



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de ingeniería
Doctorado en Ingeniería

“Producción de compuestos bioactivos en pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) con diferentes factores inductores de metabolitos secundarios en condiciones protegidas”.

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
“Doctor en Ingeniería”

Presenta:

“Sandra Neli Jiménez García”

Dirigido por:

“Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez”

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Presidente

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Secretario

Dr. Irineo Torres Pacheco

Vocal

Dr. Andrés Cruz Hernández

Suplente

Dr. Sergio de Jesús Romero Gómez

Suplente

Dr. Aurelio Domínguez González

Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Director de Investigación y Posgrado

**“Producción de Compuestos Bioactivos en Pimiento
Morrón (*Capsicum annuum* L.) con Diferentes
Factores Inductores de Metabolitos Secundarios en
Condiciones Protegidas”.**

por M. C. Sandra Neli Jiménez García.

RESUMEN

La calidad del fruto es un término complejo definido por una sofisticada cadena de procesos biológicos. Dichos procesos (metabolismo primario y secundario) involucra intercambios entre el fruto y su ambiente en el cual es desarrollado. Las condiciones de estrés que se aplican a los cultivos potencia la producción ya sea del metabolismo primario para resistencia de la planta o provoca una potencialización en la producción del metabolismo secundario para supervivencia y mejora de la planta, lo cual provoca un aumento en la producción de compuestos con efectos a la salud que pueden ser un valor agregado para el fruto. La integración cuantitativa de estos procesos para monitorear el comportamiento del fruto durante su desarrollo es una tarea que definitivamente debe involucrar la modelación matemática. Actualmente, el interés en la modelación matemática de los cambios en la calidad del fruto ha ido en aumento. Es posible a través de la modelación matemática evaluar la calidad de los productos finales para satisfacer las demandas del consumidor y para ajustar o mejorar las decisiones tomadas con relación a los calendarios de siembra y cosecha y para la comercialización de los frutos. Los modelos deben ser lo suficientemente mecánicos para proporcionar una descripción representativa de los procesos fisiológicos y explicar las variaciones en los rasgos de calidad de los frutos tomando en cuenta la producción de metabolitos secundarios y dar un valor agregado al fruto. Técnicas como el análisis de compuestos fitoquímicos pueden proporcionar información importante para establecer correlaciones entre los atributos de estos metabolitos tanto primarios como secundarios. Incluyendo dicha información en los modelos matemáticos puede ayudar a tener una comprensión más amplia de la interacción ambiente-metabolismo y su influencia en los atributos de calidad.

Palabras Clave: metabolitos secundarios, pimiento morrón, calidad, modelación matemática

SUMMARY

Fruit quality is a complex term defined by a sophisticated chain of biological processes. Such processes (primary and secondary metabolism) involve exchanges between the fruit and the environment in which it is developed. Stress conditions applying to the crop production capacity of either the primary metabolism of plant resistance or causes a potentiation in the production of secondary metabolism for survival and improvement of the floor, which causes an increase in the production of compounds with health effects that can be an added value to the fruit. The quantitative integration of these processes to monitor the behavior of the fruit during development is a task that should definitely involve mathematical modeling. Currently, interest in mathematical modeling of changes in fruit quality has increased. It is possible through mathematical modeling to assess the quality of the end products to meet consumer demands and to adjust or improve decisions regarding calendars for planting and harvesting and marketing of fruits. The mechanistic models should be enough to provide a representative description of the physiological processes and explain variations in the characteristics of fruit quality by taking into account the production of secondary metabolites and to add value to the fruit. Techniques such as phytochemicals analysis can provide important information to correlate these attributes both primary and secondary metabolites. Including this information in mathematical models can help to have a broader understanding of the environment - metabolism and its influence on the quality attributes of interaction.

Key words: secondary metabolites, sweet pepper, quality, mathematical modeling

AGRADECIMIENTOS.

- A la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez por darme la oportunidad de formar parte como su alumno del grupo de Biosistemas, agradezco su paciencia y sabios consejos, su ejemplo me brindó convicción y ambición para superarme día a día y llegar a la culminación de mi formación como una mejor persona y profesionalista, espero haber cumplido cabalmente con todas sus expectativas.
- Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González y Dr. Irineo Torres Pacheco, por su dedicación y compromiso en ayudarme a formarme como un investigador crítico y consciente en mi quehacer diario.
- A mis asesores por los valiosos consejos que ayudaron a enriquecer el contenido de este trabajo y a mi formación como Doctor en Ingeniería, les estoy infinitamente agradecido.
- A CONACyT por el apoyo brindado a través de la beca de estudios de posgrado, número de contrato 424202.
- A la Universidad Autónoma de Querétaro por todo el apoyo brindado a través de quienes hicieron posible el cumplimiento de cada uno de los requisitos para alcanzar el grado de Doctor en Ingeniería.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
I INTRODUCCIÓN	11
I.1 Antecedentes y Justificación.....	13
I.1.1 El pimiento (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	13
I.1.2 Metabolitos Secundarios.....	14
I.1.3 Factores que Inducen las Síntesis de Metabolitos Secundarios (FIMS).....	14
I.1.3.1 Estrés Abiótico y Biótico	14
I.1.3.2 Elicitores	15
I.2 Planteamiento del Problema	17
I.3 Hipótesis y Objetivos	18
I.3.1 Hipótesis General.....	18
I.3.2 Objetivo General.....	18
I.3.3 Objetivos Específicos.....	18
II REVISIÓN DE LITERATURA	19
II.1 Pimiento Morrón (<i>Capsicum annuum</i> L.).....	19
II.2 Producción de Vegetales en Invernadero.....	21
II.3 Metabolitos Secundarios en Plantas.....	21
II.3.1 Compuestos Fenólicos	23
v “Producción de Compuestos Bioactivos en Pimiento Morrón (<i>Capsicum annuum</i> L.) con Diferentes Factores Inductores de Metabolitos Secundarios en Condiciones Protegidas”.	

II.3.2	Flavonoides	24
II.3.3	Antocianinas	25
II.3.4	Carotenoides	26
II.3.5	Compuestos Antioxidantes	28
II.3.6	Capacidad antioxidante de los fitoquímicos del pimiento morrón.	29
II.4	Inductores de Metabolitos Secundarios (FIMs)	30
II.5	Calidad y producción de metabolitos secundarios	31
II.5.1	Evaluación Sensorial de la Calidad de Productos Hortícolas	33
II.5.2	Evaluación Bromatológica de la Calidad de Productos Hortícolas	33
III	METODOLOGÍA	35
III.1	Marco teórico	35
III.2	Metodología	36
III.2.1	Materiales.....	36
III.2.1.1	Material biológico.....	36
III.2.2	Métodos.....	36
III.2.2.1	Recolección y procesamiento de material biológico	36
III.2.3	Cuantificación de compuestos antioxidantes	36
III.2.3.1	Extracción metanólica.....	36
III.2.3.2	Determinación de Taninos Condensados.....	37
III.2.3.3	Determinación de Flavonoides	37
III.2.3.4	Determinación de Fenoles Totales.....	38
III.2.3.5	Determinación de Capacidad antioxidante por DPPH.....	39
III.2.3.5.1	Preparación de las muestras	39
III.2.3.5.2	Cálculo de la capacidad antioxidante.....	40
III.2.3.6	Determinación de capacidad antioxidante por ABTS.....	41

III.2.4	Cuantificación de Ácido Ascórbico por HPLC.	41
III.2.4.1	Extracción de Ácido Ascórbico	41
III.2.4.2	Cuantificación de Ácido Ascórbico	41
III.2.5	Cuantificación de Carotenoides por HPLC.....	42
III.2.5.1	Extracción de Carotenoides	42
III.2.5.2	Cuantificación de Carotenoides	42
III.2.6	Cuantificación de Flavonoides por HPLC.	43
III.2.6.1	Extracción de Flavonoides	43
III.2.6.2	Cuantificación de Flavonoides.....	43
III.2.7	Cuantificación de Flavonoides por GC-MS.....	43
III.2.8	Perfil Sensorial Descriptivo	44
III.2.9	Análisis Bromatológico en el pimiento morrón.....	46
III.3	Análisis estadístico.....	46
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
IV.1	Contenido de Fenoles totales, flavonoides y taninos en los diferentes colores de pimientos morrones.....	48
IV.1.1	Fenoles Totales	48
IV.1.2	Flavonoides Totales	50
IV.1.3	Taninos Condensables Totales.....	51
IV.1.4	Carotenoides totales en los diferentes colores de pimiento morrón	52
IV.1.5	Antocianinas en los diferentes colores de pimiento.....	53
IV.1.6	Capacidad antioxidante en los diferentes colores de pimiento	56
IV.1.7	Correlación entre los metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante.....	58
IV.1.8	Identificación y cuantificación de Ácido Ascórbico por HPLC en los diferentes colores de pimiento	60

IV.1.9	Identificación y cuantificación de Carotenoides por HPLC en los diferentes colores de pimiento.....	61
IV.1.10	Identificación y cuantificación de Flavonoides por HPLC en los diferentes colores de pimiento	65
IV.1.11	Identificación de moléculas de bajo peso molecular por GC-MS en pimiento morrón	69
IV.1.12	Perfil metabólica de pimiento morrón (<i>C. annuum</i> L.) con elicitores	71
IV.2	Evaluación sensorial en los diferentes colores de pimiento.....	76
IV.3	Análisis Bromatológico en los diferentes colores de pimiento morrón.....	83
V	CONCLUSIONES.....	86
VI	BIBLIOGRAFÍA	87
ANEXO 1.....		97
ANEXO 2.....		98
ANEXO 3.....		99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III.1 Distribución de compuestos para curva de calibración.	38
Tabla III.2 Diseño experimental	40
Tabla III.3 Descriptores sensoriales utilizados en las sesiones por el panel de evaluadores	45
Tabla IV.1 Contenido de flavonoides, taninos, y fenoles en los diferentes colores de pimiento morrón.	50
Tabla IV.2 Contenido de Carotenoides totales en los diferentes colores de pimiento morrón....	53
Tabla IV.3 Contenido de Antocianinas en los diferentes colores de pimiento morrón.	55
Tabla IV.4 ABTS y DPPH- capacidad antioxidante de los tres diferentes colores de pimiento morrón.....	57
Tabla IV.5 Correlación entre flavonoides, fenoles y taninos con la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de los tres colores de pimiento morrón en los diferentes tratamientos.	59
Tabla IV.6 Contenido de ácido Ascórbico en los diferentes colores de pimiento morrón.	61
Tabla IV.7 Cuantificación de carotenoides pimiento morrón variedad Baselga (A), Fascinato (B) y Orangela (C).	63
Tabla IV.8 Determinación del Perfil de compuestos fenólicos por HPLC de los diferentes pimiento morrón.....	67
Tabla IV.9 Metabolitos de bajo peso molecular del pimiento morrón (<i>Capsicum annum</i> L.).....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.1 (A) Planta de <i>Capsicum annuum</i> L., (B) floración y (C) fruto.....	19
Figura II.2 Clasificación de la familia de los compuestos fenólicos.	24
Figura II.3 Principales flavonoides presentes en el chile (<i>Capsicum annuum</i>) (Howard y Wildman, 2007).	25
Figura II.4 Estructura química de las antocianinas más comunes.	25
Figura II.5 Plantas de chile que muestran acumulación de antocianinas. A-B) <i>Capsicum annuum</i> L. “accesión” 387; C) <i>Capsicum annuum</i> L. “accesión” 1109; D-E) <i>Capsicum eximium</i> L. “accesión” 1546; F) <i>Capsicum annuum</i> L. ‘Uvilla’; G) Bolivian rainbow pepper (Pepper Joe Seeds); H-I) Fluorescent purple pepper (Pepper Joe Seeds); J) <i>Capsicum annuum</i> L. (chile de árbol).....	26
Figura II.6 Principales estructuras de carotenoides y xantofilas presentes en el pericarpio de chile.....	27
Figura IV.1 Mapa de calor de 32 metabolitos que se acumularon en la pimienta morrón (<i>C. annuum</i> L.).....	72
Figura IV.1 Evaluación de los atributos sensoriales en las diferentes variedades de pimiento morrón.....	79
Figura IV.2 Análisis de componentes principales (matriz de covarianza) en los atributos sensoriales de los datos experimentales por tratamiento.	81
Figura IV.3 HCA basados en los resultados PCA en atributos sensoriales de la variedad Fascinato y Orangela.....	82
Figura IV.4 Determinación de grasa total en las diferentes variedades de pimiento morrón..	83
Figura IV.5 Determinación de proteína total en las diferentes variedades de pimiento morrón.	84
Figura IV.6 Determinación de Fibra total en las diferentes variedades de pimiento morrón.....	85

CAPÍTULO 1:

I INTRODUCCIÓN

Los alimentos vegetales tienen un contenido amplio de nutrientes y fitoquímicos con una variedad de estructuras químicas que pueden ofrecer diferentes efectos biológicos en el organismo humano. Estudios epidemiológicos han encontrado una asociación inversa entre el consumo de frutas, vegetales y granos y el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Matsufuji *et al.*, 1998; Ferrari *et al.*, 2003; Ilow *et al.*, 2008).

Anteriormente, se creía que la protección contra diferentes enfermedades era atribuida solamente al contenido de vitamina C, E y carotenoides en los alimentos vegetales (Dikilitas *et al.*, 2011). Sin embargo, estudios clínicos han demostrado que el suministro de estos compuestos a sujetos con diferentes padecimientos no reducen lo suficiente la incidencia de enfermedades del corazón, daño cerebral y el riesgo de trombosis (Dikilitas *et al.*, 2011). Recientes estudios han demostrado que los compuestos bioactivos o metabolitos secundarios, como fenoles, flavonoides, taninos, carotenoides y antocianinas, poseen una mayor actividad antioxidante en frutas, hortalizas y granos lo cual está relacionado con la prevención de enfermedades crónico-degenerativas (Heo *et al.*, 2007).

Los compuestos bioactivos son sustancias biológicamente activas, que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, confiriéndoles color, aroma y sabor. No son nutrientes esenciales para la vida como los nutrimentos, pero tienen efectos positivos en la salud y como defensa para las plantas. En los últimos años, se han considerado elementos importantes en la dieta humana, ya que se ha comprobado su acción como; anticancerígenos, protectores contra enfermedades cardiovasculares y como agentes retardantes del envejecimiento (Silva *et al.*, 2013).

Los ejemplos más conocidos como fitoquímicos antioxidantes son los compuestos polifenólicos como: ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles, terpenoides, fitoestrógenos y fitoesteroles (Sun y Tanumihardjo, 2007). La composición y los niveles de los fitoquímicos con actividad

antioxidante en los alimentos individuales no reflejan necesariamente la capacidad antioxidante total (CAT), ya que ésta depende de la interacción sinérgica o inhibitoria de las diferentes moléculas presentes en el alimento. Por lo que es importante evaluar la CAT de cada alimento o vegetal.

En el presente trabajo el término pimiento o chile es utilizado para describir el fruto del *Capsicum annuum* L. a los chiles (pimientos) se les consideran una fuente buena de vitaminas A, C, E y compuestos polifenólicos, taninos, carotenoides y antocianinas, conocidos todos como compuestos bioactivos y con propiedades antioxidantes (Sukrasno y Yeoman, 1993; Palevitch *et al.*, 1995; Matsufuji *et al.*, 1998; Juarez *et al.*, 2008). Además, los cultivares picantes son ricos en capsaicinoides, los cuales son alcaloides con propiedades farmacológicas específicas (Wachtel, 1999; Juarez *et al.*, 2008).

En México existen reportes de los niveles de compuestos polifenólicos presentes en el chile *Capsicum*, sin embargo, la relación de éstos con la actividad antioxidante no se ha fundamentado adecuadamente. Así que, es necesario fraccionar estos compuestos presentes en el fruto de chile para proceder a la identificación y cuantificación de las clases o grupos de fitoquímicos, así como evaluar su capacidad para inhibir la oxidación lipídica.

I.1 Antecedentes y Justificación

I.1.1 El pimiento (*Capsicum annuum* L.)

En México, los frutos del género *Capsicum* en especial la especie *annuum*, representan una tradición cultural, ya que son uno de los vegetales más importantes utilizados como alimento y especia. Generalmente, en México y Centroamérica al pimiento morrón se les conoce como chiles y en Sudamérica y en las islas del Caribe, se les denomina ajíes (Sima *et al.*, 2010).

El pimiento (*Capsicum annuum* L.), al igual que el tomate, pertenece a la familia de las solanáceas. Presenta una amplia variabilidad que deriva en una gran diversidad genética. El pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) es la especie que engloba a casi todas las variedades cultivadas (Martínez y García, 1993) y tiene una demanda en el mercado nacional creciente debido a su alto contenido de vitaminas (A y C) y de algunos compuestos bioactivos como carotenos que poseen propiedades antioxidantes. El pimiento morrón es de gran importancia mundial, ya que se encuentra extendido de manera general en las regiones templadas y cálidas, además ocupa el 5° lugar en la producción y superficie cultivada de las principales hortalizas (Hernández-Fuentes *et al.*, 2010).

En México la mayor parte de la producción de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.), tanto la que se genera a campo abierto como la de invernadero, se destina a la exportación. En todo el país se siembran aproximadamente 5,800 ha., con rendimientos en campo que pueden llegar hasta las 50 ton/ha/año. La exportación hacia los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá se ha incrementado llegando a un máximo de 240,000 ton. en el 2006 (Castellanos y Borbón, 2009).

Los invernaderos que se utilizan para la producción de pimiento morrón por lo general son de alta tecnología y, en consecuencia, de costo elevado, por lo que la inversión se justifica cuando el rendimiento, calidad, sanidad y el precio del producto es alto (Saleh, 2010). En general el pimiento de invernadero, por su calidad y sanidad, alcanza un precio hasta cinco veces mayor que el proveniente de cultivo a cielo abierto, sobre todo si se comercializa cuando el fruto toma el color característico de la variedad (rojo, naranja, amarillo, crema, chocolate y morado). La generación de metabolitos secundarios no siempre es tomada en cuenta en el cultivo de este fruto ya que se enfatiza la importancia en la producción, tamaño del fruto, ausencia de defectos y

resistencia a enfermedades. Lo anterior ha resultado en cultivos con rendimientos elevados adaptados a la agricultura moderna, pero carentes de beneficios para la salud (Caviglia, 2007).

I.1.2 Metabolitos Secundarios

Los compuestos bioactivos forman parte de los metabolitos secundarios, producen un efecto biológico cuantificable a una concentración fisiológica determinada y tienen el potencial de afectar los cultivos de forma benéfica (Warren, 1992; García y Urría-Carril, 2009). Los metabolitos secundarios son derivados de azúcares, lípidos y aminoácidos. En las plantas tienen funciones específicas como repelentes a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, atrayentes a insectos polinizadores. Además tienen función protectora frente a predadores y patógenos, actuando como pesticidas naturales. Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por las plantas pero no son necesarios para la sobrevivencia de las mismas, sin embargo desempeñan un papel fundamental en procesos de sobrevivencia y adaptación al medio ambiente (García y Urría-Carril, 2009).

Por otro lado los metabolitos secundarios al ser consumidos por el ser humano aportan beneficios para la salud más allá de los considerados como nutrientes básicos: Estos compuestos se pueden encontrar en pequeñas cantidades en alimentos, especialmente de origen vegetal, en algunos de origen proteico y en alimentos ricos en lípidos (Clarke, 1996; Rahman *et al.*, 2012).

Aunque los metabolitos secundarios no se consideran sustancias esenciales, son indispensables a largo plazo para nuestra salud. Intervienen ejerciendo un efecto protector del sistema cardiovascular, reductor de la presión sanguínea, regulador de la glucemia y la colesterolemia, reductor del riesgo de cáncer, de procesos neurodegenerativos, procesos inflamatorios y mejorador de la respuesta del sistema inmunológico (Muñoz-Quezada *et al.*, 2010).

I.1.3 Factores que Inducen las Síntesis de Metabolitos Secundarios (FIMS)

I.1.3.1 Estrés Abiótico y Biótico

La biosíntesis de metabolitos secundarios suele estar restringida a estados específicos del desarrollo y a períodos de estrés (Piñol y Palazón, 1993). Algunas plantas producen metabolitos

secundarios importantes en las interacciones de la planta con el medio ambiente o están relacionadas con la parte reproductiva de la misma. El estrés suele generar una disminución del crecimiento de la planta y, en caso extremo la muerte, sin embargo, correctamente dosificado puede repercutir positivamente en las características fenotípicas y sensoriales. La respuesta de las plantas al estrés genera cambios fenotípicos de adaptación que conferirán una mayor resistencia a dicho estrés. (Gama *et al.*, 2007).

Existen diferentes factores inductores de estrés. Los factores de origen abiótico que afectan el rendimiento de los cultivos pueden ser temperatura, humedad y nutrición mineral. Dentro del estrés biótico se consideran virus, plagas, enfermedades y malezas. La respuesta de una planta al estrés puede ser fitoquímica en el ámbito fisiológico a nivel celular, tisular, de órganos e incluso a nivel estructural. (Kramer, 1983; Basurto-Sotelo *et al.*, 2008).

I.1.3.2 Elicitores

Los elicitores se definen como compuestos químicos procedentes de diversas fuentes metabólicas que pueden desencadenar respuestas fisiológicas y morfológicas o provocar una situación de estrés en plantas. Estos determinan la expresión de genes asociados con las enzimas de diferentes vías metabólicas, provocando una serie de reacciones que involucran la síntesis de metabolitos involucrados en la defensa, incluyendo la acumulación de sustancias, tales como fitoalexinas, quitina, quitosan, oligogalacturónidos, etc. (Larqué-Saavedra y Mex, 2007; Mejía-Teniente *et al.*, 2010, 2013).

Las plantas tratadas con elicitores desarrollan resistencia ya que la aplicación de elicitores en la superficie de la planta activa múltiples vías de señalización intracelular de la defensa. Una de las ventajas de los tratamientos de elicitación es que no se requiere la transferencia de la biomasa a un medio de producción y que generalmente generan respuestas rápidas. La desventaja es que la producción, en general, no es sostenible en el tiempo. Existe una gran especificidad en la interacción planta-elicitor, lo que implica que debe seleccionarse el tipo de elicitor adecuado para cada cultivo, el momento de agregarlo y la concentración para obtener la mejor respuesta (Di Cosmo y Misawa, 1995; Mejía-Teniente *et al.*, 2010, 2013).

I.1.4 Justificación

Actualmente en México se requiere una mayor atención a las enfermedades crónico-degenerativas como enfermedades cardiovasculares, obesidad, cáncer, y diabetes. Los consumidores están interesados en una dieta saludable, cuya base sea el consumo de productos hortícolas con valor agregado que puedan reducir el riesgo de estas enfermedades. Hoy en día, existe una gran necesidad en la producción de vegetales con un contenido elevado de metabolitos secundarios cuyas propiedades más importantes son la actividad antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, y antioxidante.

La principal línea de trabajo se vincula al uso de marcadores bioquímicos y moleculares para el análisis de los mecanismos de tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico en cultivos y su uso en programas de mejoramiento genético. Los tipos de estrés, particularmente el estrés térmico y el déficit hídrico, son de gran importancia debido al cambio climático y la ocurrencia cada vez más frecuente de sequías y temperaturas extremas.

Por otro lado, se necesita disminuir la contaminación con el uso de fertilizantes, insecticidas orgánicos y así disminuir las pérdidas genéticas de las especies. Además es necesario el uso de más tecnología y de cultivos sistematizados para aumentar la calidad, las propiedades nutrimentales y una producción controlada de metabolitos secundarios en los cultivos ocasionando una alta producción de especies y tener un aumento en sus ingresos.

I.2 Planteamiento del Problema

En México, aproximadamente el 82% de las unidades de producción rural, tienen un tamaño que va de 2 a 5 hectáreas, y su producción genera ingresos decrecientes. También la inversión elevada de capital en laboreo intenso del suelo a cielo abierto, uso de fertilizantes, herbicidas, fungicidas, insecticidas y reguladores de crecimiento químicos ha traído consigo la contaminación de los mantos freáticos, liberación de gases con efecto invernadero, pérdida de diversidad genética, eutrofización de ríos, corrientes subterráneas, lagos y ecosistemas de las costas marinas (Matson *et al.*, 1997; SAGARPA, 2010).

Además la carencia en tecnología para el mejor aprovechamiento del suelo, la disminución del agua destinada al riego de cultivos, y la falta de sistematización agronómica en los cultivos reduce la calidad, las propiedades nutrimentales y la producción descontrolada de metabolitos secundarios en los vegetales ocasionando bajo producción e ingresos decrecientes.

Por otro lado, el aumento de la morbilidad y mortalidad por enfermedades crónicas degenerativas promueve el consumo de vegetales que suministren una mezcla óptima de fitoquímicos, antioxidantes naturales, fibra y otros metabolitos secundarios con efectos benéficos a la salud.

I.3 Hipótesis y Objetivos

I.3.1 Hipótesis General

Es posible mediante la manipulación de diferentes FIMs en un cultivo bajo condiciones protegidas incrementar la producción de compuestos bioactivos para lograr cultivos con valor agregado, que puede ser comprobable por metabolómica.

I.3.2 Objetivo General

Determinar y cuantificar el efecto de diferentes factores de estrés, inductores de metabolitos secundarios, sobre la cantidad y tipo de compuestos bioactivos producidos en pimiento Morrón (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones protegidas.

