduración.

La capsaicina es absorbida a través del receptor de capsaicina, receptor vaniloide (VR1) o receptor de potencial transitorio miembro de la subfamilia 1 (TRPV1). TRPV1 es un canal de cationes no selectivo activado por una amplia variedad de estímulos incluyendo sustancias químicas y factores químicos, como el calor, protones y vaniloides. Los capsinoides actúan de manera similar y son menos tóxicos (Sasahara *et al.*, 2010).

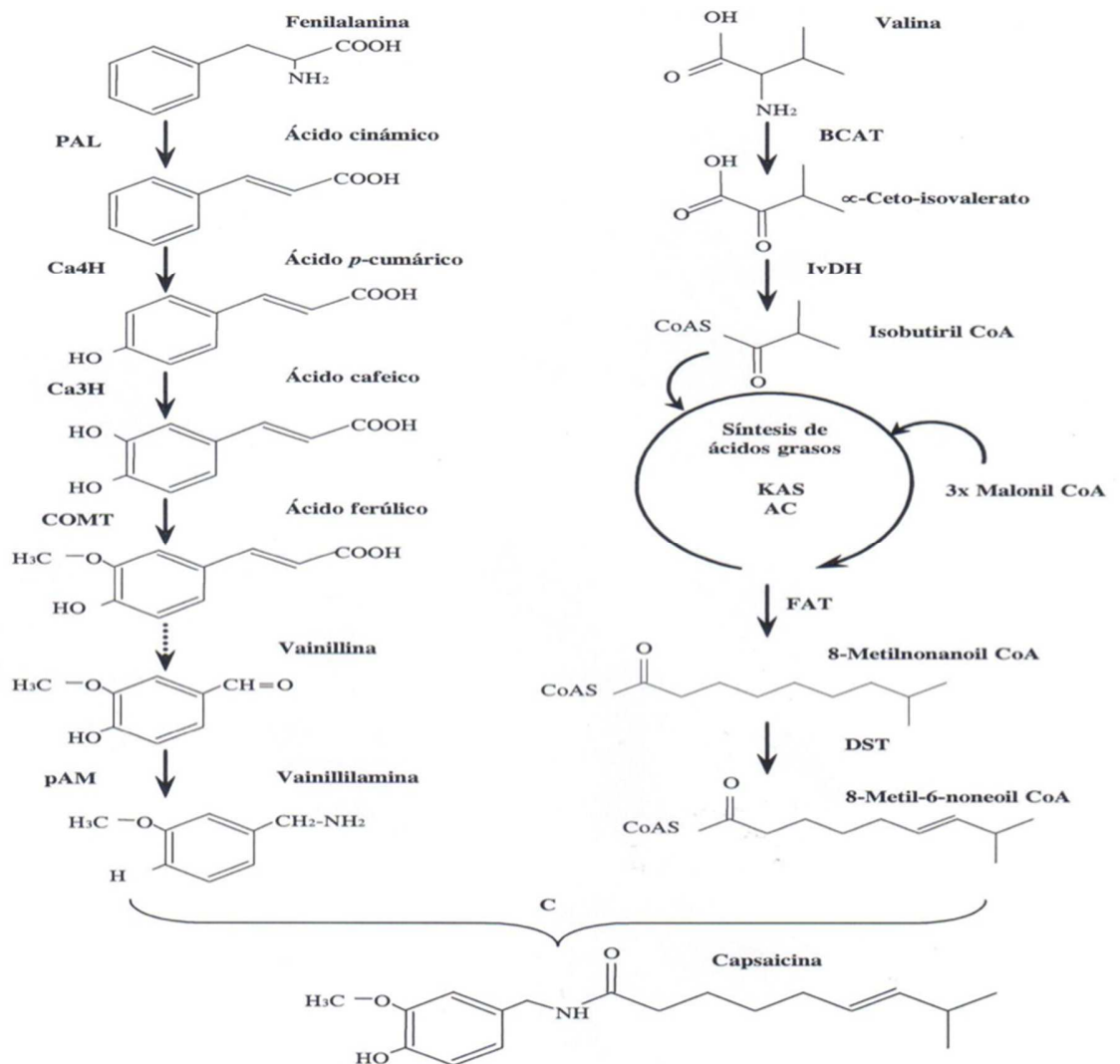


Figura 2. Ruta biosintética de los capsaicinoides.

Las enzimas indicadas en la ruta son: PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H, cumarato 3 hidroxilasa; COMT, ácido cafeico O-metiltransferasa; pAMT, presunta aminotransferasa de la vainillina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados; IvDH, isovalerato deshidrogenasa; KAS, β-cetoacil sintasa; ACL, proteína acarradeadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa, C, capsaicinoide sintasa. La flecha punteada representa reacciones por caracterizar (Vázquez-Flota *et al.*, 2007).

2.2.5 Actividad antioxidante

El impacto del procesado sobre la AOX de los chiles es contradictorio. Mientras Chuah *et al.* (2008) reportan que no hay diferencias significativas entre los chiles crudos y los sometidos a cocción por microondas y fritos, Ornelas-Paz *et al.* (2013) indican que sí hay una reducción de la actividad antioxidante después de

que se someten a los diferentes procesos de cocción como hervido y asado, con la excepción de los no picosos que aumentan su actividad antioxidante. Las pérdidas de poder antioxidante en los tejidos hervidos están relacionadas con el área superficial del producto (Howard *et al.*, 2000).

La actividad antioxidante de los chiles no picosos es menor que la de los picosos (Howard *et al.*, 2000; Ornelas-Paz *et al.*, 2013). Además, para el mismo tipo de chile en crudo, la actividad antioxidante varía de acuerdo al estado de maduración; sin embargo, los reportes todavía no son claros al respecto, ya que mientras algunos indican que es mayor en el estado verde que en el amarillo o rojo (Ornelas-Paz *et al.*, 2013); otros indican lo contrario (Howard *et al.*, 2000; Materska y Perucka, 2005) y otros, que no hay diferencias a lo largo del proceso de maduración (Sun *et al.*, 2007). Se han reportado valores de AOX entre 47.9 y 376.5 mmol/g expresados en base seca para pimientos verdes y de 54.3 a 376.5 mmol/g para rojos (Deepa *et al.*, 2007).

Se ha encontrado que los capsinoides presentes en el pimiento son capaces de aumentar la actividad de la enzima “superóxido dismutasa”, lo que puede explicar su efecto como antioxidantes (Luo *et al.*, 2011).

Serrano *et al.* (2010) analizaron la actividad antioxidante tanto en la fase hidrofílica como lipofílica encontrando que los compuestos responsables de tal comportamiento se encuentran en mayor proporción en la fase hidrofílica. La diferente composición de las fases hidrofílica y lipofílica influencia las discrepancias entre éstas; sin embargo, en ambos casos, los análisis en pimientos maduros rojos indican una mayor actividad que en verde (Deepa *et al.*, 2007; Guil-Guerrero *et al.*, 2006). Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, siendo la prueba de FRAP una de las más utilizadas por ser económica y rápida, a pesar de sus limitaciones. Este método se basa en la actividad reductora del hierro. La utilización de los métodos de DPPH y ABTS son ampliamente utilizadas y se basan en la capacidad para atrapar radicales libres.

2.3 Manejo postcosecha

Al cosechar las frutas y hortalizas se está desprendiendo de la planta un producto todavía capaz de sufrir cambios que disminuyan o incrementen su calidad. Por lo cual el manejo posterior que sufren estos productos debe considerar esta trascendental cuestión (Puerta-Gomez y Cisneros-Zevallos, 2011). El manejo postcosecha involucra varias operaciones enfocadas no sólo en el traslado del producto al consumidor sino también en la conservación de su integridad y preservación de su calidad de acuerdo a su propio comportamiento y características químicas y biológicas.

Varios son los trabajos realizados en los que se investigan diferentes tratamientos postcosecha con la intención de conservar el color, tamaño y textura del producto o bien, de evitar el ataque de patógenos (Jin-Hua *et al.*, 2007; Rao *et al.*, 2011; Terry y Joyce, 2004); sin embargo, son limitadas las aportaciones en las que se tenga como objetivo investigar el efecto de los tratamientos postcosecha en el contenido de fitoquímicos, más aún el efecto en los fitoquímicos resultado de la mezcla de un coctel de FMM. El trabajo de Shafiee *et al.* (2010) es una aproximación al objetivo anterior; no obstante, sólo evalúa el contenido de ácido ascórbico resultado de la imbibición en agua caliente, ácido salicílico o cloruro de calcio.

Como manejo postcosecha en aras de evitar el daño por frío. al que es susceptible el pimiento morrón, Meir *et al.* (1995) utilizan varios tipos de bolsas de polietileno con diferente grado de perforación para evaluar su efecto en la pérdida de agua y pudrición. Este autor concluye que la utilización de bolsas de polietileno con 0.064% o 0.23% de perforación previene las pérdidas de peso, así como la pudrición. Fallik *et al.* (1994) utilizan peróxido de hidrógeno como tratamiento postcosecha; no obstante, lo que miden es el deterioro por *B. cinerea* y *A. alternata*. Un experimento similar al anterior fue realizado por Bayoumi (2008) en el que evalúa el efecto de la imbibición con peróxido de hidrógeno en la pudrición, pérdida de agua y también vitamina C. Se requiere de la realización de más experimentos en los que se evalúen otros fitoquímicos además del ácido ascórbico.

2.4 Condiciones de producción

Los sistemas de manejo de cultivo son: intensivos y extensivos. Se consideran como cultivos intensivos en pimiento aquéllos en los que, mediante artificios agronómicos, se obtiene la producción fuera de su época normal de aparición en el mercado, con el objetivo de conseguir mejores rendimientos económicos. Dentro de los sistemas intensivos se tienen el semiforzado y forzado. En el semiforzado la protección climática es temporal, aplicándose a fases bien definidas del ciclo de desarrollo y crecimiento de la planta (usualmente finales del invierno, principios de la primavera). Por otro lado, en la modalidad de cultivo forzado, la protección es fija y está presente en todas las fases o periodos vitales de la planta (Móznér *et al.*, 2012; Nuez Viñals y Ortega, 2003).

Algunas de las técnicas de manejo en el sistema semiforzado implican la utilización de acolchado plástico (mulching) que consiste en la colocación de un techo de plástico transparente en el terreno donde se procederá al trasplante (Liang *et al.*, 2011). Otra técnica utilizada es la cubierta flotante que consiste en un velo que se coloca sobre el cultivo tras el trasplante, sin armazón alguno que lo soporte por lo que es el propio cultivo el que lo eleva en su crecimiento. Por último, están los multitúneles (protecciones formadas por arcos de distintos materiales sobre las que se coloca la cubierta plástica) que se mantienen durante las primeras fases del cultivo hasta que dejan de ser necesarios cuando las temperaturas son las adecuadas, consiguiendo acortar el ciclo de cultivo (Nuez Viñals y Ortega, 2003).

El sistema forzado de cultivo de pimiento es en invernadero, el cual es una construcción cuya estructura soporta un material que permite el paso de la radiación solar y con el tamaño suficiente para permitir efectuar las labores de cultivo, acceso al personal y a los equipos. Algunos de los materiales más utilizados para la construcción de invernaderos son polietilenos de baja densidad, polietileno de larga duración y termoaislante. Cabe mencionar que el cultivo del pimiento es, junto con el jitomate, la hortaliza que más superficie ocupa bajo invernadero. Las principales ventajas del cultivo de pimiento bajo invernadero son el aumento de precocidad,

calidad y rendimientos, posibilitando un mayor control de las plagas y enfermedades (Cruz Huerta *et al.*, 2009; Hernández-Hernández *et al.*, 2011).

El manejo extensivo del pimiento se caracteriza por un grado mínimo de modificación del medio ambiente, existiendo muy poco control sobre el mismo, así como sobre la calidad y cantidad de los insumos agregados para estimular, suplementar o reponer el ciclo de cultivo (Móznér *et al.*, 2012; Nemecek *et al.*, 2011). En la agricultura extensiva los cultivos están sometidos a diverso tipos de estrés de tipo abiótico y biótico que impacta en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Ncube *et al.*, 2012).

Las prácticas agrícolas convencional, integrada y orgánica influyen la composición del pimiento, reportándose un mayor contenido de compuestos fenólicos, carotenoides y vitamina C en los pimientos cultivados utilizando agricultura orgánica comparados con aquéllos que se cultivaron empleando prácticas integradas y convencionales (Pérez-López *et al.*, 2007; Pérez-López *et al.*, 2007). Lo anterior, influye en la actividad antioxidante, ya que son los pimientos orgánicos los que reportan el mejor desempeño como atrapadores de radicales libres.

Es pertinente mencionar que el término de prácticas agrícolas convencionales, hace referencia al sistema agropecuario en el que se utilizan sustancias químicas sintéticas de manera parcial o total; el término de agricultura orgánica, alude a un sistema que trata de utilizar al máximo los recursos de la finca, dándole énfasis a la fertilidad del suelo y a la actividad biológica y al mismo tiempo, a minimizar el uso de los recursos no renovables y no utilizar fertilizantes y plaguicidas sintéticos para proteger el medio ambiente y la salud humana. Por último, la agricultura integrada, se refiere a un sistema de producción agraria a medio camino entre la agricultura orgánica y la convencional. La producción integrada, a diferencia de la producción orgánica, permite la utilización de productos agroquímicos de síntesis (abonos, pesticidas, etc.), si bien se busca hacer un uso

mínimo de los mismos. Cuando estos sistemas se comparan en invernadero, se excluyen las variaciones debidas al tipo de suelo y clima, lo que hace que los resultados se deban exclusivamente al tipo de manejo agronómico (Pérez-López *et al.*, 2007).

Es importante indicar que en aras de detonar la producción de algunos metabolitos en las plantas, en paralelo con los manejos agronómicos, se utilizan factores moduladores de metabolitos (FMM), los cuales pueden ser condiciones de estrés o elicitores.

2.4.1 Manejo de cultivo

Las prácticas agronómicas, convencional y orgánica, impactan en el contenido de ácido ascórbico, carotenoides y fenoles, así como en el color del pimiento. Estos compuestos aumentan durante la maduración, el pimiento rojo es el que tiene la mayor cantidad de bioactivos y es todavía mayor en aquéllos chiles cultivados orgánicamente. Asimismo éstos exhiben la mayor intensidad de coloración (Kim *et al.*, 2010; Pérez-López *et al.*, 2007).

Chassy *et al.* (2006) reportan que el medio ambiente influencia levemente el contenido de compuestos antioxidantes como fenoles, ácido ascórbico y flavonoides y que las prácticas agronómicas no influyen en los niveles de estos compuestos. Por otro lado, Marín *et al.* (2009) indican que las prácticas agrícolas impactan el contenido de bioactivos en el pimiento y que la hidroponia y manejo orgánico pueden ser similares en el contenido de éstos con la ventaja de que el cultivo en hidroponia presenta un mejor perfil microbiológico.

Marín *et al.* (2008) reportan que el AA es mayor en los pimientos cultivados orgánicamente y en hidroponia que aquéllos cuyo cultivo fue convencional, asimismo indican que es mayor en los pimientos maduros rojos que en el estado inmaduro. Se señalan diferencias en el contenido de β -caroteno, presentándose en mayor proporción en los chiles cultivados en hidroponía; no obstante, el contenido de compuestos fenólicos no se ve afectado por las prácticas agronómicas.

La producción de pimiento en México ha experimentado un crecimiento sostenido y, junto con el jalapeño y serrano, representa un 78% de la producción de chile fresco (SAGARPA, 2008), por lo cual, constantemente se busca mejorar su rendimiento de cosecha y calidad. En aras de satisfacer un renovado interés de los consumidores por adquirir alimentos con propiedades bioactivas, el uso de FMM, señales que estimulan la aparición de respuestas defensivas que promueven la acumulación de metabolitos secundarios, se ha posicionado como un área de interés en la producción de pimiento para dar valor agregado a un producto que *per se* presenta beneficios para la salud.

Parađiković *et al.* (2011) señalan que el uso de elicitores mejora el contenido de vitamina C, fenoles y la actividad antioxidante de pimiento cultivado en invernadero en hidroponia, por lo que la aplicación de éstos podría ser considerada como una estrategia viable para la obtención de altos rendimientos de los vegetales con un mejor valor nutritivo y menor impacto sobre el medio ambiente. Todavía hay mucho por dilucidar sobre el efecto de los elicitores en la producción de metabolitos secundarios; sin embargo, algunas de las sustancias más usadas son el peróxido de hidrógeno (PH, H₂O₂), quitosán (Q), ácido salicílico, metiljasmonato, ácido jasmónico (AJ), ácido absícico y etileno (Zhao *et al.*, 2005). El H₂O₂ es una de las especies reactivas de oxígeno formadas en respuesta al estrés oxidativo por el ataque de patógenos y, en consecuencia, es de los primeros mecanismos de defensa de la planta (Choi *et al.*, 2007).

Las prácticas de fertilización (composteo, vermicomposta, biofertilizantes) impactan en el rendimiento del pimiento. El composteo es la práctica que mejor funciona para incentivar el crecimiento y rendimiento del pimiento durante la conversión del cultivo convencional a orgánico. En los dos primeros años existe una reducción en el rendimiento del cultivo, debido posiblemente a la poca disponibilidad de nutrientes en el suelo, lo que impacta en un 40% en el precio (Gopinath *et al.*, 2009).

2.4.2 FMMs (elicitores) y metabolitos secundarios

Los elicitores son compuestos o biofactores de diferentes fuentes que inducen cambios en la planta. En un sentido amplio, los elicitores activan respuestas de defensa en las plantas mediante la síntesis de fitoalexinas (García-Mier *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2005).

En la actualidad, esta definición, se ha generalizado y aceptado para cualquier molécula química o condición que pueda estimular mecanismos de defensa o asociados con la respuesta de defensa en las plantas. Estas moléculas activadoras hacen referencia a un amplio ámbito de compuestos, los cuales pueden ser derivados a partir de plagas, de plantas u de otros microorganismos, así como a partir de preparados biológicos de origen vegetal o de análogos producidos sintéticamente (Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013).

La elicitación es un proceso de síntesis inducida o aumentada de metabolitos secundarios por parte de las células de la planta para asegurar su supervivencia, persistencia y competitividad. Existen dos categorías de elicitores: los elicitores específicos de tipo genético, producidos por los genes *avr* (avirulencia) que interactúan con las proteínas del gen *R* (respuesta) de la planta, para desencadenar una respuesta hipersensible la cual conduce a la muerte por suicidio de algunas células que bloquean la invasión del parásito en los tejidos de la planta. Los elicitores generales o no-específicos son sustancias de naturaleza glúcida, lipídica o proteica. Éstos inducen una resistencia general efectiva contra una amplia gama de patógenos y/o plagas y actúan en un rango taxonómico variado de especies (Henry *et al.*, 2012).

Otra clasificación de los elicitores es según su naturaleza: abióticos y bióticos. Los primeros son moléculas procedentes de material inorgánico y los segundos son aquellos compuestos provenientes de microorganismos vivos o fragmentos inactivados de éstos, y a su vez los elicitores bióticos se comportan como:

- Endógenos, si el medio desde donde se produce está inmerso en el ambiente intracelular (al interior del tejido del hospedante) de la planta misma o involucrado en la liberación de la molécula, como respuesta a la interacción con el patógeno.
- Exógenos, cuando la molécula se libera externamente (fuera de la célula del hospedante), desde los mismos agentes agresores durante los primeros contactos en la interacción planta-patógeno. También el inductor exógeno podría ser un biopreparado que se emplee externamente en aplicaciones artificiales sobre la planta para inducir respuesta de defensa natural. Por ejemplo, se ha observado que algunas sustancias producidas normalmente por células de plantas en respuesta de defensa también pueden provocar el mismo tipo de respuesta cuando se aplican exógenamente. Algunos ejemplos de estos compuestos son el ácido jasmónico y su éster metílico (metil jasmonato, MeJa), así como el ácido salicílico (AS) y el peróxido de hidrógeno (Riveros Angarita, 2010).

Como ya se mencionó la elicitación es una respuesta biológica, la cual consiste en hacer aparecer una sustancia de naturaleza tóxica, que forma la propia planta y normalmente se desarrolla en las siguientes fases:

- 1) Se da la señal y el reconocimiento del elicitor por el receptor.
- 2) La transmisión de la señal hasta el gen de defensa.
- 3) La inducción del gen de defensa, de la proteína a la respuesta metabólica.
- 4) La producción de la sustancia de defensa donde se encuentran: el ácido salicílico, el ácido jasmónico, el etileno, la sistemina, las fitoalexinas, las PAP (proteínas asociadas a la patogénesis), etc. Todos estos mensajeros sirven para alertar a las células no infectadas y así orientar su metabolismo hacia una resistencia (Mejía-Teniente *et al.*, 2010).

Pocos minutos después de que los elicitores hayan sido reconocidos por un gen R (distribuidos en más de un lugar en la célula, algunos situados en el exterior de la membrana plasmática, donde pueden detectar rápidamente los elicitores,

otros en el citoplasma para detectar moléculas de patógenos), se inician complejas rutas de señalización que conducen a respuestas de defensa. Un elemento común en estas cascadas es un cambio transitorio en la permeabilidad iónica de la membrana plasmática. La activación de los genes R estimula un flujo de entrada de iones Ca^{+2} y H^{+1} a la célula y de salida de iones K^{+1} y Cl^{-1} . El flujo de entrada de Ca^{+2} activa la respuesta oxidativa (producción de O^{-2} , H_2O_2 , y el radical hidroxilo OH^{-1}), que puede actuar directamente en defensa (matar al patógeno), así como en la señalización de otras reacciones de defensa (muerte celular como parte de la respuesta hipersensible y también sobre la expresión de genes codificantes para las enzimas del metabolismo de los polifenoles). En la respuesta hipersensible, las células que rodean la zona de infección mueren rápidamente, privando al patógeno de nutrientes y evitando su extensión. Después de una respuesta hipersensible satisfactoria, queda una pequeña zona de tejido muerto en el sitio donde se ha iniciado la invasión, pero impide que el resto de la planta se vea afectada. La respuesta hipersensible con frecuencia está precedida por la producción de especies reactivas de oxígeno (como se ha mencionado anteriormente). Ya que las células próximas a la infección sintetizan una enorme cantidad de compuestos tóxicos formados por la reducción del oxígeno molecular (Bent y Mackey, 2007).

Los investigadores han aislado más de 20 genes diferentes de resistencia vegetal, conocidos como genes R, que participan en la defensa contra hongos, bacterias y nematodos. Se cree que la mayoría de los genes R codifican receptores proteicos que reconocen y se unen a las moléculas específicas reconocidas del patógeno que se conocen como elicitores e incluyen proteínas, péptidos, esteroides y fragmentos de polisacáridos procedentes de la pared celular del patógeno, membrana externa y procesos de secreción. Los productos mismos de los genes R son casi todos proteínas con un dominio rico en leucina, que se repite de forma irregular varias veces en la secuencia de aminoácidos. Estos dominios pueden estar implicados en la unión del elicitador y reconocimiento del patógeno. Además, el producto del gen R inicia las rutas de señalización que activan las diversas defensas contra los patógenos (Bent y Mackey, 2007).

2.4.2.1 Quitosán

Actualmente los elicitores son ampliamente utilizados para mejorar el rendimiento de los metabolitos secundarios de las plantas. Entre los elicitores más utilizados son los hidratos de carbono sintetizados por hongos y extractos de levadura (Kim *et al.*, 2005).

El quitosán (Q) es un heteropolisacárido policatiónico que consiste en dos monosacáridos, N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (**Figura 3**) unidos por enlaces glicosídicos β -(1-4). Es preparado a partir de quitina mediante hidrólisis alcalina del grupo N-acetilo en donde la cantidad relativa de los dos monosacáridos puede variar, así que el término quitosán no se refiere a un compuesto definido de forma exclusiva, sino que simplemente se refiere a una familia de copolímeros con diferentes fracciones de unidades acetiladas (Amborabé *et al.*, 2008).

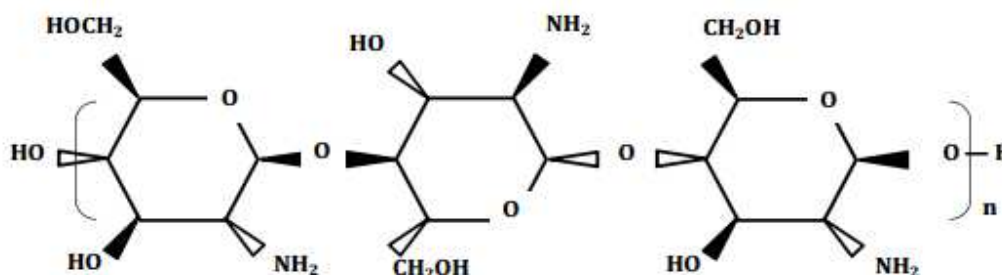


Figura 3. Estructura química del quitosán.

El quitosán se encuentra en paredes celulares de algunos hongos (*Zygomycetes*), y a su vez tiene un efecto inhibitor contra hongos fitopatógenos ya que imita los efectos de algunos microorganismos patógenos y así estimula a las plantas para que sinteticen metabolitos secundarios relacionados con la defensa, además que no presenta efectos fitotóxicos. Por lo tanto, el quitosán se utiliza ampliamente como un inductor (Chakraborty *et al.*, 2009).

2.4.2.2 Peróxido de hidrógeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) a menudo son inducidas en las plantas bajo diferentes tensiones y desempeñan diferentes funciones, a concentraciones moderadas actúan como moléculas de señalización provocando la tolerancia frente a diversas tensiones, el refuerzo de la pared celular, la activación de genes (asociados con la acumulación de metabolitos secundarios, por ejemplo) y la inducción de compuestos de defensa y en altas concentraciones, la muerte celular programada. Dentro de las ERO se incluyen al ión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), al oxígeno singulete (O_2) y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Esta última molécula es el resultado de una reducción en dos etapas del oxígeno molecular, la NADPH-oxidasa cataliza la reducción de O_2 a O_2^- el cual es rápidamente convertido a H_2O_2 por una superóxido dismutasa (SOD). La producción activa de H_2O_2 ocurre principalmente en el espacio apoplástico (intracelular), pero también puede existir en diferentes compartimientos celulares como resultado del metabolismo como por ejemplo la fotorrespiración y oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas y glioxisomas, durante la cadena transportadora de electrones en las mitocondrias y cloroplastos etc., cabe mencionar que esta producción se ve modificada, en respuesta a una amplia variedad de tipos de estrés bióticos y abióticos (Apel y Hirt, 2004).

El H_2O_2 actúa como regulador de una multitud de procesos fisiológicos tales como la adquisición de resistencia, el fortalecimiento de la pared celular, senescencia, la producción de fitoalexinas, la fotosíntesis, la apertura de estomas y el ciclo celular. Tiene una vida útil relativamente larga en comparación con otras ERO (1 ms), la característica anterior junto a su pequeño tamaño le permiten atravesar membranas celulares y migrar de diferentes compartimientos, lo que facilita sus funciones como señalizador (Petrov y Van Breusegem, 2012).

2.4.2.3 *Ácido jasmónico*

Las fitohormonas están definidas como sustancias orgánicas que influyen a bajas concentraciones en los procesos fisiológicos de la planta tales como el crecimiento, la diferenciación, el desarrollo, y la respuesta al estrés abiótico y biótico. Entre estos compuestos se encuentran, los reguladores del crecimiento

tales como auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno, junto con las hormonas de defensa que incluyen, el ácido salicílico, ácido jasmónico y el metil jasmonato (Rohwer y Erwin, 2008).

El ácido jasmónico hormona vegetal de estrés (AJ) (**Figura 4**), es una ciclopentenona que se produce ampliamente en las plantas y su biosíntesis comienza con la liberación de ácido linolénico desde la membrana celular de la planta y procede con una serie de etapas que implican la lipoxidación, ciclación y β -oxidación del ácido graso; una manera análoga a la biosíntesis de prostaglandinas (hormonas de acción local) en células de mamífero (Creelman y Mullet, 1997).

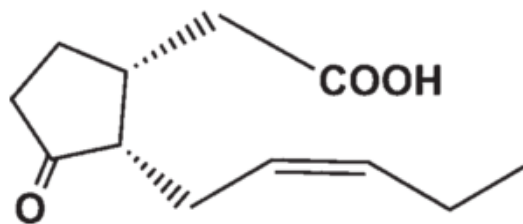


Figura 4. Estructura química del ácido jasmónico.

El ácido jasmónico puede transformarse por diferentes rutas incluyendo la metilación para formar MeJa, conjugación con aminoácidos, etc., a estos derivados se les clasifica dentro del grupo de moléculas de señalización llamadas oxilipinas. Al ser una hormona vegetal del estrés, el ácido jasmónico juega un papel importante en el desarrollo y defensa de parte de las plantas contra estrés biótico y abiótico. El AJ endógeno y demás jasmonatos son compuestos que modulan la señalización de diversos procesos fisiológicos en las plantas bajo diferentes tensiones tales como heridas y ataques de patógenos, por lo tanto, el AJ y el MeJa exógenos han sido utilizados para inducir metabolitos secundarios tales como alcaloides, terpenoides y compuestos fenólicos en algunas plantas, algunos de estos estudios se citan a continuación (Kim *et al.*, 2005).

2.4.3 Metabolitos secundarios

Un aspecto metabólico que distingue el reino animal del vegetal es la capacidad de las plantas y los hongos para producir sustancias que no son esenciales para su supervivencia. A esas sustancias se les designa como metabolitos secundarios (Jeong y Park, 2005).

Las plantas, además de metabolitos primarios, tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas, citocromos, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, también producen metabolitos secundarios, es decir, sustancias que no parecen participar directamente en el crecimiento o desarrollo, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno. Algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002).

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se clasifican según la presencia o no de nitrógeno en su composición. Los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los terpenoides, compuestos fenólicos y los alcaloides (compuestos que tienen nitrógeno en su estructura). Los terpenoides derivan del isopentenil difosfato (IPP) y se conocen unos 25,000. Los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno y derivan principalmente de aminoácidos, de ellos se conocen unos 12,000. Mientras que los aproximadamente 8,000 fenilpropanoides provienen de las llamadas vías biosintéticas del shikimato o del malato/acetato (Mazid *et al.*, 2011). A continuación se describirán brevemente estos compuestos.

Los terpenoides o isoprenoides, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (C5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Por su parte, los alcaloides son compuestos heterocíclicos

que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. Finalmente, los fenilpropanoides son compuestos que se caracterizan por tener en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilos y se sintetizan a partir de un precursor común, el ácido cinámico, derivado de la fenilalanina por la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa. Debido a su fitotoxicidad se almacenan en las vacuolas de las plantas o bien se encuentran ligados a la pared celular (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004).