I.3.3 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de los FIM's sobre las variables fisiológicas de la planta del pimiento (*Capsicum annuum* L.).
2. Estimar el efecto de los FIM's sobre las variables fisicoquímicas y sensoriales que mejor describan la calidad del pimiento (*Capsicum annuum* L.).
3. Caracterizar los metabolitos secundarios del pimiento (*Capsicum annuum* L.).
4. Determinar bioactividad (*in vivo*) de los compuestos bioactivos del pimiento (*Capsicum annuum* L.).

CAPÍTULO 2:

II REVISIÓN DE LITERATURA

II.1 Pimiento Morrón (*Capsicum annuum* L.)

Chile es el nombre común de la planta y su fruto pertenece a la familia de las *Solanáceas*. La planta de tallo leñoso, forma normalmente un arbusto. Las flores son blancas o verdosas en la mayoría de las variedades, las flores de *Capsicum annuum* son solitarias en cada nodo (ocasionalmente fasciculadas). Con corola blanca lechosa ocasionalmente purpura, sin manchas difusas en la base de los pétalos; éstos de corola usualmente recta. Sus venas a menudo son prolongadas en dientes cortos y las semillas son de color paja, salvo en el *Capsicum pubescens*, en que tienen un color violáceo. El fruto, técnicamente una baya, varía en coloración y tamaño de acuerdo a la variedad; puede ser cúbico, cónico o esférico como se observa en la Figura II.1 (Molina, 2009).



Figura II.1 (A) Planta de *Capsicum annuum* L., (B) floración y (C) fruto.

La producción de pimiento morrón en México se realiza a cielo abierto y es destinada principalmente al mercado de exportación, el 90 % de la producción es destinada a Estados Unidos y Canadá, por medio del cual se captan divisas que influyen en el desarrollo regional. El cultivo de esta especie requiere mucha mano de obra, es un cultivo que genera altos ingresos por lo que no representa un problema de costos en los jornales y es económico.

Uno de los aspectos más interesantes de la agricultura moderna es que los cultivos menores como son las hortalizas, han entrado en una etapa de gran productividad generando cambios en los sistemas de producción. Por otro lado, los cambios climáticos están obligando a los productores a buscar una mayor seguridad en los sistemas de producción para garantizar la calidad de sus productos, el volumen y los beneficios para la salud (Hernández-Fuentes *et al.*, 2010).

La agricultura de plantas y hortalizas ha sido la actividad esencial para la supervivencia y el bienestar humano, pero también ha sido la actividad que más ha afectado al ambiente, por ello se plantea una agricultura alternativa. Los cultivos protegidos favorecen la calidad y cantidad de productos. El pimiento morrón cultivado en invernadero se caracteriza por ser de crecimiento semideterminado o indeterminado, con altura de planta superiores a los 2 m. Se usan dos tipos de sistemas comerciales de cultivo, el sistema de poda en “V” u holandés y el sistema español (Kholer y Tillmann, 1988; Caviglia, 2007).

En el sistema en “V” se manejan densidades de 2 a 3 plantas/m², con dos tallos por planta, para lo cual se eliminan uno de los dos tallos que se desarrollan en cada nodo (horqueta) de la planta, cada tallo es guiado individualmente de tal forma que la planta simula una “V”, y cultivada en sustrato; los rendimientos por área de este sistema en Holanda son altos, entre 25 a 30 kg/m²/año. En el sistema español, en el que se dejan de 2 a 4 tallos principales por planta, la poda es mínima manteniéndose las ramas laterales, se guía lateralmente por líneas de alambre y postes distribuidas en ambos lados a lo largo de las hileras de plantas; se utiliza principalmente para siembra en suelo, la densidad es de hasta 4 plantas/m² y los rendimientos de este sistema son menores a los 10 kg/m² (Reséndiz, 2010).

El ciclo del cultivo del pimiento en ambos sistemas es largo y por lo regular superior a 10 meses desde el trasplante hasta la cosecha, por lo que se tiene un solo ciclo de cultivo por año. Los primeros frutos maduros son cosechados después de tres o cuatro meses, con un período de cosecha de cuatro a siete meses (Reséndiz, 2010). Una característica del cultivo de pimiento morrón son las fluctuaciones en la producción, donde se alterna un número alto de frutos y crecimiento lento de éstos con etapas de un bajo número de frutos y alto crecimiento de los

mismos; los períodos de cosecha duran por espacio de 50 días aproximadamente, aunque el período de cosecha es prolongado, sólo se tienen frutos para la venta la mitad del tiempo; dos a tres meses y medio en el año (Taheri-Garavand *et al.*, 2011).

II.2 Producción de Vegetales en Invernadero

El uso de invernaderos se ha expandido a muchas partes del mundo (Enoch y Enoch, 1999), en particular en la costa del Mediterráneo y el sureste de España se presenta una cantidad importante de invernaderos con aproximadamente 37,500 ha, dedicadas principalmente al cultivo intensivo de vegetales (Vans Straten *et al.*, 2011). La mayoría de los invernaderos constan de estructuras de bajo costo cubiertas con películas de plástico, carentes de sistemas para el control del ambiente interno (Vazquez-Cruz *et al.*, 2010). El uso de esta tecnología para la construcción de invernaderos se ha extendido a muchos otros países como Sudáfrica y Marruecos durante la última década, y representa el prototipo de invernaderos de bajo costo (Bosokalfa *et al.*, 2010). Comúnmente, el ambiente artificial generado dentro de un invernadero es el adecuado para el crecimiento de los cultivos comparado con el cultivo en campo (Huaiying *et al.*, 2006). Actualmente existen invernaderos mejor equipados que permiten favorecer el microclima incrementando la calidad de los productos (Vazquez-Cruz *et al.*, 2010).

Los principales cultivos producidos en invernadero incluyen tomates, pepinos, pimientos y lechuga. Bajo condiciones de invernadero la calidad sensorial y nutrimental de los frutos suele ser menor que la de aquellos frutos cultivados a cielo abierto, por lo que la aceptación por parte del consumidor se ve afectada.

II.3 Metabolitos Secundarios en Plantas

El conjunto de reacciones químicas que se generan en un organismo constituye el metabolismo del mismo, este metabolismo se divide en dos tipos: el metabolismo primario donde la mayor parte del carbono, nitrógeno y la energía se transforman en moléculas similares como aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, necesarias para el funcionamiento de los organismos (Anexo 1). Por otra parte los metabolitos secundarios o compuestos bioactivos, son sustancias no nutritivas que requieren también de cantidades significativas de carbono asimilado y de energía para llevar a cabo la síntesis de éstos (Anexo 2). Algunos de ellos son colorantes

(pigmentos), aromáticos, reguladores del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos y otros microorganismos (Fanasca *et al.*, 2009; Proctor *et al.*, 2009).

Los metabolitos secundarios tienen funciones específicas como atrayentes o repelentes de insectos y otros animales, actuando como pesticidas naturales (Foyer *et al.*, 2007; Fanasca *et al.*, 2009). En los sistemas agrícolas es necesario garantizar que los diversos agroquímicos utilizados como biocidas, estimuladores de crecimiento y fertilizantes, no produzcan efectos perjudiciales como la inducción de resistencia a patógenos o su acumulación en los consumidores humanos. Se estima que muchas de las enfermedades actuales se producen por las causas anteriores (Foyer *et al.*, 2007). Son muchas las sustancias que desde hace tiempo se usan en este sentido. Por ejemplo, peróxido de hidrogeno, ácido salicílico, quitina y el quitosán, que son biopolímeros de origen natural que se han convertido rápidamente en una alternativa prometedora para la agricultura (Lárez, 2008).

Las propiedades antimicrobianas de la quitina y el quitosán son conocidas por el hombre desde la antigüedad. En este sentido, se sabe que los primeros mexicanos usaban preparaciones derivadas de hongos para acelerar la cicatrización de heridas y que los coreanos primitivos utilizaban quitina, proveniente de la tinta de calamar, para favorecer la curación de abrasiones corporales (Goodman, 1989; Lárez, 2008). El Anexo 3 muestra algunas de las aplicaciones que se han ensayado con metabolitos secundarios en actividades relacionadas con la agricultura (Lárez, 2008).

Los metabolitos secundarios pueden ser: los terpenos, entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales. Son sintetizados a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, o bien por la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplasto. Muchas plantas como limón, menta, eucalipto y tomillo producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas. Otros compuestos en planta son los fenoles, cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos, los cuales son sintetizados por la ruta del ácido malónico, en hongos y bacterias, y la ruta del ácido shikímico (García y Urria-Carril, 2009; Quezada *et al.*, 2010).

II.3.1 Compuestos Fenólicos

Entre los ingredientes funcionales, el grupo que actualmente está generando mayor interés es el de los compuestos fenólicos, también ampliamente denominados polifenoles, debido a sus propiedades organolépticas y farmacológicas. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por los vegetales tanto en su desarrollo normal como en respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico. La cantidad de compuestos fenólicos presentes en una planta depende de factores como la especie o variedad, técnica y condiciones de cultivo, estado de madures, así com de las condiciones de procesado y almacenado, entre otras. Por otro lado su distribución en los tejidos de las plantas, a nivel celular y subcelular, no es uniforme.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por los vegetales, que presentan en su estructura química la presencia de anillos aromáticos con grupos hidroxilos responsables de su actividad antioxidante (Feregrino *et al.*, 2008). En la Figura II.2 se indican las principales familias de compuestos fenólicos. Muchos de los compuestos fenólicos se encuentran en la naturaleza asociados a mono- o polisacáridos (glúcidos), o como derivados funcionales tales como ésteres o metilésteres.

En general, son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la vía del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, en el caso de los flavonoides). Entre los compuestos fenólicos naturales se encuentran los fenoles monocíclicos, los flavonoides, los fenilpropanoides, las quinonas fenólicas y las cumarinas. Las sustancias poliméricas de las plantas como los lignanos y taninos son polifenólicos (Aiyer *et al.*, 2008).

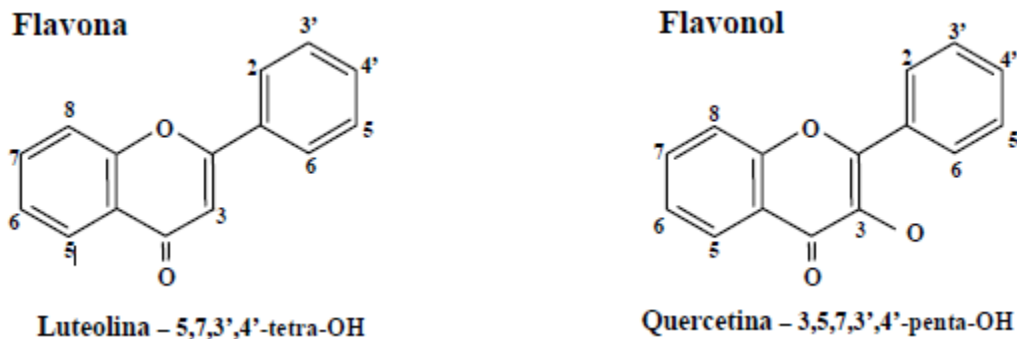


Figura II.3 Principales flavonoides presentes en el chile (*Capsicum annuum*) (Howard y Wildman, 2007).

II.3.3 Antocianinas

Las antocianinas, son pigmentos (rojo, naranja, violeta, azul y púrpura) que imprimen color a las hojas, flores, semillas, frutos y otros tejidos de una gran variedad de especies de plantas. Representan el grupo más grande de pigmentos hidrosolubles dentro del reino vegetal (Wu y Prior 2005).

Todas las antocianinas se derivan de la estructura química de la cianidina (Figura II.4), por la adición o sustracción de grupos hidroxilo, por el grado de metilación de estos grupos hidroxilo, y por la naturaleza, número y posición de azúcares. Con algunas excepciones, las antocianinas son glicosiladas en el hidroxilo del carbono 3 (Harborne, 1998).

Antocianina	R	R'
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	O-CH ₃	O-CH ₃
Pelargonidina	H	H
Peonidina	O-CH ₃	H
Petunidina	O-CH ₃	OH

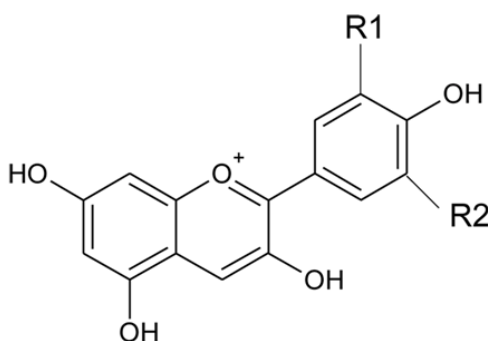


Figura II.4 Estructura química de las antocianinas más comunes.

Wu y Prior en 2005, determinaron el perfil de acumulación de antocianinas en diferentes frutos, incluyendo manzana, durazno, frutillas y ciruela. En el caso de *Capsicum* spp., hay chiles de algunas especies que muestran pigmentación debido a la acumulación de antocianinas. Esta pigmentación se puede encontrar en flores, frutos y follaje (Figura II.5). El color purpura, es el que comúnmente se puede encontrar en los frutos de chile, aunque es posible encontrar algunos otros como negro y magenta.

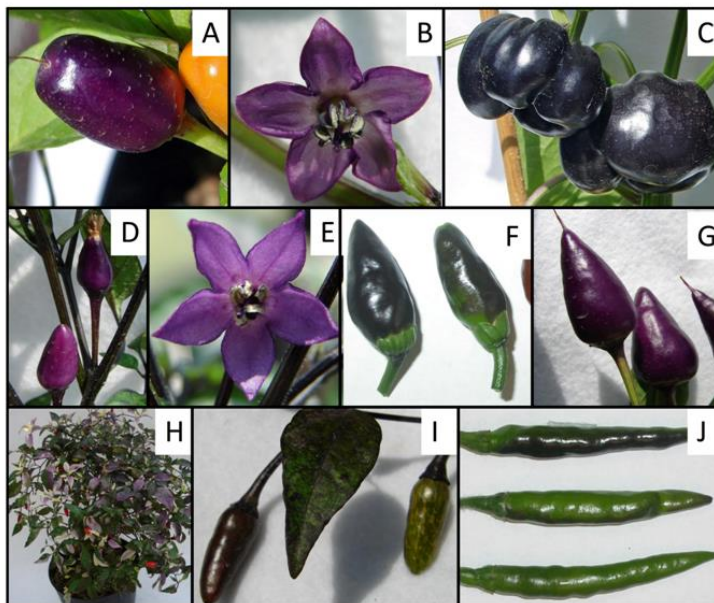


Figura II.5 Plantas de chile que muestran acumulación de antocianinas. A-B) *Capsicum annuum* L. “accesión” 387; C) *Capsicum annuum* L. “accesión” 1109; D-E) *Capsicum eximium* L. “accesión” 1546; F) *Capsicum annuum* L. ‘Uvilla’; G) Bolivian rainbow pepper (Pepper Joe Seeds); H-I) Fluorescent purple pepper (Pepper Joe Seeds); J) *Capsicum annuum* L. (chile de árbol). *Pepper Joe Seeds* (www.pepperjoe.com). Las accesiones mostradas en esta figura fueron provistas por el IPK Gatersleben, Genebank Department, Foundation Leibniz, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK); 06466-Gatersleben, Germany.

II.3.4 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de fitoquímicos que de manera natural se encuentran como pigmentos y son sintetizados invariablemente en los cloroplastos de las plantas superiores. Aunque en este tejido fotosintético su color está oculto por el de la clorofila, son los pigmentos más importantes entre las diversas clases encontradas en la naturaleza. Son responsables de la coloración amarillo, naranja y rojo de las flores, frutos y vegetales (Molina, 2008).

La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos unidas de manera tal que el orden se invierte al centro (Figura II.6).

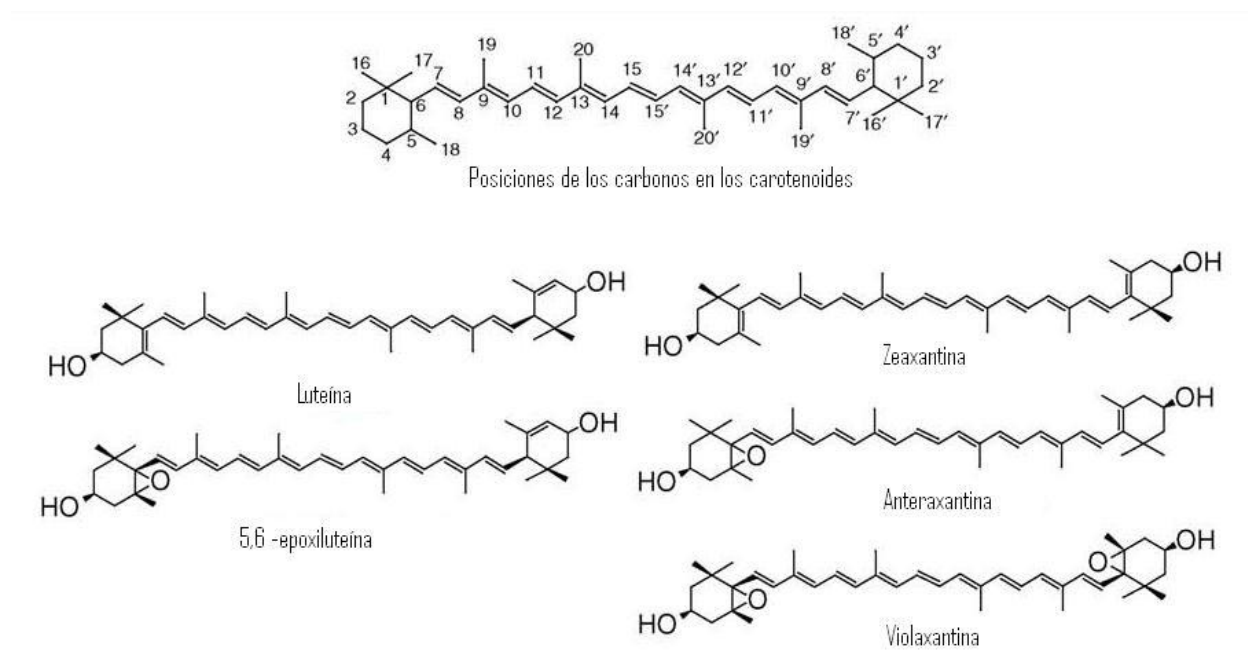


Figura II.6 Principales estructuras de carotenoides y xantofilas presentes en el pericarpio de Chile.

Los carotenoides hidrocarbonados son los llamados carotenos, de donde se derivan los que tienen funciones oxigenadas, las cuales son llamadas xantofilas (Che Man y Tan, 2003). El fruto de Chile maduro (rojo, anaranjado, amarillo) presenta mayores contenidos de carotenoides que los frutos inmaduros generalmente de color verde (Matsufuji *et al.*, 2007). Se tienen evidencias que los carotenoides poseen actividad como provitamina A, considerándose al β -caroteno como el más importante (Molina, 2008).

II.3.5 Compuestos Antioxidantes

Los antioxidantes naturales pueden ser extraídos de los tejidos de las plantas como es el caso del chile, en algunos animales y aquéllos compuestos que se forman durante la cocción o el procesado de compuestos alimenticios de origen vegetal o animal. Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales (Yanishlieva-Maslarova, 2010).

Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Estos pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios, o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios. Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno en singulete (Gordon, 2001).

Diversos estudios indican que el exceso de radicales libres puede dar lugar a la inducción de importantes cambios fisiológicos, que por lo general desembocan en el desarrollo de ciertas enfermedades. Para contrarrestar estos efectos nocivos, el organismo suele disponer de moléculas ricas en electrones que, al donarlos, ejercen un efecto antioxidante. Sin embargo, cuando los sistemas antioxidantes defensivos del organismo se ven superados por la actividad dañina de los radicales, aparece un estrés oxidativo, iniciador de ciertas situaciones patológicas con una mayor o menor trascendencia sobre la salud. Cada vez es más contundente la información que pone de manifiesto la presencia de componentes químicos con la capacidad de realizar funciones antioxidantes en los alimentos de origen vegetal, una vez que han sido absorbidos dentro del organismo, por lo que su consumo podría significar el desempeño de un papel crítico frente al desarrollo de algunas enfermedades degenerativas, reduciendo o retrasando la posibilidad de padecerlas (Bello, 2005).

II.3.6 Capacidad antioxidante de los fitoquímicos del pimiento morrón.

Existen algunos métodos (“*in vitro*” e “*in vivo*”) para evaluar la actividad antioxidante total. Una de las estrategias más aplicadas en la evaluación “*in vitro*” de la capacidad antioxidante de un compuesto, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a radicales cromógenos, los cuales exponen una pérdida de color proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas “*in vitro*” proporcionan un conocimiento aproximado de lo que ocurre en situaciones complejas “*in vivo*” (Kuskoski *et al.*, 2005; Goristein *et al.*, 2009).

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Además, los compuestos interactúan entre sí, pudiendo inducirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Kuskoski *et al.*, 2005 Goristein *et al.*, 2009). Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo (Pellegrini *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2007).

Algunos compuestos cromógenos (ABTS^{•+}, DPPH[•]) son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los chiles para estabilizar a los radicales libres, actuando en contra de los efectos perjudiciales de la oxidación, (Kuskoski *et al.*, 2005 Goristein *et al.*, 2009).

Estudios realizados en fracciones de flavonoides con ácidos fenólicos y capsaicinoides de chile rojo ha mostrado actividades antioxidantes mayores que las de chile verde (Sun *et al.*, 2007; Matsufuji *et al.*, 2007). Materska y Perucka (2005) identificaron los principales compuestos presentes en las fracciones de chile rojo (sinapoil y el feruloil glucósidos) y chile verde (quercetina-3-O-L- ramnosida). También, encontraron que la fracción de capsaicinoides presentó una actividad antioxidante (oxidación del β -caroteno en un sistema de ácido linoleico y por la prueba del DPPH[•]) similar a la de la fracción de flavonoides y ácidos fenólicos de chile rojo. Se encontró además, que la capsaicina y dihidrocapsaicina fueron los principales componentes en la fracción de capsaicinoides, reportando una correlación alta entre el contenido de estos

compuestos y la actividad antioxidante (Bartrina *et al.*, 2006). En base a lo expuesto anteriormente, en este trabajo se pretendió generar información básica sobre los niveles de los compuestos fenólicos, capsaicinoides, carotenos y tocoferoles, presentes en el chile cultivado en la región Norte y Noreste del país; así mismo establecer la relación entre los compuestos fenólicos y sus propiedades antioxidantes. Por lo tanto, se expone la siguiente hipótesis y objetivos.

II.4 Inductores de Metabolitos Secundarios (FIMs)

Durante el cultivo de plantas se pueden modificar condiciones que incrementen la producción de metabolitos. Las plantas cuando se exponen a ambientes desfavorables, tales como déficit de agua, estrés con calor y frío, deficiencia de oxígeno, etc., resulta en la expresión algunos genes relacionados con la síntesis de compuestos que contienen nitrógeno y metabolitos secundarios. Estos compuestos le sirven a la planta como defensa contra herbívoros y patógenos, como atrayentes para la polinización, reducen el crecimiento de plantas competentes, entre otras funciones. Estudios recientes han demostrado que el someter a las plantas a determinado tipo de estrés puede incrementar la calidad y el rendimiento de sus metabolitos, por ejemplo, se ha observado un aumento en la cantidad de vitamina C en plantas expuestas a una alta intensidad de luz o con una irrigación menos frecuente (Sgroppo y Pereyra, 2009), del mismo modo, se ha encontrado que se puede incrementar el nivel picante en chile cuando la planta es sometida a estrés hídrico (Estrada *et al.*, 1999).

El estrés abiótico es la principal causa de daño a cultivos y el problema de la salinidad es el más severo. La salinidad en los suelos se estima de acuerdo a la habilidad para conducir la electricidad (conductividad eléctrica: EC_e) las concentraciones se dan en deciSiemens/metro (dS/m) donde 1 dS/ tiene una concentración aproximada de 10 mM NaCl (Gholamreza *et al.*, 2010).

En las plantas, como en todos los organismos vivos, el estrés ambiental da lugar a la activación de respuestas de adaptación y defensa. Entre éstas se encuentra la inducción de la vía de los fenilpropanoides, la cual, entre otros compuestos, genera ácido salicílico (AS) y sus derivados. El AS es un compuesto aromático que puede inducir incrementos en la productividad, juega un

papel importante en la señalización celular local de la patogénesis y participa en el proceso de señalización del estrés abiótico (Gutiérrez-Corona *et al.*, 1998; Smith-Becker *et al.*, 1998).

II.5 Calidad y producción de metabolitos secundarios

El término “calidad” puede ser definido de muchas maneras, esto significa que agricultores, productores, vendedores y consumidores tendrán diferentes puntos de vista sobre la calidad en base a su percepción y experiencia. Lo anterior se refleja en los distintos factores de calidad que se toman en cuenta para un determinado producto. Las variables de calidad comúnmente asociados a vegetales son: forma, color, sabor, textura, firmeza, carga microbiana y contenido de nutrientes. Las características de calidad mencionadas pueden clasificarse en cuatro grupos: físicos, químicos, microbiológicos y nutricionales (Sablani, 2006). También son importantes el contenido de sólidos totales, acidez, contenido de fibra, además de una gran variedad de compuestos denominados metabolitos secundarios con propiedades benéficas para la salud humana como es el caso de glucosinolatos, carotenoides, polifenoles, saponinas y terpenos (Herrmann, 2001). Estas características son importantes tanto para productos en fresco como procesados (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999) y pueden afectar negativamente la aceptación de los productos por parte del consumidor (Sablani, 2006).

Existen diferentes puntos de vista concernientes a la calidad de frutos y vegetales, la calidad es función tanto del tipo de producto final (fresco o procesado) como de los criterios de aceptación por parte del consumidor, en el caso de un producto, los atributos que definen su calidad pueden ser cuantificados, mientras que los criterios del consumidor para definir la calidad de un producto están orientados hacia su satisfacción, un concepto abstracto y por tanto difícil de cuantificar. Las metodologías para el control de calidad deben ser capaces de establecer que características le proporcionan un valor agregado al producto al mismo tiempo de que satisfacen las exigencias del consumidor (Dris y Jain, 2004).

Se han establecido criterios objetivos para definir la calidad de frutas y vegetales basados en el Codex Alimentarius de la FAO y de la Organización Mundial de la Salud (WHO). Estos estándares de calidad son medidas objetivas de la calidad basados en cualidades externas como forma, tamaño, color (Kays, 1999), las cuales no son fijas sino que son atributos dinámicos que cambian de acuerdo al proceso de madurez. Para el caso específico del jitomate las

características de calidad más importantes son: pH, contenido de sólidos solubles, conductividad eléctrica, contenido de glucosa, acidez titulable y materia seca (Chapagain, 2003). Otro criterio importante, que define la calidad de los productos agrícolas, es la inocuidad. Este término se refiere a la cualidad de no causar daño, es decir, que no estén asociados a riesgos que puedan afectar la salud de los consumidores, los cuales pueden ser introducidos tanto en la producción primaria como en los procesos de transformación (Torrado, 2002).

El metabolismo del nitrógeno está directamente relacionado con el potencial de producción de las hortalizas. Se requiere una gran cantidad de nitrógeno (N) para una óptima producción, sin embargo, la deficiencia de este macronutriente puede causar disminución en el número y tamaño de frutos, así como reducción en la vida de anaquel, pérdida de color, sabor y aroma (Sainju *et al.*, 2003). El K es un nutriente esencial para las plantas, actúa durante la estabilización del pH, osmorregulación, activación de las enzimas y en procesos de transporte a través de la membrana (Chapagain *et al.*, 2003). Las relaciones N/K adecuadas para las distintas fases de desarrollo aparece como uno de los problemas fundamentales que, desde el punto de vista nutricional, inciden en la productividad y calidad de la cosecha para el cultivo protegido. Esta relación de N/K determina el equilibrio entre los procesos de crecimiento y fructificación, adecuada partición de la biomasa vegetal y una mayor eficiencia del proceso fotosintético (Hernández *et al.*, 2009). Los consumidores demandan alimentos con alta calidad nutritiva, y además sabor, aroma, textura y color satisfactorios con un mínimo de conservadores (Bull *et al.*, 2004). El valor nutricional del pimiento morrón se debe a los efectos benéficos para la salud de algunos de sus constituyentes (vitaminas, fibra, carotenoides, etc.) los cuales en general, ayudan a inhibir el proceso de estrés oxidativo y, en particular, ayudan a prevenir algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Rao & Agarwal, 2000). La concentración de metabolitos secundarios como β -caroteno, compuestos fenólicos y flavonoides se incrementa bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno (Dorais *et al.*, 2008).

II.5.1 Evaluación Sensorial de la Calidad de Productos Hortícolas

La caracterización de un alimento es un proceso largo y complejo que normalmente involucra a varias disciplinas científicas. El análisis sensorial es una de ellas y, concretamente, la obtención del perfil descriptivo o “huella sensorial” del producto es una parte fundamental de esa caracterización. Definir qué características son importantes sensorialmente no es una tarea fácil, esto se debe a que cada consumidor tiene diferentes puntos vista y suelen dar apreciaciones relativas comparando unos productos con otros (Marsili, 2006).

El análisis sensorial se ha definido como una disciplina científica usada para medir, analizar e interpretar las reacciones percibidas por los sentidos de las personas hacia ciertas características de un alimento como son sabor, aroma, color y textura, por lo que el resultado de este conjunto de sensaciones captadas es usado para medir la calidad de los alimentos (Marsili, 2006; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999). Un método diseñado para este propósito es el método Spectrum®, cuyo objetivo es establecer todo el programa de evaluación sensorial, los objetivos específicos del proyecto para desarrollar el panel de catadores y el nivel deseado de confiabilidad para el tratamiento estadístico de los datos (Meilgaard, 2007).

El método requiere que los panelistas sean entrenados para desarrollar la terminología que permita describir los productos. En un principio los panelistas desarrollan sus propios descriptores evaluando una amplia variedad de productos (marcas comerciales) para definir una categoría. Después todos los términos de los panelistas son organizados en una lista para elegir la mejor opción que defina cada atributo evaluado y que sea entendido de la misma manera por todos los panelistas, a su vez este método emplea una escala de intensidades de 1 a 15 que se asigna a cada descriptor de acuerdo a la apreciación de los panelistas (Meilgaard, 2007).

II.5.2 Evaluación Bromatológica de la Calidad de Productos Hortícolas

El pimiento rojo es un vegetal de bajo aporte calórico. Su principal componente es el agua, seguido de las proteínas y los hidratos de carbono —que casi duplican al contenido en hidratos de carbono de los pimientos verdes—. Es buena fuente de fibra que mejora el tránsito intestinal, además de poseer un efecto saciante. Al igual que el resto de los vegetales, su contenido en grasas es mínimo. Como los pimientos morrones verdes son una buena fuente de vitamina C.

Así, un pimiento morrón de tamaño grande aporta casi el 90% de la ingesta diaria de este micronutriente recomendada a hombres y mujeres de 20 a 39 años con una actividad física moderada. Por otro lado, el contenido de vitamina A en un pimiento morrón destaca mayoritariamente por los β -carotenos: 2.220 $\mu\text{g}/100$ g de porción comestible en pimiento morrones cocido. Al igual que en los verdes, en los pimientos morrones cabe destacar la presencia de potasio, estando presentes en menor proporción el hierro, el magnesio, y el fósforo (Minguez *et al.*, 1993).

El sistema proximal sirve para el análisis ordinario del valor nutritivo de los productos alimenticios. Se creó para obtener una clasificación muy amplia y con un nivel máximo de los componentes de los alimentos. El sistema consiste en la determinación analítica de varios compuestos como agua (humedad), cenizas, grasas brutas (extracción con éter), las proteínas brutas y la fibra bruta (Chowdhury *et al.*, 1998).

CAPÍTULO 3:

III METODOLOGÍA

III.1 Marco teórico

La parte experimental de campo se desarrolló en el Centro de Investigación y Capacitación Koppert Rapel (CEICKOR) ubicado en Rancho San Ignacio, carretera a Bernal-Ezequiel montes km. 3, Los Benitos, municipio de Colón, Estado de Querétaro, con una posición geográfica de 20° 38' 49.49" N y 99° 54' 2.53" O, con una altitud de 1850 m, clima semiseco, y una temperatura media de 17°C.

La especie de estudio de este trabajo es: Pimiento morrón (*Capsicum annuum L.*) en tres variedades Fascinato, Orangela y Baselga. El diseño experimental que se desarrollará en bloques al azar con arreglo en franjas, análisis de varianza Fisher y la comparación de medias se realizará por medio de la prueba de Tukey.

Los factores de estrés que inducen la producción de metabolitos secundarios que se evaluaron son: Conductividad eléctrica aplicada durante el desarrollo vegetativo hasta fructificación, tomando como variable base (3.2dS/m), como conductividades permitidas en la planta a dos niveles 3.4 y 3.6 dS/m.

Los elicitores que se aplicaron al pimiento (*Capsicum annuum L.*) son peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y ácido salicílico (As), aplicado por método de aspersión durante la siembra, en el desarrollo vegetativo y entre la floración (antésis) y la fructificación. La concentración de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) es 18mM y 36 mM y de ácido salicílico 0.01 mM y 0.1 mM.

III.2 Metodología

III.2.1 Materiales

III.2.1.1 Material biológico

Se utilizó la variedad de chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) en tres variedades Fascinato, Baselga, Orangela, sembradas en un sistema de monocultivo bajo invernadero localizado en Centro de Investigación y capacitación Koppert Rapel (CEICKOR).

Los sistemas de cultivo (monocultivo) se realizaran en un invernadero de estructura metálica tipo capilla de 5 naves con cubierta de polietileno, y malla antiáfidos (protegen a las plantas de los insectos), con ventanas cenitales. Las condiciones ambientales internas (temperatura y humedad relativa) del invernadero se mantendrán monitoreadas con sensores (PRIVA) mediante un registrador hasta concluir el desarrollo de los cultivares.

III.2.2 Métodos

III.2.2.1 Recolección y procesamiento de material biológico

El material que se utilizó para el estudio fue recolectado directamente del invernadero donde se recolectarán 9 kilos de chile pimiento en un estado madurez adecuada, entendiendo esto como una coloración uniforme de cada tratamiento. Se cortaron en cubos sin incluir los pedúnculos y la placenta. Se congelaron con nitrógeno líquido. Al finalizar el tiempo de congelado, se molieron en una licuadora marca KRUPS modelo GX4100 y se guardará protegiéndolas de la luz en un ultra congelador a una temperatura de -70°C para análisis posteriores.

III.2.3 Cuantificación de compuestos antioxidantes

III.2.3.1 Extracción metanólica

La extracción se realizaron de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martínez y col., (2002) se colocaron 200 mg de muestra en un matraz de 50 mL y se adicionaron 10 mL de metanol. Se cubrió de la muestra con papel aluminio y se agita durante 24 h. Centrifugando a 4000 rpm por 10 min, desechando la pastilla formada, quedando el sobrenadante.

III.2.3.2 Determinación de Taninos Condensados

Para la cuantificación de taninos condensados se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Feregrino-Pérez y col. (2008) en microplaca. 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 sacó 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 triplicado. Se adicionaron 200 μ l de la solución 1:1 de HCl 8%: Vainillina. Debe 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) y se colocaron en los pozos. En seguida, se adicionaron 200 μ l de la solución 1:1 de HCl 8%: vainillina 1%. Debe adicionarse de 50 μ l en 50 μ l a cada uno de los pozos hasta completar los 200 μ l, protegiendo las muestras de luz y oxígeno. Posteriormente, se midió la absorbancia a 492 nm en espectrofotómetro MultiskanTM Go, Thermo scientific.

Se preparó un blanco al cual se le adiciona 50 μ l del sobrenadante (muestra y se le añadieron 200 μ l de HCl 4%). Se lee en espectrofotómetro MultiskanTM Go, Thermo scientific a 492 nm realizándolo por triplicado. Se compararon con la curva de calibración y se expresaron como mg de (+)-catequina por gramo de muestra fresca.

III.2.3.3 Determinación de Flavonoides

La determinación de los flavonoides totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Oomah y col., 2005. Se realizó una curva de calibración para la cual se colocaron 50 μ l de cada una de las concentraciones (50, 25, 10, 2.5 y 1 μ g/mL de rutina) por triplicado. Se adicionaron 180 μ l de agua destilada, y se incorporaron 20 μ l de solución 2-aminoetildifenil borato 1%. El blanco se realizó con 230 μ l de metanol y 20 μ l de 2-aminoetildifenilborato 1%, se midió en espectrofotómetro MultiskanTM Go, Thermo scientific a una absorbancia de 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 metanol, se adicionaron 20 μ l de solución 2-aminoetildifenilborato al 1%, se midió la absorbancia de 404 nm en espectrofotómetro MultiskanTM Go, Thermo scientific. Los resultados son interpolados a la curva del estándar y

fueron expresados como mg equivalentes de rutina por gramos de muestra fresca. Las pruebas se realizaron por triplicado al igual que el blanco.

III.2.3.4 Determinación de Fenoles Totales

Se realizó una curva de calibración para la cual se prepararon las siguientes soluciones. La solución de Na₂CO₃ al 20%, se pesaron 5 g de carbonato de sodio y se disolvió en 20 mL de agua destilada, se sónico hasta disolver completamente y se aforó a 25 mL. Para la solución de ácido gálico 0.1 mg/mL, se tomaron 10 mg de ácido gálico y se aforo a 10 mL con agua destilada. De esta solución se tomaron 1 mL y se aforo con 10 mL de agua destilada. Se rotularon los tubos y se le adicono a cada tubo la cantidad necesaria de la sustancia de acuerdo al Tabla III.1 y se agito en vortex, se dejaron reposar 2 horas en la oscuridad para posteriormente leer en un espectrofotómetro marca MultiskanTM Go, Thermo scientific a 760nm.

Tabla III.1 Distribución de compuestos para curva de calibración.

Tubo	Solución ácido gálico (ul)	Agua destilada (ul)	Folin	Na ₂ CO 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 de folin y 1250 μL de Na_2CO_3 . Se dejó reposar por 2 horas en oscuridad para posteriormente hacer la lectura en espectrofotómetro marca Multiskan™ Go, Thermo scientific a 760nm. Las lecturas se hicieron por triplicado.

III.2.3.5 Determinación de Capacidad antioxidante por DPPH

El método original de Brand-Williams y col., (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; 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.

III.2.3.5.1 Preparación de las muestras

Se cubrió con papel aluminio un matraz aforado de 25 mL; y se pesó en él 0.0015 g de DPPH, el cual se reservó para análisis posteriores. En una placa de 96 pozos, se añadieron 20 μl de la muestra en cada pozo según el diseño experimental mostrado en el Tabla III.2; conforme se llenaron los pozos, se taparon con papel parafilm. En el matraz aforado que contenía el DPPH, se aforo a 25 mL de metanol, se agregaron 200 μl de esta solución a la placa en menos de 1 minuto con la micropipeta multicanal; excepto en el blanco (agua HPLC). La microplaca es leída en Multiskan™ Go, Thermo scientific bajo el programa establecido $\lambda = 540 \text{ nm}$ cada 10 minutos durante dos hora (120 minutos). La placa se mantuvo cubierta y en la oscuridad a temperatura ambiente entre lecturas.

Tabla III.2 Diseño experimental

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O											
B	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
C	T _{0.5}	T _{0.5}	T _{0.5}	T ₁	T ₁	T ₁	T ₂	T ₂	T ₂	T ₃	T ₃	T ₃
D	T ₄	T ₄	T ₄	T ₀₅	T ₅	T ₅	T ₆	T ₆	T ₆	T ₇	T ₇	T ₇
E	T ₈	T ₈	T ₈	BHT	BHT	BHT	M	M	M	M	M	M
F	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
G	M	M	M	M	M	M						

20µL de muestra más 200µl de DPPH.

OH= Metanol (control negativo).

T= Trolox (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800µM).

BHT= Butirato de hidroxitolueno (100µM).

M= Muestras

DPPH= 2,2-difenilpicrilhidrazilo.

III.2.3.5.2 Cálculo de la capacidad antioxidante

La actividad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, usando la siguiente ecuación (Burda y Oleszek, 2001):

$$ARA = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})$$

Donde ARA= actividad antirradical, A_{muestra} es la absorbancia de la muestra a 520nm y A_{control} es la absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

III.2.3.6 Determinación de capacidad antioxidante por ABTS

El método fue desarrollado usando el 2,2'-asinobis (ácido-6-sulfónico-3-etilbenzotiazolina (ABTS) ensayo descrito por Nenadis y col. (2004) modificado para ser elaborado en microplaca de 96 pozos. Brevemente, una alícuota de 20 μL del extracto se mezcló con 230 μL de una solución de ABTS^{•+} previamente preparada. El control contenía todos los reactivos excepto el extracto. La absorbancia fue leída a 730 nm a 0 y 6 minutos en un espectrofotómetro marca MultiskanTM Go, Thermo scientific. Los resultados para la actividad antiradical del ABTS fueron expresados como la concentración media inhibitoria (%).

III.2.4 Cuantificación de Ácido Ascórbico por HPLC.

III.2.4.1 Extracción de Ácido Ascórbico

Ácido Ascórbico se determinó según el método de Ruiz-Cruz *et al.*, (2010). Se pesan (2 g) de pimiento morrón y se homogeneizaron (Homogeneizador Ika Basics T18), adicionando 15 mL. ácido metafosfórico 4 %. La mezcla se sometió a ultrasonidos (Sonicator VWR modelo 150 D) durante 5 min y se centrifugó (centrífuga Thermo Scientific sorvall ST16) a 1.610 \times g durante 10 min a temperatura ambiente. El extracto se filtró a través de una membrana de polietileno de 0,45 micras de tamaño de poro (Millipore Corp., Bedford, MA).

III.2.4.2 Cuantificación de Ácido Ascórbico

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). Se utilizó el equipo Agilent 1200, con un detector de arreglo de diodos. Ácido Ascórbico se determinó a $\lambda = 254$ nm. Cada extracto fue analizado en tres ocasiones. Se utilizó una columna C18 con partículas de 25 μm , SORBAZ eclipse plus (Agilent), (4,6 x 250 mm , 5 micras) de columna de fase inversa, con una temperatura de 25 ° C. La fase móvil (sistema isocrático) de 0.2 M KH_2PO_4 , ajustando su valor de pH final de 2.3 con ácido o-fosfórico al 85 %. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min. Para identificar y cuantificar ácido ascórbico en las muestras, se utilizó un estándar externo de ácido ascórbico puro (Sigma) con un 99% de pureza.

III.2.5 Cuantificación de Carotenoides por HPLC.

III.2.5.1 Extracción de Carotenoides

Carotenoides se determinaron según el método de Ornelas-Paz *et al.*, (2010) Se realizó una extracción por colecta. Para ello se tomaron 2 g de muestra en un tubo eppendorf posteriormente se añadir 500 μ l de etanol con BHT al 0.1%. Posteriormente agitar, después calentar a 80°C durante 5 min. Posteriormente agregar 10 μ l de KOH al 80% y agitar. Por segunda ocasión calentar durante 10 min. Transcurrido el tiempo poner en hielo durante 10 min. y añadir 500 μ l de agua destilada y agitar. Posteriormente añadir 500 μ l de hexano, agitar hasta deshacer la pastilla. En seguida centrifugar (centrífuga Thermo Scientific sorvall ST16) a 7000 rpm durante 10 min a 4°C. Transcurrido el tiempo extraer la fase 400 μ l de la fase superior (oleosa). Volver a centrifugar (centrífuga Thermo Scientific sorvall ST16) a 7000 rpm durante 10 min a 4°C, transferir a otro tubo eppendorf 200 μ l de la fase superior y evaporar todo el hexano con nitrógeno gas. Resuspender la muestra en etanol grado HPLC, volver a centrifugar (centrífuga Thermo Scientific sorvall ST16) a 7000rpm/10 min/4°C. Extraer 100 μ l y verter en un inserto y ponerlo en los viales, posteriormente almacenar hasta su análisis en ultracongelación -70°C.

III.2.5.2 Cuantificación de Carotenoides

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). Se utilizó el equipo Agilent 1200, con un detector de arreglo de diodos. Los carotenoides se determinó a dos longitudes de onda $\lambda = 290$ y 450 nm. Cada extracto fue analizado en tres ocasiones. Se utilizó una columna C18 con partículas de 25 μ m, SORBAZ eclipse plus (Agilent), (4,6 x 250 mm, 5 micras) de columna de fase inversa, con una temperatura de 30 °C. Los carotenoides fueron inyectados en 20 μ l de muestra, la duración de la corrida de 30 min. La fase móvil con un gradiente A 55% (metanol) y B 45% (acetonitrilo), con un flujo de 1 ml/min hasta los 13.59 min, y posteriormente del min 14 hasta los 30 min un flujo de 2 ml/min. Para identificar y cuantificar carotenoides en las muestras, se utilizaron estándares externos de Luteína, Zeaxantina, tocoferol, β -croptoxantina, licopeno y β -caroteno puro (Sigma) con un 99% de pureza. Para el cual se realizó una curva de calibración para cada compuesto.

III.2.6 Cuantificación de Flavonoides por HPLC.

III.2.6.1 Extracción de Flavonoides

Flavonoides se determinaron según el método de Kim *et al.*, (2010). Se pesan (5 mg) de pimiento morrón liofilizado y se homogeneizaron (Homogeneizador Ika Basics T18), adicionando 1mL. Metanol grado HPLC. La mezcla se sometió a ultrasonidos (Sonicator VWR modelo 150 D) durante 18 h. y se centrifugó (centrífuga Thermo Scientific sorvall ST16) a 7000 rpm/10 min/4°C. El extracto se filtró a través de una membrana de polietileno de 0,45 micras de tamaño de poro (Millipore Corp., Bedford, MA).

III.2.6.2 Cuantificación de Flavonoides

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). Se utilizó el equipo Agilent 1200, con un detector UV/Vis. Los flavonoides se determinó a dos longitudes de onda $\lambda = 260$ y 320 nm. Cada extracto fue analizado en tres ocasiones. Se utilizó una columna C18 con partículas de $25 \mu\text{m}$, SORBAZ eclipse plus (Agilent), (4,6 x 250 mm, 5 micras) de columna de fase inversa, con una temperatura de 25°C . Los Flavonoides fueron inyectados en $10 \mu\text{l}$ de muestra, la duración de la corrida de 67 min. La fase móvil consistió en dos disolventes: A (Ácido fórmico:Agua) 1/99 v/v y B (acetonitrilo), con un flujo de 1 ml/min, en una relación (A /B) de 98/2 a los 0 min, 68/32 en 30 min, 45/55 en 48 min, 5/95 en 53 min, 98/2 a 57 minutos, y el tiempo total fue de 67 min. Para identificar y cuantificar Flavonoides en las muestras, se utilizaron estándares externos de ácido clorogenico, epicatequina, hesperidina, ácido cumárico, ácido cafeico, epigallocatequin galato, rutina, ácido sinápico, ácido elágico, vainillina, ácido rosmarinico, quercetina y resveratrol puro (Sigma) con un 99.9% de pureza. Para el cual se realizó una curva de calibración para cada compuesto.

III.2.7 Cuantificación de Flavonoides por GC-MS.

La muestra se preparó en metanol HPLC (1 mg / ml), el metanol fue evaporado con nitrógeno gas, y posteriormente se agregaron $50 \mu\text{l}$ de agente de derivatización, BSTFA (N, O-bis [trimetilsilil] trifluoroacetamida) + 1% TMCS (trimetilclorosilano), se agitó durante 2 min a temperatura ambiente. Finalmente, $1 \mu\text{l}$ se inyectó en un cromatógrafo GC-MS. El equipo utilizado consistió en un GC de la serie Agilent 7890A (Wilmington, DE, EE.UU.) y un detector

Agilent simple cuarupolo MS (modelo 5975C), con set de energía de electrones a 70 eV y el intervalo de masas 50-700 m / z. Una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0.25 lm) y un inyector splits/splitless (2 mm de diámetro). El inyector tenía una temperatura 250 °C. GC se utilizó en modo splitless con un tiempo de 2.5 minutos sin splitless. La temperatura inicial del horno fue 100 °C durante 1 min y se elevó a 220 °C a 6 °C/min, se mantuvo durante 1.23 min, luego se elevó a 290 °C a 10 °C/min, y luego se elevó a 310 °C a 40 °C/min, y se mantuvo durante 7.5 min. La velocidad de flujo de gas acarreador (Helio) se mantuvo a 1 ml/min. El control de GC-MS y el procesamiento de datos se realizaron con el software Chem-Station (Agilent Technologies).

III.2.8 Perfil Sensorial Descriptivo

Para cada tratamiento se emplearon lotes de 10 pimientos morrones para el análisis sensorial. El análisis descriptivo se realizó en un laboratorio de análisis sensorial. Diez panelistas entrenados de acuerdo al método Spectrum® (Mailgaard *et al.*, 2007) tomaron parte en las evaluaciones. Tres meses antes de los análisis, los panelistas fueron sujetos a sesiones de entrenamiento para familiarizarse con los términos descriptivos (4 sesiones por semana de 60 min cada una). Durante las sesiones de entrenamiento, los panelistas alcanzaron una desviación estándar en sus resultados menor a 1.0. Los panelistas evaluaron las muestras de tomate de acuerdo a los descriptores contenidos en un formulario (Tabla III.3).

Durante las sesiones, los panelistas evaluaron 5 muestras de pimiento morrón derivadas de 5 tratamientos, las muestras se presentaron por duplicado. Cada miembro del panel acudió a dos sesiones para evaluar 5 muestras en cada una. Las muestras se presentaron en cada sesión totalmente al azar. Para todas las sesiones se utilizó una escala de intensidades. La intensidad o fuerza para cada término descriptivo se describió como apenas detectable (1) e intensidad extrema (15).