2.5 Procesado

El pimiento, en sus diferentes estadios de maduración, es una fruta que ha ganado popularidad, además de por sus atributos de color, pungencia y aroma, por la abundancia y tipo de fitoquímicos que contiene, el cual se ve afectado por los tratamientos culinarios. En este contexto, es relevante conocer el tipo de compuestos benéficos para la salud presentes en el chile pimiento, así como su concentración y la actividad antioxidante total que gobierna su efecto benéfico en la salud. No obstante, siendo más rigurosos, no sólo interesa conocer los beneficios del producto en crudo, sino también una vez procesado culinariamente.

El chile pimiento se consume tanto crudo como cocinado. Los diferentes tratamientos culinarios producen modificaciones en los atributos sensoriales del producto, pero también afectan el contenido nutrimental y de compuestos bioactivos del alimento. Un ejemplo de los cambios que ocurren durante el cocinado es la reducción del ácido ascórbico debido a su termolabilidad y solubilidad en el agua; los tratamientos en microondas y en aceite reportan una menor reducción en el contenido de vitamina C. El asado causa mayores pérdidas de ácido ascórbico en el pimiento que el hervido (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

El contenido total de carotenoides (CTT), responsables de la coloración de los chiles, se reduce después del hervido (Wahyuni *et al.*, 2011), siendo los chiles no picosos, como el pimiento, los que presentan las mayores pérdidas. También, la

actividad antioxidante de los vegetales se reduce por el procesado térmico en medio acuoso lo cual se atribuye a la pérdida en el agua de cocción de antioxidantes como el ácido ascórbico y polifenoles (Chuah *et al.*, 2008). El asado reduce, al igual que el hervido, e incluso en mayor proporción que éste, la actividad antioxidante de los chiles picosos, no así la de los dulces. Cabe mencionar que la coloración del chile pimiento (verde, rojo, amarillo, naranja) influencia no sólo su contenido de fitoquímicos sino también su capacidad antioxidante, la cual se ve poco afectada por la cocción del producto al vapor, en aceite o en microondas (Sun *et al.*, 2007).

El contenido total de polifenoles también se ve afectado por el procesado (Sun *et al.*, 2007). La reducción de polifenoles es menor en la cocción al vapor, en aceite o en microondas comparada con aquella que se realiza en medio acuoso. En lo que respecta al contenido de capsaicinoides, el hervido, reduce moderadamente su contenido en el pimiento mientras que el asado lo incrementa (Ornelas-Paz *et al.*, 2013).

Una de las formas de mayor consumo del chile pimiento es deshidratado, proceso que aumenta la actividad antioxidante del pimiento y que reporta diferencias por los diferentes tratamientos de deshidratación: microondas y al sol (Arslan y Özcan, 2011).

CAPÍTULO 3

III. METODOLOGÍA

3.1 Materiales

3.1.1 Equipo

A continuación se enumera el equipo con el que se realizaron las pruebas descritas en esta sección.

Lector de microplacas (Multiskan Go model 51119300; Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia), licuadora 2 L (Tapisa), centrífugas refrigeradas (Orbit 1000 model S2030-1000; Labnet, Woodbridge, NJ, USA y Velocity 14R; Dynamica, Salzburgo, Austria), sonicador (Elma E30H), microplacas de 96 pozos (Corning), micropipetas de 20, 200, 1000, 5000 y 10000 µL (Brand), micropipeta multicanal de 30-300 y 10-100 µL (Brand), plato caliente con agitación (Thermo Scientific Cimatec), vortex (Science Med MX-F), estufa 30-110°C (Terlab), pHmetro (Hanna HI207), congelador (Torrey), refrigerador (Torrey), ultracongelador (Thermo Scientific Revco Plus y VWR Modelo 5715), Espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 10S UV-Vis), HPLC/MS (Agilent serie 1200/8120), GC/MS (Agilent serie 7890A/5975C), agitador orbital (Labnet Orbit 1000), baño recirculador (Polyscience), liofilizador (Labconco Freezone 2.5), rotoevaporador (Heidolph "The collegiate"), báscula (Ohaus Pioneer y Ohaus Scout Plus), matraz de filtración de 1 L (Millipore), bomba de vacío (KNF), colorímetro (Minolta CM 2002), refractómetro (Atago).

3.1.2 Materia prima

Pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) variedad Fascinato (rojo) de Syngenta®, el cual se eligió por ser una variedad apta para el cultivo en invernadero, además de que por experiencia previa, el pimiento rojo, es el que presenta el mejor perfil en los metabolitos estudiados.

3.1.3 Reactivos

Los reactivos utilizados son de las marcas Sigma®, J.T. Baker® y Fermont® y son los que a continuación se enlistan.

Reactivo de Folin-Ciocalteu, metanol RA y HPLC (CH₄O), vainillina (C₈H₈O₃), ácido clorhídrico (HCl), (+)-catequina (C₁₅H₁₄O₆), carbonato de sodio (Na₂CO₃), agua destilada, desionizada y HPLC (H₂O), ácido gálico (C₇H₆O₅), rutina (C₂₇H₃₀O₁₆), 2-aminoetildifenilborato (C₁₄H₁₆BNO), hexano (C₆H₁₄), acetona (C₃H₆O), etanol (C₂H₆O), acetonitrilo HPLC (C₂H₃N), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH; C₁₈H₁₂N₅O₆), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-carboxílico (TROLOX; C₁₄H₁₈O₄), butil-hidroxitolueno (BHT; C₁₅H₂₄O), ácido 6-sulfónico-2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina (ABTS; C₁₈H₁₈N₄O₆S₄), dihidrocapsaicina (C₁₈H₂₉NO₃), capsaicina (C₁₈H₂₇NO₃), capsiato (C₁₈H₂₆O₄), ácido metafosfórico (HPO₃), ácido o-fosfórico (H₃PO₄), fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), hidróxido de potasio (NaOH), licopeno (C₄₀H₅₆), β-criptoxantina (C₄₀H₅₆O), α-tocoferol (C₂₉H₅₀O₂), luteína (C₄₀H₅₆O₂), zeaxantina (C₄₀H₅₆O₂), β-caroteno (C₄₀H₅₆), N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA; C₈H₁₈F₃NOSi₂), quitosán (β-(1-4) D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina), ácido jasmónico (C₁₂H₁₈O₃), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ácido acético glacial (C₂H₄O₂), hidróxido de sodio (NaOH), α-amilasa, ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), tartrato de sodio y potasio (KNaC₄H₄O₆), almidón, fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄), maltosa, ácido ascórbico (C₆H₈O₆), ácido fórmico (CH₂O₂), estándares polifenoles (ácido clorogénico, apigenina 3-glucósido, isoquercetina, luteolina 3-glucósido), hidróxido de potasio (KOH).

3.2 Métodos

Para la caracterización fisicoquímica y proximal se llevaron a cabo los siguientes análisis. El análisis de lípidos, proteínas, cenizas, humedad y fibra se llevaron a cabo según la AOAC (1995), de acuerdo a las referencias 983.23, 950.48, 940.26, 925.09 y 962.09, respectivamente. Los fenoles totales, flavonoides, taninos, carotenoides, actividad antioxidante (DPPH y ABTS) y la actividad inhibitoria de α-

amilasa se determinaron mediante métodos espectrofotométricos que se describirán más adelante en esta sección junto con los métodos cromatográficos para la determinación de capsaicinoides, vitamina C (ácido ascórbico), flavonoides, carotenoides y el análisis no específico de metabolitos. Adicionalmente, se aborda la realización de los análisis para evaluar la calidad del pimiento en términos del color, sólidos solubles y pH, así como la caracterización del suelo utilizado para elaborar el jugo de suelo (sección 3.2.2 más adelante) y la realización de las mediciones morfológicas.

3.2.1 Cultivo de pimiento

El cultivo de pimiento tipo *blocky* rojo (variedad Fascinado de Syngenta®) se realizó del 14 de marzo al 19 de septiembre de 2013 en un invernadero automatizado de la Universidad Autónoma de Querétaro en el Campus Amazcala ubicado en el municipio de El Marqués en el Estado de Querétaro (longitud 100°16' oeste; latitud, 20° 42' norte; altitud, 1920 m). El invernadero tuvo las siguientes características: 50 m de largo por 10 m de ancho y 5 m de alto, tipo túnel con paredes rectas, con dos ventiladores, un extractor, un calefactor y una pantalla térmica. El invernadero se mantuvo con temperaturas de día y de noche de 37 y 13°C, respectivamente. La humedad relativa osciló entre 50-55%. La radiación fue de 743 ± 72 W/m².

La germinación de las semillas se realizó en charolas de poliestireno de 160 cavidades, colocando una semilla por cavidad con vermiculita y peat moss en una cámara de germinación que se mantuvo a 27°C con una humedad relativa del 70%.

El trasplante se efectuó 77 días después de la emergencia (DDE), en fibra de coco, cuando las plántulas habían formado de dos a tres hojas verdaderas. Se utilizó para el riego un sistema de riego por goteo. Se comenzó irrigando aproximadamente 400 mL por planta hasta alcanzar un máximo de 1.3 L. El riego se realizó veintinueve veces en el día cada treinta o sesenta minutos.

La solución nutritiva que se utilizó cambió a lo largo de cinco etapas según el estadio del cultivo (**Cuadro 1** y **Cuadro 2**). El pH de la solución se mantuvo en un rango de 5.5-6.5 y la conductividad eléctrica, de acuerdo a la fase de la solución, estuvo entre 1.8-2.3 mS/cm. Adicionalmente, según las recomendaciones del fabricante, se aplicó Fungi Q, Nutri Q y Q calcio de la empresa Quimcasa®.

Cuadro 1. Composición de la solución nutritiva.

Compuesto ¹	Cantidad (g) ²				
	<i>Fase 1</i>	<i>Fase 2</i>	<i>Fase 3</i>	<i>Fase 4</i>	<i>Fase 5</i>
Ca(NO₃)₂	919	1777	2022	2493	2493
CaCl	29	49	49	49	49
KNO₃	607	1011	1011	1011	1011
K₂SO₄	279	466	800	800	1446
Mg(NO₃)₂	0	0	0	10	408
MgSO₄	317	435	458	518	195
H₃PO₄³	475 g	791	791	791	791
Micronutrientes (Librel Mix®)⁴	45	45	45 ⁴	45	45

1 La preparación debe realizarse disolviendo en tanques separados los compuestos que contengan calcio de los que no para que, una vez disueltos, se mezclen.

2 Las cantidades presentadas son para preparar 5000 L de solución nutritiva. El ácido fosfórico tiene una densidad de 1.685 g/mL.

3 Tener cuidado al momento de adicionar el ácido. Poner el ácido al agua.

4 En carencia de los micronutrientes se aplican 20 g de quelato de hierro.

Cuadro 2. Concentración de la solución nutritiva por elemento en ppm.

Compuesto	Cantidad (ppm)				
	<i>Fase 1</i>	<i>Fase 2</i>	<i>Fase 3</i>	<i>Fase 4</i>	<i>Fase 5</i>
N	80	89	95	114	148
P	50	50	50	50	50
K	120	120	150	150	208
Ca	80	92	104	127	127
Mg	40	40	40	48	48
S	56	56	56	56	56

Cada quince días las plantas se asperjaron, según el tratamiento, con AJ, PH y Q. Asimismo en un tratamiento se utilizó jugo de suelo (ver 3.2.2).

Las plantas se manejaron con el crecimiento de todos sus tallos a dos vías. El tutorado se efectuó con cordeles de rafia sostenida sobre alambre sujetado en la estructura del propio invernadero. La densidad de plantas fue de 4 plantas/m², el arreglo fue de cuatro plantas por cama, 200 plantas por hilera con separación entre planta y planta de 30 cm y entre hileras de 1.3 cm.

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con veinte tratamientos y tres repeticiones. El arreglo fue tres factores con cuatro niveles. Cada unidad experimental estuvo conformada por 10 plantas de pimiento. Como control las plantas se rociaron con agua.

La estructura de tratamientos se realizó de acuerdo al Plan Puebla (Turrent y Laird, 1975) según el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Tratamientos aplicados al cultivo (coctel de FMM).

Tratamiento	Descripción			Lugar de aplicación
	AJ (μM)	PH (mM)	Q(%)	
T1	0.1	22.5	0.5	Foliar
T2	0.1	22.5	0.75	Foliar
T3	0.1	27	0.5	Foliar
T4	0.1	27	0.75	Foliar
T5	1	22.5	0.5	Foliar
T6	1	22.5	0.75	Foliar
T7	1	27	0.5	Foliar
T8	1	27	0.75	Foliar
T9	0.01	22.5	0.5	Foliar
T10	10	27	0.75	Foliar
T11	0.1	18	0.5	Foliar
T12	1	36	0.75	Foliar
T13	0.1	22.5	0.05	Foliar
T14	1	27	1	Foliar
T15	1	27	0.75	A toda la planta
T16	1	27	0.75	En fruto cosechado verde
T17	1	27	0.75	Se aplicó también jugo de suelo
T18	1	27	0.75	En fruto cosechado maduro
T19 (control)	0	0	0	Agua
T20	1	27	0.75	Foliar a partir de la floración

Los tratamientos se distribuyeron en el invernadero según el **Cuadro 4**.

Cuadro 4. Distribución de tratamientos en el invernadero.

Línea 1	Línea 2	Línea 3
T15	T1	T19
T11	T3	T11
TT9	T15	T17
T18	T10	T2
T2	T6	T14
T20	T19	T8
T13	T16	T4
T8	T13	T5
T4	T20	T10
T5	T18	T18
T17	T5	T3
T14	T17	T16
T1	T4	T1
T16	T8	T15
T3	T11	T6
T7	T12	T9
T6	T14	T7
T12	T2	T13
T10	T7	T20
T19	T9	T12

La recolección del producto se realizó de acuerdo a la maduración del pimiento. Los pimientos se llevaron al laboratorio en cajas de plástico, se lavaron con agua corriente y se dejaron a temperatura ambiente por un día. Posteriormente se procesaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron con hielo seco. Las muestras se conservaron a -70°C hasta su análisis de α -amilasa, flavonoides, carotenoides, actividad antioxidante, ácido ascórbico, capsaicina, fenoles totales y taninos en el pimiento fresco, deshidratado, frito, hervido, hervido en microondas y asado.

3.2.2 Jugo de suelo

Se colectó suelo de un terreno de siembra. A 100 g de suelo se le adicionó 1 L del extracto que se preparó de la siguiente manera. A 500 mL de agua destilada se le adicionaron 5.7 mL de ácido acético glacial y, posteriormente, 65 mL de hidróxido de sodio 1 N. Esto se aforó a 1 L con agua destilada. El jugo de suelo se aplicó en dosis de 10 mL/planta. Este procedimiento se realizó siguiendo de forma parcial lo indicado en la NOM-053-ECOL-1993 (1993).

3.2.3 Análisis de suelo

Los análisis del suelo los llevó a cabo el INIFAP de Celaya de acuerdo a los métodos descritos en el **APÉNDICE I**.

3.2.4 Mediciones morfológicas

Cada quince días, comenzando el 11 de junio de 2013, se realizaron mediciones morfológicas que incluyeron diámetro basal de tallo, largo de tallo, número de nodos, frutos y flores y largo y ancho de hoja. La hoja que se midió fue la tercera hoja del primer piso. Los nodos se midieron sólo en una vía. Las mediciones se realizaron con un flexómetro y un vernier. El área foliar fue calculado usando la ecuación $AREA (cm^2) = 0.61906 * LW + 0.2060 * W^2 - 0.5142 * W$, donde L es el largo de la hoja y W el ancho (De Swart *et al.*, 2004)

3.2.5 Colecta y conservación de materia vegetal

Se tomaron muestras de chiles de diferentes plantas de un mismo tratamiento, las cuales inmediatamente después de recolección se trasladaron al laboratorio en cajas de plástico. Los chiles se lavaron a chorro de agua, se secaron y se repartieron para los diferentes procesados culinarios (fresco, deshidratado, frito, asado y hervido convencional y en microondas). Los pimientos que se analizaron en fresco se cortaron en tiras homogéneas (se desechó el pedúnculo y semillas), se envolvieron con papel aluminio y se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente molerse en licuadora junto con hielo seco. Se guardaron en refrigeración a -70°C. Algunos pimientos se cortaron en tiras, se les quitaron las semillas y se pusieron a secar en horno a 60°C por tres días. Posteriormente se

molieron con una licuadora y se conservaron en bolsas de polietileno perfectamente selladas a temperatura ambiente resguardadas de la luz.

3.2.6 Procesado culinario

Los chiles fueron sometidos a diferentes procesados culinarios:

- Hervido en proporción 1:2 p/p a 94°C en un recipiente tapado por cinco minutos.
- Asado en comal a 210°C por un tiempo entre 8-10 minutos.
- Hervido en microondas en proporción 1:2 p/p en un recipiente de plástico cubierto con plástico por cinco minutos.
- Deshidratado en horno por tres días a 60°C.
- Freído de 250 g de producto en 5.0 mL de aceite por cinco minutos. Primero se precalentó el aceite en el sartén por 1 minuto.

Los chiles que se sometieron a las diferentes cocciones se cortaron en tiras y se desecharon las semillas, excepto el tratamiento de asado en el que se sometió a cocción el pimientito entero y posteriormente se desechó el exterior quemado. Después del tratamiento, las tiras de pimientito se envolvieron con papel aluminio y se congelaron en nitrógeno líquido para posteriormente molerse en licuadora junto con hielo seco. Se guardaron en refrigeración a -70°C. Anteriormente se expuso cómo se almacenó el pimientito deshidratado.

3.2.7 Extracción metanólica

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martinez *et al.* (2002) colocando 1 g de muestra fresca o deshidratada en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se adicionan 10 mL de metanol. Se cubrió la muestra con papel aluminio y se agitó durante 24 h en un ambiente fresco (de preferencia en un cuarto con aire acondicionado). Se centrifugó a 10000 rpm por 10 min a 4°C, desechando la pastilla formada, quedando el sobrenadante. Se almacenó en congelación (-20°C) protegida de la luz por máximo 48 horas. La extracción puede realizarse también en tubos Falcon de 50 mL y poner en agitación orbital por 24 horas.

3.2.8 Evaluación de la calidad del fruto

La calidad del fruto fue evaluada en términos del contenido de sólidos totales, pH y color. Para la medición de sólidos totales se cortaron cuadritos de fruto de 1 cm*1 cm, los cuales se pusieron en una tela de manta de cielo para exprimirlos y poner el jugo en un refractómetro. La medición fue realizada a temperatura ambiente. Para la medición de pH se mezclaron 20 g de pimiento con 20 mL de agua. Las mediciones de color se realizaron por triplicado con un colorímetro Minolta, CR-200 (Atlanta, Georgia, Software: Spectral Magic versión 1.01). El color se determinó según la escala CIELAB donde L mide la luminosidad en rango de 0 a 100 (de negro a blanco), a^* puede tener valores positivos (rojo) o negativos (verde) y b^* valores positivos (amarillo) y negativos (azul) (**Figura 5**).

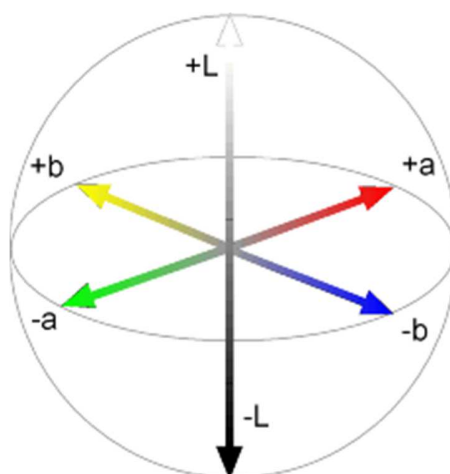


Figura 5. Escala CIELAB.

3.2.9 Análisis espectrofotométricos

3.2.9.1 Taninos condensados

La cuantificación de taninos condensados se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Feregrino-Pérez *et al.* (2008) en microplaca. Este método se basa en la condensación de la vainillina con la proantocianidina en solución ácida. La vainillina protonada, un radical electrofílico débil, reacciona con el anillo flavón en la posición 6 u 8 del polímero del tanino condensado (**APÉNDICE II**).

Se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones de 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/mL de (+)-catequina. La curva se realizó por duplicado, se calculó la media de absorbancia y se determinó la ecuación de la recta y la R^2 .

Se colocaron 50 μ l de cada concentración en la celda de 96 pozos por quintuplicado. Se adicionaron 200 μ l de la solución 1:1 de HCl 8%:vainillina 1%. Deben adicionarse de 50 μ l en 50 μ l a cada uno de los pozos y repetir la operación hasta completar los 250 μ l. Al blanco se le adicionaron 50 μ l de metanol más 200 μ l de HCl 4%.

Para la muestra se tomaron 50 μ l del sobrenadante (muestra-extracto metanólico) y se colocaron en los pozos. En seguida, se adicionaron 200 μ l de la solución 1:1 de HCl 8%:vainillina 1%. Se adicionaron de 50 μ l en 50 μ l en cada uno de los pozos hasta completar los 200 μ l, protegiendo las muestras de luz y oxígeno. El blanco se preparó de igual manera que para la curva de calibración. Posteriormente, se leyó la absorbancia con filtro de 492 nm (Multiskan Go model 51119300; Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia). Los resultados se compararon con la curva de calibración y se expresaron como mg de (+)-catequina por gramo de muestra seca o fresca.

3.2.9.2 Fenoles totales

Se determinaron según el método de Folin-Ciocalteu. Se realizó una curva de calibración para la cual se prepararon las siguientes soluciones. Para la solución de Na_2CO_3 al 20%, se pesaron 5 g de carbonato de sodio y se disolvieron en 20 mL de agua destilada, se sonicó hasta disolver completamente y se aforaron a 25 mL. Para la solución de ácido gálico 0.1 mg/mL, se tomaron 10 mg de ácido gálico y se aforaron a 10 mL con agua destilada. De esta solución se tomó 1 mL y se aforó con 10 mL de agua destilada. Se rotularon microtubos de 2 mL y se les adicionó a cada uno la cantidad necesaria de la sustancia de acuerdo al **Cuadro 5**. Los tubos se agitaron en vortex y posteriormente se dejaron reposar 2 horas en la oscuridad.

Después del reposo, se transfirieron por triplicado 200 μL de cada tubo a celdas de 96 pozos. Se leyó en espectrofotómetro a una $\lambda=750$ nm.

Cuadro 5. Distribución de compuestos para la curva de calibración para la determinación de fenoles totales.

Tubo	Solución ácido gálico (μl)	Agua destilada (μl)	Reactivo Folin-Ciocalteau	Na_2CO_3
0	0	500	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250
7	140	360	250	1250
8	160	340	250	1250

Para la cuantificación de fenoles totales se tomaron 40 μL del extracto metanólico y se adicionaron 460 μL de agua destilada, 250 μL del reactivo de Folin-Ciocalteau y 1250 μL de Na_2CO_3 . Se dejó reposar por 2 horas en oscuridad para posteriormente, transferir por triplicado 200 μL de cada tubo a celdas de 96 pozos. Se leyó en espectrofotómetro.

3.2.9.3 Flavonoides

La determinación de los flavonoides totales se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Oomah *et al.* (2005). Se realizó una curva de calibración para la cual se colocan 50 μl de cada una de las concentraciones (200, 150, 100, 50, 25, 10, 5 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rutina) por triplicado. Se adicionaron 180 μl de agua destilada o metanol (se utilizó metanol), e incorporaron 20 μl de solución 2-aminoetildifenil borato 1%. El blanco se realizó con 230 μl de metanol y 20 μl de 2-

aminoetildifenilborato 1%. Se leyó en espectrofotómetro Multiskan Go (model 51119300; Thermo Scientific, Vantaa, Finlandia) a una $\lambda=404$ nm.

Para la cuantificación de las muestras se tomaron 50 μ l del extracto metanólico de la muestra (sobrenadante), se adicionaron 180 μ l de agua destilada y 20 μ l de solución 2-aminoetildifenilborato al 1%. Se leyó la absorbancia a 400 nm. Los resultados son interpolados a la curva del estándar y son expresados como μ g equivalentes de rutina por gramo de muestra seca o fresca. Las pruebas se realizaron por triplicado al igual que el blanco.

3.2.9.4 Carotenoides

Para la preparación de la muestra se pesaron 2.5 g de chile fresco, los cuales se mezclaron con 20 mL de mezcla de solventes (hexano:acetona:etanol, 5:2.5:2.5). Se agitó la muestra 24 horas protegida de la luz. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a temperatura de 4°C. Se realizó la dilución de 100 μ L de muestra más 2.9 mL de la mezcla de solventes. La lectura se realizó en espectrofotómetro UV-Vis en modo de barrido de 400 a 750 nm.

La concentración de β -caroteno se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Carotenoides totales (mg/100 g de muestra)} = \frac{A_{max} * 100 * f}{250 * L} \quad (1)$$

donde:

A_{max} : absorbancia en la cual cada extracto presentó la máxima absorbancia.

L: longitud de la celda (1 cm).

f: factor de dilución (volumen total/cantidad de muestra).

Coefficiente de absortividad: 250 L/g*cm

3.2.9.5 Actividad antioxidante: DPPH

Se utilizó el método original de Brand-Williams *et al.* (1995) modificado por Fukumoto y Mazza (2000) adaptado para su uso en microplaca. Este método se basa en la disminución de la absorbancia del radical libre DPPH a 515 nm, ya que cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece, lo que proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales por la donación de hidrógeno, esto es observado visualmente como la decoloración del color púrpura a amarillo (**Figura 6**). Para esta determinación se preparó una solución 100 μM de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), 200 μL de esta solución se adicionaron a 20 μL del extracto metanólico. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz se leyó la absorbancia de la mezcla a 515 nm. La actividad para secuestrar radicales del extracto metanólico se determinó en base a la disminución en los valores de absorbancia y los resultados se expresaron como μmoles equivalente de Trolox por gramo de muestra fresca o seca. Ese valor se interpoló a una curva de Trolox de 50-800 μM . Para más detalles sobre la realización de esta técnica consultar el **APÉNDICE III** y el **APÉNDICE IV**.

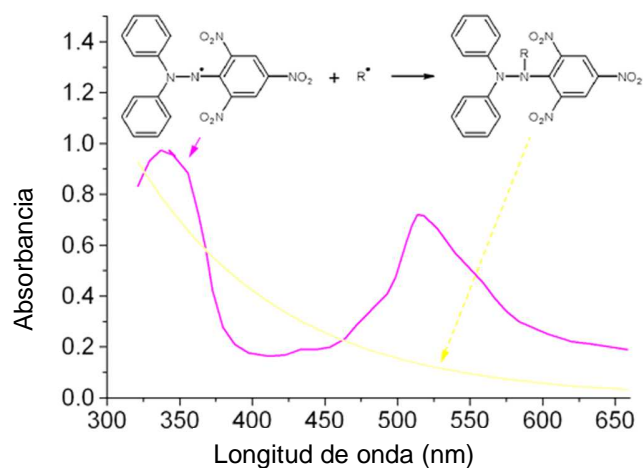


Figura 6. Actividad antiradical DPPH.

3.2.9.6 Actividad antioxidante: ABTS

El método fue desarrollado usando el 2,2'-azinobis-ácido-6-sulfónico-3-etilbenzotiazolina (ABTS) modificado para ser elaborado en microplaca de 96 pozos. Una alícuota de 20 µL del extracto se mezcló con 230 µL de una solución de ABTS•⁺ 7 mM previamente preparada. El control incluyó todos los reactivos excepto el extracto. La absorbancia fue leída a 754 nm en un lector de microplacas. Los resultados para la actividad antiradical del ABTS se expresaron como µmoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra fresca o seca.

3.2.9.7 Ensayo de inhibición de α-amilasa

La solución enzimática fue preparada con a una concentración de 1 unidad/mL en un volumen de 500 mL de agua desionizada fría. Para este ensayo, 500 µl de almidón (1%), previamente llevados a ebullición junto con un buffer de fosfato 20 mM por 15 minutos, fueron mezclados con 500 µl de inhibidor y se permitió alcanzar el equilibrio a 25° C por 15 minutos. La reacción fue iniciada con 1 mL de solución enzimática. Toda la mezcla fue incubada a 37° C por 3 minutos. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción por adición de 1 mL de solución de DNS (96 mM de ácido 3,5-dinitrosalicílico, tartrato de sodio y potasio). La mezcla fue llevada a ebullición en un baño de agua por 15 minutos y luego enfriada en un baño de hielo por 5 minutos. Finalmente se diluyó con 4 mL de agua desionizada y se realizó la lectura de las absorbancias a 540 nm.

Los porcentajes de actividad de α-amilasa fueron calculados con la siguiente fórmula, teniendo en cuenta los valores de las respectivas absorbancias:

$$\% \text{ actividad} = \frac{B-D}{A-C} * 100 \quad (2)$$

donde:

B: absorbancia de la muestra

D: absorbancia del blanco (sin enzima)

A: absorbancia del control 1 (sin inhibidor)

C: absorbancia del control 2 (sin inhibidor y sin enzima)

3.2.10 Análisis cromatográficos

3.2.10.1 *Capsaicinoides*

Se hizo una extracción doble por tratamiento. Para ello se tomaron 5 g de muestra y 10 ml de acetonitrilo grado HPLC en tubos de plástico de 50 mL. Los tubos estuvieron durante tres horas en baño de agua a 60°C, sonicándose y agitándose cada 30 minutos con un vortex. El sobrenadante se centrifugó a 8000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente se filtró a través de acrodiscos de polietileno con tamaño de poro de 0.45 µm. Los extractos resultantes se colocaron en viales de vidrio ámbar y se mantuvieron en refrigeración (-20°C) hasta el momento del análisis.

Las muestras se analizaron en un sistema HPLC/MS (Agilent Serie 1200, 6120 Quadrupole), el cual tiene una bomba cuaternaria (G1311A), detector UV-Vis y automuestreador.

Se utilizó una columna Agilent C18 empacada con partículas de 5 µm de diámetro (Eclipse Plus), 4.6x150 mm. La fase móvil fue acetonitrilo:agua ambas grado HPLC, en una relación 70:30, las cuales se filtraron al vacío a través de una membrana de 0.2 µm de poro. El tiempo de análisis fue de treinta minutos. La fase móvil con flujo de 0.8 mL/min isocrático. La temperatura de la columna fue de 25°C. Se inyectaron 20 µL. La identificación y cuantificación de la capsaicina y dihidrocapsaicina se llevó a cabo mediante la utilización de estándares externos grado HPLC con un detector de arreglo de diodos a una $\lambda = 280$ nm. Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon soluciones de los estándares de capsaicina y dihidrocapsaicina a concentraciones de 0.1, 1, 3, 5, 7 y 10 mg/L en acetonitrilo grado HPLC, las cuales se corrieron bajo las mismas condiciones de las muestras.

3.2.10.2 *Ácido ascórbico*

Se hizo una extracción por tratamiento. Para ello se tomaron 2 g de muestra y se homogeneizaron con 15 mL de ácido metafosfórico 4% (se utilizó agua HPLC

para la preparación de la solución) en tubos de plástico Falcon de 50 mL. Los tubos se sonicaron por cinco minutos y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Posteriormente el extracto se filtró a través de acrodiscos de polietileno con tamaño de poro de 0.45 µm. Los extractos resultantes se colocaron en viales de vidrio ámbar y se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta el momento del análisis.

Las muestras se analizaron en un sistema HPLC/MS (Agilent Serie 1200, 6120 Quadrupole), el cual tiene 1 bomba cuaternaria (G1311A) y detector UV-Vis y automuestreador.

Se utilizó una columna Agilent C18 con partículas de 5 µm de diámetro (Eclipse Plus), 4.6x150 mm. La fase móvil isocrática estuvo compuesta de 0.2 M KH₂PO₄ ajustada a pH 2.3 con ácido o-fosfórico al 85%, la cual previo a su uso se filtró al vacío a través de una membrana de 0.2 µm de poro. El tiempo de análisis fue de seis minutos. El flujo de la fase móvil fue de 0.5 mL/min. La temperatura de la columna fue de 25°C. Se inyectaron 20 µL. La identificación y cuantificación de la ácido ascórbico se llevó a cabo mediante la utilización de estándar externo grado HPLC con un detector de arreglo de diodos a una $\lambda=254$ nm. Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon soluciones del estándar a concentraciones de 230, 180, 140, 100, 75, 50, 30, 20, 10 y 1 mg/L en ácido metafosfórico, las cuales se corrieron bajo las mismas condiciones de las muestras.

3.2.10.3 *Flavonoides*

Los flavonoides fueron analizados de acuerdo a Neugart *et al.* (2014) con pequeñas modificaciones. 10 mg de material liofilizado y molido se extrajeron con 600 µL de metanol 60% a 20°C. Las muestras se mantuvieron en agitación en un plato con agitación por 40 min, posteriormente fueron centrifugadas a 4500 rpm a la misma temperatura por 10 min. Se recolectó el sobrenadante en un tubo Eppendorf. El proceso se repitió dos veces más con 300 µL de metanol al 60% y con agitación por 20 min y luego por 10 min. Los sobrenadantes se combinaron y se evaporaron a sequedad. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis.

Para su análisis, las muestras se resuspendieron en 200 µL de metanol 10%, se centrifugaron en tubos Corning® Costar® Spin-X®. Cada extracción se realizó por duplicado. Las muestras así preparadas, se inyectaron en un equipo HPLC Agilent 1100 series (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Alemania) el cual consistía en un desgasificador, bomba binaria, automuestreador, horno de columnas y detector DAD. Se utilizó una columna Supelco Ascentis® Express F5 (150 mm × 4.6 mm, 5µm, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Alemania). El flujo fue de 0.85 mL/min y la temperatura de la columna fue de 25°C. El volumen de inyección fue de 10 µL. Se utilizaron los siguientes solventes como fase móvil. Fase A fue ácido acético 0.5% y fase B fue 100% acetonitrilo. Los gradientes utilizados para la fase B fueron: 5-12% (0-3 min), 12-25% (3-46 min), 25-90% (46-49.5 min), 90% isocrático (49.5-52 min), 90-5% (52-52.7 min) y 5% isocrático (52.7-59 min). Ácidos hidroxycinámicos y flavonoides glucosilados fueron determinados a 320, 340 y 370 nm de acuerdo a Schmidt *et al.* (2010) por HPLC-DAD-ESI-MSⁿ usando un equipo Agilent 1100 series con un detector de masas de trampa de iones en modo de ionización negativo. Se usó nitrógeno como gas de secado y helio como gas de colisión. El escaneo m/z fue de 200-2000. Se utilizaron ácido clorogénico, luteolina 3-glucósido, isoquercetina y apigenina 3-glucósido como estándares para las curvas de calibración, las cuales se analizaron bajo las mismas condiciones que las muestras.

3.2.10.4 Carotenoides

Se hizo una extracción por tratamiento adicionando a 2 g de muestra fresca 500 µL de etanol con BHT, esta mezcla se calentó en agua a 80°C por 5 min. Posteriormente se adicionaron 10 µL de KOH 80%. Se realizó una posterior adición de hexano y de la parte superior se tomaron 400 µL. Los cuales posteriormente se trataron con flujo de nitrógeno para evaporar el hexano y se conservaron a -20°C hasta su análisis. Las muestras para su inyección en HPLC se resuspendieron en 200 µL de etanol con BHT. Para consultar la extracción de carotenoides paso a paso ver el **APÉNDICE V**.

Las muestras se analizaron en un sistema HPLC/MS (Agilent Serie 1200, 6120 Quadrupole), el cual tiene 1 bomba cuaternaria (G1311A) y detector UV-Vis y automuestreador.

Se utilizó una columna Agilent C18 con partículas de 5 μm de diámetro (Eclipse Plus), 4.6x150 mm. La fase móvil, la cual previo a su uso se filtró al vacío a través de una membrana de 0.2 μm de poro, estuvo compuesta de metanol (A) y acetonitrilo (B) 45:55% variando el flujo: hasta el minuto 14 se tuvo un flujo de 1 mL/min, posteriormente el flujo fue de 2 mL/min. El tiempo de análisis fue de treinta y cinco minutos. La temperatura de la columna fue de 30°C. Se inyectaron 20 μL . La identificación y cuantificación de carotenoides se llevó a cabo mediante la utilización de estándares externos grado HPLC a $\lambda = 290$ y 450 nm. Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon soluciones de los estándares (zeaxantina, luteína, β -criptoxantina, tocoferol, licopeno y β -caroteno) a diferentes concentraciones las cuales se corrieron bajo las mismas condiciones de las muestras.

3.2.10.5 *Análisis no específico de metabolitos*

Para la determinación de metabolitos se extrajeron 10 mg de muestra liofilizada con 1 mL de metanol. La mezcla se dejó sonicar por 18 horas o hasta disolverse completamente. Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se tomaron 950 μL del sobrenadante y se evaporaron con flujo de nitrógeno. Se conservaron a -20°C hasta su análisis. Para su inyección las muestras se derivatizaron con 50 μL del agente derivatizante N,O-Bis (trimetilsililo) trifluoroacetamida (BSTFA). Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases equipado con una columna HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm) y un detector de masas (cuadrupolo Agilent 5975C). La inyección se realizó en el modo splitless a 250°C. La temperatura del cromatógrafo de gases fue programa de la siguiente manera: temperatura inicial de 100°C, posteriormente se incrementó a 310°C a 40°C/minuto y un tiempo de permanencia de 7.5 min. Se utilizó helio como gas de acarreo a un flujo de 1 mL/min. El espectrómetro de masas se operó en modo TIC a 70 eV. La identificación de los compuestos fue confirmada

por los tiempos de retención del ion blanco y la relaciones iones entre el ion blanco y el estándar para cada compuesto.

3.2.11 Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza (ANOVA), con posterior comparación de medias (Tukey), según el caso. Se fijó el nivel de significancia a $p \leq 0.05$. Se llevó a cabo análisis de regresión lineal. El software utilizado para el análisis estadístico fue JMP (Statistical Analysis Systems. 2012. Versión 8.0. Cary, N.C. Statistical Analysis System Institute).

CAPÍTULO 4

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aptitud del suelo para la elaboración del jugo de suelo

La importancia del suelo tiene que ver con que es en esta superficie donde el ser humano puede cultivar y crecer sus alimentos. El suelo es un elemento natural muy complejo que puede presentar muchas variantes dependiendo de la región geográfica, de las transformaciones que el ser humano haya aplicado sobre el mismo, etc. Puede estar compuesto por una sección rocosa o inorgánica para luego estar cubierto por diversas y muy disímiles entre sí capas de otros elementos como arcilla, arena, o el hummus o tierra orgánica donde la vida es posible. Esta última capa es la que suele estar en la parte superior del suelo y donde el desarrollo de diferentes formas de vida es más probable. Se suele denominar suelo franco a las partes superficiales del terreno cuya composición cuantitativa está en proporciones óptimas o muy próximas a ellas (Flores, 2012). Es suelo de elevada productividad agrícola, en virtud de su:

- Textura relativamente suelta -propiciada por la arena-
- Fertilidad -aportada por los limos-
- Adecuada retención de humedad -favorecida por la arcilla

El **Cuadro 6** muestra que el suelo utilizado para la elaboración del jugo de suelo aplicado a las plantas de pimiento era un suelo franco. Este tratamiento se aplicó al sustrato donde crecieron las plantas (fibra de coco) con la finalidad de proporcionar a la planta posibles elementos minerales no identificados que no se suministran mediante la aplicación de soluciones nutritivas y que no están presentes en el sustrato utilizado, pero que se estima pueden desempeñar un rol esencial en el crecimiento y desarrollo de la planta; sin embargo, más adelante se podrá apreciar que la aplicación de este jugo no presentó efectos significativos en las variables evaluadas. En el mismo cuadro se indica la composición del suelo, la cual es, según Casanova (2005), típica de un suelo franco. El suelo franco se considera

apto para la mayoría de las especies de plantas, ya que no se compacta, no se anega, pero tampoco es excesivamente permeable y se considera tiene una buena distribución de nutrientes.

Cuadro 6. Características del suelo utilizado para la obtención de jugo de suelo.

CARACTERÍSTICAS DEL SUELO

SUELO FRANCO

PH: 6.72, NEUTRO

COMPOSICIÓN (%)

Arena: 38.20

Arcilla: 14.52

Limo: 47.28

4.2 Características morfológicas del pimiento morrón

La elicitation de las plantas es un conjunto de técnicas que tiene como finalidad inducir o mejorar la síntesis de metabolitos secundarios de las plantas para asegurar su persistencia supervivencia y competitividad. Muchos de estos productos secundarios tienen uso en la industria farmacéutica y en la producción de tests de diagnóstico, de fragancias, de aditivos alimentarios y de biocidas en general. Los elicitores, como se mencionó anteriormente, son factores químicos o físicos de variado origen, que inducen cambios no sólo en el metabolismo secundario del organismo blanco sino también en el primario. Adicionalmente, los procesos de elicitación también pueden provocar alteraciones en la morfología de la planta. Diversos autores arguyen que la producción de metabolitos secundarios mediante la activación de mecanismos de defensa implica un costo para la planta que impacta en diferentes caracteres morfológicos (Conrath, 2009; Redman *et al.*,

2001; Züst *et al.*, 2011); sin embargo, en el experimento desarrollado, los resultados indican que sólo el T9 difiere significativamente del control en lo que respecta al número de flores. No se encontraron diferencias para las variables de diámetro de tallo, altura de la planta, número de nodos, área foliar y peso de fruto (**Cuadro 7**). Asimismo, no se encontraron diferencias en el número de frutos, cuyo rango en los tratamientos es de 5.222-7.442. El control tuvo en promedio 5.888 frutos. Los tratamientos 7, 1, 15, 6, 16, 13, 2, 8, 18, 17 y 9 presentaron un promedio de frutos abajo del control en tanto que los tratamientos 12, 5, 14, 3, 4, 20, 11 y 10 un número de frutos superior al desplegado por el control. Es de destacarse que el T9 que tuvo el mayor número de flores es el tratamiento que exhibió el menor número de frutos, posiblemente debido a que se presentaron abortos florales. La **Figura 7** muestra una correlación lineal positiva entre la altura de la planta y el número de nodos (R^2 0.87).

Los resultados anteriores concuerdan con lo reportado por Figueroa Pérez *et al.* (2014) para *Mentha piperita* quienes indican que no se encontraron diferencias con el control en las variables de crecimiento evaluadas (crecimiento de hoja y tallo) con la utilización de H_2O_2 y ácido salicílico a concentraciones de 0.05, 0.10 y 0.50 mM y 0.5, 1.0 mM, respectivamente. Sólo el tratamiento 2 mM con ácido salicílico presentó un incremento de aproximadamente 50% en las hojas y de 77% en el tallo. Concentraciones similares de SA (10^{-5} a 10^{-3} M) mejoraron la altura de la planta, número de ramas, nodos, hojas, así como el área foliar en albahaca y mejorana (Gharib, 2006).

Los resultados anteriores sugieren que existe una concentración umbral de los elicitores aplicados, a partir de la cual se presentan diferencias con los tratamientos control, ya sea inhibiendo o favoreciendo el crecimiento de la planta. Las concentraciones utilizadas en coctel de elicitores no permitieron evidenciar diferencias en las variables evaluadas, ya sea porque se estuvo por debajo de la concentración umbral para perturbar significativamente el metabolismo de la planta o bien, la combinación de elicitores pudo detonar varias rutas metabólicas

favoreciendo un efecto concurrente que finalmente no alteró la morfología de la planta.

Cuadro 7. Características morfológicas del pimiento morrón como respuesta a diferentes cocteles de FMMS.

Tratamiento	Diámetro de tallo (cm)	Altura de planta (cm)	Número de flores	Número de nodos	Área foliar (cm ²)	Peso fruto (g)
Control	1.344 ± 0.111 ab	78.000 ± 10.637 ab	8.556 ± 2.893 b	15.667 ± 1.284 ab	151.873 ± 42.002 ab	143.513 ± 31.713 ab
1	1.344 ± 0.206 ab	84.111 ± 7.817 ab	13.000 ± 2.713 ab	16.000 ± 0.903 a	168.111 ± 41.841 ab	149.800 ± 36.329 ab
2	1.267 ± 0.084 ab	73.333 ± 9.836 ab	9.222 ± 3.141 b	14.667 ± 1.040 b	162.598 ± 36.652 ab	130.837 ± 31.688 ab
3	1.278 ± 0.144 ab	73.000 ± 10.650 ab	9.667 ± 4.551 ab	15.000 ± 1.042 ab	178.392 ± 35.329 ab	139.433 ± 39.255 ab
4	1.233 ± 0.046 b	77.222 ± 6.885 ab	11.556 ± 4.626 ab	15.222 ± 0.652 ab	169.668 ± 31.131 ab	135.227 ± 31.013 ab
5	1.244 ± 0.062 b	73.444 ± 7.610 ab	9.556 ± 5.008 ab	15.111 ± 0.611 ab	148.901 ± 21.308 b	133.497 ± 32.150 ab
6	1.267 ± 0.068 ab	72.889 ± 5.201 b	8.889 ± 4.009 b	15.111 ± 0.507 ab	159.168 ± 50.632 ab	155.717 ± 30.733 a
7	1.289 ± 0.052 ab	79.444 ± 7.177 ab	9.778 ± 3.976 ab	15.667 ± 0.663 ab	161.715 ± 37.839 ab	143.453 ± 29.311 ab
8	1.278 ± 0.089 ab	73.000 ± 5.764 ab	10.333 ± 4.081 ab	14.889 ± 0.584 ab	142.150 ± 19.430 b	136.910 ± 33.249 ab
9	1.322 ± 0.074 ab	77.722 ± 5.048 ab	14.667 ± 2.621 a	15.444 ± 0.416 ab	183.142 ± 33.003 ab	143.307 ± 26.108 ab
10	1.256 ± 0.132 b	80.000 ± 6.117 ab	10.111 ± 3.569 ab	15.667 ± 0.657 ab	139.220 ± 30.459 b	148.217 ± 20.000 ab
11	1.422 ± 0.198 a	85.222 ± 12.682 a	10.333 ± 2.833 ab	16.111 ± 1.104 a	209.213 ± 40.754 a	156.753 ± 47.619 a
12	1.278 ± 0.074 ab	73.778 ± 6.023 ab	10.778 ± 3.348 ab	15.000 ± 0.667 ab	157.714 ± 32.626 ab	133.567 ± 38.000 ab
13	1.256 ± 0.066 b	74.889 ± 4.427 ab	11.222 ± 2.790 ab	15.222 ± 0.536 ab	149.611 ± 39.593 b	130.413 ± 31.844 ab
14	1.222 ± 0.081 b	76.778 ± 6.988 ab	8.778 ± 2.588 b	15.444 ± 0.887 ab	153.960 ± 41.269 ab	154.557 ± 31.758 a
15	1.233 ± 0.068 b	81.556 ± 8.305 ab	8.222 ± 1.979 b	15.778 ± 0.782 ab	169.702 ± 35.897 ab	153.967 ± 31.305 a
16	1.222 ± 0.093 b	76.111 ± 4.624 ab	9.778 ± 2.976 ab	15.333 ± 0.550 ab	165.553 ± 20.809 ab	125.246 ± 16.568 b

17	1.233 ± 0.064 ^b	81.556 ± 7.917 ^{ab}	11.333 ± 2.774 ^{ab}	15.778 ± 0.784 ^{ab}	149.529 ± 36.321 ^b	143.717 ± 45.432 ^{ab}
18	1.267 ± 0.064 ^{ab}	72.889 ± 8.804 ^b	9.778 ± 2.810 ^{ab}	15.222 ± 0.975 ^{ab}	157.016 ± 39.244 ^{ab}	139.473 ± 30.048 ^{ab}
20	1.256 ± 0.062 ^b	75.889 ± 3.910 ^{ab}	11.556 ± 2.541 ^{ab}	15.111 ± 0.703 ^{ab}	152.809 ± 37.935 ^{ab}	147.447 ± 32.885 ^{ab}

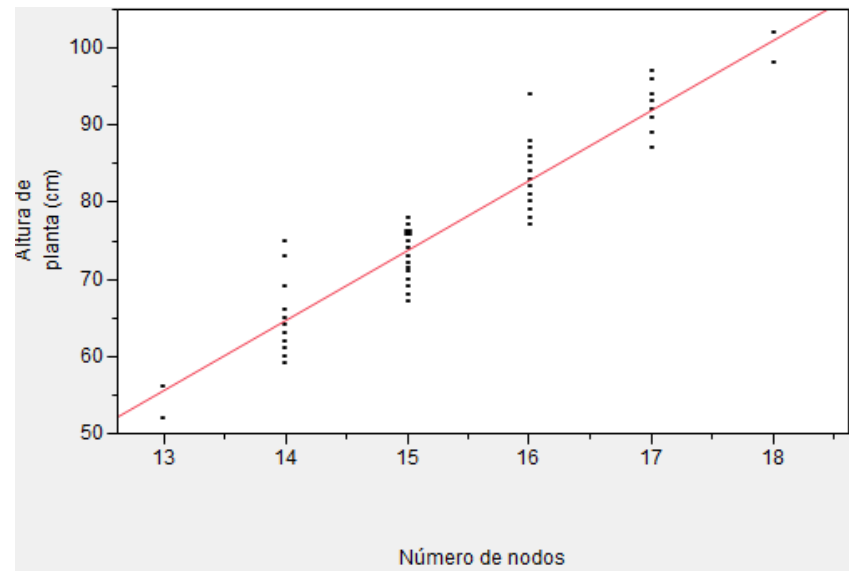


Figura 7. Correlación lineal entre número de nodos y altura de la planta de pimiento morrón.

4.3 Análisis en pimiento fresco

4.3.1 Color

El color es una cualidad organoléptica de los alimentos que se aprecia por medio del sentido físico de la vista. Suele ser considerado como un factor psicológico de aceptación y un criterio para elegir un alimento. En las plantas, el color está determinado principalmente por la presencia de flavonoides, carotenoides y clorofilas.

El atractivo color rojo del chile pimiento es determinado por la presencia de carotenoides. Asimismo, este fruto tiene niveles de moderados a buenos de flavonoides (Deepa *et al.*, 2006). Se midió el color del pimiento mediante las coordenadas L, a* y b*. Los resultados indican que la aplicación de los cocteles de elicitors no incidieron en cambios significativos de color ($p \geq 0.05$), excepto para los tratamientos 16 y 18, que corresponden a tratamientos donde el coctel de elicitors se aplicó en estado inmaduro y maduro, los cuales son significativamente diferentes del control para la variable L. Estos tratamientos tienen un valor menor que el control. T16 difiere del control para la variable b*, tendiendo a tonos verdes. Para la variable a* no hay tratamientos que difieran del control; no obstante, T16 y T18 difieren entre sí. T16 se ubica en los tonos azules mientras que T18 en los amarillos (**Cuadro 8**). Estas características están relacionadas con el estado inmaduro (verde) en el que se asperjaron los elicitors en el T16, lo cual hace que inherentemente el color cambie. Uno de los cambios más evidentes que se producen en la maduración del pimiento, es la transición del color verde de los frutos inmaduros al rojo de los frutos maduros debido a que existe una conversión del cloroplasto en cromoplasto. Con la aplicación de los elicitors, se observaron cambios de coloración en el T16 hacia el tono rojo. Chassy *et al.* (2006) mencionan que el color se relaciona con la madurez, por lo cual suele ser un indicador de madurez. Los valores encontrados para L y a* son similares a los reportados por Zaki *et al.* (2013); no obstante, los valores de b* son menores.

Un número de reportes indican que no hay cambios de color después de la aplicación de elicitores. Cuvi *et al.* (2011) no encontraron diferencias en el color del pimiento después de aplicarles radiación UV-C (10 kJ/m²) y almacenarlos a 0°C. Asimismo, Roussos *et al.* (2009), aunque reportan un incremento en el contenido de antocianinas de las fresas después de la aplicación de estimuladores de crecimiento (extractos de algas, nitrofenolatos y una combinación de ácido giberélico con fenotiol), no encontraron diferencias en ninguna de las variables de color evaluadas (L, a* y b*).

Cuadro 8. Variables de color de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas ± desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra fresca.

Tratamiento	Color					
	L		a		b	
	CV(%)	CV(%)	CV(%)	CV(%)	CV(%)	CV(%)
Control	34.329 ± 0.387 ^a	1.129	28.971 ± 0.441 ^a	1.523	15.511 ± 0.691 ^{ab}	0.045
1	35.063 ± 0.525 ^a	1.497	30.034 ± 1.855 ^a	6.177	16.818 ± 1.414 ^{ab}	0.084
2	34.552 ± 0.254 ^a	0.736	28.357 ± 1.572 ^a	5.542	14.938 ± 1.555 ^{ab}	0.104
3	34.186 ± 0.722 ^a	2.112	27.176 ± 1.695 ^a	6.236	14.085 ± 1.522 ^{ab}	0.108
4	36.492 ± 1.233 ^a	3.378	31.290 ± 0.712 ^a	2.275	17.953 ± 1.946 ^{ab}	0.108
5	34.843 ± 1.380 ^a	3.959	29.784 ± 1.280 ^a	4.297	16.232 ± 1.535 ^{ab}	0.095
6	35.585 ± 1.616 ^a	4.542	27.886 ± 1.956 ^a	7.014	16.072 ± 2.957 ^{ab}	0.184
7	37.463 ± 2.027 ^a	5.412	29.503 ± 2.557 ^a	8.668	18.458 ± 1.666 ^{ab}	0.090
8	33.817 ± 1.589 ^a	4.698	27.937 ± 2.124 ^a	7.601	16.056 ± 3.113 ^{ab}	0.194
9	33.768 ± 0.748 ^a	2.214	28.963 ± 2.613 ^a	9.022	15.729 ± 2.660 ^{ab}	0.169
10	36.234 ± 1.288 ^a	3.553	30.520 ± 1.464 ^a	4.796	17.751 ± 2.787 ^{ab}	0.157
11	34.026 ± 1.685 ^a	4.952	27.628 ± 2.315 ^a	8.378	14.712 ± 2.559 ^{ab}	0.174
12	35.513 ± 0.721 ^a	2.029	28.197 ± 2.652 ^a	9.404	16.380 ± 0.849 ^{ab}	0.052
13	33.949 ± 1.720 ^a	5.067	28.793 ± 0.697 ^a	2.421	15.939 ± 0.229 ^{ab}	0.014
14	35.319 ± 0.577 ^a	1.632	29.457 ± 1.173 ^a	3.984	16.288 ± 0.871 ^{ab}	0.053

15	35.256 ± 1.119 ^a	3.173	29.630 ± 2.632 ^a	8.881	16.527 ± 2.456 ^{ab}	0.149
16	28.815 ± 2.301 ^b	7.984	-7.845 ± 2.249 ^b	-28.66	12.057 ± 4.313 ^b	0.358
17	33.812 ± 2.288 ^a	6.766	29.276 ± 3.215 ^a	10.98	15.961 ± 3.011 ^{ab}	0.189
18	25.374 ± 2.406 ^b	9.482	31.661 ± 1.554 ^a	4.908	20.138 ± 2.651 ^a	0.132
20	35.308 ± 2.481 ^a	7.027	29.933 ± 3.299 ^a	11.02	16.604 ± 3.157 ^{ab}	0.190

4.3.2 Grados Brix y pH

El **Cuadro 9** muestra los resultados de grados Brix y pH del pimiento sometido a diferentes tratamientos de elicitación. Los valores de pH no difieren significativamente del control (4.790) a excepción del T16 (5.340). Los sólidos solubles expresados como grados Brix difieren significativamente del control para el T18 (9.067). Los cambios en los grados Brix para el T18 están en armonía con lo esperado, ya que las frutas conforme van madurando incrementan su contenido de azúcar, lo cual se traduce en un aumento de los grados Brix (Niklis *et al.*, 2002). Este tratamiento, al asperjarse el coctel de FMM en postcosecha, tuvo oportunidad de presentar una sobre maduración, aunque no se descarta que el resultado se pueda deber a un efecto de concentración de solutos debido a un menor contenido de agua como lo expresa Stefanelli *et al.* (2010); sin embargo, estos autores también comentan que algunos incrementos en esta variable no se explican sólo por un efecto de concentración sino a un mecanismo fisiológico. Asimismo, es predecible que existan diferencias en el pH entre un pimiento verde y rojo. Lo que llama la atención es que el pH en lugar de presentar un valor menor que el rojo, exhibe un valor mayor, lo cual posiblemente se deba a que algunos ácidos como el ascórbico aumentan con la maduración del chile (Navarro *et al.*, 2006). Alexandre *et al.* (2012) no detectaron cambios en el pH del pimiento morrón, berros y fresas tratadas H₂O₂ 1 y 5%. Diversos estudios mencionan que no hay diferencias en el contenido de sólidos después de la aplicación de elicitors. Por ejemplo, Fallik *et al.* (1994) indican que el tratamiento de uvas con peróxido de hidrógeno disminuye la incidencia de *Botrytis cinerea* en uva, pero no afecta el contenido de sólidos solubles. Asimismo, Roussos *et al.* (2009) mencionan que la aplicación de

estimuladores de crecimiento no impacta la cantidad de sólidos solubles. En el mismo sentido, Moretti *et al.* (2010) mencionan que el pérsimo tratado con ozono no presentó diferencias significativas con el control en el contenido de sólidos solubles, pH y color. Bautista-Baños *et al.* (2003) no encuentran diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles en papayas tratadas con quitosán 0.5 y 1.5%. Contrastando con esto se encuentra lo expuesto por Boonlertnirun *et al.* (2010), que reportan un incremento de la concentración de azúcares en plántulas de maíz después de la aplicación de quitosán.

Cuadro 9. pH y grados Brix de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra fresca.

Tratamiento	pH		°Brix	
	Media \pm DE	CV(%)	Media \pm DE	CV(%)
Control	4.790 \pm 0.020 ^b	0.418	5.600 \pm 0.170 ^b	3.0397
1	4.797 \pm 0.018 ^b	0.383	5.500 \pm 0.794 ^b	14.437
2	4.830 \pm 0.049 ^b	1.016	5.167 \pm 0.644 ^b	12.466
3	4.803 \pm 0.080 ^b	1.671	5.633 \pm 0.709 ^b	12.581
4	4.890 \pm 0.156 ^b	3.181	6.267 \pm 1.108 ^b	17.675
5	4.830 \pm 0.014 ^b	0.290	6.133 \pm 1.099 ^b	17.911
6	4.793 \pm 0.008 ^b	0.170	4.533 \pm 0.585 ^b	12.897
7	4.830 \pm 0.023 ^b	0.482	5.467 \pm 0.607 ^b	11.109
8	5.020 \pm 0.269 ^b	5.353	6.167 \pm 0.783 ^b	12.689
9	4.847 \pm 0.052 ^b	1.083	4.433 \pm 0.247 ^b	5.5623
10	4.790 \pm 0.024 ^b	0.505	5.867 \pm 0.943 ^b	16.07
11	4.820 \pm 0.007 ^b	0.148	6.100 \pm 1.158 ^b	18.977
12	4.843 \pm 0.024 ^b	0.498	4.867 \pm 0.518 ^b	10.634
13	4.840 \pm 0.051 ^b	1.054	5.500 \pm 1.545 ^b	28.091
14	4.847 \pm 0.031 ^b	0.647	5.700 \pm 0.669 ^b	11.736
15	4.800 \pm 0.027 ^b	0.563	5.100 \pm 0.378 ^b	7.4141

16	5.340 ± 0.083 ^a	1.555	5.767 ± 0.912 ^b	15.82
17	4.813 ± 0.016 ^b	0.332	6.000 ± 1.310 ^b	21.826
18	4.850 ± 0.034 ^b	0.692	9.067 ± 0.364 ^a	4.0194
20	4.810 ± 0.027 ^b	0.568	4.933 ± 0.914 ^b	18.532

4.3.3 Análisis proximal

La composición de los chiles analizados en este estudio (**Cuadro 10**) es similar a la reportada en otros estudios (Guil-Guerrero *et al.*, 2006). El contenido de humedad y proteínas no difiere del control para ninguno de los tratamientos ($p \geq 0.05$). El rango de humedad es de 89.955-93.340%. El T15 en el cual el coctel de elicitors fue aplicado a toda la planta es el que presenta el menor contenido de humedad. El rango determinado de proteínas está entre 1.085-1.410%. Los valores para esta variable son ligeramente superiores a los reportados por Guil-Guerrero *et al.* (2006).

El contenido de lípidos en los tratamientos 2, 10, 11, 13, 14 y 20 difiere del control (~0.415%) ($p \leq 0.05$). Posiblemente esto se deba a que el ácido jasmónico induce la formación de más ácido jasmónico (Zhang y Memelink, 2009), el cual utiliza como precursor el ácido linoleico y en consecuencia disminuya la cuantificación de lípidos. Es notable mencionar que las cenizas, que corresponden al contenido de minerales, difieren del control únicamente para el T16 que fue cosechado en verde y cuyo tratamiento se aplicó en ese estadio. Este resultado concuerda con lo expuesto por Pérez-López *et al.* (2007) que encontraron una mayor concentración de minerales en el pimiento en estado verde, pero que indican que usualmente se reporta lo contrario, concluyendo que la concentración de minerales es altamente dependiente del estado de maduración del pimiento y de las prácticas agrícolas utilizadas en su producción (orgánica, convencional y orgánica). Finalmente, ninguno de los tratamientos difieren del control para el contenido de fibra cuya presencia en el pimiento se encontró en el rango de 1.210-1.520%.