Tabla III.3 Descriptores sensoriales utilizados en las sesiones por el panel de evaluadores

Descriptor	Definición	Referencia* e intensidad†
Aroma		
Aroma global	Intensidad de la impresión global originada por los compuestos volátiles liberados durante la percepción nasal	Leche en polvo Nestle = 4.0 Goma de mascar Wrigley Spearmint = 11
Cítrico	Aroma asociado con compuestos característicos del limón, naranja y uva	1 g de limón molido colocado en una copa = 9.0
Fresco	Aroma asociado con compuestos característicos de pasto, eucalipto y menta	Cubos de tomate fresco de 1 cm = 6.0
Herbáceo	Aroma asociado con compuestos característicos de hojas verdes	Hojas de tomate molidas colocadas en una copa = 10.0
Floral	Sensación aromática asociada con compuestos aromáticos característicos de geranio, violeta y rosas	Flores de tomate molidas colocadas en una copa = 8.0
Sabor		
Dulce	Sensación asociada con soluciones de azúcar en diferente concentración	Solución de sacarosa al 1% = 1.0 Solución de sacarosa al 6% = 6.0
Salado	Sensación asociada con soluciones de sal en diferentes concentraciones	Solución de NaCl al 0.20 % = 2.5 Solución de NaCl al 0.60% = 8.5
Ácido	Sensación asociada con soluciones de ácido cítrico en diferentes concentraciones	Solución de AC al 0.05% = 3.5 Solución de AC al 0.10% = 10
Amargo	Sensación asociada con soluciones de cafeína en diferentes concentraciones	Solución de cafeína 0.01% = 2.0 Solución de cafeína 0.035% = 5.0
Vegetativo	Sensación asociada con el sabor generado por los compuestos característicos de vegetales procesados y frescos	Chícharos enlatados Del Monte = 8.0
Textura		
Dureza externa	Describe la resistencia del producto cuando se comprime con una cuchara	Puré de tomate Campbell's = 4.0 Tomate fresco = 7.0
Jugosidad	Describe la cantidad de agua liberada por el producto en la boca durante el masticado	Rebanadas de aguacate = 5.0 Rebanadas de naranja = 15.0
Grumosidad	Describe la sensación de formación de grumos durante el masticado	Cubo de pera de 1 cm = 8.0
Dureza a la primer mordida	Describe la dureza del producto cuando se muerde con los dientes incisivos por primera vez	Queso Kraft Philadelphia = 1.0 Rodajas de zanahoria = 11.0
Resabio		
Vegetativo	Sabor básico asociado con vegetales frescos o procesados después de la masticación	Chícharos enlatados Del Monte = 8.0

* Las referencias fueron preparadas aproximadamente 24 h antes de cada sesión, refrigeradas durante la noche y retiradas del refrigerador 30 min antes de cada sesión de entrenamiento.

† Intensidad la intensidad se basa en una escala de 15 puntos con incrementos de 1.0, donde 1 representa apenas detectable y 15 representa intensidad extrema.

Las muestras de pimiento morrón fueron lavadas con agua corriente fría, se secaron con una toalla limpia y se colocaron en porciones cúbicas de un centímetro, se sirvieron cinco porciones de cada muestra a cada panelista. Los panelistas recibieron dos porciones de cada muestra en un plato de plástico desechable etiquetado con un código de tres dígitos. A cada panelista se le pidió:

1. Evaluar el aroma y características visuales (color y apariencia);
2. Usar una porción de pimiento morrón para evaluar sabor y textura.
3. Usar el resto de las porciones para primera mordida, primer masticada y evaluación de resabio. A los panelistas se les permitió comerse el segmento completo de pimiento morrón si ellos así lo desean si no lo expectoran.

Los panelistas enjuagaron su boca con agua mineral para neutralizar los sabores residuales en el paladar entre cada muestra, y también se les proporcionó una galleta integral después de enjuagar su boca. Ninguna información les fue proporcionada a los panelistas acerca de las muestras de pimiento morrón ni de los tratamientos a los que fueron sometidas.

III.2.9 Análisis Bromatológico en el pimiento morrón

Se utilizaron frutos de pimiento morrón de las distintas variedades evaluadas y en estado maduros. Las muestras de pimiento morrón fueron recolectadas del invernadero, se lavaron, se congelaron con nitrógeno líquido y posteriormente se llevaron a molienda para ser evaluados se determinó nitrógeno, extracto etéreo, fibra bruta hizo siguiendo los protocolos de la AOAC, 2002.

III.3 Análisis estadístico

Para cada variable en este estudio los datos fueron sujetos a un análisis de varianza y la diferencia entre las medias fue determinada por la prueba LSD a un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los datos fueron analizados utilizando el software JMP 5.0.1 (SAS Institute Inc.)

Los datos del análisis sensorial, bioactivos y bromatológicos fueron analizados con STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.0.03 (StatPoint Technologies, Inc.). La comparación de medias y la interacción entre los tratamientos y los panelistas fue evaluada

mediante análisis ANOVA de una y dos vías a un nivel de significancia de $p < 0.05$. El análisis de componentes principales (ACP) (por el método de covarianza) fue aplicado a la matriz de medias de los datos sensoriales en cada tratamiento. La matriz de datos sensoriales fue analizada posteriormente sólo para aquellos atributos que mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Estos datos fueron analizados mediante análisis jerárquico (HCA) para agrupar aquellos tratamientos con perfiles sensoriales y bioactivos similares y los análisis de regresión lineal múltiple (MLR).

Los análisis GC-MS se analizaron por la agrupación jerárquica se realizó sobre los datos normalizados de transformación logarítmica. Donde un pequeño valor (unidad) se añadió a cada valor normalizado para permitir la transformación logarítmica. Los datos de transformación logarítmica fueron centrados en la mediana por los metabolitos antes de la agrupación para una mejor visualización. La correlación de Pearson se utilizó para obtener similitudes métricas. El esquema de color marrón / rosa fue utilizado en los mapas de color de los metabolitos. Para determinar qué vías metabólicas se ven afectados por el estrés inducido (SA y H₂O₂ / CE), los metabolitos diferenciales identificados fueron asignadas mediante el software MetaboAnalyst 3.0. Para el análisis, se emplearon la biblioteca de la vía *Arabidopsis thaliana* (*Thale berro*), donde se analizaron la prueba hipergeométrica, y los algoritmos de centralidad. El software proporciona un coeficiente de ajuste (p) a partir del análisis de enriquecimiento de la vía y un factor de impacto a partir del análisis de topología para cada vía analizada.

CAPÍTULO 4:

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 Contenido de Fenoles totales, flavonoides y taninos en los diferentes colores de pimientos morrones.

IV.1.1 Fenoles Totales

El rendimiento de la extracción de pimiento rojo dulce fue el más alto, seguido de naranja y pimiento amarillo. El orden del rendimiento de extracto de metanol es de acuerdo a la orden del nivel de contenido de fenoles totales, que fue la más alta de 0.024 mg equivalentes de ácido gálico/g de naranja dulce pimienta. El contenido de fenoles totales de rojo y amarillo pimientos dulces fue de 0,021 y 0,018 mg de ácido gálico equivalente/g, respectivamente. El contenido de fenoles totales de pimientos dulces fue similar a los reportados por (Vinson *et al.*, 1998). Se observó que el contenido total de fenoles con respecto a color correspondientes en función de pimienta dulce, si se evalúan los tratamientos de cada color que en pimiento amarillo dulce contenía la mayor concentración de 0.018 mg de ácido gálico equivalente/g para el tratamiento 4 y el nivel de concentración más baja de 0,011 mg de ácido gálico equivalente/g, lo que corresponde al tratamiento 8. Este espectáculo que en el tratamiento 4 fue la mayor concentración de los inductores utilizados: SA (0,1 mm) y H₂O₂ (36 mM) y una baja concentración de conductividad eléctrica: EC (3,2 dS/m). Esto se muestra por el aumento del contenido de fenoles totales por encima del control (tratamiento 1) que corresponde a 0,015 mg de equivalente de ácido gálico/g, que es significativamente diferente. Según (Mejía - Teniente *et al.*, 2013), la combinación de inductores a altas concentraciones, el efecto sobre el estrés oxidativo en la planta y la producción de diferentes metabolitos secundarios, así como el contenido de fenoles totales. El pimiento naranja dulce contiene la mayor concentración de 0,024 mg equivalentes de ácido gálico/g, lo que corresponde al tratamiento 5 y el nivel de concentración más baja de 0,016 mg de ácido gálico equivalente/g para el tratamiento 2 y 9. Este espectáculo que en el tratamiento 5 se aplicó estrés abiótico con los más altos niveles de

conductividad eléctrica: EC (3,6 dS/m). Se aumenta el contenido fenólico total por encima del control (tratamiento 1) que corresponde a equivalente de ácido gálico 0,018 mg/g, este es significativamente diferente. Pimienta dulce roja contiene la mayor concentración de 0.021 mg de equivalente de ácido gálico/g en el tratamiento 2 y el nivel de concentración más bajo a 0.014 mg de ácido gálico equivalente/g, correspondiente al tratamiento 4, 5 y 9. El tratamiento 2 utiliza más alta concentración de inductor: H₂O₂ (36 mM) y EC (3,6 dS/m). Esta muestra el aumento del contenido de fenoles totales por encima del control (tratamiento 1) corresponden 0.016 mg de ácido gálico equivalente/g es significativamente diferente (Tabla IV.1). De acuerdo con algunos estudios (Duh *et al.*, 1999; Komali *et al.*, 1999), hizo hincapié en el papel clave de los compuestos fenólicos como captadores de radicales libres.

Tabla IV.1 Contenido de flavonoides, taninos, y fenoles en los diferentes colores de pimiento morrón.

Variedad	Tratamiento	Flavonoides (μg rutina/g muestra)	$\pm\text{SD}$	Taninos (mg (+)catequina/g muestra)	$\pm\text{SD}$	Fenoles (mg acido galico/g muestra)	$\pm\text{SD}$
Amarillo Baselga	1	223.819 ^{c,d}	30.035	0.704 ^b	0.195	0.015 ^b	0.001
	2	208.786 ^{b,c}	26.456	0.714 ^b	0.218	0.014 ^b	0.003
	3	199.600 ^{a,b,c}	34.919	0.662 ^b	0.233	0.014 ^{a,b}	0.002
	4	181.310 ^{a,b}	30.336	0.874 ^{b,c}	0.269	0.018 ^c	0.008
	5	196.378 ^{a,b,c}	31.279	0.976 ^c	0.433	0.014 ^{a,b}	0.002
	6	182.818 ^{a,b}	40.227	0.740 ^b	0.381	0.012 ^{a,b}	0.001
	7	219.029 ^{c,d}	31.584	0.189 ^a	0.134	0.014 ^{a,b}	0.003
	8	248.104 ^d	83.535	0.224 ^a	0.091	0.011 ^a	0.001
	9	168.765 ^a	52.244	0.885 ^{b,c}	0.358	0.013 ^{a,b}	0.005
Naranja Orangela	1	240.676 ^a	46.690	1.895 ^{c,d}	0.600	0.018 ^{a,b}	0.006
	2	276.327 ^{a,b,c}	116.719	1.524 ^{b,c}	0.731	0.016 ^a	0.006
	3	235.235 ^a	43.401	1.663 ^{b,c}	0.398	0.020 ^{a,b,c}	0.010
	4	246.814 ^a	79.086	1.328 ^b	0.694	0.018 ^{a,b}	0.007
	5	255.307 ^{a,b}	40.503	1.678 ^{b,c}	0.514	0.024 ^c	0.007
	6	256.555 ^{a,b}	53.488	1.504 ^{b,c}	0.266	0.014 ^a	0.002
	7	313.069 ^c	53.507	1.789 ^c	0.464	0.022 ^{b,c}	0.007
	8	303.182 ^{b,c}	63.202	0.467 ^a	0.155	0.018 ^{a,b}	0.009
	9	277.111 ^{a,b,c}	24.920	2.259 ^d	0.285	0.016 ^a	0.002
Rojo Fascinato	1	237.577 ^b	54.999	2.726 ^a	0.689	0.016 ^{a,b}	0.003
	2	195.397 ^a	50.359	2.613 ^a	0.498	0.021 ^c	0.008
	3	211.332 ^{a,b}	32.675	2.709 ^a	0.417	0.020 ^{b,c}	0.011
	4	210.569 ^{a,b}	40.623	2.619 ^a	0.550	0.014 ^a	0.003
	5	226.277 ^{a,b}	35.519	2.701 ^a	0.360	0.014 ^a	0.004
	6	225.782 ^{a,b}	50.630	2.674 ^a	0.380	0.017 ^{a,b,c}	0.004
	7	275.124 ^c	59.381	2.669 ^a	0.667	0.016 ^a	0.002
	8	364.482 ^d	35.263	2.474 ^a	0.455	0.021 ^c	0.002
	9	220.510 ^{a,b}	40.898	2.835 ^a	0.400	0.014 ^a	0.003

Diferencia significativa ($P < 0.05$) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

IV.1.2 Flavonoides Totales

Los flavonoides totales en los diferentes cultivares de pimiento dulce corresponde una mayor concentración en el pimiento rojo, seguida de naranja y amarillo con una concentración de 364.482 mg rutina equivalente/g de pimiento rojo dulce y 313.069 mg rutina equivalente/g 248.104 rutina mg equivalente/g para el amarillo, y naranja pimiento, respectivamente. Si se

analizan cada tratamientos de los diferentes cultivar el pimiento dulce amarillo la concentración más alta 248.104 g rutina equivalente/g. El tratamiento 8 se utilizó altas concentraciones de elicitors tratamiento 8 y la concentración más baja 168.765 g rutina equivalente/g para el tratamiento 9 correspondiente. Y conductividad eléctrica: SA (0,1 mM), H₂O₂ (36 mM) y EC (3,6 dS/m). Tratamiento 8 mostró los más altos de concentración de flavonoides, pero respecto al control (tratamiento 1), no mostró diferencia significativa, indicando que no hay efecto del estrés en esta dulce pimienta. El pimiento dulce de naranja tiene mayor concentración 313.069 g rutina equivalente/g. El tratamiento 7 se utilizó alta concentración de inductor de tratamiento 7 y la concentración más baja 235.235 g rutina equivalente/g Tratamiento 3 correspondiente: SA (0,1 mM) y la conductividad eléctrica: CE (3,6 dS/m). Respecto al control (tratamiento 1), el tratamiento 7 mostró la concentración más alta cantidad de flavonoides, mostró 30 por ciento más alto contenido de flavonoides con respecto al control , lo que indica que hay una interacción sinérgica entre el SA y CE, este efecto potencial sobre la producción de flavonoides en esta especie de pimiento. Pimienta dulce roja la más alta concentración de 364.482 g rutina equivalente/g, correspondiente al tratamiento 8 y la concentración más baja 195.397 g rutina equivalente/g, correspondiente al tratamiento 2. El tratamiento 8 utiliza altas concentraciones de elicitors y la conductividad eléctrica: SA (0,1 mM), H₂O₂ (36 mM) y EC (3,6 dS/m). Respecto al control (tratamiento 1), el tratamiento 8 mostró la concentración más alta cantidad de flavonoides, mostró 50 por ciento más alto contenido de flavonoides con respecto al control, lo que indica que hay una interacción sinérgica entre el SA, H₂O₂ y CE, este efecto potencial en la producción de flavonoides en esta especie de pimiento.

IV.1.3 Taninos Condensables Totales

La cantidad de taninos totales, dependiendo del cultivar corresponde a la mayor concentración de pimiento naranja 2,259 mg (+) catequina equivalente/g seguido 0,976 mg (+) catequina equivalente/g pimiento amarillo y pimiento rojo dulce no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. Tratamientos analizados en cada cultivar de pimiento dulce mostraron que la pimienta dulce amarilla la mayor concentración 0,976 mg de (+) catequina equivalente/g se corresponde con el tratamiento 5 y la concentración más baja 0,189 mg de (+) catequina equivalente/g, correspondiente al tratamiento 7. El tratamiento 5 utiliza la más alta concentración de la conductividad eléctrica: EC (3,6 dS/m). Respecto al control (tratamiento 1) , el tratamiento 5 mostró la concentración más alta cantidad de taninos, mostró 38 por ciento más alto contenido

de contenido de taninos con respecto al control, lo que indica que hay sólo efecto de la CE, este efecto potencial en la producción de taninos en esta especie de pimienta. Pimienta dulce Naranja la mayor concentración de 2,259 mg (+) catequina equivalente/g para el tratamiento 9, y la concentración más baja de 0,467 mg de (+) catequina equivalente/g para el tratamiento 8. Entonces, el tratamiento 9 utiliza concentraciones intermedias de inductor: SA (0,01 mM), H₂O₂ (18 mM) y conductividad eléctrica: EC (3,4 dS/m). Pimienta roja no presentó diferencias significativas entre los tratamientos. Tratamiento 9 mostró los más altos de concentración de taninos, pero respecto al control (tratamiento 1), no mostró diferencias significativas, indicando que no hay efecto del estrés en esta dulce pimienta.

IV.1.4 Carotenoides totales en los diferentes colores de pimienta morrón

Frutos de pimienta morrón experimentan profundas transformaciones morfológicas, fisiológicas y metabólicas en cuanto a la composición del pigmento y el contenido durante la maduración. Estos cambios en la composición de la fruta son afectados por el genotipo, madurez y condiciones de crecimiento (Howard *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2004). La clorofila es responsable del color verde de los frutos de chile, las antocianinas son pigmentos de color violeta / púrpura y el amarillo-naranja los colores son proporcionados por α - y β -caroteno, zeaxantina, la luteína y β -criptoxantina. Los carotenoides con formas oxigenados tales como los que llevan acylcyclopentanol grupos terminales controlan el rojo colorear frutos de chile. Los ejemplos más característicos son la capsantina , capsorrubina y capsantina - 5 ,6 - epóxido (Sun *et al.*, 2007). Niveles Capsantina pueden representar hasta el 50 % del total de fruta de carotenoides contenido durante la fase de maduración. La estructura capsantina contiene 11 dobles enlaces conjugados, un grupo cetona conjugada y un anillo de ciclopentano.

Los tratamientos que tuvieron mayor cantidad de carotenoides totales respecto del control fueron solo en la variedad Baselga y Orangela ya que fascinato no obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos. En la variedad Baselga el tratamiento 5 y 8 obtuvieron mayor cantidad de carotenoides con un valor de 15.992, 16.016 mg β -caroteno/g muestra fresca respectivamente lo que nos indica que en el tratamiento 5 solo hubo un efecto de la conductividad eléctrica de 3.6 dS/m con respecto del control y en el tratamiento 8 hubo un efecto sinérgico de los elicitores (SA y H₂O₂) y la conductividad eléctrica en sus concentraciones más altas de (0.1 mM y 36 mM) para cada elicitador respectivamente y en la CE con un valor de 3.6 dS/m. En cuanto a la variedad

Orangela el tratamiento que obtuvo mayor cantidad de carotenoides respecto del control fue el tratamiento 3 donde solo existe el efecto del SA en su concentración de 0.1 mM. Lo que nos lleva a suponer que si hay efecto de los elicitores dependiendo de la variedad.

Tabla IV.2 Contenido de Carotenoides totales en los diferentes colores de pimiento Morrón.

Tratamiento	Baselga		Fascinato		Orangela	
	Carotenoides Totales*	± DS	Carotenoides Totales*	± DS	Carotenoides Totales*	± DS
1	15.243 ^{ab}	0.297	50.190 ^a	2.860	53.546 ^{bc}	1.573
2	14.564 ^{ab}	0.649	55.107 ^a	6.780	53.420 ^{bc}	0.693
3	13.211 ^b	0.531	42.993 ^a	1.340	59.528 ^a	1.008
4	13.172 ^b	0.208	43.341 ^a	1.282	53.072 ^{bc}	1.048
5	15.922 ^a	0.973	46.614 ^a	1.744	52.684 ^{bc}	0.745
6	12.982 ^b	0.165	45.926 ^a	1.339	47.434 ^d	1.409
7	15.334 ^{ab}	0.584	48.483 ^a	3.214	56.832 ^{ab}	1.451
8	16.016 ^a	0.524	49.225 ^a	1.833	16.552 ^e	0.326
9	13.096 ^b	0.239	50.157 ^a	1.123	51.250 ^{cd}	0.372

* mg β-caroteno/g muestra fresca

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

IV.1.5 Antocianinas en los diferentes colores de pimiento

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. El color de las antocianinas depende del número y orientación del grupo hidroxilo y metoxilo de la molécula. Por ejemplo, incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incremento en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Wrolstad *et al.*, 2004).

De las muestras de pimientos analizadas, solo en la variedad baselga y fascinato hubo diferencias significativas en el tratamiento 8 y en el tratamiento 1 (Control) respectivamente. EL la variedad baselga el tratamiento 8 obtuvo una mayor cantidad de antocianinas con respecto del control con un valor 0.019 mg/g muestra tanto en la delfinidina como en la cianidina lo que

nos indica que en este tratamiento tuvimos una interacción de los elicitores en sus concentraciones altas (SA y H₂O₂) y la conductividad eléctrica.

Por otro lado sabemos que la única acumulada en varios tipos de chiles en mayores cantidades es la delfinidina como en el chile uvilla, árbol, entre otros. En los cuales los chiles uvilla durante su desarrollo producen mayor cantidad de antocianinas y los de árbol los acumulan durante su madures, las cantidades que se han detectado son de 40 y 50 DPA las cuales no pueden detectarse a simple vista por el ojo humano, son tan pequeñas estas cantidades que no se puede ver una coloración pero en este tipo de chile son cantidades muy grandes (Sadilova *et al.*,2006). Además la producción de antocianinas en las solanaceae y en la mayoría de las plantas está regulada por el cambio de pH y este influye desde la acidez vacuolar y esto influye en las diversas formas de las antocianinas por decir en el rango del pH ácido, las antocianinas se presentan como un catión de flavilio rojo, lo que puede confundir esta lectura con algunos carotenoides presentes en el chile (Hernann, 1991). El estrés sal disminuye los niveles de antocianinas (Petrusa y Winicov, 1997; Ramakrishna y aswathanarayana, 2011) lo cual lo podríamos relacionar con la CE eléctrica en los tratamientos aplicados ya que los vegetales que contienen antocianinas son muy resistentes a la sequía lo cual la producción de antocianinas es bajo (Chalker-Scott, 1999). Arakawa *et al.*, 1985 estudió el efecto de la radiación UV luz sobre la acumulación de antocianinas en luz en los chiles rojos lo cual la Uv entre 280-320 nm estimula la síntesis de antocianinas.

Tabla IV.3 Contenido de Antocianinas en los diferentes colores de pimiento morrón.