Cuadro 10. Contenido de humedad, proteínas, lípidos, cenizas y fibra de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas±desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra fresca.

Tratamiento	Humedad (%)			Proteínas (%)			Lípidos (%)			Cenizas (%)			Fibra (%)							
	Media	±	CV(%)	Media	±	CV(%)	Media	±	CV(%)	Media	±	CV(%)	Media	±	CV(%)					
Control	91.973	± 0.482	abc	0.524	1.263	± 0.094	abc	7.457	0.415	± 0.061	a	14.817	0.688	± 0.059	a	8.647	1.243	± 0.078	a	6.268
1	91.728	± 0.186	abc	0.203	1.270	± 0.046	abc	3.597	0.333	± 0.024	abc	7.241	0.553	± 0.028	ab	5.144	1.353	± 0.064	a	4.699
2	91.530	± 0.568	abc	0.621	1.325	± 0.026	ab	1.992	0.245	± 0.052	bc	21.422	0.563	± 0.057	ab	10.134	1.258	± 0.087	a	6.886
3	90.710	± 0.319	abc	0.352	1.350	± 0.092	ab	6.824	0.293	± 0.035	abc	11.940	0.570	± 0.035	ab	6.182	1.280	± 0.064	a	5.028
4	91.138	± 0.544	abc	0.596	1.325	± 0.033	ab	2.511	0.293	± 0.026	abc	8.781	0.565	± 0.100	ab	17.612	1.520	± 0.477	a	31.395
5	91.078	± 0.583	abc	0.641	1.233	± 0.158	abc	12.781	0.285	± 0.096	abc	33.572	0.660	± 0.078	a	11.808	1.293	± 0.128	a	9.868
6	91.848	± 0.742	abc	0.808	1.328	± 0.079	ab	5.962	0.310	± 0.042	abc	13.435	0.555	± 0.061	ab	11.081	1.510	± 0.110	a	7.256
7	91.410	± 0.567	abc	0.620	1.325	± 0.126	ab	9.496	0.293	± 0.037	abc	12.637	0.670	± 0.061	a	9.069	1.368	± 0.117	a	8.586
8	91.540	± 0.563	abc	0.616	1.245	± 0.058	abc	4.663	0.365	± 0.060	abc	16.335	0.588	± 0.082	ab	13.994	1.265	± 0.184	a	14.557
9	91.295	± 0.526	abc	0.576	1.223	± 0.051	abc	4.136	0.310	± 0.060	abc	19.287	0.588	± 0.048	ab	8.180	1.308	± 0.132	a	10.128
10	91.475	± 0.908	abc	0.993	1.233	± 0.084	abc	6.830	0.245	± 0.046	bc	18.651	0.613	± 0.084	ab	13.747	1.423	± 0.174	a	12.262
11	92.715	± 1.610	ab	1.736	1.085	± 0.097	c	8.967	0.238	± 0.058	c	24.430	0.625	± 0.103	ab	16.536	1.280	± 0.064	a	5.034
12	93.340	± 1.874	a	2.008	1.155	± 0.161	bc	13.919	0.388	± 0.042	ab	10.764	0.560	± 0.027	ab	4.787	1.210	± 0.098	a	8.059
13	92.255	± 0.421	abc	0.457	1.318	± 0.071	ab	5.396	0.263	± 0.070	bc	26.774	0.568	± 0.178	ab	31.410	1.513	± 0.240	a	15.898
14	91.375	± 0.789	abc	0.863	1.410	± 0.094	a	6.668	0.253	± 0.027	bc	10.771	0.585	± 0.045	ab	7.737	1.490	± 0.064	a	4.319
15	89.955	± 2.170	c	2.413	1.315	± 0.052	abc	3.932	0.308	± 0.053	abc	17.146	0.608	± 0.045	ab	7.357	1.448	± 0.182	a	12.591

16	93.318	± 0.943	^{ab}	1.010	1.253	± 0.076	^{abc}	6.067	0.290	± 0.025	^{abc}	8.549	0.445	± 0.087	^b	19.526	1.335	± 0.083	^a	6.185
17	92.363	± 1.206	^{abc}	1.306	1.295	± 0.073	^{abc}	5.668	0.348	± 0.079	^{abc}	22.622	0.538	± 0.046	^{ab}	8.585	1.368	± 0.097	^a	7.097
18	91.668	± 1.613	^{abc}	1.760	1.155	± 0.091	^{bc}	7.908	0.340	± 0.046	^{abc}	13.504	0.698	± 0.097	^a	13.922	1.410	± 0.145	^a	10.313
20	90.678	± 0.106	^{bc}	0.117	1.278	± 0.034	^{abc}	2.658	0.260	± 0.082	^{bc}	31.688	0.553	± 0.041	^{ab}	7.395	1.358	± 0.136	^a	10.053

4.4 Metabolitos-pimiento fresco

4.4.1 Flavonoides, taninos y fenoles

Las determinaciones de flavonoides y taninos que se realizaron en el pericarpio del pimiento exhiben diferencias con el control para los tratamientos 16 y 18. El contenido de fenoles se presenta en menor proporción en el T16 que difiere significativamente del control (**Cuadro 11**).

Las prácticas de agricultura intensiva se han enfocado en aumentar el rendimiento y la calidad de los cultivos. Sin embargo, en años recientes se ha mostrado interés no sólo en aumentar las dos variables anteriores sino en hacer más eficientes las prácticas agrícolas usando invernaderos con un óptimo control de la irrigación, fertilización, temperatura, control de plagas, iluminación, etc., con la intención de provocar un estrés controlado en orden de aumentar la producción de metabolitos secundarios en los cultivos.

Los resultados de esta investigación sugieren que la aplicación de cocteles de elicitors que simulan condiciones de estrés aumentan el contenido de polifenoles, metabolitos secundarios. No obstante, el mayor incremento se presenta en los pimientos maduros tratados en postcosecha.

El pimiento verde presenta el menor contenido de estos compuestos, lo cual era esperado, ya que son distintos los reportes que indican que los compuestos fenólicos aumentan con la maduración del fruto. Por ejemplo, Serrano *et al.* (2010) manifiestan que el contenido de compuestos fenólicos se acumula a lo largo de la maduración del pimiento y que la aplicación de nitrofenolatos aumenta la producción de estos compuestos. Howard *et al.* (2000) indican un aumento de los fenoles con la maduración en la mayoría de las variedades de Chile; sin embargo, Marín *et al.* (2004) encuentran el comportamiento contrario.

Aunque la aplicación del coctel de elicitores pudo haber detonado la producción de dichos compuestos, ésta no estuvo por encima del control en el pimiento verde, las diferencias significativas para este tratamiento se considera son inherentes al estado de maduración. Se sugiere realizar un futuro estudio teniendo un control de pimiento verde. Asimismo, es conveniente evaluar otras concentraciones de FMM, pues como indican Glowacz *et al.* (2015) en su estudio del efecto de la aplicación de ozono en pimiento morrón, se presenta un incremento con el control en el contenido de fenoles al aplicar concentraciones de 0.1 $\mu\text{mol/mol}$ pero no hay cambios en concentraciones de 0.3 $\mu\text{mol/mol}$. Lo anterior sugiere un efecto de la concentración de los elicitores en la incremento, decremento o no efecto en estos metabolitos.

El interés de la cuantificación de compuestos fenólicos en los alimentos radica en que ayudan en la prevención o tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas (Manach *et al.*, 2004). El contenido de fenoles determinado por el método de Folin-Ciocalteu y flavonoides para pimiento morrón maduro en estado fresco reportado por Howard *et al.* (2000) es de 2846 mg/kg y 23.15 mg/kg, respectivamente. Deepa *et al.* (2007) reportan valores de fenoles en el rango de 12.5-66.25 mg/100 g de materia fresca. Estos resultados son considerablemente superiores a los encontrados en este estudio para los fenoles, lo cual se asume es por diferencias en el genotipo, condiciones de cultivo y ambiente, e incluso por la parte del fruto utilizado (se incluyen o no las semillas). Las semillas de varios frutos

se ha encontrado contribuyen significante en la cuantificación de compuestos fenólicos (Velioglu *et al.*, 1998).

Es interesante que el tratamiento en postcosecha presentó los mejores resultados de compuestos fenólicos. Se hipotetiza que cuando la aplicación se realiza de manera focalizada en el fruto, debido a que ya no hay la posibilidad de que los compuestos se trasloquen a otras partes de la planta (Baltazar y Monaco, 1984), se genera un aumento sustancial (58.12%) en el contenido de estos compuestos en la parte comestible. La **Figura 8** indica que existe una correlación lineal positiva entre el contenido de taninos y los flavonoides (R^2 0.84). La ecuación encontrada es $\text{Taninos (mg/g)} = -1.597706 + 0.0248117 * \text{Flavonoides (microgramos/g)}$.

Cuadro 11. Flavonoides, taninos y fenoles totales medidos a diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón. Los valores son la media de tres réplicas \pm desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra fresca.

Tratamiento	Flavonoides ($\mu\text{g eq. de rutina/g}$)		Taninos (mg eq. de catequina/g)		Fenoles (mg eq. de ácido gálico/g)	
	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)
Control	278.991 \pm 34.664 ^b	12.425	5.051 \pm 0.534 ^b	10.576	0.011 \pm 0.002 ^{ab}	15.048
1	239.785 \pm 13.397 ^b	5.587	4.498 \pm 0.322 ^b	7.1693	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	6.538
2	274.127 \pm 24.259 ^b	8.850	4.880 \pm 0.499 ^b	10.218	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	10.013
3	248.118 \pm 49.632 ^b	20.004	4.878 \pm 0.896 ^b	18.372	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	16.335
4	236.434 \pm 21.777 ^b	9.211	4.590 \pm 0.488 ^b	10.621	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	15.969
5	244.531 \pm 39.105 ^b	15.992	4.543 \pm 0.705 ^b	15.527	0.009 \pm 0.000 ^{bc}	4.426
6	235.729 \pm 36.792 ^b	15.608	4.597 \pm 0.567 ^b	12.335	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	12.374
7	217.551 \pm 15.527 ^{bc}	7.137	4.314 \pm 0.427 ^b	9.9088	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	11.238
8	276.574 \pm 28.588 ^b	10.336	5.155 \pm 0.516 ^b	10.009	0.010 \pm 0.001 ^{bc}	8.086
9	237.797 \pm 13.625 ^b	5.730	4.373 \pm 0.321 ^b	7.332	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	10.744
10	252.300 \pm 39.442 ^b	15.633	4.692 \pm 0.884 ^b	18.83	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	15.532
11	220.273 \pm 16.834 ^{bc}	7.642	4.223 \pm 0.251 ^b	5.9394	0.009 \pm 0.001 ^{bc}	14.692

12	234.920 ± 48.894 ^{bc}	20.813	4.576 ± 0.949 ^b	20.745	0.009 ± 0.002 ^{bc}	18.975
13	238.286 ± 26.945 ^b	11.308	4.513 ± 0.589 ^b	13.044	0.008 ± 0.002 ^{bc}	19.596
14	257.375 ± 22.223 ^b	8.635	4.804 ± 0.469 ^b	9.7667	0.010 ± 0.002 ^{bc}	18.531
15	244.593 ± 25.680 ^b	10.499	4.597 ± 0.740 ^b	16.091	0.010 ± 0.001 ^{bc}	5.420
16	168.809 ± 13.809 ^c	8.180	0.471 ± 0.310 ^c	65.898	0.007 ± 0.001 ^c	14.402
17	243.388 ± 31.363 ^b	12.886	4.369 ± 0.894 ^b	20.468	0.010 ± 0.001 ^{bc}	15.087
18	441.139 ± 51.272 ^a	11.623	9.320 ± 1.305 ^a	14.006	0.013 ± 0.002 ^a	11.811
20	225.541 ± 24.408 ^{bc}	10.822	4.062 ± 0.709 ^b	17.444	0.010 ± 0.002 ^{bc}	16.609

eq.: equivalentes

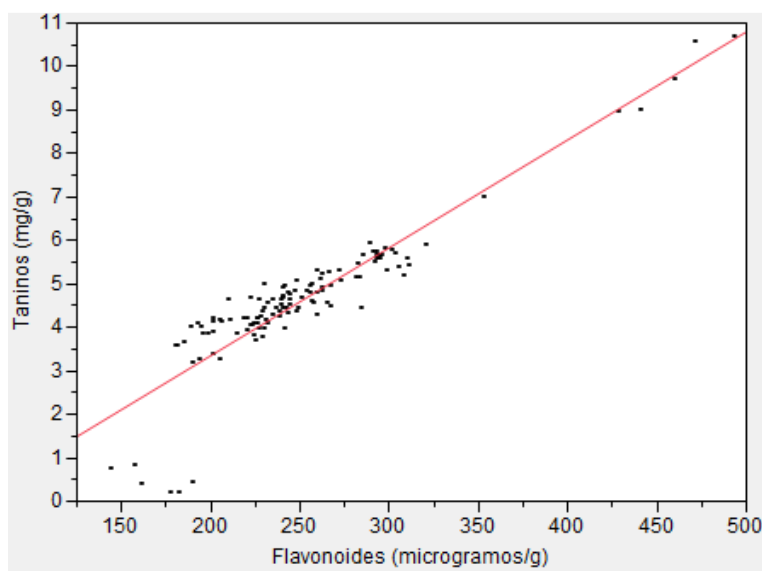


Figura 8. Correlación lineal entre cantidad de taninos y flavonoides del pimiento fresco.

El **Cuadro 12**, **Cuadro 13** y **Cuadro 14** indican el perfil de flavonoides determinados en los pimientos elicitados. En estos cuadros se puede apreciar que el pimiento posee tanto ácidos fenólicos como flavonoides glucosilados.

Los resultados concuerdan parcialmente con los expuestos por Marín *et al.* (2004) ya que también en el presente estudio se determinaron glucósidos de quercetina y luteolina; sin embargo, están ausentes algunos compuestos que se

Cuadro 12. Perfil de flavonoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón_parte 1. Los valores son la media de dos réplicas±desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra seca liofilizada.

Tratamiento	Glucósido de ácido ferúlico (mg/g)		Glucósido de ácido sinápico (mg/g)		Derivado de un ácido fenólico (mg/g)		Derivado de ácido sinápico (mg/g)		Derivado de ácido sinápico (mg/g)	
	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)
Control	0.080 ± 0.002 ^{abcd}	2.282	0.070 ± 0.004 ^{abc}	5.099	0.049 ± 0.001 ^b	1.964	0.051 ± 0.002 ^a	3.189	0.052 ± 0.001 ^{ab}	1.942
1	0.083 ± 0.003 ^{abcd}	3.135	0.068 ± 0.002 ^{abc}	3.205	0.050 ± 0.001 ^{ab}	2.000	0.053 ± 0.001 ^a	1.174	0.051 ± 0.001 ^{ab}	1.140
2	0.089 ± 0.008 ^{abcd}	9.058	0.067 ± 0.001 ^{abc}	2.189	0.050 ± 0.001 ^{ab}	1.633	0.052 ± 0.001 ^a	1.482	0.051 ± 0.001 ^{ab}	1.601
3	0.095 ± 0.015 ^{ab}	16.142	0.067 ± 0.001 ^{abc}	1.357	0.051 ± 0.001 ^{ab}	2.556	0.053 ± 0.001 ^a	1.959	0.052 ± 0.001 ^{ab}	1.942
4	0.077 ± 0.001 ^{cd}	1.208	0.063 ± 0.002 ^{bc}	2.632	0.049 ± 0.001 ^b	1.026	0.053 ± 0.001 ^a	2.347	0.051 ± 0.001 ^{ab}	1.868
5	0.080 ± 0.006 ^{abcd}	7.932	0.067 ± 0.003 ^{abc}	3.916	0.050 ± 0.001 ^{ab}	2.020	0.054 ± 0.001 ^a	1.669	0.052 ± 0.001 ^{ab}	1.570
6	0.078 ± 0.002 ^{cd}	2.421	0.061 ± 0.002 ^{bc}	3.223	0.049 ± 0.001 ^{ab}	1.458	0.053 ± 0.001 ^a	1.852	0.051 ± 0.001 ^{ab}	1.868
7	0.086 ± 0.003 ^{abcd}	3.567	0.066 ± 0.002 ^{abc}	3.567	0.050 ± 0.001 ^{ab}	1.924	0.053 ± 0.001 ^a	1.454	0.052 ± 0.001 ^{ab}	1.570
8	0.085 ± 0.004 ^{abcd}	4.571	0.070 ± 0.005 ^{abc}	6.702	0.052 ± 0.002 ^a	3.300	0.051 ± 0.001 ^a	1.335	0.052 ± 0.001 ^{ab}	1.570
9	0.082 ± 0.001 ^{abcd}	1.131	0.069 ± 0.001 ^{abc}	0.936	0.051 ± 0.001 ^{ab}	2.556	0.053 ± 0.001 ^a	1.852	0.053 ± 0.001 ^a	1.100
10	0.085 ± 0.004 ^{abcd}	5.093	0.073 ± 0.009 ^{ab}	12.598	0.051 ± 0.001 ^{ab}	2.773	0.051 ± 0.001 ^a	1.787	0.052 ± 0.001 ^{ab}	0.957
11	0.081 ± 0.001 ^{abcd}	1.527	0.065 ± 0.000 ^{bc}	0.626	0.049 ± 0.001 ^{ab}	1.170	0.053 ± 0.000 ^a	0.779	0.051 ± 0.001 ^{ab}	1.980

12	0.095 ± 0.007 ^a	7.584	0.071 ± 0.008 ^{ab}	10.624	0.049 ± 0.001 ^{ab}	1.170	0.052 ± 0.001 ^a	1.997	0.049 ± 0.001 ^b	2.041
13	0.082 ± 0.008 ^{abcd}	9.211	0.068 ± 0.003 ^{abc}	4.131	0.049 ± 0.002 ^{ab}	3.333	0.053 ± 0.002 ^a	4.244	0.050 ± 0.002 ^{ab}	3.015
14	0.091 ± 0.007 ^{abc}	8.190	0.077 ± 0.011 ^a	13.771	0.049 ± 0.002 ^{ab}	4.082	0.053 ± 0.001 ^a	2.347	0.051 ± 0.002 ^{ab}	4.236
15	0.080 ± 0.002 ^{abcd}	2.408	0.067 ± 0.004 ^{abc}	5.327	0.050 ± 0.001 ^{ab}	2.020	0.053 ± 0.002 ^a	4.135	0.051 ± 0.001 ^{ab}	1.887
16	0.076 ± 0.006 ^d	8.427	0.059 ± 0.006 ^c	10.236	0.049 ± 0.001 ^b	1.964	0.052 ± 0.003 ^a	5.718	0.050 ± 0.003 ^{ab}	5.292
17	0.081 ± 0.003 ^{abcd}	4.251	0.070 ± 0.002 ^{abc}	2.787	0.050 ± 0.001 ^{ab}	1.162	0.052 ± 0.001 ^a	1.888	0.052 ± 0.001 ^{ab}	2.720
18	0.083 ± 0.006 ^{abcd}	7.236	0.071 ± 0.004 ^{ab}	5.286	0.049 ± 0.001 ^{ab}	1.015	0.053 ± 0.001 ^a	1.512	0.052 ± 0.001 ^{ab}	1.850
20	0.076 ± 0.002 ^d	2.418	0.066 ± 0.004 ^{abc}	6.669	0.050 ± 0.001 ^{ab}	1.924	0.052 ± 0.001 ^a	2.165	0.050 ± 0.001 ^{ab}	1.905

Cuadro 13. Perfil de flavonoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón_parte 2.

Los valores son la media de dos réplicas ± desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra seca liofilizada.

Tratamiento	Derivado de ácido hidroxiferúlico (mg/g)	Derivado de ácido fenólico (mg/g)	Apigenina-6-C-pentósido-8-C-hexósido (mg/g)	Apigenina-6-C-hexósido-8-C-pentósido (mg/g)	Luteolina 7-O-(2-apiosil-6-malonil) glucósido (mg/g)
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
Control	nd	0.062 ± 0.001 ^{abc}	2.099	nd	0.009 ± 0.000 ^a
1	nd	0.058 ± 0.002 ^{bcd}	3.539	0.005 ± 0.002 ^a	15.714
2	nd	0.057 ± 0.001 ^{bcd}	1.022	nc	60.609

3	0.049 ± 0.001 ^a	2.357	0.060 ± 0.001 ^{abcd}	2.170	nc	nc	0.008 ± 0.000 ^a	0.902		
4	nd		0.058 ± 0.002 ^{bcd}	3.840	0.012 ± 0.003 ^a	25.000	0.005 ± 0.003 ^a	57.282	0.008 ± 0.000 ^a	0.902
5	nd		0.061 ± 0.001 ^{abcd}	1.653	0.007 ± 0.005 ^a	67.755	0.008 ± 0.003 ^a	39.848	0.009 ± 0.001 ^a	5.943
6	0.050 ± 0.001 ^a	2.325	0.059 ± 0.002 ^{abcd}	3.988	0.007 ± 0.004 ^a	53.272	0.005 ± 0.003 ^a	57.282	0.009 ± 0.001 ^a	13.632
7	nd		0.063 ± 0.001 ^{ab}	1.833	0.010 ± 0.001 ^a	14.142	nc	0.008 ± 0.001 ^a	6.604	
8	nd		0.065 ± 0.001 ^a	0.766	0.008 ± 0.004 ^a	54.962	0.008 ± 0.003 ^a	39.848	0.009 ± 0.000 ^a	0.802
9	nd		0.062 ± 0.002 ^{abc}	2.634	0.006 ± 0.003 ^a	54.545	0.012 ± 0.006 ^a	48.739	0.009 ± 0.000 ^a	0.802
10	nc		0.062 ± 0.003 ^{abc}	4.797	0.008 ± 0.002 ^a	25.000	nd	0.009 ± 0.000 ^a	0.802	
11	nd		0.059 ± 0.002 ^{abcd}	3.222	nd	nc	0.008 ± 0.000 ^a	0.902		
12	nd		0.059 ± 0.003 ^{abcd}	5.706	nd	0.013 ± 0.003 ^a	21.757	0.009 ± 0.001 ^a	13.632	
13	nc		0.056 ± 0.006 ^{cd}	10.505	0.005 ± 0.003 ^a	52.915	nc	0.009 ± 0.001 ^a	6.845	
14	nd		0.060 ± 0.003 ^{abcd}	5.225	0.013 ± 0.000 ^a	0.000	0.010 ± 0.004 ^a	39.111	0.009 ± 0.001 ^a	13.079
15	nd		0.062 ± 0.002 ^{abc}	2.794	0.013 ± 0.004 ^a	28.284	nc	0.009 ± 0.000 ^a	5.281	
16	0.049 ± 0.001 ^a	2.357	0.055 ± 0.003 ^d	5.246	0.011 ± 0.004 ^a	38.569	0.014 ± 0.012 ^a	89.416	0.009 ± 0.001 ^a	15.066
17	nd		0.061 ± 0.002 ^{abcd}	4.016	0.006 ± 0.003 ^a	54.545	nc	0.009 ± 0.000 ^a	4.996	
18	nd		0.061 ± 0.004 ^{abcd}	5.916	nc	nc	0.009 ± 0.000 ^a	0.802		
20	nc		0.058 ± 0.002 ^{bcd}	2.957	nc	0.012 ± 0.001 ^a	6.149	0.008 ± 0.000 ^a	0.902	

Cuadro 14. Perfil de flavonoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón_parte 3. Los valores son la media de dos réplicas±desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra seca liofilizada.

Tratamiento	Quercitina-3-O-ramnósido-7-O-glucósido (mg/g)			Isoramnetina-3-ramnosido-7-glucósido (mg/g)			Quercetina-3-ramnósido-glucósido (rutina) (mg/g)			Quercetina 3-O-ramnósido (mg/g)		
	Media	Desviación	CV (%)	Media	Desviación	CV (%)	Media	Desviación	CV (%)	Media	Desviación	CV (%)
Control	0.025 ±	0.003 ^{bc}	10.785	0.022 ±	0.001 ^a	2.628	nd			0.027 ±	0.001 ^a	4.872
1	0.030 ±	0.003 ^{abc}	9.815	0.022 ±	0.003 ^a	12.682	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.030 ±	0.001 ^a	3.390
2	0.031 ±	0.003 ^{abc}	9.838	0.022 ±	0.002 ^a	11.088	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.026 ±	0.005 ^a	19.345
3	0.027 ±	0.002 ^{abc}	9.019	0.023 ±	0.001 ^a	5.941	0.021 ±	0.002 ^a	9.524	0.024 ±	0.004 ^a	14.737
4	0.024 ±	0.002 ^c	6.843	0.023 ±	0.000 ^a	1.884	0.019 ±	0.000 ^a	0.000	0.027 ±	0.002 ^a	6.048
5	0.027 ±	0.002 ^{abc}	8.320	0.023 ±	0.001 ^a	4.319	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.030 ±	0.002 ^a	5.741
6	0.025 ±	0.001 ^{bc}	4.829	0.023 ±	0.000 ^a	1.989	0.020 ±	0.001 ^a	2.961	0.028 ±	0.008 ^a	29.669
7	0.027 ±	0.004 ^{abc}	13.275	0.023 ±	0.001 ^a	3.176	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.023 ±	0.004 ^a	16.612
8	0.034 ±	0.004 ^{abc}	10.714	0.025 ±	0.001 ^a	5.557	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.033 ±	0.002 ^a	5.329
9	0.030 ±	0.007 ^{abc}	21.689	0.024 ±	0.002 ^a	6.972	0.020 ±	0.000 ^a	0.000	0.032 ±	0.005 ^a	15.078
10	0.035 ±	0.007 ^{ab}	20.285	0.025 ±	0.001 ^a	2.362	0.021 ±	0.002 ^a	9.524	0.030 ±	0.007 ^a	24.191
11	0.025 ±	0.001 ^{bc}	2.321	0.024 ±	0.001 ^a	5.005	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.026 ±	0.002 ^a	8.309

12	0.030 ±	0.003 ^{abc}	10.899	0.022 ±	0.001 ^a	3.320	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.028 ±	0.005 ^a	17.746
13	0.025 ±	0.001 ^c	3.170	0.023 ±	0.003 ^a	13.184	0.020 ±	0.001 ^a	2.961	0.027 ±	0.002 ^a	6.536
14	0.025 ±	0.002 ^{bc}	9.298	0.023 ±	0.001 ^a	3.970	0.020 ±	0.001 ^a	2.961	0.030 ±	0.002 ^a	5.871
15	0.036 ±	0.005 ^a	12.848	0.024 ±	0.002 ^a	6.735	0.020 ±	0.001 ^a	2.532	0.029 ±	0.005 ^a	18.887
16	0.026 ±	0.003 ^{bc}	11.679	0.022 ±	0.001 ^a	6.691	0.019 ±	0.001 ^a	2.597	0.032 ±	0.004 ^a	12.758
17	0.028 ±	0.003 ^{abc}	9.153	0.023 ±	0.001 ^a	5.052	0.020 ±	0.000 ^a	0.000	0.029 ±	0.002 ^a	8.219
18	0.035 ±	0.006 ^{ab}	17.509	0.022 ±	0.002 ^a	10.909	0.020 ±	0.001 ^a	3.626	0.028 ±	0.001 ^a	3.571
20	0.027 ±	0.005 ^{abc}	19.079	0.023 ±	0.001 ^a	3.176		nd		0.028 ±	0.001 ^a	2.099

determinaron en el estudio anterior como el ácido cafeico. Es de destacarse que los compuestos que se presentan en mayor proporción son los ácidos fenólicos comparados con los flavonoides. Son pocas las diferencias que se distinguen en el perfil de flavonoides debido a los tratamientos de elicitación. En general los valores son muy similares para los compuestos determinados. Asimismo llama la atención que el ácido hidroxferúlico y la apigenina-6-C-pentósido-8-C-hexósido no fueron detectadas en todos los tratamientos. Finalmente, el tratamiento 16 presenta para algunos de los flavonoides indicados los menores valores, esto contrasta con lo expuesto con Marín *et al.* (2004) pero coincide con lo expuesto por otros autores mencionados previamente.

4.4.2 Actividad antioxidante-DPPH y ABTS

Los efectos benéficos para la salud de varios de los metabolitos encontrados en el Chile se deben en gran medida a su actividad antioxidante entendida, en este contexto, como la capacidad para atrapar radicales libres. De lo anterior, deriva la importancia de cuantificar la actividad antioxidante en los alimentos. Hay diferentes métodos para medir la actividad antioxidante de un alimento (Moon y Shibamoto, 2009). En esta investigación se utilizaron dos métodos que se basan en la capacidad atrapadora de radicales libres: DPPH y ABTS. El primero de ellos muy utilizado por su sencilla realización y alta sensibilidad y el segundo, por ser aplicable a fases tanto hidrofílicas como lipofílicas. Los pimientos contienen compuestos antioxidantes tanto hidrofílicos (ácido ascórbico y polifenoles) como lipofílicos (carotenoides). Ninguno de los tratamientos muestra diferencias significativas con el control por el método de ABTS (**Cuadro 15**). Tampoco se presentan diferencias con el control utilizando el método de DPPH; sin embargo, con esta prueba sí se distinguen diferencias entre el T16 (2.718 μ moles eq. de Trolox/g) y T18 (5.473 μ moles eq. de Trolox/g) ($p \leq 0.05$), ya que el T16 es el que tiene la menor actividad antioxidante y el T18 la mayor. El control queda en medio de estos tratamientos y, aunque estadísticamente no son diferentes, no se descarta que los resultados tengan implicaciones biológicas. Los valores de actividad antioxidante encontrados son mayores a los reportados por Sun *et al.* (2007), 2.1 ± 0.6 y 3.9 ± 1.0 μ moles eq. de Trolox/g, para pimiento verde y rojo, respectivamente.

De acuerdo a Deepa *et al.* (2007) la actividad antioxidante del pimiento morrón se incrementa con la maduración en la mayoría de los genotipos, por lo cual se sugiere consumir el producto en su estado maduro, en este caso rojo. El estudio sobre actividad antioxidante y antiproliferativa de diversos vegetales llevado a cabo por Chu *et al.* (2002) revela que el Chile rojo es el vegetal que presenta la mayor actividad antioxidante seguido del brócoli, zanahoria, espinaca, repollo, cebolla amarilla, cilantro, papa, lechuga y pepino. El Chile tiene una actividad antioxidante de 46.95 μ moles eq. de vitamina C/g de muestra, aunque cabe mencionar que la

determinación se realizó por un método distinto (TOSC) mediante cromatografía de gases. En el presente estudio no se encontró una correlación significativa entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles ($R^2=0.05$). Algunos estudios indican una correlación positiva y significativa entre estas variables (Chuah *et al.*, 2008; Galvez Ranilla *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2003) y otros, como el de Deepa *et al.* (2006), la descartan o bien, como el estudio de Heredia y Cisneros-Zevallos (2009), se reporta una correlación positiva en algunos cultivos como el de jícama, lechuga, zanahoria, cebolla y cilantro, pero se descarta en el pimiento.