Tratamiento	Baselga				Fascinato				Orangela			
	Delfinidina*	± DS	Cianidina**	± DS	Delfinidina*	± DS	Cianidina**	± DS	Delfinidina*	± DS	Cianidina**	± DS
1	0.013 ^{ab}	0.001	0.006 ^d	0.002	0.030 ^a	0.005	0.027 ^a	0.003	0.024 ^a	0.001	0.023 ^a	0.001
2	0.012 ^{bc}	0.001	0.009 ^{bcd}	0.002	0.023 ^{ab}	0.001	0.023 ^a	0.002	0.026 ^a	0.002	0.025 ^a	0.002
3	0.008 ^c	0.001	0.006 ^{cd}	0.001	0.028 ^{ab}	0.002	0.025 ^a	0.001	0.025 ^a	0.002	0.025 ^a	0.002
4	0.016 ^{ab}	0.001	0.014 ^{abc}	0.001	0.019 ^{ab}	0.003	0.020 ^a	0.003	0.026 ^a	0.002	0.024 ^a	0.002
5	0.017 ^{ab}	0.001	0.016 ^{ab}	0.001	0.028 ^{ab}	0.003	0.026 ^a	0.002	0.024 ^a	0.002	0.022 ^a	0.002
6	0.014 ^c	0.001	0.013 ^d	0.001	0.025 ^{ab}	0.002	0.022 ^a	0.001	0.024 ^a	0.002	0.023 ^a	0.003
7	0.010 ^{bc}	0.003	0.010 ^d	0.002	0.025 ^{ab}	0.002	0.022 ^a	0.003	0.022 ^a	0.002	0.022 ^a	0.003
8	0.019 ^a	0.002	0.018 ^a	0.003	0.017 ^b	0.002	0.018 ^a	0.002	0.007 ^b	0.002	0.007 ^b	0.002
9	0.012 ^c	0.001	0.011 ^d	0.001	0.024 ^{ab}	0.002	0.021 ^a	0.002	0.025 ^a	0.003	0.025 ^a	0.003

* mg delfinidina/g muestra fresca

** mg Cianidina/g muestra fresca

IV.1.6 Capacidad antioxidante en los diferentes colores de pimiento

La capacidad de barrido del radical ABTS y DPPH se muestra en la (Tabla IV.4). Las capacidades radicales de pimientos dulces rojos, anaranjados y amarillos fueron significativamente diferentes con las concentraciones más altas en el orden mencionado. Este patrón fue similar a la del contenido total de compuestos fenólicos. La capacidad de absorción del radical ABTS de amarillo pimientos dulces con las concentraciones más altas se observó en 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 aunque no mostraron diferencias significativas. Se observó que las concentraciones más bajas en los tratamientos 7 y 8 con equivalentes 1,973 y 2,008 mmol Trolox/g, respectivamente. Tratamientos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 mostraron la capacidad de absorción más alto de la concentración de radicales ABTS pero respecto al control (tratamiento 1), no mostraron diferencias significativas, indicando que no hay efecto de la tensión entre los tratamientos en este dulce pimienta. Pimiento naranja con las concentraciones más altas fueron los tratamientos 1, 5 y 7 con 2.868, 2.837 y 2.878 equivalentes Trolox mmol/g, respectivamente, y la concentración más baja 1,859 equivalentes Trolox mmol/g para el tratamiento 8. Tratamientos 1, 5, y 7 mostró la mayor capacidad de absorción de la concentración de radical ABTS pero respecto al control (tratamiento 1), no mostró diferencia significativa, indicando que no hay efecto de la tensión entre los tratamientos en este dulce pimienta. Pimiento rojo con las concentraciones más altas fueron los tratamientos 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 no mostraron diferencias significativas y las concentraciones más bajas fueron el tratamiento 1 y 9 con 2,441 y 2,526 equivalentes Trolox mmol/g, respectivamente. Respecto al control (tratamiento 1), tratamientos 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 mostraron la capacidad de absorción más alta del radical ABTS, mostró 19 por ciento más de capacidad de absorción del radical ABTS con respecto al control, lo que indica que hay una interacción sinérgica entre el SA, H₂O₂ y CE, este efecto mostró una capacidad antioxidante más alta en esta especie de pimiento. La capacidad de absorción para el radical DPPH en el pimiento dulce amarillo concentraciones más altas 6.686, 6.625 y 6.244 mmol equivalentes de Trolox/g al tratamiento 5, 6 y 9 y la concentración más baja equivalentes de Trolox 1,563 mmol/g para el tratamiento 8. Respecto al control (tratamiento 1), tratamientos 5, 6, y 9 mostraron la capacidad de absorción más alta del radical DPPH, mostraron 32 por ciento más de capacidad de absorción del radical DPPH con respecto al control, lo que indica que hay una interacción sinérgica entre el SA, el H₂O₂ y la CE en sus concentraciones altas e intermedias, este efecto mostró una capacidad antioxidante más alta en esta especie de pimiento. Pimiento

dulce naranja concentraciones más altas 6.049, 6.021 y 6.158 mmol equivalentes de Trolox/g para los tratamientos 2, 4 y 7 respectivamente, y la concentración más baja de 3,455 mmol equivalentes de Trolox/g para el tratamiento 8. Respecto al control (tratamiento 1), el tratamientos 2, 4, y 7 mostraron la capacidad de absorción más alta del radical DPPH, mostró 8 por ciento más de capacidad de absorción del radical DPPH con respecto al control, lo que indica que hay una interacción sinérgica entre el SA, H₂O₂ y CE, este efecto mostró una mayor capacidad antioxidante en esta especie de pimiento. Pimienta dulce roja mayores concentraciones 6,453, 6,516 y 6,563 mmol equivalentes Trolox /g para el tratamiento 4, 6 y 9, respectivamente, y concentraciones más bajas 5,014 mmol equivalentes trolox/g para el tratamiento 1. Respecto al control (tratamiento 1), tratamientos de 4, 6 y 9 mostraron la capacidad de absorción más alta del radical DPPH, mostró 30 por ciento más de capacidad de absorción del radical DPPH con respecto al control, lo que indica que hay una interacción sinérgica entre el SA, H₂O₂ y CE, este efecto mostró un antioxidante mayor capacidad en esta especie de pimiento.

Tabla IV.4 ABTS y DPPH- capacidad antioxidante de los tres diferentes colores de pimiento Morrón

Variedad	Tratameento	ABTS (μ mol eq. TROLOX/g muestra)	\pm SD	DPPH (μ mol eq. TROLOX/g muestra)	\pm SD
Amarillo	1	2.907 ^b	0.071	5.050 ^c	1.092
	2	2.851 ^b	0.087	4.644 ^c	0.578
	3	2.832 ^b	0.050	4.236 ^{b,c}	0.528
	4	2.857 ^b	0.057	5.044 ^c	1.045
	5	2.925 ^b	0.040	6.686 ^d	0.324
	6	2.888 ^b	0.050	6.625 ^d	0.618
	7	1.973 ^a	0.999	3.706 ^b	2.565
	8	2.008 ^a	0.311	1.563 ^a	0.594
	9	2.899 ^b	0.066	6.244 ^d	0.482
Naranja	1	2.868 ^c	0.060	5.674 ^{b,c}	0.589
	2	2.815 ^{b,c}	0.133	6.049 ^c	0.385
	3	2.775 ^{b,c}	0.252	5.651 ^{b,c}	0.477
	4	2.787 ^{b,c}	0.161	6.021 ^c	0.481
	5	2.837 ^c	0.090	5.387 ^b	0.772
	6	2.807 ^{b,c}	0.097	5.944 ^{b,c}	0.481
	7	2.878 ^c	0.070	6.158 ^c	0.491
	8	1.859 ^a	0.343	3.455 ^a	1.508
	9	2.698 ^b	0.125	5.933 ^{b,c}	0.479

Roja	1	2.441 ^a	0.443	5.014 ^a	0.611
	2	2.796 ^b	0.103	6.053 ^{c,d,e}	0.362
	3	2.905 ^b	0.038	5.382 ^{a,b}	0.731
	4	2.873 ^b	0.071	6.453 ^e	0.649
	5	2.843 ^b	0.067	5.505 ^{a,b,c}	1.110
	6	2.850 ^b	0.050	6.516 ^e	0.505
	7	2.879 ^b	0.059	6.246 ^{d,e}	0.366
	8	2.825 ^b	0.112	6.563 ^e	0.404
	9	2.526 ^a	0.444	5.704 ^{b,c,d}	1.079

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por diferente letra entre tratamiento variedad

IV.1.7 Correlación entre los metabolitos secundarios y la capacidad antioxidante

Las correlaciones entre los compuestos bioactivos y la capacidad radical se muestran en (Tabla IV.5). La correlación de los contenidos de flavonoides, taninos y fenoles totales y la capacidad de eliminar los radicales libres de los tres cultivares de color de pimiento dulce fue significativa ($r = 0,99$, $P < 0,000$) en el tratamiento de 7 mostraron una correlación entre el DPPH y flavonoides, taninos y polifenoles totales e igualmente para el ABTS, la correlación entre ellos es la unión de los tres metabolitos han generado una mayor capacidad de absorción de ABTS y DPPH radicales y la combinación adecuada de diferentes estrés, se aplicó en todas las variedades de pimientos dulces de diferentes colores fue la interacción inductor: SA (0,1 mM) y el estrés abiótico: EC (3,6 dS/m). Se observó la correlación de su contenido fenólico total y la capacidad de eliminar los radicales libres por DPPH tres cultivares de diferentes pimientos de colores en los tratamientos 1, 8 y 9 con una correlación significativa ($r = 0,99$, $P < 0,007$) ($r = 0,99$, $P < 0,000$) y ($r = 0,99$, $P < 0,001$), respectivamente. Por lo tanto, la producción de fenoles totales está influenciada por la combinación de SA y H₂O₂ elicitores aplicadas en estas tres cultivares de pimientos de diferentes colores. Además, el contenido total de flavonoides se han correlacionado con la capacidad de eliminar radicales por absorción de radical DPPH y radical ABTS se observó en el tratamiento de 6 con una correlación significativa ($r = 0,99$, $P < 0,006$) y ($r = 0,99$, $P < 0,019$), respectivamente, por lo tanto, indica que la interacción del inductor: H₂O₂ (36 mM) y estrés abiótico: CE (3,6 dS/m) influye en la producción de flavonoides en tres cultivares de pimientos de colores sobre la absorción de la capacidad de los dos radicales diferentes como DPPH y ABTS.

Tabla IV.5 Correlación entre flavonoides, fenoles y taninos con la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de los tres colores de pimiento morrón en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	ABTS (μmoles eq. trolox/g muestra)	DPPH (μmoles eq. trolox/g muestra)	Flavonoides (μg rutina/g muestra)	fenoles (mg ácido galico/g muestra)	Taninos (mg (+)catequina/g muestra)	Ecuación de regresión	R ²	P<0.05
1						-0.1371x + 14.69	0.64	0.000
						-2.0184x + 344.37	0.60	0.242
						-0.2925x + 17.769	0.99	0.011
2						-0.2925x + 17.769	0.64	0.003
						0.0006x - 0.0159	0.92	0.007
						0.1668x - 7.4307	0.8	0.000
3						0.5717x - 53.208	0.81	0.002
						0.0006x - 0.0155	0.91	0.014
						0.1832x - 7.9368	0.97	0.000
4						-0.0019x + 0.2017	0.86	0.914
						0.9003x - 85.661	0.97	0.001
						-0.0003x + 0.0368	0.73	0.178
5						0.169x - 8.4228	0.89	0.010
						-20.635x + 2234.5	0.60	0.102
						-0.6956x + 69.487	0.79	0.012
6						-2.5325x + 384.47	0.84	0.002
						59.672x + 6015.5	0.9	0.006
						-7.148x + 685.81	0.9	0.019
7						-0.0004x + 0.0403	0.64	0.050
						112.18x - 10625	0.99	0.000
						0.0189x - 1.8169	0.99	0.000
8						-2.6022x + 255.52	0.99	0.000
						-12.551x + 1140	0.99	0.000
						-0.0021x + 0.161	0.99	0.000
9						0.2911x - 17.392	0.99	0.000
						2.5587x + 114.86	0.68	0.001
						0.0638x - 3.6927	0.96	0.000
9						1.8047x + 231.68	0.87	0.000
						0.0001x + 0.0117	0.61	0.000
						0.041x - 0.6154	0.99	0.000
9						-0.1052x + 11.839	0.61	0.000
						-0.1978x + 13.943	0.99	0.001

Harvert-Hernández *et al.*, (2010) observado en el caso de polifenoles hidrolizables: ABTS ($r = 0,835$; $R^2 = 0,697$) y FRAP ($r = 0,921$; $R^2 = 0,848$). En apoyo a esto, una alta correlación fue encontrada previamente entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los frutos de pimiento (*Capsicum annum L.*). Vale la pena señalar que los polifenoles extraíbles en este trabajo mostraron correlaciones altas de ABTS y DPPH. Es de acuerdo con la correlación positiva ($r = 0,72$) de la inhibición de la peroxidación lipídica y el contenido de compuestos fenólicos en la pimienta (Hanson *et al.*, 2004). Además, se ha informado de la correlación significativa del contenido de flavonoides en los pimientos con su actividad antioxidante (Lee *et al.*, 1995; Markus *et al.*, 1999; Mateřská y Perucká, 2005). Por lo tanto, se puede concluir que los compuestos fenólicos en pimientos juegan un papel importante en la actividad antioxidante de los pimientos dulces. La diferencia en la actividad antioxidante de pimiento amarillo y rojo se puede explicar por las diferencias en fenólico, flavonoides y el contenido de taninos. Los pigmentos de los pimientos rojos, fenólicos, flavonoides y taninos contenidos, contribuyen significativamente a su actividad antioxidante, mientras que el pimiento dulce amarillo era estos pigmentos inferior. Por lo tanto, el color de los pimientos dulces puede ser una característica importante que refleja su actividad antioxidante.

IV.1.8 Identificación y cuantificación de Ácido Ascórbico por HPLC en los diferentes colores de pimiento

El ácido ascórbico se extrajo con ácido metafosfórico al 5% (Tabla IV.6). Las concentraciones de ácido ascórbico no mostraron diferencias significativas en la variedad Fascinato (rojo), y en el Orangelita (naranja) y el Basella (amarillo) mostraron un incremento en el tratamiento donde tenemos una mezcla en coctel de inductores en las más altas concentraciones. El contenido de ácido ascórbico de los cultivares de pimiento dulce son similares a la de muchos diferentes cultivares de pimiento estudiados por Howard *et al.*, (1994) y Simonne *et al.*, (1997). Sin embargo, para otros cultivares en sus estudios, mostraron que el contenido de ácido ascórbico aumentó sus niveles en comparación con los presentes por aquellos que se les aplicó algún inductor. El ácido ascórbico se utilizó para promover el blanqueo de la emulsión de β -caroteno (Storey *et al.*, 1992). Nuestros resultados también mostraron que el ácido ascórbico tenía efecto pro-oxidante. Por lo tanto, sugerimos que la actividad antioxidante de los extractos metanólicos muestran el efecto antioxidante de los compuestos fenólicos y efecto pro-oxidante del ácido

ascórbico (Zhang y Hamauzu, 2004). El contenido de ácido ascórbico en los tratamientos 5, 7, 2 fueron mayores de 1,5 mg/g en comparación con los reportados. Estas diferencias pueden ser potenciadas por la CE. Estos resultados se pueden considerar en la selección de material de reproducción por medio del valor nutricional. Valores estadounidense DRI de la vitamina C son de 75 y 90 mg/día para los hombres adultos y mujeres, respectivamente (OIM, 2000). Teniendo en cuenta estos valores, si se consume alrededor de 100 g de frutas maduras en un día proporcionaría entre el 17% y el 72% de los valores de Estados Unidos DRI de la vitamina C para un adulto (edades 19-50 años) hombres, y el 20% y el 86% para un adulto (edades 19-50 años) mujeres dependiendo de los cultivares y madurez.

Tabla IV.6 Contenido de ácido Ascórbico en los diferentes colores de pimiento morrón.

Tratamiento	Baselga		Fascinato		Orangela	
	Ácido Ascórbico*	± DS	Ácido Ascórbico*	± DS	Ácido Ascórbico*	± DS
1	1.373 ^a	0.013	1.221 ^a	0.201	1.367 ^a	0.020
2	1.412 ^a	0.030	1.491 ^a	0.065	1.571 ^a	0.078
3	1.333 ^{ab}	0.019	1.462 ^a	0.102	1.464 ^a	0.012
4	1.321 ^{ab}	0.039	1.290 ^a	0.096	1.435 ^a	0.024
5	1.411 ^a	0.013	1.501 ^a	0.058	1.457 ^a	0.019
6	1.266 ^{ab}	0.040	1.382 ^a	0.053	1.469 ^a	0.010
7	0.874 ^b	0.262	1.493 ^a	0.051	1.435 ^a	0.033
8	0.320 ^c	0.163	1.620 ^a	0.050	0.550 ^b	0.164
9	1.263 ^{ab}	0.029	1.403 ^a	0.035	1.576 ^a	0.026

* mg Ácido Ascórbico/g muestra fresca

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

IV.1.9 Identificación y cuantificación de Carotenoides por HPLC en los diferentes colores de pimiento

La Tabla IV.7 muestra el cambio en el perfil de la composición de pigmento de pimiento morrón tratada con cóctel de elicitores. Los principales compuestos identificados en el pimiento morrón eran luteína, tocoferol, β-criptoxantin, licopeno y β-caroteno. Tratamientos 8 mostraron un

aumento en la mayoría en luteína, tocoferol, y β -caroteno en comparación con el tratamiento control. Además, β -criptoxantin mostró mayor concentración en el control y un aumento en el licopeno en el tratamiento 7 y 9. Por otro lado, pimientos contenía principalmente violaxanthin, capsantina, luteína y β -caroteno Durante el proceso de maduración, el contenido de estos compuestos principales, tienden a disminuir en los cloroplastos; Mientras tanto, se están formando nuevas xantofilas e inmediatamente esterificados con ácidos grasos para formar mono- y/o diésteres (Deli, *et al.*, 1992). Los niveles de compuestos carotenoides variar con diferentes pimientos de colores. Pimiento morrón amarillo tiene el mayor nivel de carotenoides, mientras que el pimiento morrón verde obtuvo los valores más bajo. Deli, *et al.* (1992) informó de un aumento de los carotenoides totales en el pimiento morrón amarillo (*C. annuum lycopersiciforme flavum*) durante la maduración; sin embargo, los niveles de carotenoides (β -criptoxantina, α - y β -caroteno) alcanzó su punto máximo y luego disminuyeron. También se identificaron licopeno y otros carotenoides como la luteína, capsantina, y la zeaxantina, pero no se cuantificaron. Estos carotenoides pueden ser benéficos para la salud humana (Machlin y Bendich, 1987; Bendich y Olson, 1932). Los resultados de nuestra investigación en las concentraciones de los carotenoides son más altos que los reportados previamente en el pimiento morrón de diferentes colores de madurez óptimo. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento 8 tratado con el cóctel de elicitores tiene mayor concentración de estos compuestos a los reportados en otros pimientos morrones. Estos resultados sugieren que la aplicación de cócteles de inductores, SA, H₂O₂ y CE, puede causar un estado de estrés oxidativo en el pimiento morrón, lo que resulta una mayor sinergia de producción y una mayor síntesis de carotenoides.

Tabla IV.7 Cuantificación de carotenoides pimiento morrón variedad Baselga (A), Fascinato (B) y Orangela (C).

A Tratamiento	Luteína*	± DS	Zeaxantina*	Tocoferol*	± DS	β-criptoxantina*	± DS	Licopeno*	β-caroteno*	± DS
1	9.70E-04 ^b	2.59E-04	ND	5.33E-03 ^{ab}	2.48E-03	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	1.46E-03 ^b	0.00E+00
2	6.63E-04 ^b	5.65E-05	ND	8.65E-03 ^{ab}	1.82E-03	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	1.46E-03 ^b	0.00E+00
3	3.29E-04 ^b	1.03E-04	ND	3.39E-03 ^b	1.81E-03	9.85E-04 ^a	4.76E-05	ND	1.72E-03 ^b	2.60E-04
4	7.86E-04 ^b	1.57E-04	ND	6.95E-03 ^{ab}	2.12E-03	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	1.46E-03 ^b	0.00E+00
5	1.07E-03 ^b	2.26E-04	ND	4.64E-03 ^{ab}	2.49E-03	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	1.46E-03 ^b	0.00E+00
6	8.65E-04 ^b	1.93E-04	ND	7.11E-04 ^b	0.00E+00	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	1.46E-03 ^b	0.00E+00
7	1.58E-03 ^{ab}	4.65E-04	ND	1.66E-02 ^a	5.72E-03	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	8.84E-03 ^a	1.45E-03
8	2.75E-03 ^a	6.12E-04	ND	7.11E-04 ^b	0.00E+00	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	6.59E-03 ^a	5.32E-04
9	7.55E-04 ^b	1.56E-04	ND	6.27E-03 ^{ab}	2.59E-03	9.37E-04 ^a	0.00E+00	ND	1.46E-03 ^b	0.00E+00

*mg/g

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

B Tratamiento	Luteína*	± DS	Zeaxantina*	Tocoferol*	± DS	β-criptoxantina*	± DS	Licopeno*	β-caroteno*	± DS	
1	1.68E-03 ^{bc}	2.39E-04	ND	7.50E-03 ^b	1.09E-03	1.23E-03 ^a	6.86E-05	5.46E-03 ^b	3.20E-03	1.49E-02 ^{ab}	2.10E-03
2	1.49E-03 ^{bc}	1.48E-04	ND	7.17E-03 ^b	7.60E-04	1.18E-03 ^a	7.03E-05	5.75E-03 ^b	3.91E-03	1.02E-02 ^b	1.85E-03
3	1.51E-03 ^{bc}	1.84E-04	ND	7.42E-03 ^b	3.36E-04	1.20E-03 ^a	1.37E-05	1.10E-03 ^b	7.48E-04	1.33E-02 ^{ab}	5.57E-04
4	1.30E-03 ^{bc}	1.62E-04	ND	7.36E-03 ^b	9.37E-04	1.16E-03 ^a	5.83E-05	1.12E-03 ^b	1.55E-03	1.29E-02 ^b	1.51E-03
5	1.61E-03 ^{bc}	8.65E-05	ND	8.16E-03 ^b	8.84E-04	1.20E-03 ^a	2.60E-05	4.83E-03 ^b	1.57E-03	1.27E-02 ^b	8.89E-04
6	9.06E-04 ^c	1.29E-04	ND	8.06E-03 ^b	9.90E-04	1.20E-03 ^a	4.87E-05	4.70E-03 ^b	2.99E-03	1.60E-02 ^{ab}	2.63E-03
7	1.86E-03 ^b	2.33E-04	ND	9.69E-03 ^b	1.55E-03	1.20E-03 ^a	6.58E-05	1.15E-02 ^{ab}	3.06E-03	1.64E-02 ^{ab}	2.10E-03
8	2.93E-03 ^a	9.32E-05	ND	1.73E-02 ^a	1.21E-03	1.16E-03 ^a	2.33E-04	2.27E-02 ^a	3.82E-03	2.30E-02 ^a	1.31E-03
9	1.68E-03 ^{bc}	3.38E-04	ND	1.14E-02 ^b	2.24E-03	1.49E-03 ^a	1.08E-04	1.28E-02 ^{ab}	3.89E-03	1.90E-02 ^{ab}	4.03E-03

*mg/g

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

C Tratamiento	Luteína*	± DS	Zeaxantina*	Tocoferol*	± DS	β- criptoxantina*	± DS	Licopeno*	β- caroteno*	± DS	
1	3.37E-03 ^a	2.09E-04	ND	2.13E-02 ^{ab}	2.22E-03	2.05E-03 ^a	3.74E-04	1.08E-02 ^a	1.73E-02	2.37E-02 ^{ab}	5.80E-03
2	2.29E-03 ^{abc}	7.57E-04	ND	9.56E-03 ^{abc}	2.80E-03	1.44E-03 ^{ab}	1.95E-04	ND		1.28E-02 ^{ab}	5.08E-03
3	7.75E-04 ^c	1.21E-04	ND	6.71E-03 ^{bc}	3.97E-03	9.37E-04 ^b	0.00E+00	ND		1.46E-03 ^b	0.00E+00
4	2.96E-03 ^{ab}	7.30E-04	ND	1.36E-02 ^{abc}	2.74E-03	1.19E-03 ^{ab}	1.38E-04	ND		1.57E-02 ^{ab}	4.58E-03
5	2.31E-03 ^{abc}	3.88E-04	ND	1.41E-02 ^{abc}	3.12E-03	9.37E-04 ^b	0.00E+00	ND		1.57E-02 ^{ab}	5.75E-03
6	2.04E-03 ^{abc}	3.82E-04	ND	1.38E-02 ^{abc}	4.89E-03	9.80E-04 ^b	4.27E-05	ND		1.62E-02 ^{ab}	5.82E-03
7	2.27E-03 ^{abc}	3.56E-04	ND	2.72E-02 ^a	7.14E-03	2.13E-03 ^a	4.17E-04	5.73E-03 ^a	5.30E-03	3.74E-02 ^a	9.74E-03
8	1.15E-03 ^{bc}	3.08E-04	ND	7.11E-04 ^c	0.00E+00	9.37E-04 ^b	0.00E+00	ND		1.46E-03 ^b	0.00E+00
9	2.62E-03 ^{abc}	4.74E-04	ND	1.74E-02 ^{abc}	4.79E-03	1.54E-03 ^{ab}	3.00E-04	7.89E-03 ^a	1.44E-02	2.01E-02 ^{ab}	6.46E-03

*mg/g

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

IV.1.10 Identificación y cuantificación de Flavonoides por HPLC en los diferentes colores de pimiento

Los compuestos fenólicos son muy variados con los diferentes pimientos de colores. Se realizaron pruebas espectrofotométricas y por HPLC, los extractos metanolicos fueron observado para marcar y hacer una caracterización de los compuestos fenólicos presentes en cada variedad y como fue afectado por cada tratamiento al seleccionar la variedad con mejores resultados. El perfil fenólico de pimiento morrón rojo tratada con ácido salicílico (SA) (0, 0,01, y 0,1 mM), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (0, 18 y 36 mM) y la conductividad eléctrica (EC) (3,2, 3,4 y 3,6 dS / m) se muestran en la (Tabla IV.8). Los principales compuestos identificados en el pimiento morrón fueron ácidos fenólicos, flavan-3-oles, flavonoles y flavononas. Tratamientos del pimiento morrón tratada con el cóctel de elicitors mostraron un aumento en la mayoría de estos compuestos en comparación con el tratamiento control, este efecto fue significativo para los tratamientos 2, 3, 4, y 5. Además, el ácido clorogénico, epicatequina, galato de epigallocatequina, ácido sinápico y vainillina se encontraron en los tratamientos que tenían los inductores pero en el control no. Por otro lado, el ácido cafeico, la quercetina y el resveratrol se encontraron en todos los tratamientos, estos compuestos han mostrado un aumento en la concentración en el tratamiento 2, 5, 3, respectivamente. La vainillina también se encontró en el jengibre tratados con 10⁻³ y 10⁻⁵ M SA, pero no se encontró tampoco en el control. Ácido sinápico necesita el ácido cumárico como un precursor, que podría estar relacionado con la estimulación de la fenilalanina amoníaco-liasa. Además, otra enzima regulada en la síntesis de flavonoides es la sintasa de chalcona (Campos *et al.*, 2003). Por otro lado estudios en tomates y zanahorias usaron diferente CE con soluciones de sales en el sistema de riego no mostraron diferencias entre los tratamientos en las concentraciones de catequina, epicatequina, trans-resveratrol (Silva *et al.*, 2012). Esto confirma los resultados obtenidos en este estudio ya que no existen diferencias entre los tratamientos ocasionados por la CE. Por otra parte, Medina-Juárez, *et al.*, (2012) observó en el extracto, de pimiento morrón del caribe coincidiendo con los más altos niveles de ácido gálico, ácido clorogénico, epicatequina, rutina, luteolina, resveratrol y ácido ascórbico ($r \geq 0.85$). Con la finalidad de comparar nuestros resultados se encontró que los tratamientos tratados con el cóctel de inductores tienen mayor concentración de estos compuestos a los reportados en la pimienta dulce sin inductores de estrés. Estos resultados sugieren que la aplicación de cócteles elicitor, SA y H₂O₂, puede provocar un estado de estrés

oxidativo en el pimiento dulce, lo que resulta en una mayor producción y síntesis de diferentes compuestos fenólicos.