Cuadro 15. Actividad antioxidante medida por DPPH y ABTS a diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). Las determinaciones se realizaron en muestra fresca.

Tratamiento	ABTS (μ moles eq. TROLOX/g)			DPPH (μ moles eq. TROLOX/g)		
	Media	Desviación estándar	CV(%)	Media	Desviación estándar	CV(%)
Control	2.736 \pm	0.101 ^a	3.704	5.171 \pm	1.118 ^{ab}	0.216
1	2.747 \pm	0.126 ^a	4.591	3.651 \pm	0.976 ^{ab}	0.267
2	2.711 \pm	0.251 ^a	9.249	3.699 \pm	1.708 ^{ab}	0.462
3	2.541 \pm	0.256 ^a	10.06	4.515 \pm	1.188 ^{ab}	0.263
4	2.653 \pm	0.188 ^a	7.073	3.988 \pm	1.295 ^{ab}	0.325
5	2.646 \pm	0.271 ^a	10.24	3.468 \pm	0.723 ^{ab}	0.209
6	2.699 \pm	0.266 ^a	9.874	3.526 \pm	0.782 ^{ab}	0.222
7	2.540 \pm	0.088 ^a	3.466	3.852 \pm	0.751 ^{ab}	0.195
8	2.606 \pm	0.271 ^a	10.41	4.092 \pm	0.950 ^{ab}	0.232
9	2.743 \pm	0.205 ^a	7.478	3.989 \pm	1.679 ^{ab}	0.421
10	2.737 \pm	0.204 ^a	7.468	3.600 \pm	0.947 ^{ab}	0.263
11	2.658 \pm	0.143 ^a	5.388	4.494 \pm	1.522 ^{ab}	0.339
12	2.740 \pm	0.204 ^a	7.44	2.950 \pm	0.952 ^{ab}	0.323
13	2.741 \pm	0.149 ^a	5.433	3.544 \pm	0.729 ^{ab}	0.206
14	2.704 \pm	0.166 ^a	6.127	5.297 \pm	1.808 ^{ab}	0.341
15	2.728 \pm	0.084 ^a	3.079	4.328 \pm	0.780 ^{ab}	0.180

16	2.623 ±	0.138 ^a	5.249	2.718 ±	0.821 ^b	0.302
17	2.753 ±	0.140 ^a	5.083	4.682 ±	0.744 ^{ab}	0.159
18	2.752 ±	0.157 ^a	5.716	5.473 ±	2.065 ^a	0.377
20	2.634 ±	0.106 ^a	4.016	4.379 ±	1.431 ^{ab}	0.327

eq.: equivalentes

4.4.3 Carotenoides

Los carotenoides son importantes compuestos colorantes en los alimentos. Comúnmente a ellos se les debe el color anaranjado-rojo. Los colores amarillo-anaranjado de los chiles se deben a los carotenoides zeaxantina, luteína, β -criptoxantina y α y β -caroteno; en tanto que el color rojo, a los carotenoides capsantina, capsorubina y capsantina 5,6-epóxido (Park *et al.*, 2011). Además, los chiles también contienen licopeno, el cual es el principal caronoide del jitomate. Los diferentes colores de los chiles se relacionan estrechamente con la presencia de estos compuestos en diferentes proporciones. Adicionalmente, se ha establecido presentan actividad antioxidante.

El **Cuadro 16** expone los resultados de carotenoides totales para los diferentes tratamientos de elicitación; ahí se aprecia que el menor contenido de carotenoides lo presenta el T16 (7.045 mg de carotenoides/100 g muestra, pimiento verde), lo cual es de esperarse debido a que el color verde del chile se debe principalmente a la presencia de clorofila y en el transcurso de la maduración irá resaltando la presencia de los carotenodes de los cromoplastos dando lugar a la coloración anaranjada, amarilla y roja según el genotipo. De hecho, el estudio de Niizu y Rodriguez-Amaya (2005) indica que su investigación es consistente con lo presentado por otros autores que muestran que el chile verde no es una buena fuente de carotenoides, ya que de los vegetales evaluados fue el que presentó los menores niveles de β -caroteno, violaxantina, luteína, neoxantina y lactucaxantina. Contrastando con este resultado, se encuentra el T18 que presenta la mayor concentración de carotenoides (44.420 mg de carotenoides/100 g de muestra). Este tratamiento tiene 34.24% más carotenoides que el control. Algunos de los

tratamientos presentan valores superiores a los reportados por Serrano *et al.* (2010) que se encuentran en el rango de 5-22 mg de carotenoides/100 g de muestra para pimientos en los que se utilizaron nitrofenolatos. Los resultados aquí presentados son muy inferiores a los obtenidos por Pérez-López *et al.* (2007) para el pimiento rojo (~2500 mg/kg de muestra fresca) y verde (~400 mg/kg de muestra fresca).

Cuadro 16. Contenido de carotenoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón. Los valores son la media de tres réplicas±desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Carotenoides (mg carotenoides/100 g)		CV(%)
	Media	Desviación estándar	
Control	33.089 ±	6.346 ^{ab}	19.177
1	26.049 ±	2.463 ^{bc}	9.455
2	29.035 ±	4.370 ^{bc}	15.051
3	29.249 ±	6.502 ^{bc}	22.230
4	25.907 ±	3.210 ^{bc}	12.391
5	26.193 ±	6.251 ^{bc}	23.864
6	25.735 ±	4.786 ^{bc}	18.596
7	23.867 ±	2.971 ^{bc}	12.448
8	22.988 ±	8.213 ^{bc}	35.727
9	20.496 ±	6.670 ^{bcd}	32.543
10	26.411 ±	4.736 ^{bc}	17.931
11	24.240 ±	6.366 ^{bc}	26.262
12	27.127 ±	8.958 ^{bc}	33.022
13	19.847 ±	7.470 ^{bcd}	37.637
14	18.081 ±	4.590 ^{cd}	25.385
15	21.401 ±	8.870 ^{bcd}	41.445
16	7.045 ±	2.505 ^d	35.550
17	27.247 ±	10.514 ^{bc}	38.587

18	44.420 ±	15.060 ^a	33.903
20	24.004 ±	3.202 ^{bc}	13.338

En orden de obtener el perfil de carotenoides de los diferentes tratamientos, las muestras se analizaron por HPLC. El perfil obtenido se comparó con estándares puros de luteína, zeaxantina, α -tocoferol, β -criptoxantina, licopeno y β -caroteno. Los resultados obtenidos se presentan en el **Cuadro 17**.

En ningún tratamiento se detectaron zeaxantina y β -criptoxantina. Este resultado contrasta con lo expuesto por Pérez-López *et al.* (2007) quienes reportan valores en el rango de 211-238 mg/kg y de 165-315 mg/kg para la zeaxantina y β -criptoxantina, respectivamente. La presencia de carotenoides se ve afectada por la variedad, clima, sitio geográfico de producción, estado de maduración, temperatura de maduración, exposición a la luz solar, cosecha y manejo postcosecha, siendo la maduración el factor más importante y en la cual se detonan genes para la síntesis de carotenoides (Yahia y Ornelas Paz, 2010).

El contenido de luteína y licopeno es mayor en el T18 y difiere significativamente del control ($p \leq 0.05$). El T16 presenta los valores más bajos de luteína y el licopeno no es detectable, lo cual es de esperarse debido a que este tratamiento fue en estado verde. Este comportamiento es interesante, ya que como indican Pérez-López *et al.* (2007) y Marín *et al.* (2004), la luteína es un pigmento característico del cloroplasto y conforme avanza la maduración la concentración disminuye e incluso, eventualmente, llega a desaparecer. De hecho, este último autor reporta no haber encontrado luteína en pimiento rojo y sólo reporta el compuesto en el pimiento verde (1.36 mg/100 g peso fresco). No obstante, el reporte de Lee *et al.* (2005) indica lo contrario (10.1 μ g/g para chile maduro). La luteína es un carotenoide destacado debido a que protege contra la degeneración macular por su capacidad de absorber la luz azul (Yahia y Ornelas Paz, 2010), además, se ha reportado que puede reducir la incidencia de aterosclerosis y enfermedades del corazón (Lee *et al.*, 2005).

En lo que respecta a la concentración de α -tocoferol, el T18 es el que exhibe el mayor contenido, aunque en este caso no difiere significativamente del control. En oposición a esto, el T16 presenta el menor contenido de α -tocoferol y difiere del control. Wahyuni *et al.* (2011) estudiaron 32 variedades de chile, señalando que en todas encontraron tanto α -tocoferol como β -tocoferol. El primer compuesto se presentó en el rango de 0.84-16.32 mg/100 g muestra fresca, lo cual es superior a lo encontrado en este estudio. El β -tocoferol se presentó en un máximo de 4.24 mg/100 g de muestra fresca. Este compuesto no fue analizado en esta investigación. Los tocoferoles no se analizaron después de la cocción, pero este tratamiento puede aumentar la extractabilidad del α -tocoferol, lo que puede hacerlo más biodisponible (Amorim *et al.*, 2012).

El β -caroteno sólo fue detectable en el T18. Aquí cabe decir que como se observa en la **Figura 9**, el licopeno se encuentra en una etapa más temprana de la síntesis de carotenoides que el β -caroteno, razón por lo cual se esperaría, como sucede en este estudio, que fuera más factible que al encontrar β -caroteno también se detectara licopeno y no al revés, aunque tampoco se descarta que en algún momento la síntesis se incrementara de modo tal que se beneficiara la síntesis de α y β -caroteno mermando la presencia de licopeno en el producto. La importancia del β -caroteno radica en que es un precursor de vitamina A, la cual es sumamente necesaria para una buena visión y además se le relaciona con prevenir ciertos tipos de cáncer (Krinsky y Johnson, 2005). El contenido de β -caroteno reportado por Deepa *et al.* (2007) es de 1.7-4.3 mg/100 g peso fresco, el cual es un resultado superior al encontrado en este estudio, posiblemente debido a los factores mencionados en párrafos anteriores.

Se sugiere, para futuros estudios, determinar capsantina en el pimiento morrón rojo por su importancia en la impartición de este color y por ser el único producto donde se encuentra (Crosby, 2008). Se estima que de los carotenoides totales alrededor del 43% es capsantina; no obstante, tiene poca biodisponibilidad,

siendo el β -caroteno el carotenoide más biodisponible (Hervert-Hernández *et al.*, 2010). Se hubiera esperado que en todos los tratamientos de elicitación hubiera existido un aumento de los carotenoides debido a que como indican diversos reportes la presencia de ERO, heridas, así como condiciones de temperatura y sequía detonan la acumulación de carotenoides (Lee *et al.*, 2005). Posiblemente se deba aumentar la concentración de los elicitors utilizados en aras de observar los efectos esperados relacionados a la acumulación de metabolitos secundarios.

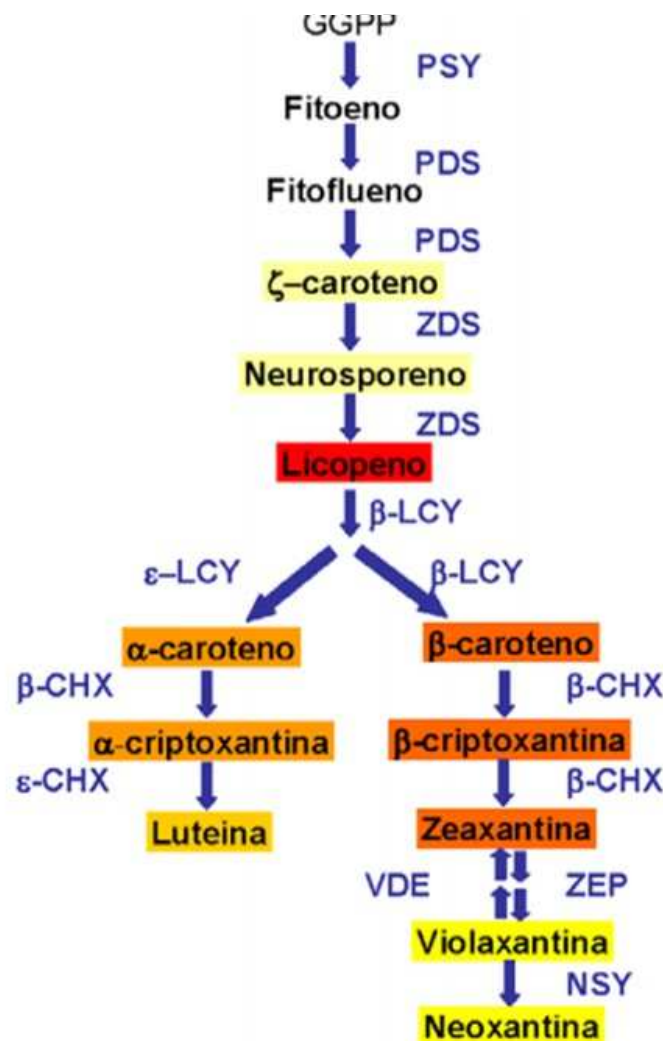


Figura 9. Biosíntesis de carotenoides.

GGPP, geranigeranil pirofosfato; PSY, fitoeno sintasa; PDS, fitoeno desaturasa; ZDS, ζ -caroteno desaturasa; β -LCY, β -licopeno ciclasa; ϵ -LCY, ϵ -licopeno ciclasa; β -CHX, β -caroteno hidroxilasa; ϵ -CHX, ϵ -caroteno hidroxilasa; ZEP, zeaxantina epoxidasa; VDE, violaxantina de-epoxidasa; NSY, neoxanthin syntasa; Modificado de Liu *et al.* (2009) y Wahyuni *et al.* (2011).

Cuadro 17. Perfil de carotenoides de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón. Los valores son la media de tres réplicas ± error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Carotenoides													
	Luteína (µg/g)		Zeaxantina (µg/g)		α-tocoferol (µg/g)		β-criptoxantina (µg/g)		Licopeno (µg/g)		β-caroteno (µg/g)			
	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)	Media	CV(%)		
Control	3.945 ± 0.014 ^{bcdef}	0.344	n.d.		4.874 ± 0.290 ^{abc}	5.941	n.d.		5.644 ± 1.102 ^{bc}	19.529	n.d.			
1	4.043 ± 0.096 ^{bcd}	2.372	n.d.		5.032 ± 1.155 ^{abc}	22.947	n.d.		6.757 ± 4.032 ^b	59.679	n.d.			
2	4.071 ± 0.092 ^b	2.250	n.d.		4.536 ± 0.698 ^{abcd}	15.391	n.d.		5.739 ± 2.712 ^{bc}	47.262	n.d.			
3	4.057 ± 0.099 ^{bc}	2.450	n.d.		4.609 ± 0.669 ^{abcd}	14.520	n.d.		6.367 ± 3.151 ^b	49.488	n.d.			
4	4.041 ± 0.051 ^{bcd}	1.272	n.d.		4.771 ± 0.308 ^{abcd}	6.448	n.d.		5.384 ± 1.767 ^{bc}	32.817	n.d.			
5	3.962 ± 0.077 ^{bcdef}	1.935	n.d.		4.336 ± 0.604 ^{abcd}	13.937	n.d.		4.264 ± 1.383 ^{bc}	32.430	n.d.			
6	4.008 ± 0.055 ^{bcde}	1.366	n.d.		4.330 ± 0.654 ^{abcd}	15.105	n.d.		5.257 ± 2.244 ^{bc}	42.683	n.d.			
7	3.948 ± 0.034 ^{bcdef}	0.865	n.d.		3.972 ± 0.259 ^{bcde}	6.529	n.d.		4.514 ± 1.477 ^{bc}	32.722	n.d.			
8	3.969 ± 0.069 ^{bcdef}	1.736	n.d.		5.797 ± 2.637 ^{ab}	45.498	n.d.		2.670 ± 2.062 ^{bc}	77.244	n.d.			
9	3.929 ± 0.032 ^{bcdef}	0.808	n.d.		3.828 ± 0.167 ^{cde}	4.350	n.d.		3.787 ± 1.788 ^{bc}	47.225	n.d.			
10	3.899 ± 0.045 ^{def}	1.163	n.d.		3.745 ± 0.961 ^{cde}	25.655	n.d.		4.394 ± 0.767 ^{bc}	17.461	n.d.			
11	3.916 ± 0.049 ^{cdef}	1.239	n.d.		3.821 ± 0.693 ^{cde}	18.132	n.d.		3.142 ± 1.725 ^{bc}	54.910	n.d.			
12	3.880 ± 0.025 ^{ef}	0.654	n.d.		3.677 ± 0.248 ^{cde}	6.753	n.d.		3.009 ± 1.117 ^{bc}	37.135	n.d.			

13	3.857 ± 0.059 ^f	1.542	n.d.	3.190 ± 0.697 ^{cde}	21.850	n.d.	2.479 ± 2.040 ^{bc}	82.310	n.d.	
14	3.820 ± 0.073 ^f	1.908	n.d.	3.349 ± 0.855 ^{cde}	25.533	n.d.	2.407 ± 1.833 ^{bc}	76.137	n.d.	
15	3.834 ± 0.090 ^f	2.341	n.d.	2.953 ± 0.895 ^{de}	30.322	n.d.	1.645 ± 0.737 ^c	44.785	n.d.	
16	3.832 ± 0.069 ^f	1.798	n.d.	2.069 ± 0.897 ^e	43.366	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
17	3.923 ± 0.133 ^{bcd}	3.387	n.d.	3.676 ± 1.015 ^{cde}	27.608	n.d.	4.118 ± 0.419 ^{bc}	10.177	n.d.	
18	4.254 ± 0.069 ^a	1.615	n.d.	6.164 ± 0.411 ^a	6.675	n.d.	13.446 ± 3.991 ^a	29.680	6.566 ± 6.000	91.375
20	3.872 ± 0.063 ^{ef}	1.616	n.d.	3.697 ± 0.702 ^{cde}	18.985	n.d.	3.265 ± 0.930 ^{bc}	28.498	n.d.	

4.4.4 Vitamina C

La vitamina C es frecuentemente utilizada como marcador de deterioro de los productos. Asimismo, su presencia posiblemente se relacione con el metabolismo de los carbohidratos que se acumulan en mayor proporción en los chiles maduros (Martínez *et al.*, 2005). El menor contenido de vitamina C se observó en el T16, que fueron pimientos analizados en el estado verde. Este resultado concuerda con lo observado por otros autores que mencionan que la cantidad de vitamina C aumenta conforme el producto va madurando (Hernández-Fuentes *et al.*, 2010; Marín *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2010), empero con una maduración avanzada del chile disminuye el contenido de vitamina C (Ghasemnezhad *et al.*, 2011). El T18 exhibe uno de los mayores contenidos de vitamina C para los tratamiento evaluados (**Cuadro 18**), aunque ninguno es significativamente diferente. Martínez *et al.* (2005) reportan valores de 107.39 y 154.39/7.56 mg/100 g de porción comestible para pimientos verdes y rojos, respectivamente.

Asimismo, se menciona que los pimientos verdes almacenados a temperatura ambiente (20°C), después de diez días en estas condiciones alcanzan valores similares a los del pimiento rojo, pero que el almacenamiento de los pimientos rojos reduce en alrededor del 25% el contenido de vitamina C. Tal situación no se pudo observar en este estudio, posiblemente a que la temperatura de almacenamiento fue menor (-18°C).

La determinación del contenido de vitamina C de los pimientos es muy importante, ya que esta fruta, a pesar de no reconocerse por su contenido de ácido ascórbico, es uno de los productos hortícolas que presenta la mayor concentración de este compuesto, incluso por encima de otros que se reconocen como fuente de vitamina C (Ghasemnezhad *et al.*, 2011). Deepa *et al.* (2006) mencionan que la ingesta de 100 g de pimiento puede satisfacer el RDA para esta vitamina (60 mg/día). También, se ha establecido un posible efecto de la vitamina C en la prevención de ciertos tipos de cáncer debido a la inhibición de compuestos N-nitrosos y a la estimulación del sistema inmune (Chen *et al.*, 2008). Se le reconoce como un potente antioxidante, razón por la cual en algunos estudios como el de Chu *et al.* (2002) sustraen la aportación de ese compuesto a la actividad antioxidante para poder establecer la actividad debida a otros compuestos.

Dada la relevancia de la vitamina C en la prevención y/o tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, se ha explorado la manera de aumentar su contenido en los alimentos. Uno de los tratamientos explorados para aumentar este metabolito es la elicitación (Schreiner y Huyskens-Keil, 2006). Al respecto se reporta que la aplicación de prohexadiona de calcio (P-Ca) a una concentración de 100 mg/L mostró superioridad, así como los tratamientos con ácido absícico 1×10^{-6} M y ácido salicílico 1×10^{-6} M en las semillas de chile jalapeño mostraron una tendencia a incrementar la concentración de vitamina C (Ramírez *et al.*, 2009). Benavides-Mendoza *et al.* (2007) han señalado que los inductores de los cambios de la concentración de antioxidantes como AB y AS ejercen en plantas su efecto al fortalecer el mecanismo de tolerancia al estrés ambiental. En el mismo sentido,

Parađiković *et al.* (2011) mencionan que la aplicación de diversos bioestimulantes comerciales propicia el aumento de vitamina C en comparación con el control en pimiento cultivado en hidroponía. Se hipotetiza que las concentraciones utilizadas de elicitors estuvieron por debajo del umbral de respuesta para percibir un aumento significativo del ácido ascórbico con los diferentes tratamientos de elicitación.

Cuadro 18. Vitamina C de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón. Los valores son la media de tres réplicas \pm desviación estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Vitamina C (mg/g muestra)	
		CV(%)
Control	1.534 \pm 0.076 ^a	4.979
1	1.510 \pm 0.089 ^a	5.915
2	1.320 \pm 0.412 ^a	31.256
3	1.603 \pm 0.064 ^a	4.019
4	1.388 \pm 0.117 ^a	8.463
5	1.455 \pm 0.184 ^a	12.679
6	1.392 \pm 0.083 ^a	5.968
7	1.539 \pm 0.155 ^a	10.083
8	1.511 \pm 0.104 ^a	6.874
9	1.443 \pm 0.185 ^a	12.803
10	1.612 \pm 0.153 ^a	9.505
11	1.525 \pm 0.087 ^a	5.734
12	1.466 \pm 0.214 ^a	14.596
13	1.389 \pm 0.201 ^a	14.477
14	1.450 \pm 0.146 ^a	10.040
15	1.572 \pm 0.078 ^a	4.968
16	1.290 \pm 0.085 ^a	6.560
17	1.501 \pm 0.130 ^a	8.668
18	1.541 \pm 0.183 ^a	11.879

4.4.5 Capsaicinoides

Se realizó la determinación de capsaicinoides en las muestras; sin embargo, en ninguna se detectaron capsaicinoides; ni su análogo dulce, el capsiato. Estos resultados coinciden con los expuestos por Ornelas-Paz *et al.* (2010) y Wahyuni *et al.* (2011). Las muestras se llevaron a cabo con el chile sin semillas que es tal como se consume. En este sentido, Wahyuni *et al.* (2011) reportan que si bien no se encontraron capsaicinoides en el pimiento sin semilla sí se detectan niveles bajos cuando la determinación se realiza en la placenta y las semillas. Esta determinación no fue posible llevarla a cabo, ya que se había desechado el producto. Estos mismo autores indican la presencia de capsiato en varios chiles, pero todos ellos son picosos. En ningún caso reportan la presencia de capsiato en pimiento.

En algún momento se consideró que si no se detectaba capsaicina en el pimiento era porque la ruta de producción se desviaba hacia la producción de capsiato. Tal resultado hubiera sido muy interesante, ya que esta sustancia tiene propiedades nutraceuticas similares a las de la capsaicina, pero sin la pungencia (Luo *et al.*, 2011). La diferencia de esta característica la hace un enlace; la capsaicina tiene un enlace amida y el capsiato tiene un enlace éster.

Lang *et al.* (2009) señalan que la aminotransferasa pAMT que cataliza la formación de vainillinamina en la ruta de los capsaicinoides no se encuentra presente en el chile CH19-Sweet, el cual fue el primer en el que se detectaron estos compuestos. Asimismo, mencionan que esto se debe a la inserción de un nucleótido T que señala la formación de un códon de paro. Esta modificación a la ruta de síntesis de los capsaicinoides sólo la encontraron en el CH19-Sweet y describen no haberla hallado en ningún otro chile, pungente o no pungente.

4.4.6 Análisis no específico de metabolitos

Este perfil metabólico no específico se realizó mediante cromatografía de gases acompañada a un espectrómetro de masas (GC-MS). La realización de este análisis debe profundizarse en todos los tratamientos realizados, por lo que lo expuesto a continuación tiene meramente un carácter indagatorio del perfil de metabolitos para algunos de los tratamientos. Si bien, en los tratamientos mencionados no se encuentran diferencias en la actividad antioxidante como se puede evidenciar en el **Cuadro 15**, esto no debe subestimarse debido a que los resultados arrojan diferencias en el perfil de metabolitos entre los tratamientos, lo cual podría modificar otro tipo de bioactividad no explorada en la presente tesis. Varios aminoácidos y un ácido graso se encontraron en el T11 pero no en el control. T7 y T9 despliegan la menor diversidad de compuestos.

En total se identificaron 28 metabolitos de acuerdo a su perfil de identidad de espectro de masas mediante el uso del software Chemstation, comprobando dichos compuestos en la base de datos del NIST (National Institute of Standards and Technology). La gráfica de heatmap (**Figura 10**) se elaboró con base en el área de cada compuesto identificado. Los compuestos identificados se dividieron en 4 grupos como lo muestra el **Cuadro 19**. En este cuadro también se aprecian los tiempos de retención, las áreas de cada compuesto y los iones importantes de cada pico. Los elicitores no sólo pueden detonar la actividad de los metabolitos secundarios, sino también modificaciones en el metabolismo primario. En este sentido, Glowacz *et al.* (2015) reportan incrementos en la glucosa y fructosa en chiles rojos expuesto a ozono. Algunos de los compuestos encontrados en el perfil son precursores de rutas de metabolitos secundarios como la fenilalanina de los fenilpropanoides (Havsteen, 2002) y el ácido linolénico de los jasmonatos (Wasternack y Hause, 2002).

La **Figura 11** señala las diferentes rutas metabólicas que se presumiblemente se detonaron de acuerdo a los metabolitos encontrados por GC-MS. Como se puede apreciar, se activan alrededor de 28 rutas relacionadas con el

Cuadro 19. Metabolitos de bajo peso molecular encontrados en el pimiento asperjados con diferentes cocteles de FMM.

Naturaleza del compuesto	Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	Área de los picos (%)					Iones importantes en los picos: m/z
			C	T5	T7	T9	T11	
Aminoácido	Alanina	4.39	0.75	0	0	0	1.38	116, 73, 147, 17, 45, 59, 75, 74, 118, 190
	Valina		0	0	0	0	1.49	73, 144, 45, 218, 145, 59, 75, 43, 74, 100
	Isoleucina	7.18	0	0	0	0	0.89	158, 73, 218, 159, 45, 147, 74, 100, 59, 75
	Ácido 4-aminobutírico		0	0	0	0	0.52	73, 174, 59, 75, 147, 86, 74, 100, 45, 43
	Serina	8.60	1.30	0	0	0	0	
	Treonina	9.12	1.14	1.11	0	0	1.58	73, 117, 218, 219, 10, 45, 57, 147, 291, 74
	Asparagina	14.46	2.22	1.21	0	0	3.02	73, 116, 231, 132, 75, 147, 45, 188, 74, 100
	Leucina	6.78	0	0	0	0	0.62	158, 73, 159, 147, 102, 75, 74, 160, 103, 232

	Ácido aspártico	11.56	0	1.77	0	0	0	232, 73, 233, 100, 147, 218, 75, 234, 202, 188
	Fenilalanina	13.47	0	0	0	0	2.036	218, 73, 192, 75, 147, 77, 219, 100, 45, 193
Ácidos orgánicos	Ácido láctico	3.91	1.30	12.15	1.20	3.21	1.65	73, 147, 117, 191, 45, 190, 148, 75, 66, 43
	Ácido glicólico	4.07	1.15	7.55	2.81	0	0.89	73, 147, 66, 45, 148, 205, 177, 74, 75, 43
	Ácido succínico	7.62	1.13	3.25	0	1.29	0.88	147, 73, 75, 427, 148, 45, 149, 129, 55, 74
	Ácido málico	11.06	11.17	20.44	6.86	3.59	6.60	73, 147, 233, 245, 133, 189, 75, 148, 90, 45
	Ácido treónico	12.58	4.51	0	0	0	3.42	73, 147, 292, 205, 220, 117, 103, 217, 293, 148
	Ácido ascórbico	19.40	12.48	5.42	80.83	84.27	10.30	73, 147, 332, 205, 117, 333, 75, 148, 45, 334
Terpenoides	γ-tocoferol	35.81	0.94	0	0	0	0.60	488, 223, 73, 489, 222, 224, 43, 57, 490, 263

	α -tocoferol	38.80	19.79	5.83	1.79	0	17.25	502, 237, 73, 503, 236, 43, 238, 57, 504, 277
	Campesterol	36.84	4.52	1.96	0.60	0	5.22	129, 43, 73, 343, 75, 382, 55, 57, 95, 81
	Estigmasterol	37.11	1.10	1.47	0.12	0	1.01	83, 55, 129, 73, 69, 81, 75, 255, 43, 57
	β -sitosterol	37.72	13.63	5.01	1.11	0	15.02	129, 357, 396, 73, 43, 486, 57, 75, 381, 55
Ácidos grasos	Ácido hexadecanoico	20.51	5.68	8.82	2.23	2.74	5.74	313, 73, 117, 75, 129, 132, 43, 145, 55, 41
	Ácido 9,12 octadecanoico	23.36	4.42	10.42	1.54	1.71	4.38	75, 73, 67, 81, 129, 55, 337, 95, 117, 79
	Ácido octadecanoico	24.02	4.29	4.47	1.32	0.63	4.69	73-117-341- 75-132-145- 129-43-342-55
	Ácido glicérico	8.05	1.19	4.02	1.17	0.57	1.018	73-147-292- 189-103-45- 133-75-117-74
	Ácido láurico	13.86	1.65	0	0	0	1.398	73-117-257- 75-132-129- 145-258-55- 131
	Ácido mirístico	17.22	0	0	0	1.946	0	73-75-117- 285-132-43- 129-41-55-145

Ácido linolénico	23.38	0	4.81	0	0	0	75-79-73-95- 93-67-108- 129-91-81
------------------	-------	---	------	---	---	---	---

N.D.: No detectado.

metabolismo o biosíntesis de diferentes compuestos como los fenilpropanoides, ácidos grasos saturados e insaturados, así como diferentes aminoácidos (metionina, cisteína, prolina, arginina, tirosina, lisina, leucina). Algunos de las rutas de biosíntesis de los aminoácidos están implicadas en otras rutas como lo son los aminoácido tirosina y fenilalanina implicados en la biosíntesis de fenilpropanoides. En los metabolitos encontrados se indica la presencia de varios compuestos implicados en la ruta del ácido cítrico (ácido málico y succínico), así como la producción de aminoácidos como lo son el ácido aspártico. La detección de los diferentes ácidos grasos hace evidente su implicación en la síntesis de compuestos como los carotenoides, terpenos y esteroides.

La activación de la ruta de los glucosinolatos debe analizarse a la luz de la presencia de los aminoácidos azufrados, lo cual de ninguna forma debe asumirse que el pimiento es un fuente de glucosinolatos; pero sí que hay metabolitos precursores de esta ruta identificados en el pimiento. Es de destacarse que el análisis de rutas metabólicas se realizó considerando como modelo las rutas de *Arabidopsis thaliana*, que es el modelo de comparación disponible en el software online utilizado para este análisis (MetabolAnalyst 3.0) (Xia *et al.*, 2012). Tiwari *et al.* (2013) señalan que los cambios fisiológicos y morfológicos que se observan en *Capsicum annuum* son similares a los reportados en *Arabidopsis* y jitomate por lo cual se consideran modelos adecuados de referencia cuando se estudia *Capsicum*; no obstante, no debe tomarse como una generalidad, pues se ha observado también que hay rutas y comportamientos metabólicos inherente a un modelo de estudio.

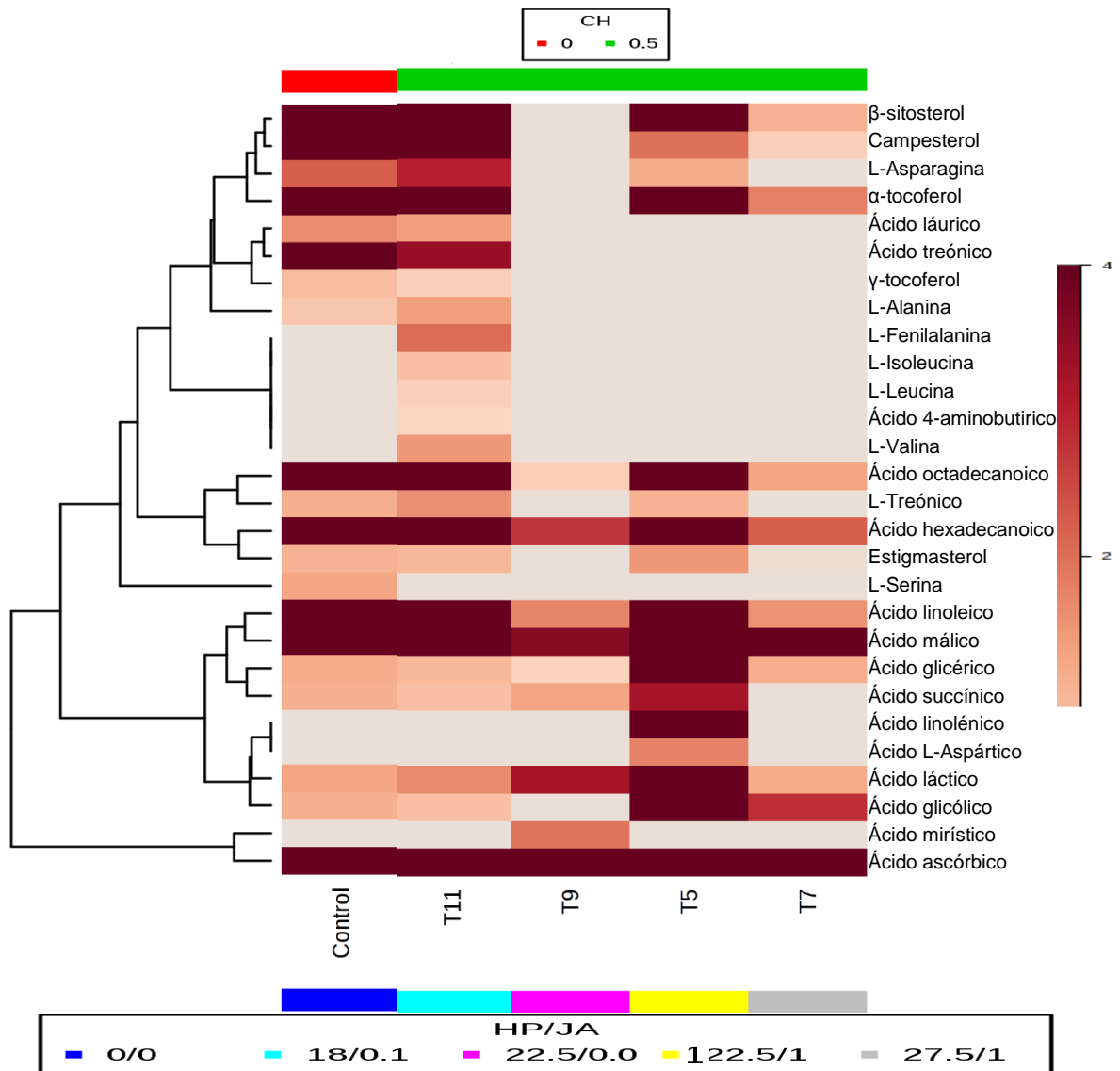


Figura 10. Heat map de 28 metabolitos encontrados en el pimiento. La matriz de colores representa los valores de la intensidad promedio de los metabolitos en tres réplicas.

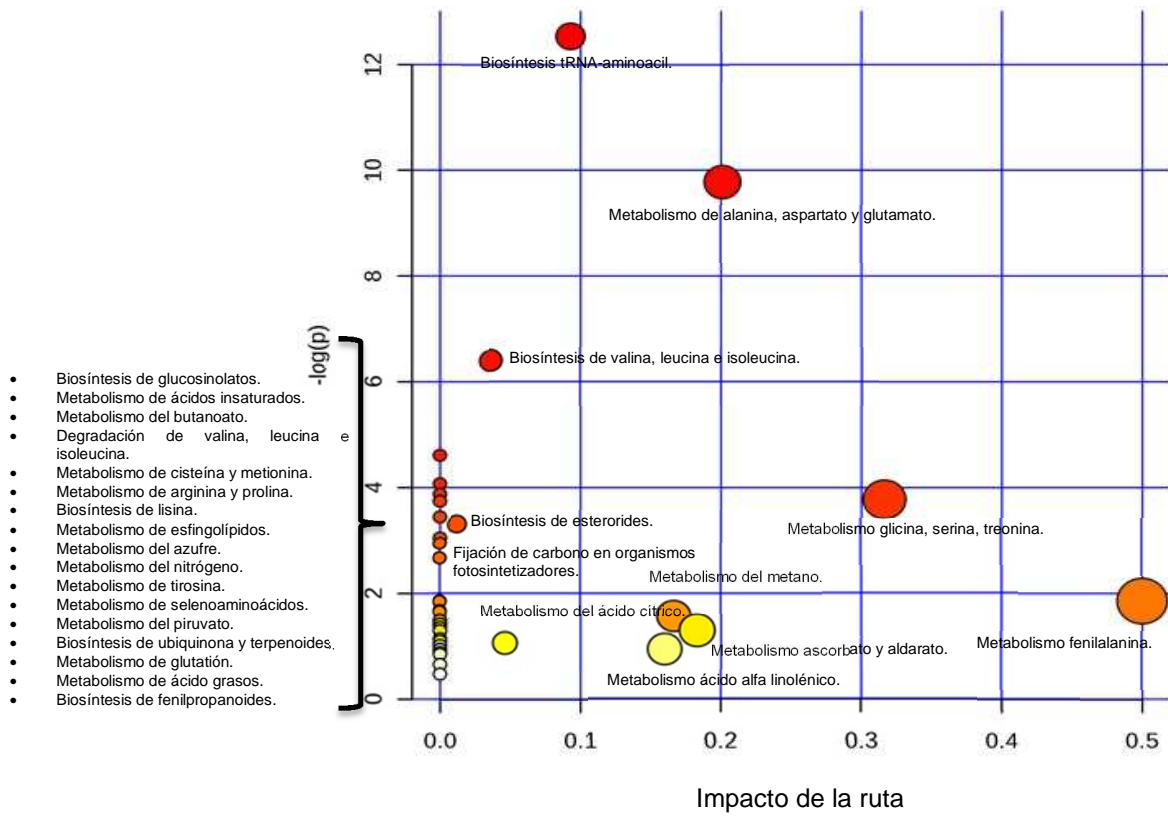


Figura 11. Impacto de diferentes rutas metabólicas considerando los 28 metabolitos encontrados en el pimienta. Los diferentes colores (de amarillo a rojo) indican la presencia del metabolito en los datos con diferentes niveles de significancia.

4.4.7 Inhibición de α -amilasa

La diabetes es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En México, es la principal causa de muerte (SSA, 2007), por lo cual muchos estudios están dirigidos hacia la búsqueda de componentes dietarios que sean benéficos para su tratamiento y prevención. La diabetes tipo 2 se caracteriza por un rápido incremento de los niveles de glucosa en sangre debido a la hidrólisis del almidón por la α -amilasa pancreática y la absorción de glucosa en el intestino delgado por la α -glucosidasa. Este súbito incremento de glucosa puede ser controlado inhibiendo las enzimas involucradas en la digestión de los carbohidratos. El consumo de inhibidores naturales como constituyentes de la dieta puede ser una adecuada terapia para manejar la hiperglicemia y minimizar los efectos secundarios de los tratamientos tradicionales como la utilización de acarbosa.

Como se ha descrito, la α -amilasa, enzima salival o pancreática juega un papel importante en la ruptura temprana de carbohidratos complejos a moléculas simples. Todos los extractos, exhibieron capacidad de inhibir la actividad de esta enzima (4.613-32.216%); sin embargo, sólo tres tratamientos (3, 6 y 9) difieren significativamente del control. Los resultados se indican en el **Cuadro 20**. El T16, el único en estado verde, es el que presenta la menor inhibición, lo que sugiere que en orden de obtener los mayores beneficios de inhibición de esta enzima se debe consumir el pimiento en el estado maduro rojo. No se encontró ninguna correlación fuerte entre el contenido de flavonoides ($R^2=0.021$), fenoles ($R^2=0.000$), taninos ($R^2=0.074$) y carotenoides ($R^2=0.033$) y la inhibición de α -amilasa.

La α -amilasa es una de las enzimas responsables de la hidrólisis del almidón, produciendo azúcares simples como glucosa y maltosa. De ahí que la inhibición de esta enzima puede retardar la digestión de carbohidratos y reducir la velocidad de absorción de glucosa y, en consecuencia, podría disminuir los niveles de glucosa postprandial en sangre. Una de las desventajas del uso de medicamentos para la diabetes son los efectos secundarios de los medicamentos utilizados para la inhibición de α -glucosidasa y α -amilasa como distensión

abdominal, flatulencia, meteorismo y diarrea (Puls, 1996). Estos efectos pueden ser causados por la excesiva inhibición de la amilasa intestinal, lo que provoca fermentación bacteriana anormal de los carbohidratos no digeridos en el colon. De lo anterior se deriva la importancia de potenciar en los alimentos el efecto inhibitorio de α -amilasa.

Las principales proteínas empleadas como fuente de resistencia a insectos son los inhibidores de enzimas digestivas, como los inhibidores de α -amilasas y proteasas, además de las lectinas, que bloquean glicoproteínas en el intestino del insecto. Los tres grupos ocasionan disminución en la absorción de nutrientes, retardo en el desarrollo del insecto y su muerte (Lawrence y Koundal, 2002; Valencia *et al.*, 2000). Posiblemente, en orden de aumentar la producción de los inhibidores de amilasa en los productos hortícolas se deba mimetizar de manera más fiel el ataque de insectos, pues como mencionan Wasternack y Hause (2002) los insectos pueden no sólo causar heridas en el tejido de la planta sino también regurgitan compuestos relacionados con la recepción de señales de alarma en la planta. También, no se deja de lado el hecho de que la poca diferencia en la inhibición de α -amilasa entre los tratamientos se haya debido a que en los tratamientos de elicitación se hayan utilizado concentraciones por debajo del umbral de respuesta para inducir la síntesis de inhibidores de α -amilasa.

Cuadro 20. Inhibición de α -amilasa de diferentes tratamientos de elicitación aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

Tratamiento	Inhibición α -amilasa (%)		CV(%)
	Media	SE	
Control	11.271	\pm 4.099	36.366
1	22.241	\pm 4.747	21.343
2	24.823	\pm 6.945	27.976

3	29.426 ± 4.177	a	14.194
4	21.992 ± 7.790	abcd	35.421
5	17.154 ± 7.429	abcd	43.306
6	31.960 ± 5.266	a	16.476
7	19.895 ± 6.984	abcd	35.103
8	28.371 ± 4.327	ab	15.250
9	32.216 ± 2.548	a	7.908
10	19.520 ± 3.066	abcd	15.708
11	5.118 ± 2.363	cd	46.162
12	20.074 ± 3.100	abcd	15.442
13	20.522 ± 9.523	abcd	46.403
14	11.728 ± 1.429	bcd	12.187
15	17.467 ± 4.160	abcd	23.815
16	4.613 ± 0.563	d	12.206
17	22.425 ± 2.022	abc	9.018
18	23.844 ± 11.660	ab	48.901
20	16.661 ± 1.259	abcd	7.559

4.5 Análisis en pimiento cocinado

4.5.1 Color del pimiento cocinado

En la **Figura 12** se pueden apreciar los cambios de color en las variables L, a* y b* experimentados por el pimiento sometido a diferentes cocciones. El pimiento deshidratado y asado difieren significativamente del pimiento fresco. El valor de L disminuye hacia el color negro, lo cual es de esperarse en el pimiento asado debido a que con este tratamiento quema algunas partes del tejido. Al observar el chile deshidratado es evidente que el producto pierde brillantez. El color de los alimentos es quizás el primer atributo que el consumidor valora cuando determina la apariencia y calidad de un producto, y por tanto va a condicionar su aceptabilidad. Una apariencia natural siempre será evaluada positivamente mientras que se tomarán precauciones ante un color extraño o inesperado que suele ser interpretado

en términos de deterioro o manipulación del producto. Los cambios descritos previamente son propios de los tratamientos de asado y deshidratación y el consumidor está acostumbrado a ellos.

En lo que respecta a la variable a^* los mayores cambios se presentaron en el asado y deshidratado. El primero presenta los valores más altos de a^* y el segundo los más bajos. Lo cual indica que en el tratamiento asado se evidencia más el color rojo que los pimientos deshidratados. Estos resultados concuerdan parcialmente con lo expuesto por Ornelas-Paz *et al.* (2013), quienes reportan decrementos en esta variable para algunos chiles hervidos, pero para otros indican incrementos. Lo que también reportan estos autores son decrementos tanto para a^* como para b^* en los chiles asados. Un comportamiento similar sigue la variable b^* en donde también el mayor valor fue para el pimiento asado y el menor para el deshidratado. Esta diferencia se puede deber, a que siguiendo la costumbre doméstica de tratamiento para los chiles asados, posterior al asado en el comal se dejó sudar en una bolsa de plástico para eliminar la capa más superficial del chile que tenía el tejido quemado.

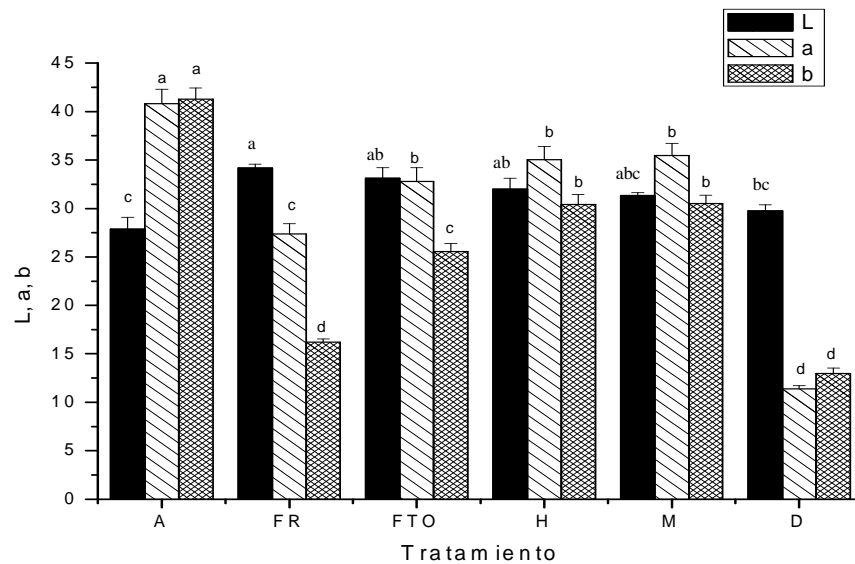


Figura 12. Medición de color L, a^* y b^* de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

4.5.2 Grados Brix y pH del pimiento cocinado

El pH reportado por Rubio-Pino *et al.* (2010) para pimiento verde y rojo es de 4.73 y 4.33, respectivamente. No se encontraron muchas referencias que indiquen el pH en pimiento cocinado salvo la de Park *et al.* (2011) que indican que los pimientos en salmuera aumentaron su pH de 2.78 a 3.10 después de 14 días de almacenamiento y que mantuvieron ese valor por 42 días. Koskiniemi *et al.* (2013) indican que un pH menor a 3.4 favorece el reblandecimiento del pimiento. Los valores de las muestras evaluadas son superiores a dicho valor. En la **Figura 13** se muestran los valores de pH para el pimiento sometido a distintos tratamientos de cocinado. El valor de pH para el pimiento fresco está en el rango de lo reportado por Marín *et al.* (2004); sin embargo, éste es inferior a lo reportado por Castro *et al.* (2005) (pH 5.0-6.4). Se evidencia que el tratamiento de fritura y deshidratación difieren significativamente del control; sin embargo, siguen estando en el intervalo de valores de pH reportados para pimiento fresco. Posiblemente el aceite utilizado en la fritura, así como la extracción de algunos componentes por la rehidratación del pimiento en agua causen las pequeñas diferencias encontradas.

El control del pH es muy importante en la elaboración de los productos alimentarios, tanto como indicador de las condiciones higiénicas como para el control de los procesos de transformación. El pH, como la temperatura y la humedad, son importantes para la conservación de los alimentos. De ahí que generalmente, disminuyendo el valor de pH de un producto, aumente el período de conservación. Un valor pH entre 2.5 y 5.5 prolonga la conservación de la fruta fresca e inhibe la reproducción de microorganismos. Lo mismo ocurre con la verdura en un intervalo entre 4.6 y 6.4 pH.

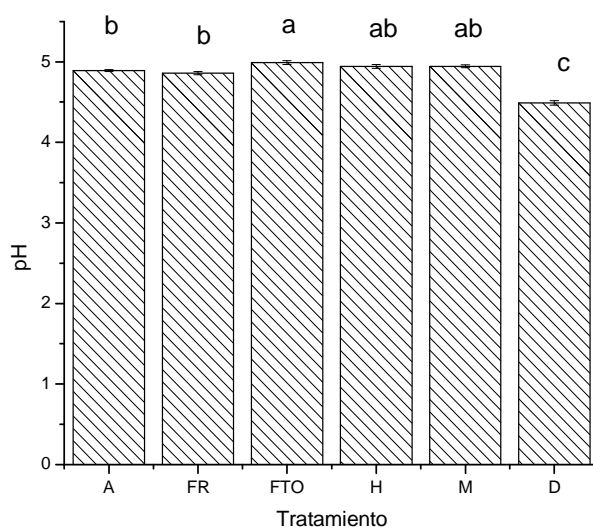


Figura 13. pH de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

En lo que respecta a los grados Brix, el pimiento crudo es el que presenta la menor cantidad de sólidos solubles (**Figura 14**). Este valor difiere difiere significativamente del encontrado en los pimientos cocinados. El pimiento hervido y deshidratado presentan valores similares de sólidos solubles, seguidos del tratamiento en microondas y finalmente de los pimientos fritos y asados. Se infiere que estas diferencias puedan deberse a una pérdida de humedad, ya que los tratamientos que alcanzan las mayores temperaturas y en los cuales se estima hay una pérdida de agua son lo que presentan los mayores valores de grados Brix. La deshidratación de alimentos constituidos por células vegetales, tales como las frutas, supone una serie de cambios físicos, químicos y sensoriales como consecuencia del estrés térmico e hídrico al que se ve sometido el tejido vegetal, de morfología compleja, durante todo el proceso. La ruptura y la degradación de la lámina media, la separación y ruptura de las paredes celulares, la lisis del citoplasma, la pérdida de la funcionalidad de la membrana y el colapso estructural de las células, pueden ocasionar cambios fisicoquímicos tales como la cristalización de la celulosa, despolimerización y solubilización de pectinas, desnaturalización de proteínas, cambios en los sólidos solubles (Crapiste, 2000).

Algunos de los tratamientos de cocción despliegan valores similares a los reportados por Castro *et al.* (2008) ($^{\circ}$ Brix 5.27-6.01); no obstante se tienen valores inferiores y superiores, ya que el reportado por este autor es solo para pimiento crudo.

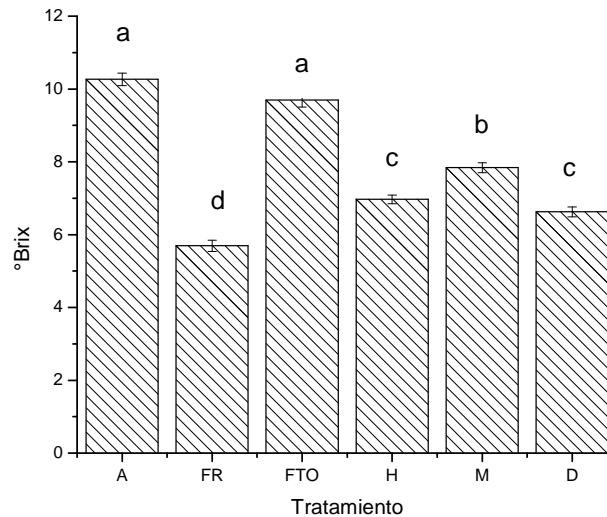


Figura 14. Grados Brix de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón. Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$). A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

4.6 Metabolitos-pimiento cocinado

Los alimentos son susceptibles de sufrir deterioro con el paso del tiempo. Este deterioro está influenciado en gran medida por la cantidad de agua que contenga el alimento, ya que es el medio donde proliferan los microorganismos. También influyen en el deterioro las condiciones ambientales como la temperatura, la composición y pH del alimento y la cantidad de oxígeno en contacto con el mismo. El cocinado de los alimentos se utiliza para ralentizar su deterioro o bien para mejorar las propiedades de los alimentos. Algunos de los tratamientos pueden afectar el valor nutricional y mejorar la biodisponibilidad de algunos nutrientes, así como la calidad del alimento procesado. De esta forma, un alimento tras ser sometido a un proceso tecnológico debe satisfacer las necesidades del consumidor en lo que se refiere a seguridad alimentaria, palatabilidad, vida útil, biodisponibilidad

de los nutrientes y en algunas ocasiones, aportar un valor añadido mediante el enriquecimiento con otros ingredientes. El pimiento es un producto que no sólo se consume en fresco sino después de haber recibido diversos procesados culinarios. Varios estudios se han realizado sobre el efecto de la deshidratación en el producto, pero la información es limitada respecto al efecto de otras formas de preparación. Por lo anterior, es importante conocer cómo cambian los compuestos blanco de este estudio después de la aplicación de varios tratamientos culinarios: fritura, hervido en microondas, asado, hervido convencional y deshidratado.

4.6.1 Flavonoides, taninos y fenoles en pimiento cocinado

Los resultados expuestos en la **Figura 15** hacen evidente que los chiles deshidratados tiene el mayor contenido de fenoles totales. El menor contenido se encuentra en el pimiento fresco. Los tratamientos que tienen agua como medio de cocción resultaron en un nivel similar de fenoles, al igual que los tratamientos cuyas temperaturas de cocción son más severas (asado y frito). La **Figura 16** y **Figura 17** presentan tendencias similares a la anterior; en ambas, el pimiento deshidratado (conocido como pimentón) presentó los mayores valores de flavonoides y taninos, siendo el pimiento fresco el que exhibe las menores concentraciones.

Los resultados debido al efecto del calentamiento en los compuestos fenólicos es contradictoria. Una apreciación común es que los alimentos que recibieron algún tratamiento térmico tienen un menor contenido nutricional que los alimentos frescos debido a las pérdidas de vitamina C y de algunas características fisicoquímicas (Ladrón de Guevara *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2011); sin embargo, contrastando con esta aseveración algunos reportes indican que el cocinado incrementa la actividad antioxidante de los alimentos al liberar compuestos antioxidantes que se encuentran en porciones insolubles de los alimentos pero que con el cocinado se solubilizan liberando los compuestos (Dewanto *et al.*, 2002; Turkmen *et al.*, 2005). Cabe mencionar que la temperatura de deshidratación fue controlada a 60°C, la cual se consideró en principio una temperatura límite para evitar dañar los posibles capsaicinoides hubiera en el producto. Esta temperatura

no se considera tan agresiva para el producto como las temperaturas alcanzadas en otros procesos, lo que se hipotetiza ayuda a liberar compuestos antioxidantes sin dañarlos excesivamente. Esto coincide con lo expuesto por Shotorbani *et al.* (2013) en su estudio de pimientos dulces, quienes mencionan que el contenido de fenoles se incrementó a 65°C pero que disminuyó cuando el tiempo a esa temperatura fue de 60 minutos. Esto indica que la disminución de fitoquímicos no sólo está ligada a una temperatura específica sino también al tiempo de permanencia a esa temperatura.

Según el informe de Roy *et al.* (2007) una temperatura baja ayudó a conservar del 80-100% de compuestos fenólicos en algunos vegetales. No obstante, se han observado incrementos en el contenido de polifenoles a altas temperaturas (90°C) debido probablemente a la generación de diversos compuestos con diferente grados de actividad antioxidante durante el proceso de cocción (López *et al.*, 2010; Que *et al.*, 2008). Adicionalmente, Pogoñ *et al.* (2013) en su estudio de diferentes tratamientos de fritura en *Lactarius deliciosus* indican que el contenido total de polifenoles no cambió, pero que el contenido de flavonoides incrementó de un 6-9%, lo cual señalan se puede deber a que el tratamiento térmico inactiva rápidamente la enzima fenol oxidasa, inhibición así cambios oxidativos enzimáticos.

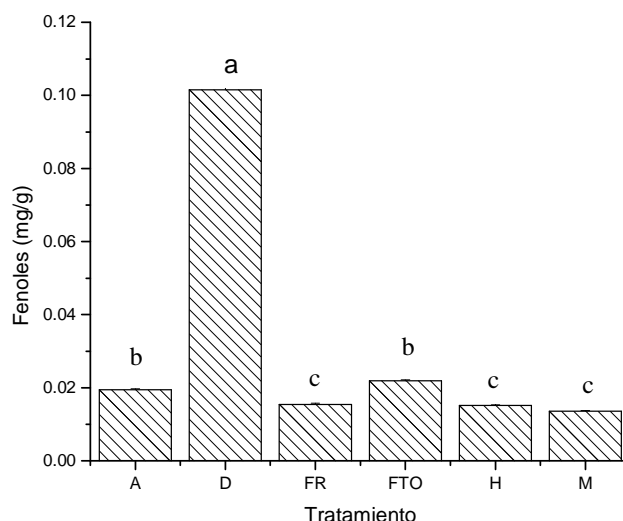


Figura 15. Contenido de fenoles de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

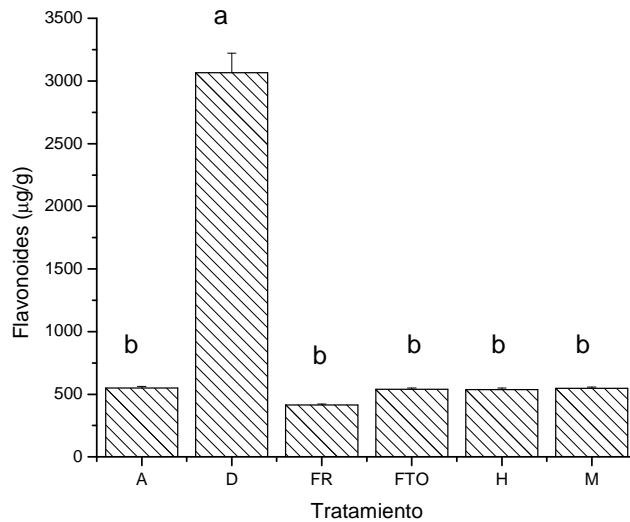


Figura 16. Contenido de flavonoides de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

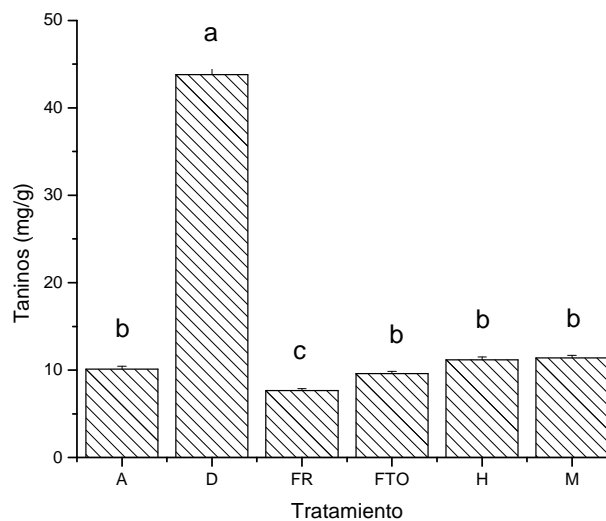


Figura 17. Contenido de taninos de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar.

Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

Cabe mencionar que diferencias en las técnicas de extracción en cuanto a solvente de extracción, pH, luz, calentamiento, pueden influir en las concentraciones detectadas y eficacia de los diferentes compuestos bioactivos encontrados en los alimentos (Shotorbani *et al.*, 2013).