Tabla IV.8 Determinación del Perfil de compuestos fenólicos por HPLC de los diferentes pimiento morrón.

Compuesto fenólico	Tiempo de retención	F1		F2		F3		F4		F5	
Ácido clorogénico	2.713	ND		2914.155	± 0.000	ND		2915.836	± 0.000	2797.014	± 12.293
Epicatequina	2.679	ND		ND		ND		936.660	± 0.000	883.329	± 5.341
Hesperidina	6.634	1.765	± 0.000	ND		0.962	± 0.000	ND		0.820	± 0.000
Ácido cumárico	7.552	ND		ND		ND		±		ND	
Ácido cafeico	20.553	14.822	± 0.000	19.577	± 2.845	19.397	± 0.000	17.305	± 0.000	10.797	± 0.035
Epigallocatequín galato	21.948	ND		ND		ND		ND		27.932	± 0.000
Rutina	25.867	ND		ND		16.710	± 0.071	ND		16.829	± 0.000
Ácido sinápico	26.197	ND		ND		ND		ND		10.305	± 0.469
Ácido elágico	26.351	ND		ND		ND		ND		-2.731	± 0.000
Vainilina	26.824	6.022	± 0.009	ND		6.051	± 0.008	6.037	± 0.031	6.203	± 0.175
Ácido rosmarínico	30.776	5.067	± 0.000	5.087	± 0.000	5.205	± 0.232	5.142	± 0.051	5.485	± 0.000
Quercetina	36.486	94.526	± 119.560	9.810	± 0.442	9.934	± 0.283	10.125	± 0.030	813.222	± 548.934
Resveratrol	39.908	12.020	± 0.000	12.218	± 0.277	13.015	± 0.119	11.341	± 0.169	3.485	± 0.000

ND = no detectables

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

Compuesto fenólico	Tiempo de retención	F6		F7		F8		F9	
Ácido clorogénico	2.713	2778.324	± 0.000	2871.140	± 0.000	2781.812	± 0.000	2799.858	± 0.000
Epicatequina	2.679	956.516	± 0.000	995.294	± 0.000	869.995	± 0.000	890.623	± 0.000
Hesperidina	6.634	ND		ND		ND		ND	
Ácido cumárico	7.552	ND		ND		ND		ND	
Ácido cafeico	20.553	18.140	± 0.000	18.656	± 0.000	ND		10.695	± 0.000
Epigallocatequín galato	21.948	ND		ND		27.626	± 0.000	ND	
Rutina	25.867	ND		ND		16.578	± 0.000	16.878	± 0.000
Ácido sinápico	26.197	ND		ND		ND		11.622	± 0.000
Ácido elágico	26.351	ND		ND		-2.738	± 0.000	-1.996	± 0.000
Vainilina	26.824	6.089	± 0.000	6.058	± 0.000	±		6.781	± 0.000
Ácido rosmarínico	30.776	ND		5.147	± 0.000	6.542	± 0.000	5.945	± 0.000
Quercetina	36.486	9.156	± 0.000	10.136	± 0.000	458.458	± 0.000	1833.912	± 0.000
Resveratrol	39.908	10.946	± 0.000	12.223	± 0.000	ND		ND	

ND = no detectables

Diferencia significativa (P<0.05) es expresada por la diferencia entre letras por tratamientos en cada color

IV.1.11 Identificación de moléculas de bajo peso molecular por GC-MS en pimiento morrón

La Tabla IV.9 muestra la identificación de compuestos polares de bajo peso molecular obtenidos por análisis GC-MS, tales como ácidos orgánicos, aminoácidos y fitosteroles. Tratamiento con elicitores dio lugar a la presencia de metabolitos no detectadas en el control; por ejemplo, se detectaron seis aminoácidos, nueve ácido orgánico y a-tocoferol en el pimiento morrón obtenidos a partir de plantas tratadas con coctel de elicitores, pero no en la muestra de control. A pesar de que la elicitación puede elevar significativamente la producción de metabolitos secundarios. La elicitación con H₂O₂ causó una disminución significativa en el contenido de aminoácidos. Los más altos niveles de aminoácidos se determinaron en el tratamiento 5 que fue inducido por CE 3,6 dS/m, aumento a 8 aminoácidos en comparación con el control. Sin embargo, en el tratamiento 2 con 36 mM H₂O₂ y EC 3.2 dS/m, presento una reducción mucho mayor de ácido-2-amino en comparación con el control. Nuestros estudios mostraron que H₂O₂ aplicado como cóctel de SA y CE de forma asperjada en el pimiento morrón aumento la tolerancia al estrés de manera efectiva. Esto causó una respuesta similar en ácidos orgánicos. Por otro lado, Hancock y Sahl (2006) observaron que el tamaño pequeño de la molécula de H₂O₂ hacía improbable que hubiera proteínas receptoras específicas que intervienen en su detección. Ellos presentaron una propuesta alternativa que los amino ácido con percepción fueron moderados por algunas proteínas, pero comparten la característica de tener grupos tiol activos como objetivos redox. Es decir, la detección fue un resultado de la oxidación de los grupos tiol por H₂O₂ y otros compuestos bioactivos, incluyendo NO, quizás incluso que implican la competencia de los dos tipos de oxidantes por los mismos sitios de modificación (Foyer *et al.*, 1997). Además, SA es un importante regulador de la fotosíntesis, ya que aumenta la actividad de dos enzimas clave en la síntesis de hidratos de carbono, ribulosa-1-5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) y anhidrasa carbónica (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). Además, algunos estudios han demostrado que una no aumenta en contenido de carbohidratos se relaciona con la síntesis de ácidos fenólicos en plantas, ya que la ruta del ácido fenólico utilizan, los productos de metabolismo de los carbohidratos como precursores (Ghasemzadeh *et al.*, 2012; Ibrahim *et al.*, 2011). Además, la cantidad de ácidos orgánicos como ácido palmítico, esteárico, oleico, el ácido linoleico se incrementaron por los cambios en la conductividad eléctrica, resultados similares se muestran por Kaewnaree *et al.*, (Kaewnaree *et al.*, 2011) con semilla de pimiento morrón.

Tabla IV.9 Metabolitos de bajo peso molecular del pimiento morrón (*Capsicum annum* L.)

Name of compound	Rt (min.)	Peak area (%)									Important iones in peaks: m/z
		Control	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	
L-Alanine	4.197	LLD	LLD	LLD	LLD	1.087	LLD	LLD	LLD	LLD	190-116-174-75
L-Valine	5.887	LLD	LLD	LLD	LLD	2.167	LLD	LLD	LLD	LLD	144-218-90-147
L-Leucine	6.856	LLD	LLD	LLD	LLD	1.07	LLD	LLD	0.771	LLD	158-102-160-147
L-Isoleucine	7.316	LLD	LLD	LLD	LLD	0.441	LLD	LLD	0.553	LLD	218-158-147-100
L-Proline	7.316	LLD	LLD	LLD	LLD	0.796	LLD	LLD	0.731	LLD	216-142-158-143
L-Serine	8.551	0.84	0.317	1.094	LLD	LLD	0.908	LLD	LLD	LLD	100-74-147-123
L-Threonine	9.081	LLD	LLD	LLD	LLD	1.845	0.834	LLD	0.454	LLD	291-218-117-219
5-oxo-L-Proline	11.604	10.996	LLD	16.181	10.517	1.887	18.465	15.526	2.399	LLD	258-230-156-147
L-Phenylalanine	13.566	LLD	LLD	LLD	LLD	LLD	LLD	LLD	LLD	LLD	218-193-100-219
L-Asparagine	14.459	1.63	0.982	3.181	LLD	6.612	2.757	LLD	1.325	LLD	188-233-234-232
Lactic acid	3.687	LLD	1.709	3.423	LLD	3.083	1.207	7.663	3.843	LLD	147-117-191-148
Glycolic Acid	3.851	LLD	LLD	LLD	LLD	1.103	LLD	LLD	0.977	LLD	205-177-218-147
Succinic acid	7.557	1.751	0.893	LLD	2.827	0.988	3.366	3.284	0.691	2.753	247-147-148-172
Glyceric acid	7949	LLD	LLD	LLD	LLD	0.696	LLD	LLD	0.487	0.838	189-292-103-133
Fumaric acid	8.148	LLD	LLD	LLD	LLD	0.184	LLD	LLD	0.136	LLD	245-247-143-147
Maleic acid	8.174	LLD	LLD	0.529	LLD	LLD	LLD	0.671	LLD	LLD	147-73-245-148
Malic acid	11.366	4.103	4.6	4.59	13.577	5.627	9.011	10.592	2.722	8.48	233-189-133-190
Aspartic acid	11.641	LLD	LLD	LLD	LLD	3.528	LLD	LLD	1.588	LLD	232-202-100-233
4-Aminobutyric acid	11.824	LLD	LLD	LLD	LLD	0.393	1.122	LLD	LLD	LLD	174-147-100-186
Threonic acid	12.578	LLD	LLD	LLD	3.512	LLD	2.879	4.364	LLD	LLD	292-117-220-147
Lauric acid	13.863	LLD	LLD	LLD	LLD	0.488	LLD	LLD	0.548	LLD	257-145-258-131
Citric acid	17.244	46.515	56.955	LLD	42.347	LLD	LLD	LLD	27.936	LLD	465-375-273-363
Ascorbic acid	19.43	2.745	LLD	10.005	4.495	43.774	LLD	8.855	24.466	82.472	73-147-332-205
Palmitic acid	20.678	7.131	4.657	9.961	9.068	6.166	8.678	8.458	8.165	1.811	313-145-117-93
Linoleic acid	23.363	4.56	5.195	6.556	6.473	5.993	5.629	9.204	9.397	1.203	262-97-147-190
α -Linolenic acid	23.513	LLD	LLD	LLD	LLD	2.492	LLD	LLD	4.541	0.675	213-129-108-95
Stearic acid	24.033	5.652	3.405	5.312	3.846	2.985	5.415	5.226	3.834	0.811	341-145-117-313
γ -Tocopherol	34.59	0.531	3.274	2.132	LLD	0.316	2.241	1.238	0.172	0.082	488-223-73-489-222
(+)- α -Tocopherol	35.78	LLD	0.609	12.41	0.799	2.298	13.129	8.75	1.576	0.335	502-237-73-503-236
Campesterol	336.78	3.037	5.165	5.971	0.624	1.264	5.771	4.196	0.753	0.195	343-73-129-43
Stigmasterol	37.122	1.031	2.845	1.438	0.157	0.306	1.68	1.209	0.235	0.049	484-255-129-313
β -Sitosterol	37.721	9.478	8.739	17.216	1.758	2.412	16.887	10.763	1.7	0.296	486-396-357-129

LLD: Lower Limit of Detection

IV.1.12 Perfil metabolómica de pimiento morrón (*C. annuum* L.) con elicitores

Treinta y un metabolitos se identificaron por comparación de los espectros de los tratamientos contra los de la biblioteca NIST comercial. Un mapa de color de todos los metabolitos identificados se muestra en la fig. IV.1 para visualizar las fluctuaciones entre los tratamientos con el estrés inducido y el control. Como se muestra, los niveles de metabolitos cambiaron moderadamente en los tratamientos inducidos por elicitores en comparación con el tratamiento control. Dieciocho metabolitos fueron potenciados por los tratamientos inducidos por elicitores. Seis metabolitos, campesterol, estigmasterol, γ -tocoferol, ácido succínico, ácido ascórbico y asparagina, aumentaron significativamente en los tratamientos inducidos por el estrés. Además ácido glicérico, fumárico, maleico e isoleucina todos estos presentaron mayor concentración en los tratamientos que tienen un cóctel de elicitores. β -sitosterol se redujo en el tratamiento 4, 5, 8 y ácido linoleico se redujo más en el tratamiento 9 a comparación de los demás tratamientos. Otros tres metabolitos mostraron una tendencia diferente: los niveles de ácido 4-amonobutyric, alanina, valina y no se estaban presente en la mayoría de los tratamientos, pero aumentaron en el tratamiento 5. Los metabolitos en el grupo inferior estuvieron presentes en diferentes concentraciones semejantes en todos los tratamientos analizados y su patrón de segregación en el tratamiento 5, 8 no eran específicos, ya que los genotipos con alta y baja abundancia de estos metabolitos estuvieron presentes y detectado en las concentraciones bajas. Metabolitos en grupo superior acumulan en concentraciones relativamente alta en los frutos de pimiento morrón. El tratamiento 2, 3, 6, 7, fueron específicos con mayor abundancia de estos metabolitos, algunos de este grupo fueron identificados como glucósidos, y esteroides detectados en *C. annuum* var. semillas acuminado (Rhouma *et al.*, 2009). Se informó que estos compuestos tienen actividad antimicrobiana contra levaduras y hongos (Iorizzi *et al.*, 2001).

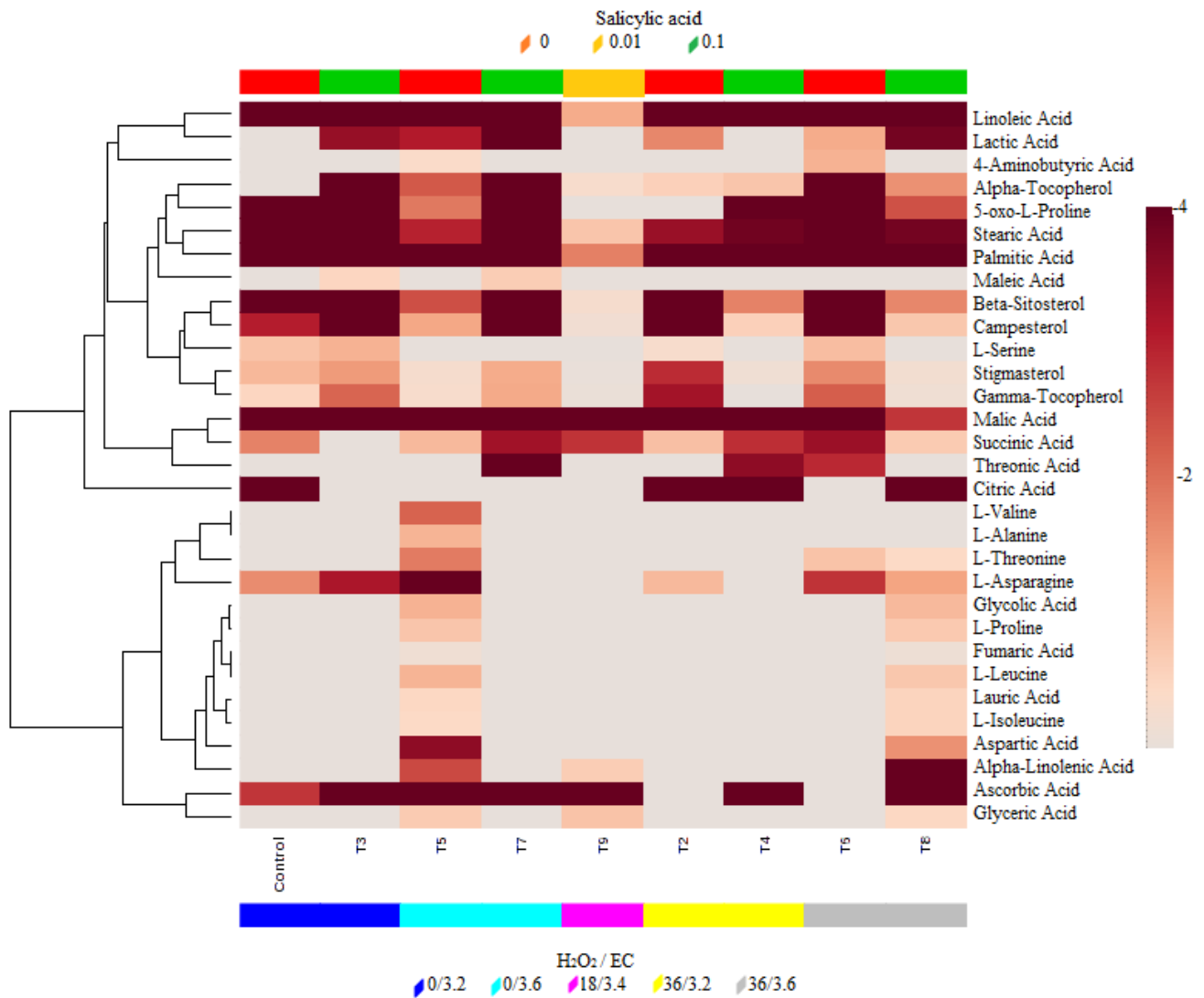


Figura IV.1 Mapa de calor de 32 metabolitos que se acumularon en la pimienta morrón (*C. annuum* L.). Las clases de muestra se indican mediante las barras inferiores (control, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9). Las columnas representan la inducida por el estrés (SA y H₂O₂ / CE), y las filas se refieren a metabolitos distintos. Una matriz de código de color representa los valores de la intensidad de metabolito en cada genotipo, que ha sido transformado log² y centrado significar. (Color cifra en línea).

Para determinar si nuestras observaciones de los cambios en los metabolitos de hecho reflexionar a coordinar los cambios en las rutas metabólicas definidas, se utilizó la vía de análisis online de MetaboAnalyst para identificar la ruta de red. Este análisis se basó en los de alta calidad vías KEGG metabólicos como la base de conocimiento de fondo que ayuda a los investigadores a identificar las vías más relevantes que intervienen en las condiciones de estudio. La construcción

detallada de las vías de metabolismo con puntuaciones más altas se muestra en la Fig. IV.2, Tabla IV.9. Los resultados revelaron que seis vías fueron significativamente ($P < 0,05$) alteradas en los tratamientos inducidos por el estrés: aminoacil t-RNA biosíntesis, alanina, aspartato y el metabolismo del glutamato, valina, leucina, y la biosíntesis de isoleucina, glycoxylate y el metabolismo dicarboxilato, citrato de ciclo (ciclo TCA), y la arginina y el metabolismo de la prolina. En la Fig. IV.3 se muestra la presencia de estos metabolitos identificados en el perfil del pimiento morrón en las diferentes rutas las cuales por la diferencia de colores nos dice que en el cual expresa la presencia de estos metabolitos con un valor de significancia de ($P < 0,06$) en la biosíntesis de proteínas, aspartato, malato-espartato, ácido linoleico y linolenico, lo cual tuvieron mayor presencia los metabolitos encontrados

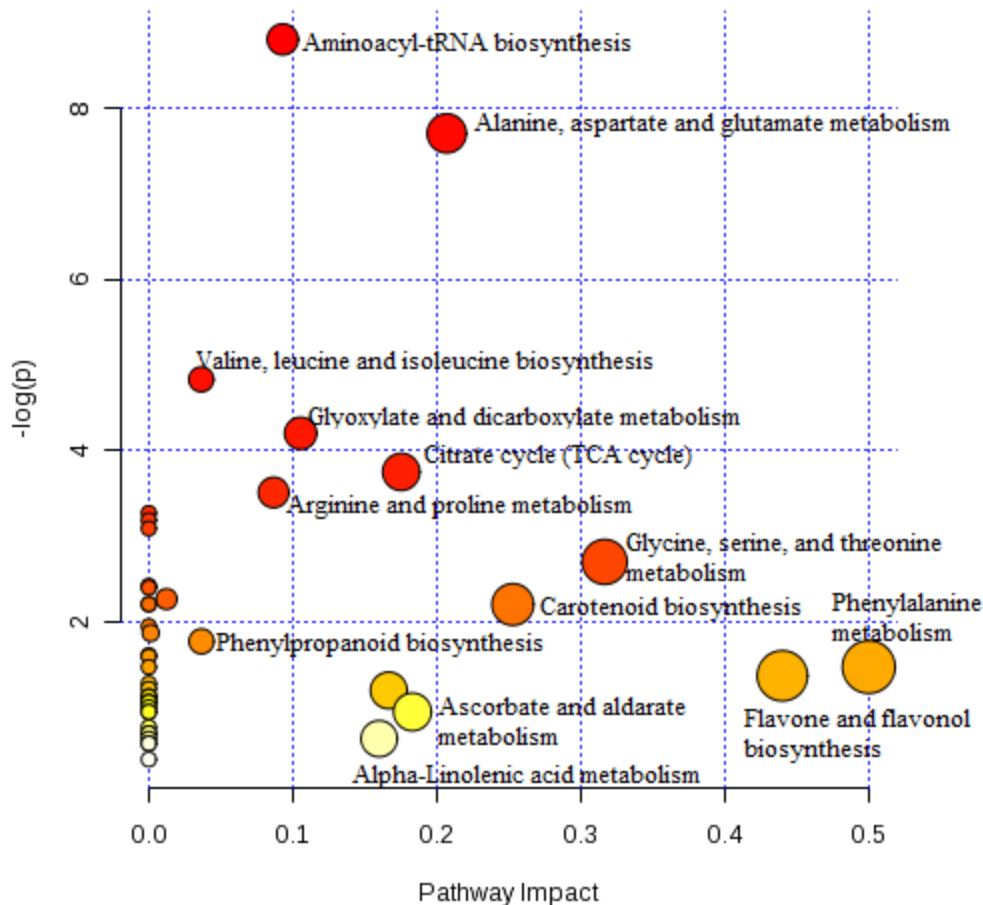


Figura IV.2 Esquema de la metabolómica siguiendo el mapeo vía metabolito de los metabolitos impactadas identificadas después del efecto del estrés inducido en pimiento dulce (*C. annuum* L.). El análisis se realizó utilizando el software MetaboAnalyst. 3.0.

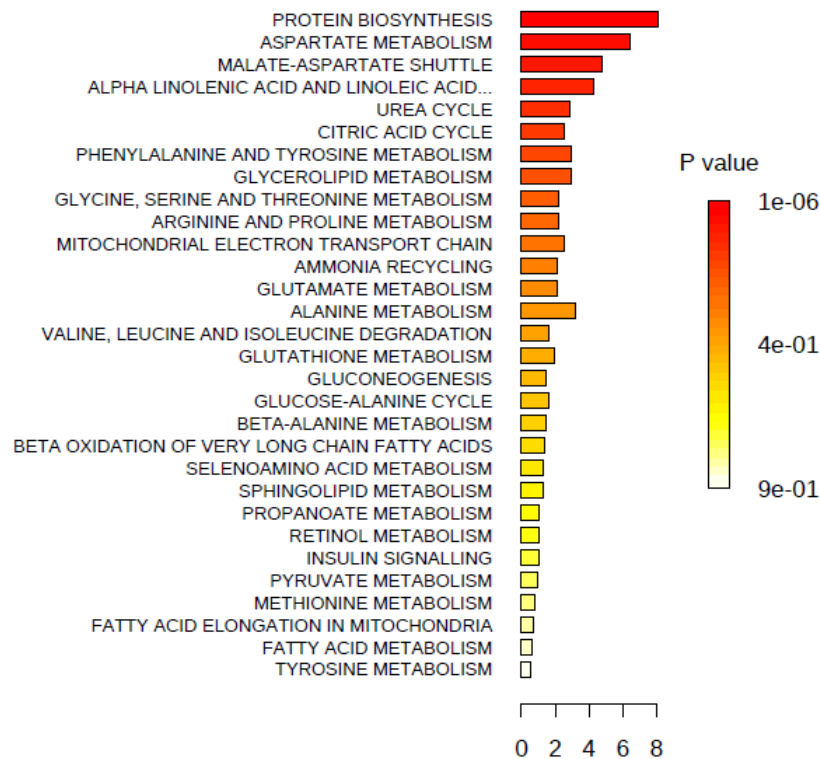


Figura IV.3 Panorama de vías relacionadas con los metabolitos presentes en el pimiento morrón (*C. annuum* L.) impactadas en la identificadas después del efecto del estrés inducido y la tonalidad de colores de claro a obscuro está relacionado con interrelación de estos metabolitos en la ruta metabólica. El análisis se realizó utilizando el software MetaboAnalyst. 3.0.

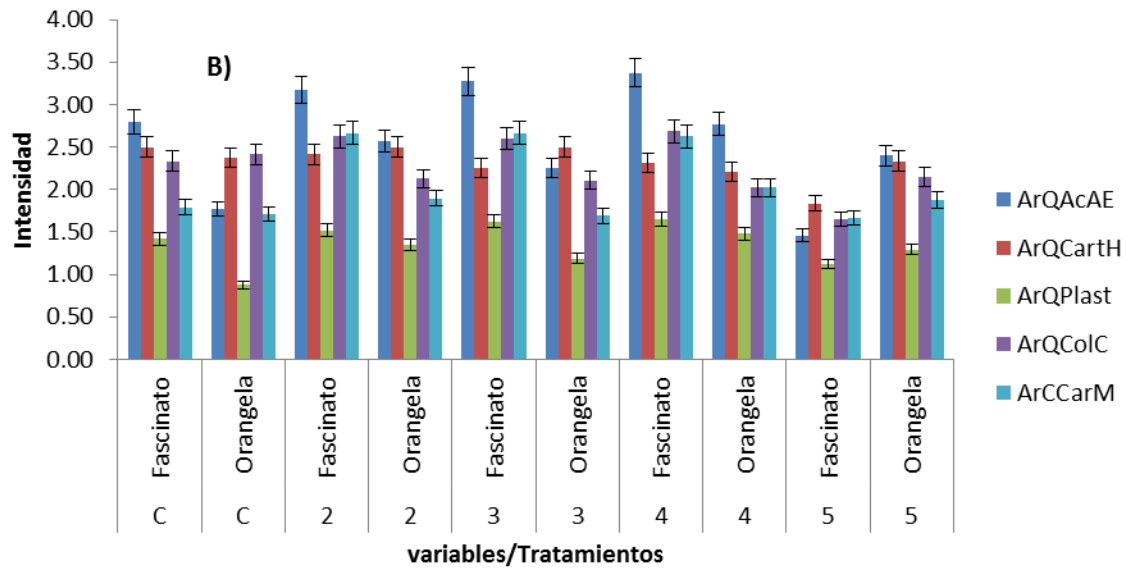
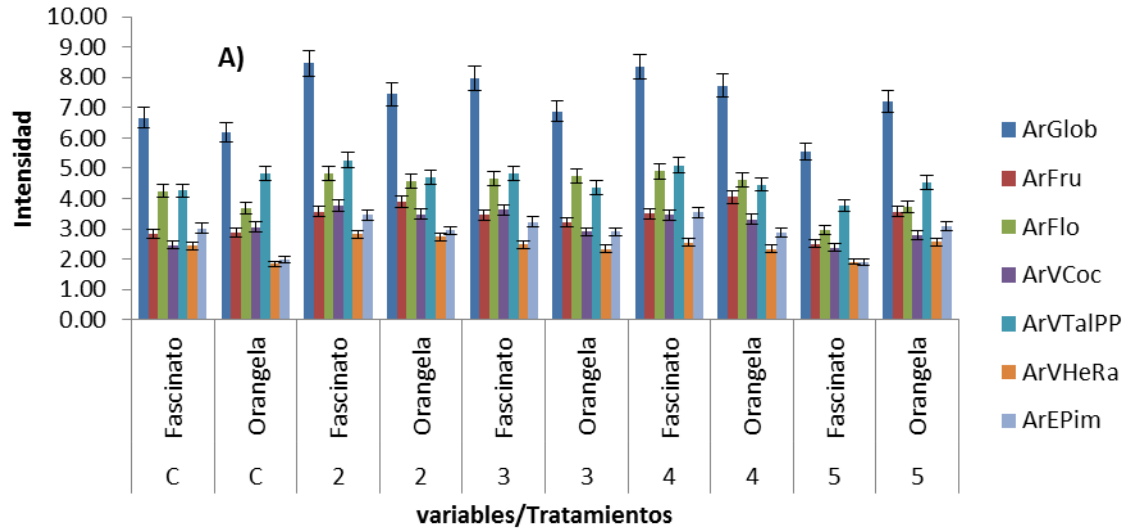
Nuestros resultados mostraron que los niveles de metabolitos se cambiaron marcadamente alterada en el tratamiento 5, 6, 7, 8 con el control. Los metabolitos inducidos por la CE y los elicitors incluyen principalmente ácidos grasos, aminoácidos, ácidos orgánicos, y fitosteroles. Los ácidos grasos son importantes reservas de energía e importantes elementos estructurales de las membranas celulares de insectos (Shipley *et al.*,2012). Un estudio sobre *Ceratitis capitata* ha demostrado que la exposición a la radiación puede causar alteraciones en las concentraciones de ácidos grasos saturados e insaturados (Zaghloul *et al.*,2011). En este estudio, los ácidos grasos representan el mayor grupo de metabolitos diferenciales. Los ácido graso puede desempeñar un papel significativo en las respuestas de la planta al ataque de patógenos, alta salinidad, sequía y baja temperatura (Torres-Schumann *et al.*,1992; Molina *et al.*,1993; Treviño *et al.*,1998). Por otro lado, se demostró que los lípidos de cebada, de forma sinérgica con tioninas, podría inhibir el crecimiento de bacterias y hongos patógenos en las plantas infectadas (Molina *et al.*,1993). Se

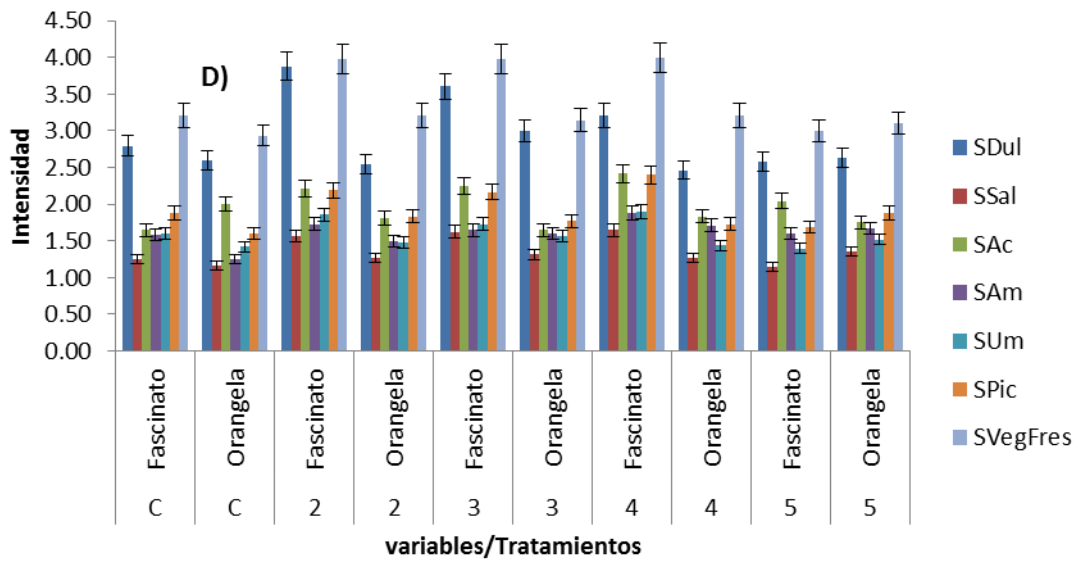
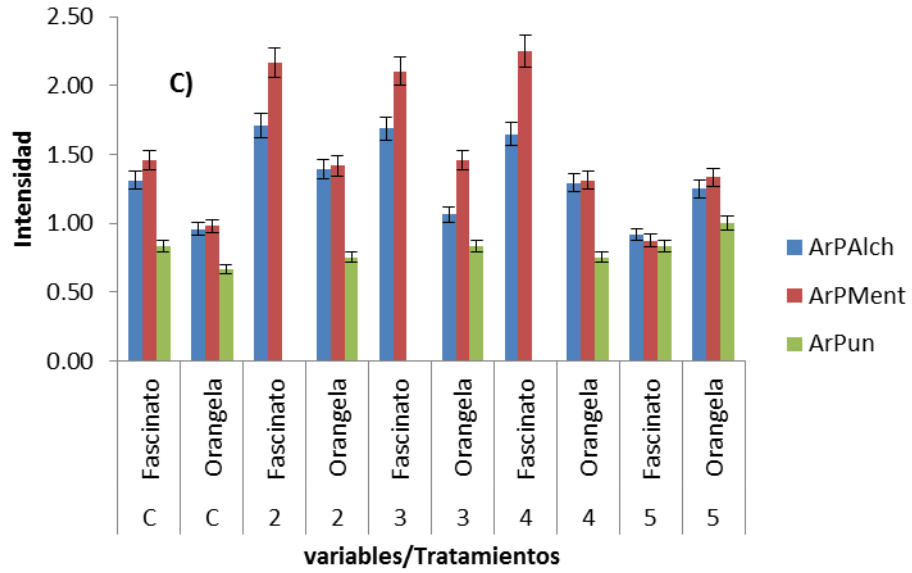
encontraron algunas lípidos en el rábano, el maíz, y la uva también mostraron actividades antimicrobianas in vitro (Molina *et al.*,1993; Treviño *et al.*,1998; Terras *et al.*,1992). Además, estos lípidos se distribuyen sobre la superficie de la planta y en los tejidos vasculares expuestas a agentes patógenos en una alta concentración que podría inhibir patógenos sensibles (Molina *et al.*,1993; Treviño *et al.*,1998; Terras *et al.*,1992; Jung *et al.*, 2003). El ácido linolénico es en sí misma una señal de estrés y el precursor de la biosíntesis de fito-oxylin (Blée, 2002). La evidencia creciente sugiere que el ácido oleico cloroplasto (18:1) niveles son críticos para las respuestas de defensa de patógenos normales en *Arabidopsis*, incluyendo la muerte celular programada y la resistencia sistémica adquirida (SAR); (Upchur, 2008). Oleico (18:1) y linoleico (18:2) los niveles de ácido, en particular, regulan el desarrollo de hongos, la colonización de semillas, y la producción de micotoxinas por *Aspergillus spp.* (Xue *et al.*, 2006). Por lo tanto, los ésteres de ácidos grasos de metilo-ramificada pueden reflejar la actividad de la vía de capsaicinoides. El sitio principal de la producción de capsaicinoides es la placenta, desde donde capsaicinoides son transportados en el apoplasto y se almacenan en los llamados "ampollas ", o hacia otros tejidos u órganos, tales como el pericarpio de frutas, tallos y hojas (Wahyuni *et al.*, 2014). Además de los ácidos grasos y aminoácidos, fitosteroles, intermediarios del ciclo TCA, e hidrocarburos también fueron alterados por el estrés inducido. El análisis de enriquecimiento reveló que seis vías fueron influenciadas en gran medida en los tratamientos inducidos por el estrés. Biosíntesis aminoacil-tRNA, el metabolismo del nitrógeno, y el ciclo de citrato, se alteraron en los tratamientos que tenían coctel de elicitores. Metabolismo de nitrógeno es uno de los procesos básicos que forma y mantiene la actividad de la vida vegetal. El ciclo TCA, una vía importante para la generación de energía, es la vía final para la oxidación de hidratos de carbono, ácidos grasos, y aminoácidos. La alteración de estas tres vías en tejido somático indica trastornos en la célula. Los aminoácidos juegan un papel importante y las condiciones de estrés salino en la remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) dio lugar a un rápido incremento en el contenido de prolina. En contraste a los ácidos aspártico y glutámico que fueron sólo ligeramente influenciados por el factor estresante, el contenido de amidas y aminoácidos básicos aumentaron considerablemente. La mayoría de los niveles de los otros aminoácidos libres, excepto serina, se mejoraron (Gzik, 1996). El ácido aspártico se encontró en dos configuraciones en los insectos, y racemasa puede convertir el ácido L-aspártico en ácido D-aspártico. Un estudio previo mostró que el ácido D-aspártico puede ser marcadamente disminuida por el estrés (Foyer *et al.*, 1997). A

diferencia de los perfiles generales de metabolitos, análisis específicos de un conjunto específico de metabolitos, como carotenoides, capsaicinoides y vitaminas C y E, revelaron una gran variación entre el origen de cada lugar de entre los grupos de especies (Wahyuni *et al.*, 2011). La variación de estos metabolitos relacionados con la salud puede ser el resultado de los esfuerzos de cría destinados a la selección de atributos orientados al consumidor, tales como los carotenoides de color de la fruta y los niveles de capsaicinoides para mejorar o evitar la acritud, en lugar de las diferencias entre las especies.

IV.2 Evaluación sensorial en los diferentes colores de pimiento

Trece rasgos sensoriales difirieron significativamente entre tratamientos ($P \leq 0,05$). Incluyeron sabor global, sabor afrutado, sabor floral, preparado sabor vegetal, sabor picante vegetal, productos químicos de sabor picante, aroma químico y plástico, caramelizada sabor a miel, picante sabor caliente, menta fresca sabor picante, sabor picante, regusto picante, y el resabio fresco. Figura IV.2(A a F) muestra el efecto de los diferentes tratamientos sobre los rasgos sensoriales en ambas variedades de pimiento. Los diferentes tratamientos mostraron un efecto significativo en el sabor global ($F = 2,573$, $p < 0,039$), sabor afrutado ($F = 2,652$, $p < 0,034$), sabor floral ($F = 3,906$, $p < 0,004$), vegetativo sabor recién preparado ($F = 3,156$, $P < 0,015$), y vegetativo sabor picante ($F = 2,587$, $p < 0,038$) (Figura IV.2 A). Para las muestras de control de los valores de los rasgos estaban en el rango de 2.4 a 6.6 para Fascinato y 1.8 a 6.1 para Orangela. En comparación con el control no se observaron las mayores intensidades de sabor global, sabor afrutado, sabor floral y sabor picante vegetal en el tratamiento 4 (8.04, 3.7, 4.7 y 3.2, respectivamente). En este grupo sólo para vegetativo fue encontrado sabor cocinado la mayor intensidad en el tratamiento 2. No se observaron diferencias significativas entre las variedades ($F = 1,322$, $P < 0,283$).





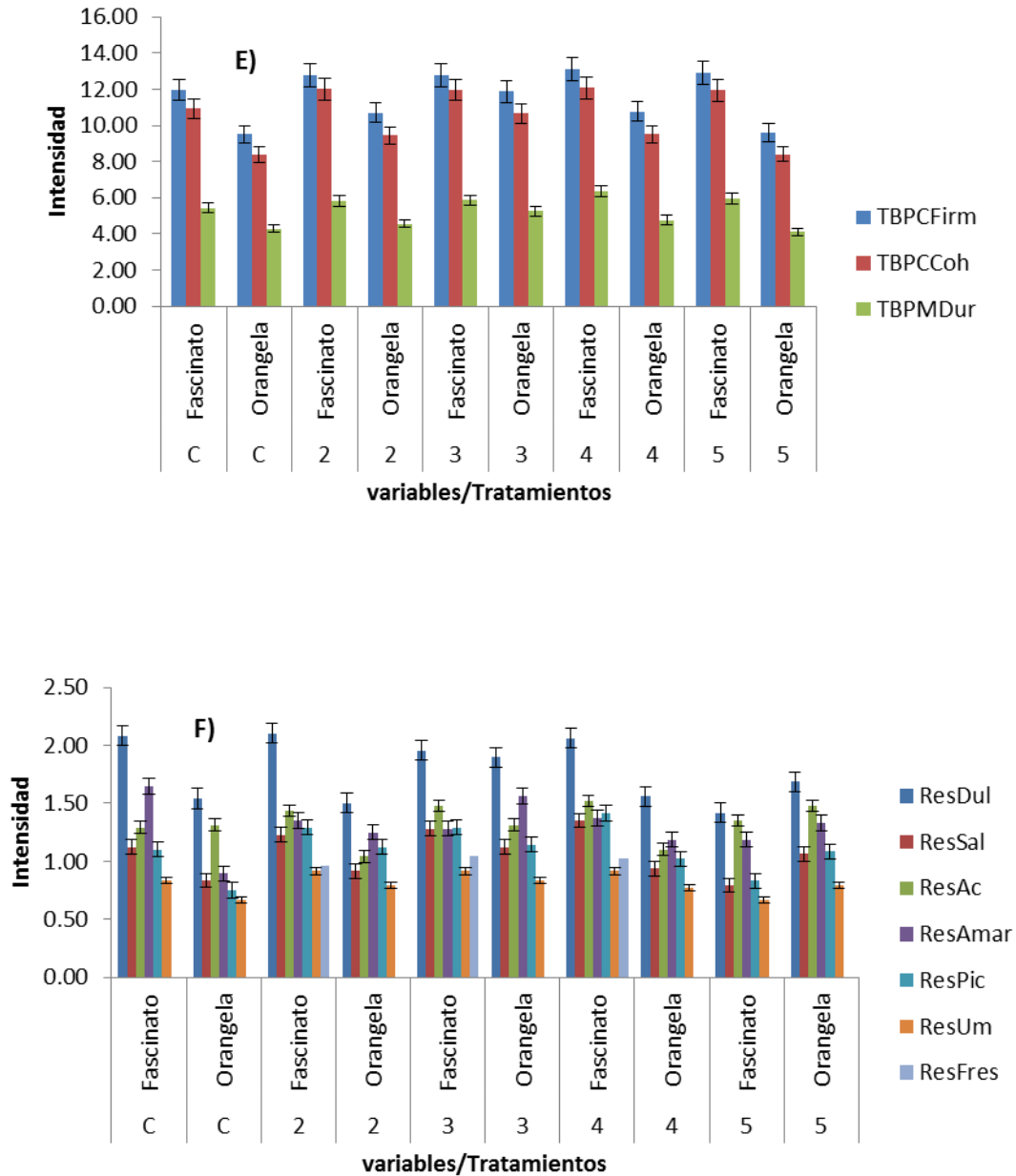


Figura IV.2 Evaluación de los atributos sensoriales en las diferentes variedades de pimiento morrón.

Para el segundo grupo de rasgos sensoriales también se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Los rasgos que mostraron diferencias eran química sabor picante ($F = 4,091$, $p < 0,003$) , aroma químico - plástico ($F = 2,209$, $p < 0,069$) , y caramelizado sabor a miel ($F = 2,519$, $p < 0,042$) (Figura IV.2.B) . Se puede observar que el tratamiento 4 mostró los más altos intensidades para estos tres rasgos sensoriales ser 3,0, 1,5, y 2,3, respectivamente.

Estos valores fueron más altos en comparación con los encontrados en el tratamiento de control. Una vez más, no se observaron diferencias significativas entre las dos variedades. En Figura IV.2 C, se puede observar que los tratamientos produjeron diferencias significativas en acre - sabor caliente ($F = 3,121$, $p < 0,016$), la menta picante - sabor fresco ($F = 3,121$, $p < 0,016$), y sabor acre ($F = 8,842$, $P < 0,000$). Tratamiento 2 produce los más altos intensidades en la menta - sabor fresco sabor caliente y picante acre en comparación con el control, para el sabor acre se observaron los valores más altos en el tratamiento 5. En la Figura IV.2 D se muestran los rasgos sensoriales relacionados con la textura, se puede observar que no se observaron diferencias significativas en los rasgos de intensidades entre los diferentes tratamientos y el control ($F = 0,499$, $p < 0,737$), también se observaron diferencias significativas entre las dos variedades ($F = 2,074$, $p < 0,188$). Estos rasgos estaban relacionados con los sabores básicos, los valores de intensidad osciló entre 1,1 y 4,0. Lo mismo se observó para los rasgos incluyen en la Figura IV.2 E, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos experimentales y de control ($F = 0,852$, $p < 0,494$), sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las variedades de la firmeza ($F = 21,321$, $P < 0,02$), la cohesión ($F = 28,553$, $P < 0,001$), y la dureza ($F = 26,268$, $p < 0,001$). Para estos rasgos Fascinato tuvo más altas intensidades de 13.2, 12.3 y 6.2, respectivamente. Sólo dos rasgos relacionados con regusto picante, ($F = 3,635$, $P < 0,007$) y fresco ($F = 16,996$, $P < 0,000$) (Figura IV.2 F), mostraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control. Tratamiento 4 y 3 produjeron las mayores intensidades para estos rasgos. Para el control de regusto dulce y el tratamiento 5 mostraron una intensidad de 0 para este rasgo. Las variedades mostraron un efecto significativo sólo para regusto dulce ($F = 5,983$, $P < 0,040$).

La aplicación foliar de inductores de cultivo de pimiento producido diferencias significativas en las características sensoriales de los frutos cosechados, fue mencionado que el tratamiento 4 produjo diferencias significativas en rasgos como: sabor global, sabor afrutado, sabor floral y vegetal sabor picante, química sabor picante, aroma químico y plástico, y caramelizado sabor a miel. Tratamiento 4 se caracterizó por intensidades más altas en comparación con los otros tratamientos y el control ($P < 0,05$). Por lo tanto, con el fin de correlacionar los resultados de esos rasgos entre las variedades y tratamientos de análisis de componentes principales se muestran en la Figura IV.3.

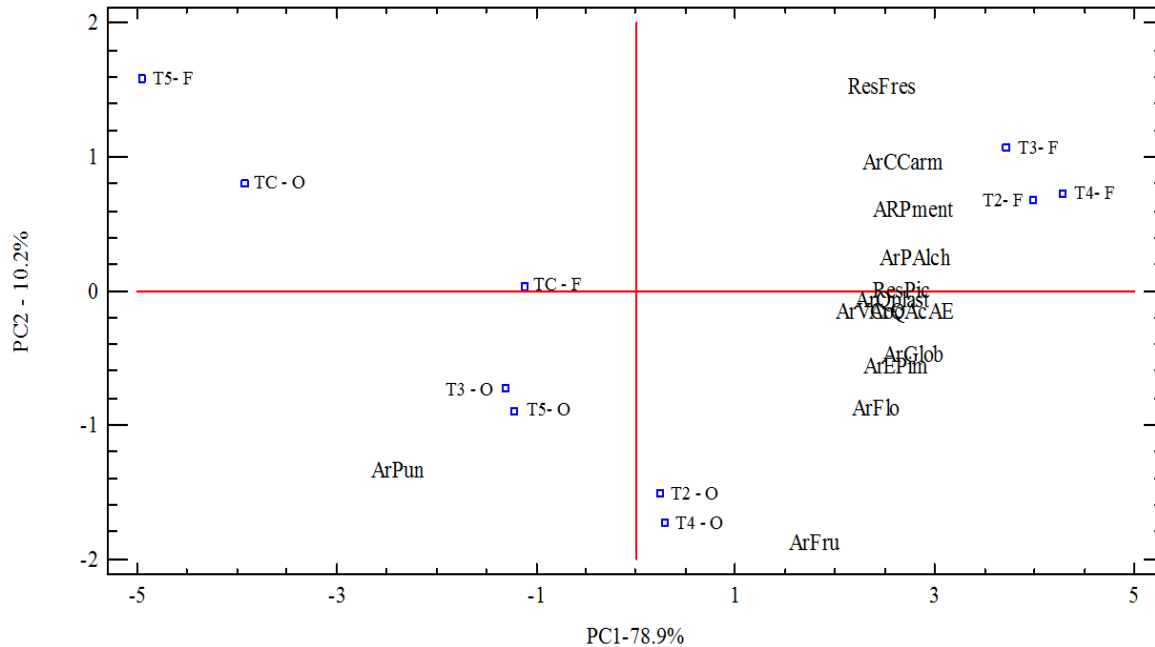


Figura IV.3 Análisis de componentes principales (matriz de covarianza) en los atributos sensoriales de los datos experimentales por tratamiento.

El PCA muestra que el tratamiento con 4 y el tratamiento 2 se relacionan fuerte con sabor a fruta (ArFru), aroma floral (ArFlo), aroma global (ArGlob), vegetativo sabor cocido (ArVCoc), de sabor picante vegetal (ArEPim), aroma - química picante (ArQAcAE) y aroma químico y plástico (ArQPlast) en la variedad Orangela. Para variar Fascinato tratamiento 4 está más relacionado con caramelizado sabor a miel (ArCCarM), picante, de sabor caliente (ArPALch), menta picante-aroma fresco (ArPMent), y el resabio dulce (ResFres). PCA discriminó significativamente entre variedades de pimiento y tratamientos en los 2 primeros componentes principales (PC) que representaron el 78,96 % y el 10,21 % de la varianza entre las muestras, respectivamente. Desde PCA las varianzas explicadas de rasgos sensoriales después de las primeras 2 dimensiones fueron: sabor global (ArGlob, 30,12 % de la varianza explicada), picante sabor caliente (ArPalch, 30,31 %), y acre - menta aroma fresco (ArPMent, 30,21 %), químicos sabor picante (ArQAcAE, 29,99 %), y caramelizado sabor a miel (ArCCarM, 29,11%).

Un HCA (método del vecino más cercano) también se llevó a cabo y se identificaron 3 grupos de muestras que tienen diferentes posiciones en el espacio definido por la PC1 y PC2 estos grupos se muestran en la parcela de muestreo con líneas circulares e identificados por color diferente (Figura IV.4). Las muestras que pertenecen al mismo grupo se consideran con perfiles sensoriales similares.

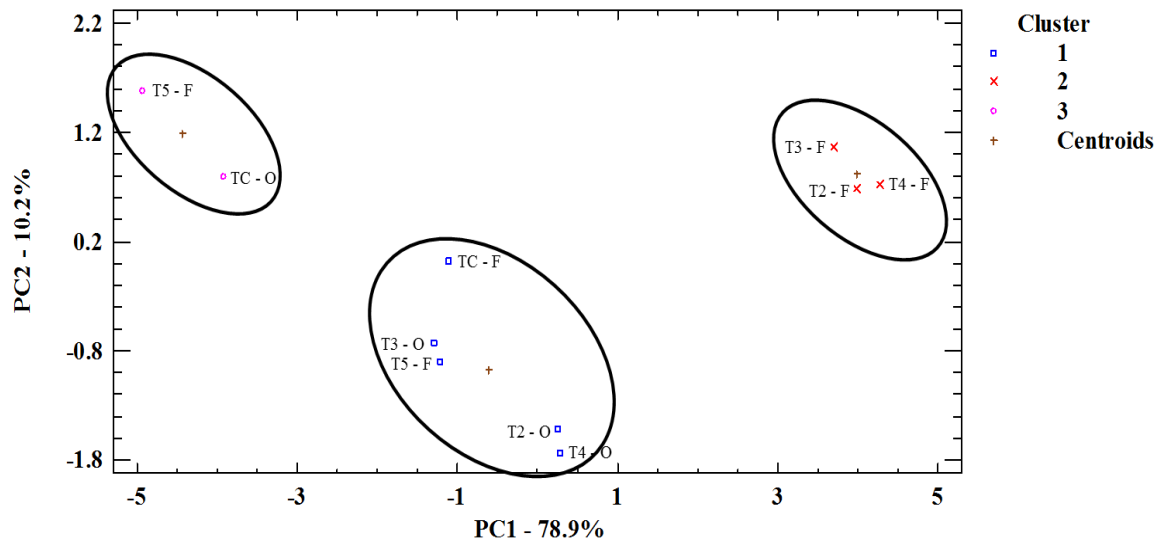


Figura IV.4 HCA basados en los resultados PCA en atributos sensoriales de la variedad Fascinato y Orangela.