4.6.2 Actividad antioxidante (DPPH y ABTS) en pimiento cocinado

La **Figura 18** resume la AOX del pimiento crudo y cocinado. El rango de actividad antioxidante por ABTS es de 4.017-9.282 μ moles equivalentes de Trolox/g de muestra seca, y para DPPH es de 4.755-11.874 μ moles equivalentes de Trolox/g de muestra seca. Estos valores se encuentran en el rango de lo reportado por Ornelas-Paz *et al.* (2013). Se encuentran diferencias significativas para todos los tratamientos. Los pimientos asados y hervidos en microondas son los que presentan la menor actividad antioxidante en tanto que el pimentón presenta los mayores valores de AOX. Esto contrasta con lo expuesto por Chuah *et al.* (2008) quienes indican no haber encontrado diferencias en la AOX del pimiento crudo y el cocido por microondas y en aceite; no obstante, sí coincide en que también encontró reducciones cuando el pimiento fue hervido, esto posiblemente a la pérdida de los compuestos antioxidantes al agua de cocción. Después de la cocción se han encontrado pérdidas del contenido de vitamina C al agua de cocción de hasta el 75% (Lešková *et al.*, 2006), lo cual podría explicar el porqué después del hervido se reduce la AOX.

Es reportado que el hervido puede aumentar la acción de los antioxidantes debido la inactivación de enzimas que causan oxidación. Asimismo, el hervido puede causar la destrucción de la pared celular y estructuras intracelulares, lo que causa la liberación de compuestos antioxidantes. En este sentido, Gahler *et al.* (2003) reportan el incremento de la AOX en tomates después del calentamiento. Asimismo, López *et al.* (2010) investigaron la AOX en arándanos encontrando que

ésta fue mayor cuando fueron calentados a temperaturas de 80-90°C que a 50-70°C. Se arguye que a menor temperatura se requiere un mayor tiempo de secado lo que puede causar la disminución de la AOX, pero que a mayor temperatura la generación de melanoidinas derivadas de las reacciones de Maillard pueden estar implicadas en este comportamiento, tal como ocurre en la fritura, el cual es un tratamiento que disminuye la presencia de ácidos grasos insaturados, minerales y vitaminas, pero que incrementa la digestibilidad de proteínas, gelatinización de almidón y aporta características sensoriales particulares debido precisamente a las mencionadas reacciones de Maillard (Pogoñ *et al.*, 2013).

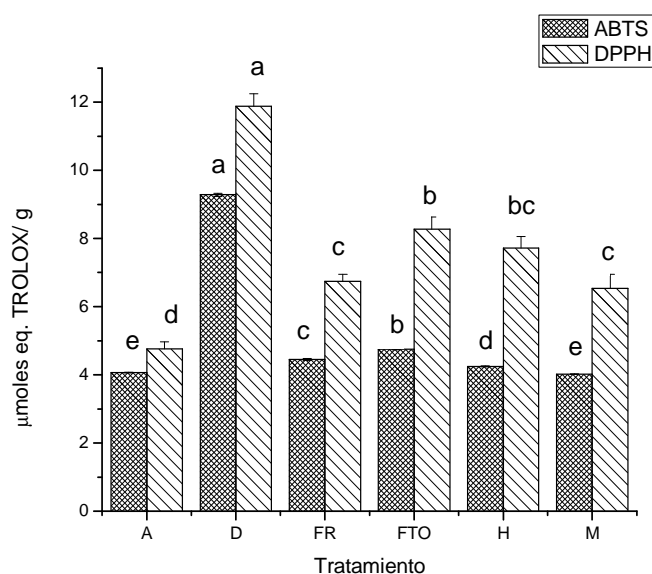


Figura 18. Actividad antioxidante (medida por DPPH y ABTS) de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra para la misma determinación significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

4.6.3 Carotenoides en pimiento cocinado

El efecto de los tratamientos culinarios en los carotenoides del pimiento morrón se observan en la **Figura 19**. Los resultados indican que el asado reduce significativamente el contenido de carotenoides en el pimiento en comparación con el pimiento crudo ($p \leq 0.05$). Asimismo, los tratamientos de deshidratación y microondas aumentan el contenido de carotenoides; en tanto, que la fritura y el

hervido convencional no difieren del pimiento fresco. Estos resultados concuerdan parcialmente con lo expuesto por Hwang *et al.* (2012) quienes observaron diferencias del hervido, cocción al vapor y blanqueado, pero no del frito con el pimiento crudo en estado rojo. Estos resultados son opuestos a los reportados por Chuah *et al.* (2008) cuyos resultados indican reducciones en el contenido de carotenoides totales de 3.2-36% y 11.6-40.9% en chile calentado en microondas y hervido, respectivamente. Además, Ornelas-Paz *et al.* (2013) indican reducciones de carotenoides por hervido y asado en chile picosos y no picosos. En contraste, otros autores indican incrementos en los carotenoides debido a una mejor extracción de los compuestos, resultado del cocinado (Chuah *et al.*, 2008). Las reducciones en el contenido de los carotenoides están influenciadas por las condiciones de cocción (que aunque similares no son las mismas a las reportadas por otros autores), el tipo de alimentos y la naturaleza de la matriz del alimentos. Adicionalmente, las técnicas de determinación también difieren entre los diferentes reportes.

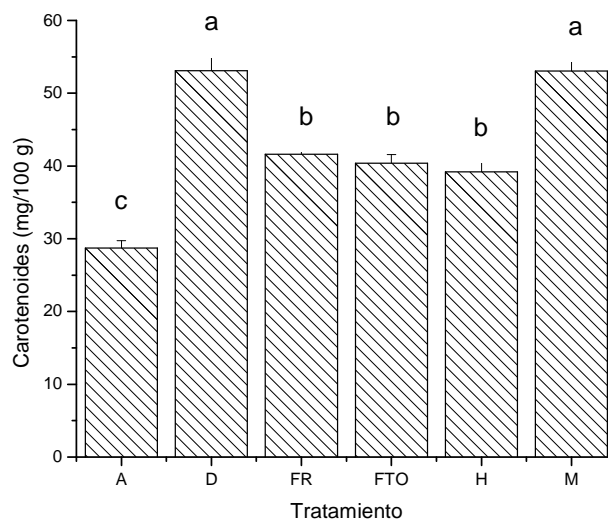


Figura 19. Carotenoides totales de diferentes tratamientos de cocción aplicados al pimiento morrón.

Los valores son la media de tres réplicas \pm error estándar. Medias con la misma letra significan que los tratamientos no son diferentes de acuerdo al test de Tukey ($p \leq 0.05$).

A: Asado, D: Deshidratado, FR: Fresco, FTO: Frito, H: Hervido, M: Microondas

El **Cuadro 21** muestra los incrementos o decrementos en porcentaje que se observaron en diferentes variables medidas en los pimientos cocidos en comparación con el fresco o crudo.

Cuadro 21. Incrementos o decrementos en porcentaje de diferentes variables medidas en pimientos cocidos en comparación con el fresco.

	Flavonoides	Taninos	Fenoles	ABTS	DPPH	Carotenoides	pH	°Brix	L	Color	
										a	b
Hervido	29.363	46.151	-2.095	-4.467	14.403	-5.861	1.691	22.554	-6.457	28.031	87.593
Microondas	31.675	48.637	-12.212	-9.714	-3.166	27.365	1.715	37.786	-8.354	29.657	88.163
Asado	32.020	32.016	25.667	-8.675	-29.520	-31.037	0.652	80.404	-18.470	49.182	154.514
Frito	29.528	25.174	41.797	6.693	22.588	-2.994	2.675	70.387	-3.160	19.923	57.544
Deshidratado	637.702	471.544	556.451	108.617	75.992	27.581	-7.597	16.425	-12.906	-58.431	-20.004

El análisis anterior permite evidenciar diferencias en el contenido de metabolitos de acuerdo al método de cocción. Por lo cual, se sugiere consumir alimentos cocinados de formas diferentes en aras de tener oportunidad de obtener beneficios derivados de la ingesta de fitoquímicos.

CAPÍTULO 5

V. CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que bajo las condiciones de experimentación llevadas a cabo, la utilización de cocteles de factores moduladores de metabolitos (FMM) en el pimiento morrón permiten modular la producción de pimiento, además de aumentar el potencial nutraceutico principalmente en el tratamiento postcosecha en estado maduro. Asimismo, el procesado culinario modifica significativamente el potencial nutraceutico del pimiento por lo cual es importante considerar estos cambios al realizar estudios de ingesta diarias recomendadas y consumirlo en sus diferentes formas de preparación para beneficiarse de la gama de fitoquímicos presentes en él.

LITERATURA CITADA

- Alexandre, E., T. R. Brandão, y C. L. Silva. 2012. Assessment of the impact of hydrogen peroxide solutions on microbial loads and quality factors of red bell peppers, strawberries and watercress. *Food Control* 27: 362-368.
- Alvarez-Parrilla, E., L. A. de la Rosa, R. Amarowicz, y F. Shahidi. 2010. Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 163-173.
- Amborabé, B.-E., J. Bonmort, P. Fleurat-Lessard, y G. Roblin. 2008. Early events induced by chitosan on plant cells. *Journal of Experimental Botany* 59: 2317-2324.
- Amorim, K., M.-A. Lage-Yusty, y J. López-Hernández. 2012. Changes in bioactive compounds content and antioxidant activity of seaweed after cooking processing. *CYTA-Journal of Food* 10: 321-324.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC Washington.
- Apel, K., y H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Arslan, D., y M. Özcan. 2011. Dehydration of red bell-pepper (*Capsicum annuum* L.): Change in drying behavior, colour and antioxidant content. *Food and Bioproducts Processing* 89: 504-513.
- Baltazar, A. M., y T. J. Monaco. 1984. Uptake, translocation, and metabolism of bentazon by two pepper species (*Capsicum annuum* and *Capsicum chinense*). *Weed Science*: 258-263.
- Bautista-Baños, S., M. Hernández-López, E. Bosquez-Molina, y C. Wilson. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- Bayoumi, Y. A. 2008. Improvement of postharvest keeping quality of white pepper fruits (*Capsicum annuum*, L.) by hydrogen peroxide treatment under storage conditions. *Acta Biologica Szegediensis* 52: 7-15.

- Benavides-Mendoza, A., D. Burgos-Limón, H. Ortega-Ortiz, y H. Ramírez. 2007. El ácido benzoico y poliácido acrílico-quitosán en la calidad y rendimiento del tomate cultivado en suelo calcáreo. *Terra Latinoamericana* 25: 123-129.
- Bent, A. F., y D. Mackey. 2007. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* 45: 399-436.
- Bi, F., S. Iqbal, M. Arman, A. Ali, y M.-u. Hassan. 2011. Carrageenan as an elicitor of induced secondary metabolites and its effects on various growth characters of chickpea and maize plants. *Journal of Saudi Chemical Society* 15: 269-273.
- Boonlertnirun, S., S. Meechoui, y E. Sarobol. 2010. Physiological and morphological responses of field corn seedlings to chitosan under hypoxic conditions. *ScienceAsia* 36: 89-93.
- Bosland, P. W., y E. J. Votava. 2012. Peppers: vegetable and spice capsicums. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, London, UK.
- Brand-Williams, W., M. Cuvelier, y C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Broadhurst, R. B., y W. T. Jones. 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29: 788-794.
- Butler, L. 1982. Polyphenols and their effects on sorghum quality. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SORGHUM GRAIN QUALITY. Proceedings... Paitancheru, AP India. p 294.
- Cardador-Martinez, A., E. Castano-Tostado, y G. Loarca-Pina. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B₁. *Food Additives & Contaminants* 19: 62-69.
- Casanova, E. 2005. Introducción a la Ciencia del Suelo. UCV-CDCH. Caracas, Venezuela.
- Castro, S. M., J. A. Saraiva, F. M. Domingues, y I. Delgadillo. 2011. Effect of mild pressure treatments and thermal blanching on yellow bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *LWT-Food Science and Technology* 44: 363-369.

- Castro, S. M., J. A. Saraiva, J. A. Lopes-da-Silva, I. Delgadillo, A. V. Loey, C. Smout, y M. Hendrickx. 2008. Effect of thermal blanching and of high pressure treatments on sweet green and red bell pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Food Chemistry* 107: 1436-1449.
- Castro, S. M., A. Van Loey, J. A. Saraiva, C. Smout, y M. Hendrickx. 2005. Process stability of *Capsicum annuum* pectin methylesterase in model systems, pepper puree and intact pepper tissue. *European Food Research and Technology* 221: 452-458.
- Conrath, U. 2009. Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research* 51: 361-395.
- Crapiste, G. 2000. Simulation of drying rates and quality changes during dehydration of foodstuffs. *Trends in Food Engineering*: 135-147.
- Creelman, R. A., y J. E. Mullet. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 355-381.
- Crosby, K. M. 2008. Pepper Vegetables II. *Handbook of Plant Breeding*. p 221-248. Springer, New York, USA.
- Cruz Huerta, N., F. Sánchez del Castillo, J. Ortiz Cereceres, M. Castillo, y M. del Carmen. 2009. Altas densidades con despunte temprano en rendimiento y período de cosecha en chile pimiento. *Agricultura Técnica en México* 35: 73-80.
- Cuvi, M. J. A., A. R. Vicente, A. Concellón, y A. R. Chaves. 2011. Changes in red pepper antioxidants as affected by UV-C treatments and storage at chilling temperatures. *LWT-Food Science and Technology* 44: 1666-1671.
- Chakraborty, M., A. Karun, y A. Mitra. 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *Journal of Plant Physiology* 166: 63-71.
- Chassy, A. W., L. Bui, E. N. Renaud, M. Van Horn, y A. E. Mitchell. 2006. Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 8244-8252.

- Chen, Q., M. G. Espey, A. Y. Sun, C. Pooput, K. L. Kirk, M. C. Krishna, D. B. Khosh, J. Drisko, y M. Levine. 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11105-11109.
- Choi, H. W., Y. J. Kim, S. C. Lee, J. K. Hong, y B. K. Hwang. 2007. Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO₂ activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology* 145: 890-904.
- Chu, Y.-F., J. Sun, X. Wu, y R. H. Liu. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6910-6916.
- Chuah, A. M., Y.-C. Lee, T. Yamaguchi, H. Takamura, L.-J. Yin, y T. Matoba. 2008. Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry* 111: 20-28.
- D Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, y R. Masella. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *ANNALI-ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA* 43: 348.
- De Rada, S. S. D., G. Aguado, J. S. de Galdeano, J. A. del Castillo García, y A. Uribarri. 2004. Pimiento en invernadero: guía de cultivo. *Navarra Agraria*: 7-13.
- De Swart, E., R. Groenwold, H. Kanne, P. Stam, L. Marcelis, y R. Voorrips. 2004. Non-destructive estimation of leaf area for different plant ages and accessions of *Capsicum annuum* L. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 79: 764-770.
- Deepa, N., C. Kaur, B. George, B. Singh, y H. Kapoor. 2007. Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes during maturity. *LWT-Food Science and Technology* 40: 121-129.
- Deepa, N., C. Kaur, B. Singh, y H. Kapoor. 2006. Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 572-578.

- Deshpande, S., y M. Cheryan. 1987. Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays. *Journal of Food Science* 52: 332-334.
- Dewanto, V., X. Wu, K. K. Adom, y R. H. Liu. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3010-3014.
- Everhart, E., R. Jauron, y C. Haynes. 2009. Peppers. Iowa State University, University Extension.
- Fallik, E., Y. Aharoni, S. Grinberg, A. Copel, y J. Klein. 1994. Postharvest hydrogen peroxide treatment inhibits decay in eggplant and sweet red pepper. *Crop Protection* 13: 451-454.
- FAOstat, F. 2009. Agriculture Organization of the United Nations. Statistical Database.
- Faustino, J., M. J. Barroca, y R. Guiné. 2007. Study of the drying kinetics of green bell pepper and chemical characterization. *Food and Bioproducts Processing* 85: 163-170.
- Feregrino-Pérez, A. A., L. C. Berumen, G. García-Alcocer, R. G. Guevara-Gonzalez, M. Ramos-Gomez, R. Reynoso-Camacho, J. A. Acosta-Gallegos, y G. Loarca-Piña. 2008. Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8737-8744.
- Fernández-García, E., I. Carvajal-Lérida, M. Jarén-Galán, J. Garrido-Fernández, A. Pérez-Gálvez, y D. Hornero-Méndez. 2012. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International* 46: 438-450.
- Figueroa Pérez, M. G., N. E. Rocha-Guzmán, E. Mercado-Silva, G. Loarca-Piña, y R. Reynoso-Camacho. 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: 273-278.

- Flores, R. C. 2012. El suelo de cultivo y las condiciones climáticas. Editorial Paraninfo, España.
- Fukumoto, L., y G. Mazza. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3597-3604.
- Gahler, S., K. Otto, y V. Böhm. 2003. Alterations of vitamin C, total phenolics, and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7962-7968.
- Galvez Ranilla, L., Y.-I. Kwon, E. Apostolidis, y K. Shetty. 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology* 101: 4676-4689.
- García-Mier, L., R. G. Guevara-González, V. M. Mondragón-Olguín, B. del Rocío Verduzco-Cuellar, y I. Torres-Pacheco. 2013. Agriculture and bioactives: achieving both crop yield and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 4203-4222.
- García-Mier, L., S. N. Jiménez-García, A. M. Chapa-Oliver, L. Mejía-Teniente, R. V. Ocampo-Velázquez, E. Rico-García, A. A. Feregrino-Pérez, R. Guevara-González, y I. Torres-Pacheco. 2014. Strategies for Sustainable Plant Food Production: Facing the Current Agricultural Challenges—Agriculture for Today and Tomorrow *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*. p 1-50. Springer, New York, USA.
- Gharib, F. 2006. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. *International Journal of Agriculture and Biology* 4: 485-492.
- Ghasemnezhad, M., M. Sherafati, y G. A. Payvast. 2011. Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five coloured bell pepper (*Capsicum annuum*) fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods* 3: 44-49.

- Glowacz, M., R. Colgan, y D. Rees. 2015. Influence of continuous exposure to gaseous ozone on the quality of red bell peppers, cucumbers and zucchini. *Postharvest Biology and Technology* 99: 1-8.
- Gopinath, K., S. Saha, B. Mina, H. Pande, A. Srivastva, y H. Gupta. 2009. Bell pepper yield and soil properties during conversion from conventional to organic production in Indian Himalayas. *Scientia Horticulturae* 122: 339-345.
- Guil-Guerrero, J., C. Martínez-Guirado, M. del Mar Reboloso-Fuentes, y A. Carrique-Pérez. 2006. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *European Food Research and Technology* 224: 1-9.
- Havsteen, B. H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67-202.
- Henry, G., P. Thonart, y M. Ongena. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. *Revue de Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 16: 257-268.
- Heredía, J. B., y L. Cisneros-Zevallos. 2009. The effects of exogenous ethylene and methyl jasmonate on the accumulation of phenolic antioxidants in selected whole and wounded fresh produce. *Food Chemistry* 115: 1500-1508.
- Hernández-Fuentes, A. D., R. C. Montiel, y J. Pinedo-Espinoza. 2010. Comportamiento poscosecha de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) var. California por efecto de la fertilización química y la aplicación de *Lombrihumu*. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 11: 82-91.
- Hernández-Hernández, F., I. L. López Cruz, R. G. Guevara-González, E. Rico-García, V. R. Ocampo-Velásquez, G. Herrera-Ruiz, M. M. Gonzalez-Chavira, y I. Torres-Pacheco. 2011. Simulación del crecimiento y desarrollo de pimiento (*Capsicum annumm* L.) bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2: 385-397.
- Hervert-Hernández, D., S. G. Sáyago-Ayerdi, y I. Goñi. 2010. Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3399-3406.

- Howard, L., S. Talcott, C. Brenes, y B. Villalon. 2000. Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1713-1720.
- Howard, L. R., J. R. Clark, y C. Brownmiller. 2003. Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 1238-1247.
- Hwang, I. G., Y. J. Shin, S. Lee, J. Lee, y S. M. Yoo. 2012. Effects of different cooking methods on the antioxidant properties of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Preventive Nutrition and Food Science* 17: 286.
- Jeong, G.-T., y D.-H. Park. 2005. Enhancement of growth and secondary metabolite biosynthesis: Effect of elicitors derived from plants and insects. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 10: 73-77.
- Jin-Hua, D., F. Mao-Run, L. Miao-Miao, y X. Wei. 2007. Effects of chlorine dioxide gas on postharvest physiology and storage quality of green bell pepper (*Capsicum frutescens* L. var. Longrum). *Agricultural Sciences in China* 6: 214-219.
- Kim, G. D., Y. S. Lee, J.-Y. Cho, Y. H. Lee, K. J. Choi, Y. Lee, T.-H. Han, S.-H. Lee, K.-H. Park, y J.-H. Moon. 2010. Comparison of the content of bioactive substances and the inhibitory effects against rat plasma oxidation of conventional and organic hot peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 12300-12306.
- Kim, H.-J., F. Chen, X. Wang, y N. C. Rajapakse. 2005. Effect of chitosan on the biological properties of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 3696-3701.
- Koskineemi, C. B., V.-D. Truong, R. F. McFeeters, y J. Simunovic. 2013. Quality evaluation of packaged acidified vegetables subjected to continuous microwave pasteurization. *LWT-Food Science and Technology* 54: 157-164.
- Krinsky, N. I., y E. J. Johnson. 2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 459-516.

- Ladrón de Guevara, R. G., M. Gonzalez, M. J. García-Meseguer, J. M. Nieto, M. Amo, y R. Varón. 2002. Effect of adding natural antioxidants on colour stability of paprika. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: 1061-1069.
- Lang, Y., H. Kisaka, R. Sugiyama, K. Nomura, A. Morita, T. Watanabe, Y. Tanaka, S. Yazawa, y T. Miwa. 2009. Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 Sweet. *The Plant Journal* 59: 953-961.
- Lawrence, P. K., y K. R. Koundal. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5: 5-6.
- Lee, J. J., K. M. Crosby, L. M. Pike, K. S. Yoo, y D. I. Leskovar. 2005. Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). *Scientia Horticulturae* 106: 341-352.
- Lešková, E., J. Kubíková, E. Kováčiková, M. Košická, J. Porubská, y K. Holčíková. 2006. Vitamin losses: retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 252-276.
- Liang, Y.-L., X. Wu, J.-J. Zhu, M.-J. Zhou, y Q. Peng. 2011. Response of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) to mulching practices under planted greenhouse condition. *Agricultural Water Management* 99: 111-120.
- Liu, G.-N., Y.-H. Zhu, y J.-G. Jiang. 2009. The metabolomics of carotenoids in engineered cell factory. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83: 989-999.
- López, J., E. Uribe, A. Vega-Gálvez, M. Miranda, J. Vergara, E. Gonzalez, y K. Di Scala. 2010. Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin C, antioxidant activity, total phenolic content, non-enzymatic browning and firmness of blueberries variety O Neil. *Food and Bioprocess Technology* 3: 772-777.
- Luo, X.-J., J. Peng, y Y.-J. Li. 2011. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology* 650: 1-7.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, y L. Jiménez. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.

- Marín, A., F. Ferreres, F. A. Tomás-Barberán, y M. I. Gil. 2004. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 3861-3869.
- Marín, A., M. a. I. Gil, P. Flores, P. Hellín, y M. a. V. Selma. 2008. Microbial quality and bioactive constituents of sweet peppers from sustainable production systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 11334-11341.
- Martínez, S., M. López, M. González-Raurich, y A. Bernardo Alvarez. 2005. The effects of ripening stage and processing systems on vitamin C content in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 56: 45-51.
- Materska, M., y I. Perucka. 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1750-1756.
- Mazid, M., K. TA, y F. Mohammad. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3: 232-249.
- Meir, S., I. Rosenberger, Z. Aharon, S. Grinberg, y E. Fallik. 1995. Improvement of the postharvest keeping quality and colour development of bell pepper (cv.'Maor') by packaging with polyethylene bags at a reduced temperature. *Postharvest Biology and Technology* 5: 303-309.
- Mejía-Teniente, L., I. Torres-Pacheco, M. M. González-Chavira, R. V. Ocampo-Velazquez, G. Herrera-Ruiz, A. M. Chapa-Oliver, y R. G. Guevara-González. 2010. Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *African Journal of Biotechnology* 9: 9155-9162.
- Menichini, F., R. Tundis, M. Bonesi, M. R. Loizzo, F. Conforti, G. Statti, B. De Cindio, P. J. Houghton, y F. Menichini. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry* 114: 553-560.
- Moon, J.-K., y T. Shibamoto. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1655-1666.

- Moretti, C., L. Mattos, A. Calbo, y S. Sargent. 2010. Climate changes and potential impacts on postharvest quality of fruit and vegetable crops: a review. *Food Research International* 43: 1824-1832.
- Mózner, Z., A. Tabi, y M. Csutora. 2012. Modifying the yield factor based on more efficient use of fertilizer—The environmental impacts of intensive and extensive agricultural practices. *Ecological Indicators* 16: 58-66.
- Naczk, M., y F. Shahidi. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054: 95-111.
- Navarro, J. M., P. Flores, C. Garrido, y V. Martinez. 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry* 96: 66-73.
- Ncube, B., J. Finnie, y J. Van Staden. 2012. Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*.
- Nemecek, T., D. Dubois, O. Huguenin-Elie, y G. Gaillard. 2011. Life cycle assessment of Swiss farming systems: I. Integrated and organic farming. *Agricultural Systems* 104: 217-232.
- Neugart, S., M. Fiol, M. Schreiner, S. Rohn, R. Zrenner, L. W. Kroh, y A. Krumbein. 2014. Interaction of Moderate UV-B Exposure and Temperature on the Formation of Structurally Different Flavonol Glycosides and Hydroxycinnamic Acid Derivatives in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 4054-4062.
- Niizu, P. Y., y D. B. Rodriguez-Amaya. 2005. New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis* 18: 739-749.
- Niklis, N. D., A. S. Siomos, y E. M. Sfakiotakis. 2002. Ascorbic acid, soluble solids and dry matter content in sweet pepper fruit: change during ripening. *Journal of Vegetable Crop Production* 8: 41-51.
- NOM-053-ECOL-1993. 1993. NOM-053-ECOL-1993. Instituto Nacional de Ecología, México.

- Nuez Viñals, F., y G. Ortega. 2003. Manejo en cultivo intensivo y extensivo El cultivo de pimientos, chiles y ajies. p 365-500. Mundi-Prensa, España.
- Oomah, B. D., A. Cardador-Martínez, y G. Loarca-Piña. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 935-942.
- Ornelas-Paz, J. d. J., L. A. Cira-Chávez, A. A. Gardea-Béjar, J. C. Guevara-Arauz, D. R. Sepúlveda, J. Reyes-Hernández, y S. Ruiz-Cruz. 2013. Effect of heat treatment on the content of some bioactive compounds and free radical-scavenging activity in pungent and non-pungent peppers. Food Research International 50: 519-525.
- Ornelas-Paz, J. d. J., J. M. Martínez-Burrola, S. Ruiz-Cruz, V. Santana-Rodríguez, V. Ibarra-Junquera, G. I. Olivas, y J. D. Pérez-Martínez. 2010. Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. Food Chemistry 119: 1619-1625.
- Parađiković, N., T. Vinković, I. Vinković Vrček, I. Žuntar, M. Bojić, y M. Medić-Šarić. 2011. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. Journal of the Science of Food and Agriculture 91: 2146-2152.
- Park, J., S. Kim, y B. Moon. 2011. Changes in carotenoids, ascorbic acids, and quality characteristics by the pickling of paprika (*Capsicum annuum* L.) cultivated in Korea. Journal of Food Science 76: C1075-C1080.
- Pérez-López, A. J., J. M. López-Nicolas, E. Núñez-Delicado, F. M. d. Amor, y Á. A. Carbonell-Barrachina. 2007. Effects of agricultural practices on color, carotenoids composition, and minerals contents of sweet peppers, cv. Almuden. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55: 8158-8164.
- Pérez-López, A. J., F. M. del Amor, A. Serrano-Martínez, M. I. Fortea, y E. Núñez-Delicado. 2007. Influence of agricultural practices on the quality of sweet pepper fruits as affected by the maturity stage. Journal of the Science of Food and Agriculture 87: 2075-2080.
- Petrov, V. D., y F. Van Breusegem. 2012. Hydrogen peroxide-a central hub for information flow in plant cells. AoB Plants: 1-13.

- Pogoń, K., G. Jaworska, A. Duda-Chodak, y I. Maciejaszek. 2013. Influence of the culinary treatment on the quality of *Lactarius deliciosus*. *Foods* 2: 238-253.
- Puerta-Gomez, A. F., y L. Cisneros-Zevallos. 2011. Postharvest studies beyond fresh market eating quality: Phytochemical antioxidant changes in peach and plum fruit during ripening and advanced senescence. *Postharvest Biology and Technology* 60: 220-224.
- Puls, W. 1996. Pharmacology of glucosidase inhibitors Oral Antidiabetics. p 497-534. Springer, New York, USA.
- Que, F., L. Mao, X. Fang, y T. Wu. 2008. Comparison of hot air drying and freeze drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours. *International Journal of Food Science & Technology* 43: 1195-1201.
- Ramachandra Rao, S., y G. Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101-153.
- Ramírez, H., O. Méndez-Paredes, A. Benavides-Mendoza, y C. Amado-Ramírez. 2009. Influencia de prohexadiona-Ca y promotores de oxidación sobre el rendimiento, capsaicina y vitamina C en chile jalapeño. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 15: 231-236.
- Rao, T. R., N. B. Gol, y K. K. Shah. 2011. Effect of postharvest treatments and storage temperatures on the quality and shelf life of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticulturae* 132: 18-26.
- Redman, A. M., D. F. Cipollini Jr, y J. C. Schultz. 2001. Fitness costs of jasmonic acid-induced defense in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Oecologia* 126: 380-385.
- Riveros Angarita, A. S. 2010. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica.
- Rohwer, C., y J. Erwin. 2008. Horticultural applications of jasmonates: a review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 83: 283-304.
- Roussos, P., N. Denaxa, y T. Damvakaris. 2009. Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. *Scientia Horticulturae* 119: 138-146.

- Roy, M. K., M. Takenaka, S. Isobe, y T. Tsushida. 2007. Antioxidant potential, anti-proliferative activities, and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry* 103: 106-114.
- Rubio-Pino, J., S. Iloki-Assanga, L. Lewis-Lujan, C. Meza-Cueto, A. Gil-Salido, A. Acosta-Silva, E. Rivera-Castañeda, y Y. Lipovka. 2010. Caracterización química, nutrimental y evaluación de la actividad biológica in vitro de los chiles habanero (*Capsicum chinense*), chiltepín (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*), morrón verde y rojo (*Capsicum annuum* L.).
- Ruiz-García, Y., y E. Gómez-Plaza. 2013. Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture* 3: 33-52.
- SAGARPA. 2008. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Base de datos.
- Sarkar, S. K., y R. E. Howarth. 1976. Specificity of the vanillin test for flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24: 317-320.
- Sasahara, I., Y. Furuhashi, Y. Iwasaki, N. Inoue, H. Sato, T. Watanabe, y M. Takahashi. 2010. Assessment of the biological similarity of three capsaicin analogs (Capsinoids) found in non-pungent chili pepper (CH-19 Sweet) fruits. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 74: 274-278.
- Schmidt, S., M. Zietz, M. Schreiner, S. Rohn, L. W. Kroh, y A. Krumbein. 2010. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chemistry* 119: 1293-1299.
- Schreiner, M. 2005. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition* 44: 85-94.
- Schreiner, M., y S. Huyskens-Keil. 2006. Phytochemicals in fruit and vegetables: health promotion and postharvest elicitors. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 267-278.
- Sepúlveda-Jiménez, G., H. Porta-Ducoing, y M. Rocha-Sosa. 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 355-363.

- Serrano, M., P. J. Zapata, S. Castillo, F. Guillén, D. Martínez-Romero, y D. Valero. 2010. Antioxidant and nutritive constituents during sweet pepper development and ripening are enhanced by nitrophenolate treatments. *Food Chemistry* 118: 497-503.
- Shafiee, M., T. Taghavi, y M. Babalar. 2010. Addition of salicylic acid to nutrient solution combined with postharvest treatments (hot water, salicylic acid, and calcium dipping) improved postharvest fruit quality of strawberry. *Scientia Horticulturae* 124: 40-45.
- Shahidi, F., y M. Naczk. 1995. Method of analysis and quantification of phenolic compounds. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*: 483-544.
- Shotorbani, N. Y., R. Jamei, y R. Heidari. 2013. Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L. varieties phenolic extracts and the effects of thermal treatment. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 3: 23-54.
- SIAP. 2010. Un panorama del cultivo de chile. .
- Sikora, E., E. Cieślik, T. Leszczyńska, A. Filipiak-Florkiewicz, y P. M. Pisulewski. 2008. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry* 107: 55-59.
- SSA. 2007. Programa Nacional de Salud 2007–2012. México, DF: Secretaria de Salud.
- Stefanelli, D., I. Goodwin, y R. Jones. 2010. Minimal nitrogen and water use in horticulture: Effects on quality and content of selected nutrients. *Food Research International* 43: 1833-1843.
- Sun, T., Z. Xu, C. T. Wu, M. Janes, W. Prinyawiwatkul, y H. No. 2007. Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science* 72: S98-S102.
- Terry, L. A., y D. C. Joyce. 2004. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. *Postharvest Biology and Technology* 32: 1-13.
- Tierranegra-García, N., P. Salinas-Soto, I. Torres-Pacheco, R. V. Ocampo-Velázquez, E. Rico-García, S. O. Mendoza-Díaz, A. A. Feregrino-Pérez, A. Mercado-Luna, M. Vargas-Hernandez, y G. M. Soto-Zarazúa. 2011. Effect of

- foliar salicylic acid and methyl jasmonate applications on protection against pill-bugs in lettuce plants (*Lactuca sativa*). *Phytoparasitica* 39: 137-144.
- Tiwari, A., A. Vivian-Smith, K. Ljung, R. Offringa, y E. Heuvelink. 2013. Physiological and morphological changes during early and later stages of fruit growth in *Capsicum annuum*. *Physiologia Plantarum* 147: 396-406.
- Turkmen, N., F. Sari, y Y. S. Velioglu. 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry* 93: 713-718.
- Turrent, A., y R. Laird. 1975. La matriz experimental Plan Puebla, para ensayos sobre prácticas de producción de cultivos. *Agrociencia* 19: 117-143.
- Valencia, A., A. E. Bustillo, G. E. Ossa, y M. J. Chrispeels. 2000. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 207-213.
- Vázquez-Flota, F., M. Miranda-Ham, M. Monforte-González, G. Gutiérrez-Carbajal, C. Velázquez-García, y Y. Nieto-Pelayo. 2007. La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30: 353-360.
- Velioglu, Y., G. Mazza, L. Gao, y B. Oomah. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4113-4117.
- Wahyuni, Y., A.-R. Ballester, E. Sudarmonowati, R. J. Bino, y A. G. Bovy. 2011. Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72: 1358-1370.
- Warabieda, W., y R. Olszak. 2010. Effect of exogenous methyl jasmonate on numerical growth of the population of the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch.) on strawberry plants and young apple trees. *Journal of Plant Protection Research* 50: 541-544.
- Wasternack, C., y B. Hause. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72: 165-221.

- Xia, J., R. Mandal, I. V. Sinelnikov, D. Broadhurst, y D. S. Wishart. 2012. MetaboAnalyst 2.0—a comprehensive server for metabolomic data analysis. *Nucleic Acids Research* 40: W127-W133.
- Yahia, E. M., y J. d. J. Ornelas Paz. 2010. Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. In: L. A. de la Rosa, E. Alvarez-Parrilla y G. A. González-Aguilar (eds.) *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value, and Stability*. p 177-222. Blackwell Publissing, Oxford, UK.
- Zaki, N., A. Hakmaoui, A. Ouatmane, A. Hasib, y J. P. Fernández-Trujillo. 2013. Morphological characterization and quality evaluation of some cultivated paprika morphotypes (*Capsicum annuum* L.) from Tadmora-Azilal region of Morocco. *Food Science and Quality Management* 17: 25-33.
- Zhang, H., y J. Memelink. 2009. Regulation of secondary metabolism by jasmonate hormones. In: A. E. Osbourn y V. Lanzotti (eds.) *Plant-derived Natural Products*. p 181-194. Springer, New York, N.Y., USA.
- Zhao, J., L. C. Davis, y R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 23: 283-333.
- Züst, T., B. Joseph, K. K. Shimizu, D. J. Kliebenstein, y L. A. Turnbull. 2011. Using knockout mutants to reveal the growth costs of defensive traits. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*: 2598-2603.

APÉNDICES

APÉNDICE I

1.1. Métodos para la evaluación del suelo

Métodos usados para las determinaciones de laboratorio e información adicional para la interpretación de los resultados analíticos.

Textura: se define como la proporción relativa de grupos de partículas de diferentes dimensiones: arena, limo y arcilla. El método a utilizar es el de Bouyoucos. El tiempo de lectura se ha escogido de 40 segundos para la separación de partículas mayores de 0.05 mm (arena) y de 2 horas para partículas de diámetro mayores a 0.002 mm (arcillas). Límite establecido por la USDA.

Porcentaje de saturación: es el porcentaje máximo de retención de agua por el suelo (en base a su peso seco), se obtiene a partir del método e Richards al preparar la pasta saturada para obtener el extracto de saturación.

Capacidad de Campo: es el agua que retiene el suelo después de que ha cesado el movimiento gravitacional, es decir a una tensión de 30 centibars o 0.3 Atm. En muestras alteradas se obtiene a partir del punto de saturación en base a relaciones que se han observado en un grupo amplio de suelos. Para su determinación se usa la siguiente fórmula; $H_{cc} (\%) = 0.75 (\%)$ de saturación.

Punto de Marchitez Permanente: es la cantidad de agua del suelo cuando se encuentra retenida a 15 atmósferas y en general a este contenido de humedad la planta se marchita. Su determinación se realiza por la siguiente fórmula: $H_{pmp} (\%) = (H_{cc}/2) + 5\%$.

pH: la medición de pH se realiza directamente en la pasta con el uso de un potenciómetro. Se realiza en relación 1:2 ya sea en agua o en $CaCl_2$ 0.05 M. La determinación en $CaCl_2$ es alrededor de media unidad más baja que en agua. El pH indica si es un suelo ácido o alcalino y nos indica si es necesario adicional cal. Cuando el suelo presenta un pH menor a 5.5, determinado en agua, se requiere aplicar cal. Un suelo con un pH superior a 8 es posible que requiere adicionársele yeso agrícola. Un suelo alcalina presenta problemas de disponibilidad de micronutrientes y en algunos casos de fósforo.

Carbonatos: La presencia de carbonatos propicia la alcalinidad del suelo. Se determinan mediante el método del cálcmetro y se considera un suelo calcáreo cuando presenta más de 5% de carbonato totales. Suelos altamente calcáreos pueden presentar problemas con la disponibilidad de P, Fe, Zn, Mn y Cu. Cuando no hay carbonatos en el suelo no se debe agregar ácido sulfúrico para rehabilitar un suelo sódico.

Materia Orgánica (MO): esa determinación se realiza mediante el Método de Walkley y Black. Este parámetro está muy asociado con las características físicas del suelo y con la disponibilidad de micronutrientes. Suelos pobres en materia orgánica, retienen menos agua y nutrientes y presentan más pobres propiedades físicas. En suelos con pH moderadamente alcalino con bajos contenidos de materia orgánica es común que se presenten problemas de disponibilidad de Zn.

Nitrógeno inorgánico (N-Inorg): La única manera de saber si un suelo es rico o pobre en nitrógeno es mediante la determinación del nitrógeno disponible, pues la determinación de N total no tiene ningún valor para los fines de diagnóstico. El N es el elemento más limitativo en casi todos los suelos por lo que hay que suministrarlo de diferentes formas. Se extrae mediante una solución de cloruro de potasio 2 N y se analiza por destilación con óxido de magnesio y aleación devarda.

Fósforo (P-Bray o P-Olsen): se determina mediante los métodos de Olsen o Bray 1, según se indique en el reporte. El método Bray 1 se usa para suelos ácidos o neutros y el método Olsen para suelos neutros o alcalinos. Este último método es el que se usa por excelencia en los suelos calcáreos. A partir del análisis de P se decide si se aplica o no fertilizante fosfatado al suelo. Este es uno de los métodos más confiables para determinar la necesidad de fertilizar el suelo, así como su dosis aproximada. Los niveles críticos para decidir la aplicación de fósforo, son de 10 ppm para el método de Olsen y 25 ppm para el método de Bray. En suelos muy ácidos o con altas cantidades de carbonatos es necesario agregar una cantidad adicional de P por encima de la dosis que se aplica en suelos normales.

Potasio (K): éste se extrae con acetato de amonio 1 N y pH 7 y se cuantifica por absorción atómica o mediante ICP. Los valores críticos son de 75 o 100 ppm en suelos tropicales degradados o de 150-250 ppm en suelos de zonas áridas y templadas. Pero en los cultivos de alta semanda se acostumbra a fertilizar aun en concentraciones mayores a estos niveles.

Calcio (Ca): mismo método de extracción y análisis que el K. Los valores críticos son de 500 y 700 ppm, aunque también depende de la proporción que ocupa de la CIC y del pH del suelo.

Magnesio (Mg): mismo método de extracción y análisis que el K. Los valores críticos van de 50 a 100 ppm, aunque también depende de la proporción que ocupe este catión de la CIC.

Nota: Ca y Mg en suelos calcáreos se extraen con acetato de amonio 1N pH de 8.5, pues las extracciones a pH 7, propician la liberación de estos elementos provenientes de los carbonatos del suelo, originando una sobrestimación de la disponibilidad. Para pasar de la concentración de ppm a meq/100 g se dividen los valores en unidades de ppm entre los factores de 200.4, 121.6, 391.0 y 230.0, respectivamente para Ca, Mg, K y Na.

Relaciones nutrimentales: las relaciones nutrimentales se reportan para dar más elementos de análisis al interpretador, aunque en general no se han encontrado que den más elementos de diagnóstico que el criterio basado en el nivel crítico.

Sodio (Na): el sodio es un elemento nocivo para el suelo, pues deteriora las propiedades físicas del suelo, reduciendo su nivel de infiltración y afectando en algunos casos la aireación del suelo. Cuando el % que ocupa de la CIC (PSI) rebasa el 5% en suelos de textura fina se considera inadecuado o cuando es mayor de 10% en suelos de textura gruesa. La forma de atacar un problema de sodio es mediante el suministro de yeso agrícola o bien mediante azufre o ácido sulfúrico, cuando se trata de suelos calcáreos. La dosis de yeso depende del nivel de sodio y de la CIC del suelo.

Fe, Cu, Zn, Mn: son determinados por extracción con DTPA y cuantificados por absorción atómica o mediante ICP. Los niveles críticos considerados para estos micronutrientes se indican a continuación.

Elemento	Valor Crítico (ppm)
Hierro (Fe)	5.0
Cinc (Zn)	1.0
Manganeso (Mn)	5.0
Cobre (Cu)	0.5

Los valores de arriba mencionados son solo indicativos, pues la disponibilidad de los micronutrientes se ve afectada también por el pH del suelo. Entre más alto sea el pH, mayor puede ser el nivel crítico y también más alta debe ser la dosis de elemento a aplicar al suelo.

Boro: se extrae mediante una solución caliente de cloruro de calcio. Su nivel crítico es del orden de 0.6 a 1 ppm y es tóxico en niveles de 4 ppm, tomando en cuenta que este valor varía con la especie vegetal y tipo de suelo.

Azufre: la determinación de S se realiza en suelos ácido normalmente, pues lo suelos de las regiones templadas y semiáridas es muy difícil que presenten problemas de disponibilidad. Se extrae con cloruro de calcio y se cuantifica turbidimétricamente. El nivel crítico es de 5 ppm.

APÉNDICE II

2.1 *Ensayo de la vainillina y principio de la determinación de taninos condensados*

La vainillina protocolada es un radical electrofílico débil que reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto intermedio de esta reacción se deshidrata rápidamente para dar un compuesto de color rosa ligero a un intenso rojo cereza producto coloreado. La reacción se verifica entre la vainillina y los flavonoides como (+)-catequina. La estabilidad del color del aducto vainillina-tanino puede incrementarse cuando la reacción ocurre en la oscuridad y se controla la temperatura de reacción; entonces se obtienen resultados exactos y reproducibles (Shahidi y Naczk, 1995).

Este ensayo se basa en la elevada reactividad de los compuestos fenólicos con los aldehídos en medio ácido. La reactividad de los núcleos floroglucinol con aldehídos se conoce desde hace tiempo, siendo populares los procedimientos colorimétricos que utilizan benzaldehídos sustituidos. El más utilizado es la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) (Butler, 1982). Los aldehídos están protonados en su grupo carbonil-oxígeno, en soluciones ácidas fuertes y forman carbocationes electrolíticos.

El ensayo de vainillina es específico para los flavan 3-ol, dihidrochalconas y proantocianinas y el metanol es usualmente utilizado como solvente (Naczk y Shahidi, 2004). La secuencia de reacción de condensación de la vainillina con (-)-epicatequina se representa en la **Figura 20**.

El método de vainillina puede ser usado para cuantificar taninos en el rango de 5-500 µg. Por otra parte, los polifenoles hidrolizables no dan reacción. Sin embargo, algunos anillos heteroaromáticos ricos en electrones (como por ejemplo pirrol o indol) y algunas dihidrochalconas (como floretina y florizina) reaccionan positivamente con la vainillina (Sarkar y Howarth, 1976). Las antocianidinas pueden interferir sustancialmente en el ensayo de la vainillina, hecho que debe ser corregido

por sustracción con un blanco (Broadhurst y Jones, 1978; Deshpande y Cheryan, 1987; Sarkar y Howarth, 1976).

La cinética de la reacción del ensayo de vainillina depende de la estructura química de la muestra. Para que el ensayo de vainillina produzca resultados óptimos el tiempo de reacción para la (+)-catequina es de 15 minutos. Asimismo, el contenido en agua de la muestra debe ser bajo (ya que de lo contrario se produce una disminución de la absorbancia). La absorbancia (que disminuye por efecto de la luz directa sobre la reacción) de los productos formados durante el ensayo se mide a 500 nm. La clorofila y el ácido ascórbico son compuestos que interfieren en esta reacción (Naczki y Shahidi, 2004).

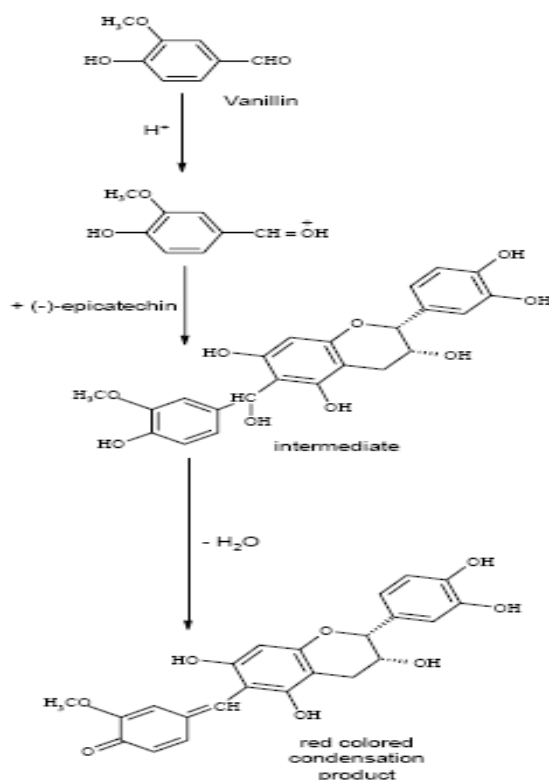


Figura 20. Condensación de la vainillina con (-)-epicatequina.

APÉNDICE III

3.1 *Preparación de soluciones para la determinación de taninos condensados.*

3.1.1 Soluciones

- Ácido clorhídrico 8% en metanol (1 litro): tomar 216 mL de HCl concentración 37% y aforar a 1000 ml. con metanol). Refrigerar. Fórmula $C_1V_1=C_2V_2$. Se considera pureza del HCl de 37%.
- Ácido clorhídrico 4% en metanol (1/2 litro): tomar 54 mL de HCl concentración 37% y aforar a 500 ml con metanol). Refrigerar.
- Vainillina al 1% en metanol (1 litro): pesar 10 g de vainillina y aforar a 1000 mL con metanol). Refrigerar.
- Solución (1:1) de HCl 8%:vainillina 1% (tomar 10 mL de cada reactivo y mezclar= 20 mL). Se prepara al momento de emplearse. No reutilizar.

3.1.2 Curva de calibración

Concentraciones: 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/mL de (+) catequina. Realizar por duplicado la curva, sacar la media de la absorbancia y determinar la ecuación de la recta y la R^2 , la cual debe ser 1 ó 0.99. Las soluciones se preparan al momento de trabajar. No reutilizar.

1. Pesar 0.008 g de (+) catequina y aforar a 10 mL con metanol.
2. De la solución anterior tomar 3.75 mL y aforar a 5 mL con metanol.
3. De la solución anterior tomar 3.33 mL y aforar a 5 mL con metanol.
4. De la solución anterior tomar 2.5 mL y aforar a 5 mL con metanol.
5. De la solución anterior tomar 2.5 mL y aforar a 5 mL con metanol.

3.2 *Preparación de soluciones para la determinación de actividad antioxidante por DPPH.*

- DPPH (100 μ M): se cubre con papel aluminio un matraz aforado de 25 mL y se pesan en él 0.0015 g de DPPH, el cual se reserva para momentos posteriores. El aforo se realiza con metanol al 80%. Se usa recién preparada.
- BHT (100 μ M): pesar 1.1 mg de BHT y aforar con metanol 80% a 50 mL.
- Metanol 80%: medir 200 mL de metanol y aforar a 250 mL.

3.2.1 Curva de calibración

- Trolox (800 μ M): pesar 2 mg de Trolox y aforar a 10 mL con metanol 80%. Para realizar las diluciones (700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 μ M) seguir el siguiente procedimiento:
 1. De la solución anterior tomar 4.375 mL y aforar a 5 mL con metanol.
 2. De la solución anterior tomar 4.285 mL y aforar a 5 mL con metanol.
 3. De la solución anterior tomar 4.167 mL y aforar a 5 mL con metanol.
 4. De la solución anterior tomar 4 mL y aforar a 5 mL con metanol.
 5. De la solución anterior tomar 3.75 mL y aforar a 5 mL con metanol.
 6. De la solución anterior tomar 3.333 mL y aforar a 5 mL con metanol.
 7. De la solución anterior tomar 2.5 mL y aforar a 5 mL con metanol.
 8. De la solución anterior tomar 2.5 ml y aforar a 5 mL con metanol.

Cuadro 22. Masa molecular de reactivos utilizados.

Reactivo	Masa molecular (g/mol)
HCl	36.5
Trolox	250.29
DPPH	618.74
BHT	220.35

3.3 Preparación de soluciones para la determinación de flavonoides

3.3.1 Soluciones

- 2-aminoetildifenil borato 1%: se pesaron 0.1 g de 2-aminoetildifenil borato y se aforaron a 10 mL con metanol.

3.3.2 Curva de calibración

- Solución stock de rutina: se pesaron 0.025g de rutina y se aforaron a 10 mL con metanol. Solución a concentración de 2.5mg/ml. Para la preparación de las diluciones 200, 150, 100, 50, 25, 10, 5 y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se realizó el siguiente procedimiento por duplicado:
- Tomar 800 μL de la solución stock y disolver en 10 mL.
- De la solución anterior tomar 7.5 mL y aforar a 10 mL.
- De la solución anterior tomar 6.67 mL y aforar a 10 mL.
- De la solución anterior tomar 5 mL y aforar a 10 mL.
- De la solución anterior tomar 5 mL y aforar a 10 mL.
- De la solución anterior tomar 4 mL y aforar a 10 mL.
- De la solución anterior tomar 5 mL y aforar a 10 mL.
- De la solución anterior tomar 4 mL y aforar a 10 mL.

3.4 Preparación de soluciones para la determinación cromatográfica de ácido ascórbico.

3.4.1 Curva de calibración

Para preparar soluciones de 230, 180, 140, 100, 75, 50, 30, 20, 10 y 1 mg/L:

- Se pesaron 2.3 mg de ácido ascórbico y se aforaron con ácido o-fosfórico 4% a 10 mL.
- De la solución anterior tomar 3.913 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 3.888 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 3.571 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 3.750 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 3.333 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 3.000 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 3.333 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 2.500 mL y aforar a 5 mL.
- De la solución anterior tomar 0.5 mL y aforar a 5 mL.

3.5 Preparación de soluciones para flavonoides en HPLC.

3.5.1 Curva de calibración

- Se prepararon soluciones stock de los estándares a concentraciones de 2000 mg/L con acetonitrilo HPLC.
- Posteriormente se preparan diluciones a 50 mg/L para determinar los tiempos de retención (TR).

APÉNDICE IV

5.1 *Ensayo de actividad antioxidante (DPPH) paso por paso*

5.1.1 Preparación de las muestras

Se cubrió con papel aluminio un matraz aforado de 25 mL y se pesaron en él 0.0015 g de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), el cual se reserva para momentos posteriores. Primero se diluyó el DPPH en 20 mL de metanol y en seguida se completó el volumen con agua. Se sonicó por 10 minutos con el matraz cubierto de aluminio.

Para el BHT (control positivo) se preparó una solución 100 μ M, disolviendo 1.1 mg en 50 mL de metanol.

Para la solución de Trolox se preparó un stock de 10 mL a una concentración de 1 mM, para lo cual se disolvieron 0.0025 g y se prepararon diluciones por duplicado de acuerdo al **Cuadro 23**.

Cuadro 23. Preparación de soluciones de Trolox para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH.

Concentración Trolox (μ M)	Volumen a tomar de la solución stock (μ L)	Volumen a completar con metanol (μ L)
50	50	950
100	100	900
200	200	800
300	300	700
400	400	600

500	500	500
600	600	400
700	700	300
800	800	200

En una placa de 96 pozos se añadieron 20 µl de la muestra en cada pozo según el diseño experimental mostrado en el **Cuadro 24**. Conforme se llenaron los pozos, se taparon con papel parafilm. La microplaca se leyó en el lector de microplacas a una $\lambda = 515$ nm (si no se cuenta con el filtro se puede leer a 540 o 500 nm) a 0, 4, 10, 30, 60, 90 minutos y 120 minutos. La placa se mantuvo cubierta y en la oscuridad a temperatura ambiente entre lecturas. Se realizó por duplicado.

Cuadro 24. Esquema de llenado de microplaca para la determinación de actividad antioxidante por el método de DPPH.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco ¹	Blanco	Blanco		T ₄₀₀	T ₄₀₀	T ₄₀₀					
B	Control ²	Control	Control		T ₅₀₀	T ₅₀₀	T ₅₀₀					
C	BHT ³	BHT	BHT		T ₆₀₀	T ₆₀₀	T ₆₀₀					
D	T ₅₀ ⁴	T ₅₀	T ₅₀		T ₇₀₀	T ₇₀₀	T ₇₀₀					
E	T ₁₀₀	T ₁₀₀	T ₁₀₀		T ₈₀₀	T ₈₀₀	T ₈₀₀					
F	T ₂₀₀	T ₂	T ₂		M ⁵	M	M					
G	T ₃₀₀	T ₃₀₀	T ₃₀₀									

1 Blanco: 20 µL de metanol más 200 µl de agua destilada o HPLC.

2 Control: metanol (control negativo): 20µL de metanol más 200 µl DPPH (100 µM).

3 BHT (Butirato de hidroxitolueno): 20µL de BHT (100 µM) más 200 µl de DPPH.

4 T: 20µL Trolox (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800µM) más 200 µl DPPH (100 µM).

5 M: muestras, 20µL de muestra más 200 µl de DPPH (100 µM).

5.1.2 Cálculo de la capacidad antioxidante

La actividad antirradical (% ARA) o el porcentaje de inhibición se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, usando la siguiente ecuación:

$$\%ARA = 100 * \frac{[A_{control} - A_{muestra}]}{A_{control}} \quad (3)$$

donde:

%ARA: actividad antirradical

$A_{muestra}$: absorbancia de la muestra a 515 nm

$A_{control}$: absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

Se realizó la cinética de inhibición para verificar a qué tiempo se neutraliza la actividad del estándar contra el DPPH. Ya que el DPPH se va oxidando y cambia su coloración de violeta a amarillo.

Con los resultados obtenidos se graficaron el porcentaje de inhibición vs la concentración de Trolox a los diferentes tiempos, así como el porcentaje de inhibición vs la concentración de Trolox a un tiempo en el que se haya estabilizado la lectura (en este caso fue de 60 minutos). Los resultados se expresaron como µmoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra fresca o seca. La curva de calibración se realizó por duplicado para minimizar el error.

5.2 *Ensayo de actividad antioxidante (ABTS) paso por paso*

5.2.1 Preparación de las muestras

El radical $ABTS^{\bullet+}$ se preparó doce horas antes de su uso. Para la preparación del radical (solución 7 mM) se pesaron 0.01920 g de ABTS y se aforó a 5 mL con agua destilada. Asimismo, se preparó una solución de 140 mM de

persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) pesando 0.1892 g del compuesto y se aforó a 5 mL con agua destilada. Posteriormente en un vial ámbar se pusieron 5 mL de la solución de ABTS y 88 μ L de la solución de persulfato de potasio. Esta solución permaneció doce horas en oscuridad para que se generara el radical. Transcurrido ese tiempo a 500 μ L del radical se le adicionaron 32 mL de etanol. La nueva solución debe tener una absorbancia entre 0.7 y 1 leída a 730 nm. Si la absorbancia es mayor se añade más etanol.

Se preparó también una solución stock de Trolox (1 mM) pesando 0.0025 g del compuesto y aforando a 10 mL con metanol. Posteriormente se realizaron diluciones de acuerdo al **Cuadro 25**.

Cuadro 25. Preparación de las soluciones de Trolox para la determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS.

Concentración Trolox (μ M)	Volumen a tomar de la solución stock (μ L)	Volumen a completar con metanol (μ L)
10	10	990
20	20	980
50	50	950
100	100	900
150	150	850
200	200	800
300	300	700
305	305	655

La placa de 96 pozos se llenó de acuerdo al **Cuadro 26** dependiendo de si se trataba de una muestra o estándar para la curva de calibración. El radical ABTS se adicionó tanto a las muestras de Trolox como a las muestras de pimiento y al control hasta el momento de realizar las lecturas.

Cuadro 26. Esquema de llenado de la microplaca para la determinación de actividad antioxidante por el método de ABTS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco ¹	Blanco	Blanco		T ₂₀₀	T ₂₀₀	T ₂₀₀					
B	Control ²	Control	Control		T ₃₀₀	T ₃₀₀	T ₃₀₀					
C	T ³ ₁₀	T ₁₀	T ₁₀		T ₃₀₅	T ₃₀₅	T ₃₀₅					
D	T ₂₀	T ₂₀	T ₂₀		M ⁴	M	M					
E	T ₅₀	T ₅₀	T ₅₀									
F	T ₁₀₀	T ₁₀₀	T ₁₀₀									
G	T ₁₅₀	T ₁₅₀	T ₁₅₀									

1 Blanco: 2030 µL de etanol más 20 µl de metanol.

2 Control: 230 µL de ABTS más 200 µl de metanol.

3 T: 230 µL de ABTS más 20 µL de la muestra del estándar de Trolox.

4 M: muestras, 230 µL de ABTS más 20 µl de la muestra metanólica.

5.2.2 Cálculo de la capacidad antioxidante

La actividad antirradical (% ARA) o porcentaje de inhibición se calculó como porcentaje de decoloración de ABTS, usando la siguiente ecuación:

$$\%ARA = 100 * \frac{[A_{control} - A_{muestra}]}{A_{control}} \quad (4)$$

donde:

% ARA: actividad antirradical

A_{muestra}: absorbancia de la muestra a 730 nm

A_{control} : absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

La curva de calibración se realizó por triplicado.

APÉNDICE V

5.1.1 Extracción de carotenoides para HPLC

1. Pesar 2 g de muestra fresca en un tubo eppendorf (tubo A)
2. Añadir 500 µl de etanol + BHT 0.1%. Agitar en vortex.
3. Calentar en agua a 80°C durante 5 min.
4. Agregar 10 µl de KOH 80%. Agitar en vortex.
5. Calentar (en termoblock si es posible) a 80°C durante 10 min.
6. Poner en hielo.
7. Añadir 500 µl de agua desionizada fria. Agitar.
8. Agregar 500 µL de hexano. Agitar vigorosamente.
9. Centrifugar a 14000 rpm, 4°C por 5 min.
10. Extraer de la fase superior (se ve oleosa) 400 µl y verter en un tubo nuevo Eppendorf. Agitar.
11. Extraer la fase superior 200 µL. Cuidar de no extraer sólidos y pasarla a otro tubo Eppendorf.
12. Evaporar el hexano con flujo de nitrógeno y conservar a -20°C protegidos de la luz.

Las muestras para inyección en HPLC se llevaron a cabo de la siguiente manera:

1. El contenido del tubo se resuspendió agregando 200 µl de etanol grado HPLC. Agitar.
2. Centrifugar durante 5 min, 4°C a 13500 rpm.
3. Extraer 100 µl y ponerlos en un inserto y posteriormente en viales ámbar.