El PC1 permitió distinguir CL2 de CL3. Tratamientos pertenecientes a CL3 no estaban claramente caracterizados por descriptores sensoriales, el tratamiento 5 y el control no mostraron cambios en los perfiles sensoriales para Fascinato y Orangela, respectivamente. Por otro lado, CL2 se caracterizó por el aroma de menta fresca sabor caliente (30,31% de la varianza explicada por el modelo) y aroma fresco (30,21% de la varianza) y que incluía los tratamientos 2, 3 y 4 para Fascinato. El PC2 descrito por sabor afrutado (ArFru, el 19,5% de la varianza) y sabor Pungente (ArPun, el 25,8% de la varianza) separa el CL1 con posiciones negativas incluyendo variedad Orangela en tratamientos 2, 3 y 4 descriptores de compartición con el tratamiento y el control del Fascinato con el tratamiento 5. Variaciones claras fueron mostradas por el HCA que

comenta el efecto de los diferentes tratamientos sobre los perfiles sensoriales en ambas variedades.

IV.3 Análisis Bromatológico en los diferentes colores de pimiento morrón.

Trece rasgos bromatológicos difirieron significativamente entre tratamientos ($P \leq 0,05$). Incluyeron grasa, proteína y fibra en los cuales se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y las variedades teniendo una tendencia similar entre las variedades pero predominando significativamente en la cantidad de grasa en el tratamiento 6 en el cual tenemos la interacción de la conductividad eléctrica en sus concentraciones más alta (3.6 dS/m) y peróxido de hidrógeno en su concentración de 36 mM (Figura IV.4) lo que nos indica que la combinación de estos dos elicitores tienen un efecto sinérgico

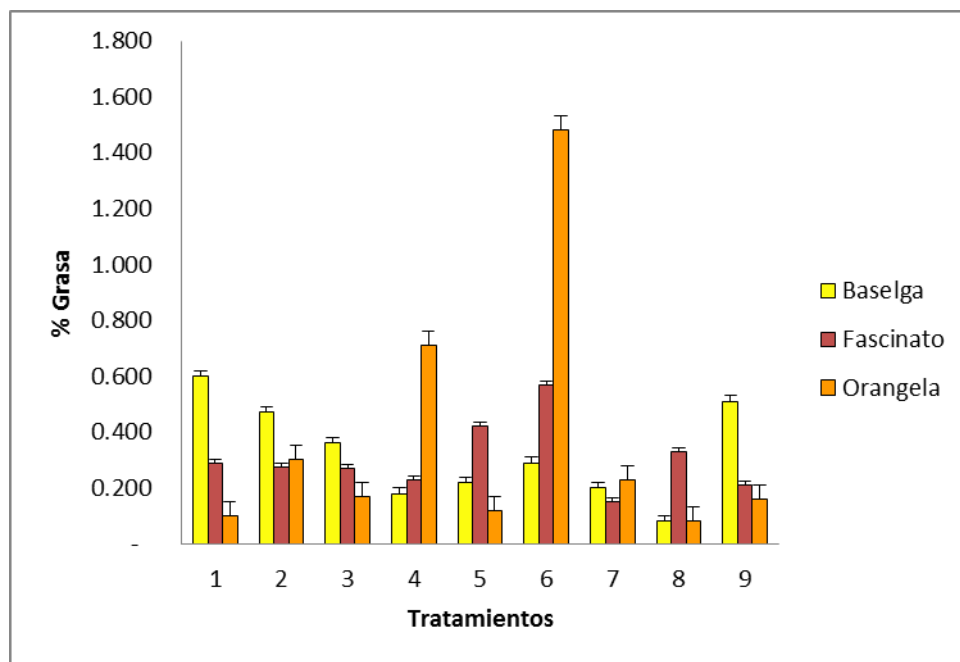


Figura IV.5 Determinación de grasa total en las diferentes variedades de pimiento morrón.

Sin embargo en la cantidad de proteína (Figura IV.5) el tratamiento 6 obtuvo una baja cantidad de ellos en todas las variedades ya que en la variedad Orangela el que mayor cantidad de proteína significativamente lo obtuvo el tratamiento 2 donde solo tenemos un estrés provocado por el peróxido de hidrógeno en una concentración de 0.01 mM, por otro lado la variedad fascinato

obtuvo una mayor cantidad de proteínas en el tratamiento 9 donde tenemos una mezcla de elicitors (peróxido de hidrogeno y ácido salicílico)y conductividad eléctrica en sus concentraciones intermedias (18 mM, 0.1 mM y 3.4 dS/m) respectivamente. Y en la variedad Baselga el que obtuvo mayor cantidad de proteínas fue el tratamiento 8 en el cual existe también un estrés sinérgico ya que contamos con los dos elicitors (peróxido de hidrogeno y ácido salicílico) y la conductividad eléctrica en sus concentraciones altas de (36 mM, 1mM y 36 dS/m) respectivamente.

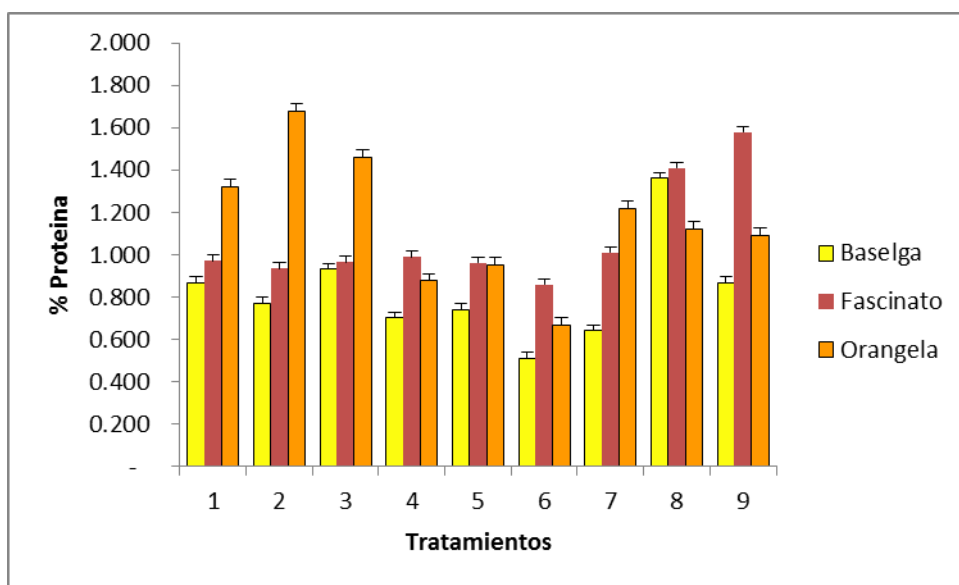


Figura IV.6 Determinación de proteína total en las diferentes variedades de pimiento morrón.

En cuanto al contenido de fibra la tendencia en las tres variedades tenemos que hay una mayor producción significativamente en el tratamiento 8 (Figura IV.6) donde tenemos una mezcla de elicitors (peroxido de hidrogeno y ácido salicílico) y conductividad electrica alta (36 mM, 1 mM y 36 dS/m) respectivamente lo que nos indica que la planta a pesar del estrés producido por este coctel la planta produce mayor cantidad de fibra respecto del control y por variedades la Orangela fue la que mas efecto tuvo de los elicitors tanto en las concentraciones bajas como altas ya que en todos ellos se mantuvo la concentracion de fibra significativamente en mayores cantidades del control por lo que observamos que el coctel de FIMs aplicados en todas sus concentraciones provoca una mayor produccion de fibra. Por lo que creemos que esta variedad aplicando las mezclas de elicitors o por si solo en concentraciones minimas o maximas tienen efecto sobre esta variedad y tenemos mayor produccion de fibra.

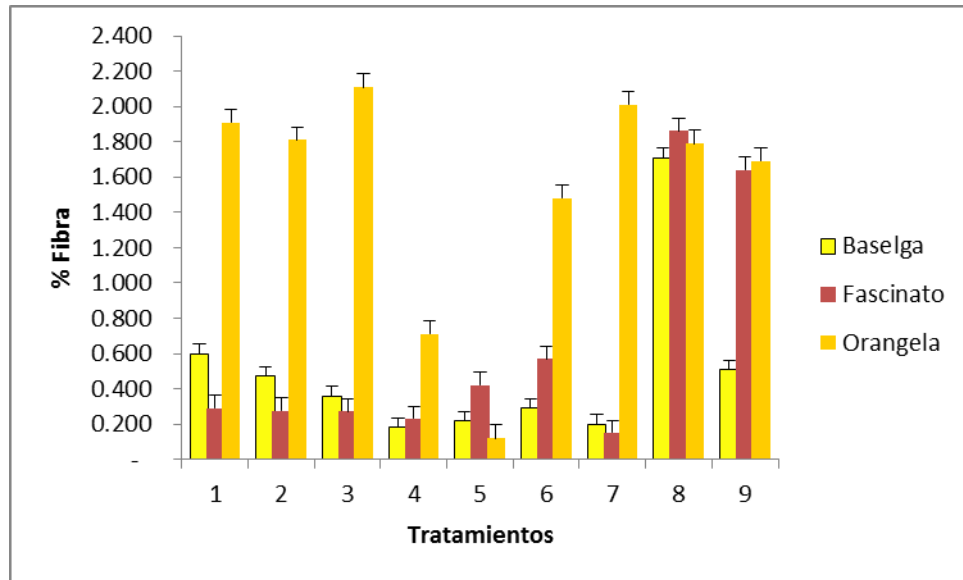


Figura IV.7 Determinación de Fibra total en las diferentes variedades de pimiento morrón.

CAPÍTULO 5:

V CONCLUSIONES

Las mezclas o cocteles de elicitores si provocaron un efecto potenciador en la producción de metabolitos secundarios, siempre y cuando se utilicen las concentraciones óptimas para que la producción en cantidad de kg/m sean factibles para el agricultor ya que con las concentraciones utilizadas de elicitores en este experimento logramos una 5% por debajo de la cantidad de pimiento producido por metro cuadrado.

La variedad fascinato por su naturaleza genética es mucho más susceptible al incremento de los descriptores sensoriales evaluados en este experimento en presencia de los FIMs. Además esta variedad también presentó la mayor cantidad de metabolitos secundarios en las concentraciones altas de conductividad eléctrica (36 dS/m) pero cuando se aplica una mezcla de elicitores (peróxido de hidrogeno y ácido salicílico 36mM y 1 mM respectivamente) aunado a esta conductividad eléctrica generan una producción de metabolitos muy similar al contrario de si solo se aplica un elicitor a esta conductividad eléctrica la producción de los metabolitos disminuye ocasionando mucho estrés en la planta generando solo los compuestos nutrimentales para su supervivencia.

La mezcla de estos FIMs nos provocan una mayor producción de metabolitos secundarios, ácidos grasos, aminoácidos, fitoesteroles y Vitaminas lo cual podemos afirmar hasta este momento que la producción de metabolitos a las concentraciones altas de este experimento del coctel de elicitores (peróxido de hidrogeno y ácido salicílico) y conductividad eléctrica (36mM, 1mM y 36 dS/m) no afecta la producción de este fruto, pero si aumenta la producción de sus metabolitos secundarios para poder aplicar un valor agregado al pimiento morrón en fresco sin afectar la producción del mismo.

VI BIBLIOGRAFÍA

Al-Rubeai, M.; Fussenegger, M.(2007) *Systems Biology*. Springer: 2007; Vol. 5.

Arbona, V.; Manzi, M.; Ollas, C. d.; Gómez-Cadenas, A.(2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 14, (3), 4885-4911.

Arvanitoyannis, I.S. y Vaitisi, O. B. (2007). A Review on Tomato Authenticity: Quality Control Methods in Conjunction with Multivariate Analysis (Chemometrics), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47:675–699.

Bakker, J. C., Bot, G. P. A., Challa, H. and Van de Braak, N. J. (1995). *Greenhouse Climate Control: An Integrated Approach*. Wageningen, The Netherlands:Wageningen Pers.

Basurto-Sotelo, M., Nuñez-Barrios, A., Pérez-Leal R. y Hernández-Rodríguez, O. A. (2008) Fisiología del estrés ambiental en plantas. *Síntesis* 48:1-5.

Bendich, A., & Olson, J. A. (1989). Biological actions of carotenoids. *The FASEB Journal*, 3(8), 1927-1932.

Biacs, P. A.; Daood, H. G.; Pavis, A.; Hajdu, F.(1989) Studies on the carotenoid pigments of paprika (*Capsicum annum* L. var Sz-20). *J. Agric. Food Chem.* 37, (2), 350-353.

Blée, E.(2002) Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* 7, (7), 315-322.

Bozokalfa, M., & Kilic, M. (2010). Mathematical modeling in the estimation of pepper (*capsicum annum* L.) Fruit volume. *Chilean Journal Of Agricultural Research*, 70(4), 626-632.

Campos, Â. D.; Ferreira, A. G.; Hampe, M. M. V.; Antunes, I. F.; Brancão, N.; Silveira, E. P.; Silva, J. B. d.; Osório, V. A.(2003) Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15, (3), 129-134.

Castellanos, J. Z., Borbón, C. M. (2009). Panorama de la horticultura protegida en México, pp. 1-18. *In: Manual de producción de tomate en invernadero*. Castellanos, J. Z. (ed.). Intagri. Guanajuato, México.

Caviglia, O. P. (2007). La contribución de los cultivos múltiples a la sustentabilidad de los sistemas agrícolas en Entre-Ríos. *Agricultura Sustentable en Entre Ríos* Instituto Nacional de Tecnología Agraria (INTA).

- Cheeseman, J. M.(2007) Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship. *Plant stress* 1, (1), 4-15.
- Clarke, R. (1996). Estrogens, Phytoestrogens, and Breast Cancer. In: Dietary Phytochemicals in Cancer prevention and treatment. *Adv. Exper. Med. Biol.* 401:63-79.
- Cohen, S. D.; Kennedy, J. A.(2010) Plant metabolism and the environment: Implications for managing phenolics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50, (7), 620-643.
- Deli, J.; Matus, Z.; Szabolcs, J.(1992) Carotenoid composition in the fruits of black paprika (*Capsicum annuum* variety longum nigrum) during ripening. *J. Agric. Food Chem.* 40, (11), 2072-2076.
- Dicosmo, F., and Misawa, M. (1995). Plant Cell and Tissue culture: Alternatives for metabolite production. *Biotechnology advances*, 13 (3): 425-453.
- Dikilitas, M., Guldur, M., Deryaoglu, A., & Erel, O. (2011). Antioxidant and Oxidant Levels of Pepper (*Capsicum annuum* cv. 'Charlee') Infected with Pepper Mild Mottle Virus. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2), 58-63.
- Edreva, A.; Velikova, V.; Tsonev, T.; Dagnon, S.; Gürel, A.; Aktaş, L.; Gesheva, E.(2008) Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen Appl Plant Physiol* 34, (1-2), 67-78.
- Fanasca, S., Roupheal, Y., Venneria, E., Azzini, E., Durazzo, A., Maiani, G. (2009). Antioxidant properties of raw and cooked spears of green asparagus cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 44: 1017-1023.
- Feregrino-Perez, A. A., Berumen, L. C., García Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J. A., and Loarca-Piña, G. (2008). Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-Induced Colon Cancer. *J. Agric. Food. Chem.* 56: 8737-8744.
- Fernie, A. R.; Schauer, N.(2009) Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends Genet.* 25, (1), 39-48.
- Ferrari, C. K. B. y Torres, E. A. F. (2003). Biochemical pharmacology of functional foods and prevent ion of chronic diseases of aging. *Biomed. Pharmacother.* 57: 251-260.
- Ferrari, S. (2010). Biological elicitors of plant secondary metabolites: Mode of action and use in the production of nutraceuticals *Bio-Farms for Nutraceuticals* (pp. 152-166): Springer.
- Forest Europe, U. *FAO (2011) State of Europe's forests 2011. Status and trends in sustainable forest management in Europe.* Paper presented at the Ministerial Conference on the Protection of Forests in Europe, Oslo.

Foyer, C H., Noctor, G., Van Emden, H. F. (2007). An evaluation of the costs of making specific secondary metabolites: Does the yield penalty incurred by host plant resistance to insects result from competition for resources?. *International Journal of Pest Management*, 53 (3): 175-182.

Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide-and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 241-254.

Gama, P., Inanaga, S., Tanaka, K., Nakazawa, R. (2007). Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 79-88.

García, A. A., y Urria-Carril, E. P. (2009). “Metabolismo secundario de planta, Biología”. *Fisc. Veg.* 2 (3) 119-145.

Geleta, L.; Labuschagne, M.; Viljoen, C.(2005) Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. *Biodiversity & Conservation* 14, (10), 2361-2375.

Ghasemzadeh, A.; Omidvar, V.; Jaafar, H. Z.(2012) Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Medicinal Plants Research* 6, (15), 2971-2976.

Gholamreza, A., Mohammadi, M. and Hedayat, M. (2010). Effect of calicylic acid on Na⁺ accumulation in shoot and roots of in diferente K⁺ status. *Journal Biol. Environ. SCI.*, 5 (13): 31-35.

Goodman, W. G. (1989). Chitin: A magic bullet. *The food insects newsletter.* 2 (1): 6 -7.

Gzik, A.(1996) Accumulation of proline and pattern of α -amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 36, (1), 29-38.

Hancock, R. E.; Sahl, H.-G.(2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 24, (12), 1551-1557.

Heo, H. J., Kim, Y. J., Chung, D. y Kim, D-O. 2007. Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system. *Food Chemistry.* 104: 87–92.

Hernández- Hernández, F., López-Cruz, I. L., Guevara-González, R.G., Rico-García E., Hernández-Fuentes, A D., Campos-Montiel, R., Pineda-Espinoza, J. M. (2010). Comportamiento poscosecha de pimiento morrón (*Capsicum annum* L.) var. California por efecto de la fertilización química y aplicación de lombrhumus. *Revista Iberoamericana de Tecnología poscosecha*, 11(1): 82-91.

Hernández-Hernández, F. (2009). Simulación del crecimiento y desarrollo del chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) para mejorar su producción en condiciones controladas. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.

Heuvelink, E. (1989). Influence of day and night temperature on growth of young tomato plants. *Scientia Hortic.* 38: 11-22.

Howard, L. R.; Wildman, R. E. (2007) Antioxidant vitamin and phytochemical content of fresh and processed pepper fruit (*Capsicum annuum*). In *Nutraceuticals and functional foods*, Second edition ed.; Wildman, R. E. C., Ed. CRC Press Taylor & Francis group: Boca Raton, New York, pp 165-192.

Howard, L.; Smith, R.; Wagner, A.; Villalon, B.; Burns, E. (1994) Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapenos. *J. Food Sci.* 59, (2), 362-365.

Huaiying, Y., Xiaodan, J. y Fengzhi, W. (2006) “Effects of continuous cucumber cropping and alternative rotations under protected cultivation on soil microbial community diversity”, *Plant and soil*, 284:195-203.

Hung, S.-H.; Yu, C.-W.; Lin, C. H. (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot Bull Acad Sin* 46, 1-10.

Ibrahim, M. H.; Jaafar, H. Z.; Rahmat, A.; Rahman, Z. A. (2011) Effects of nitrogen fertilization on synthesis of primary and secondary metabolites in three varieties of kaci fatimah (*Labisia Pumila* Blume). *Int. J. Mol. Sci.* 12, (8), 5238-5254.

Ilow, R., Regulska-Ilow, B., Walkiewicz, G., Biernat, J. y Kowalisko, A. (2008). Evaluation of Bioflavonoid Intake in the Diets of 50 -Year -Old In habitants of Wrocław. *Adv. Clin. Exp. Med.* 17(3): 327-336.

Iorizzi, M.; Lanzotti, V.; De Marino, S.; Zollo, F.; Blanco-Molina, M.; Macho, A.; Muñoz, E. (2001) New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, (4), 2022-2029.

Ioslovich, I., Seginer, I., (1996) normalized costate variable for seasonal optimization of greenhouse tomato production *Acta horticultrae* 417: 87-97.

Jones J. W., Dayan E., Allen L. H., Van Keulen H., Challa H. (1999). A dynamic tomato growth and yield model (TOMGRO). *Transactions of the ASAE* 34 (2): 663-672.

Jones, J W., Dayan, E., Allen, L. H., Van Keulen, H., Challa, H. (1991). A dynamic tomato growth and yield model (TOMGRO). *Transaction of the ASAE* 3(2):663-672.

Juarez, Abraham., Rocha-Granados, M. R., López, M. C., Rivera-Bustamante, M. G., Ochoa-Alejo N. (2008). Virus-induced silencing of *Comt*, *pAmt* and *Kas* genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chili pepper fruits. *Planta* 227: 681-695.

Jung, H. W.; Kim, W.; Hwang, B. K.(2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses*. *Plant, Cell Environ.* 26, (6), 915-928.

Kaewnaree, P.; Vichitphan, S.; Klanrit, P.; Siri, B.; Vichitphan, K.(2011) Effect of accelerated aging process on seed quality and biochemical changes in sweet pepper (*Capsicum annuum* Linn.) seeds. *Biotechnology* 10, (1), 175-182.

Kenig, A. and Jones, J. W. (1997). TOMGRO V3.0: A dynamic model of tomato growth and yield, Ch. II-5. In *Optimal Environmental Control for Indeterminate Greenhouse Crops*, eds. I. Seginer, J. W. Jones, P. Gutman, and C. E. Vallejos. BARD Research Report No. IS-1995-91RC. Haifa, Israel: Agricultural Engineering Dept., Technion.

Keurentjes, J. J.; Fu, J.; De Vos, C. R.; Lommen, A.; Hall, R. D.; Bino, R. J.; van der Plas, L. H.; Jansen, R. C.; Vreugdenhil, D.; Koornneef, M.(2006) The genetics of plant metabolism. *Nat. Genet.* 2006, 38, (7), 842-849.

Kholer, A., Tillman, H. (1988). *Campesinos y medio ambiente en Cajamarca*. Lima, Mosca Azul.

Klessig, D. F.; Malamy, J.(1994) The salicylic acid signal in plants. In *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*, Springer: pp 203-222.

Lárez, V. C. (2008). Alginas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *UDO agrícola* 8 (1): 1-22.

Larqué Saavedra, A. and Mex, R. M. (2007). "Chapter 2 Effects of salicylic acid on the bioproductivity of plants, 15-23.

López, I. L., Rojano, A., Ramírez A. (2005) "Modelos matemáticos de hortalizas en invernadero: trascendiendo la contemplación de la dinámica de cultivos". *Revista Chapingo. Serie Horticultura. Vol.11. No 2. pp. 257-267.*

López, J. L., Rojano, A., Ramírez, A., Bonilla, M. (2006) "Modelos matemáticos para el crecimiento y desarrollo de cultivos: concepto y metodología". *Notas. Universidad Autónoma de Chapingo.*

Machlin, L. J.; Bendich, A.(1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal* 1, (6), 441-445.

Martínez, E. y García, M. (1993). *Cultivo sin suelo: hortalizas en clima mediterráneo*. Ediciones de horticultura S. L. Compendio de agricultura, 45-52.

Mason, E. G., Dzierzon, H. (2006). Application of modeling to vegetation management. *Can. J. For. Res.* 36:2505-2514.

Matson, P A., Parton, W. J., Power, A. G., Swift, M. J. (1997). Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science*, 277, 504-509.

Matsufuji, H., Nakamura, H., Chino, M. y Takeda, M. (1998). Antioxidant activity of capsanthin and the fat ty acid esters in paprika (*Capsicum annuum*). *J. Agric. Food Chem.* 46: 3468-3472.

Medina-Juárez, L.; Molina-Quijada, D. M.; Del Toro-Sánchez, C. L.; González-Aguilar, G. A.; Gámez-Meza, N.(2012) Antioxidant activity of peppers (*Capsicum annuum* L.) extracts and characterization of their phenolic constituents. *Interciencia* 37, (8), 588-593.

Mejía-Teniente, L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira M. M., Ocampo-Velazquez, R. V., Herrera-Ruiz, G., Chapa-Oliver, A. M., Guevara-González, R. G. (2010). Use of elicitors as an approach for sustainable agriculture. *Journal of Biotechnology* 9:9155-9162.

Molina, A.; Segura, A.; García-Olmedo, F.(1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett.* 316, (2), 119-122.

Molina-Quijada, D.M.A., Medina-Juárez, L.A., González-Aguilar, G.A., Robles-Sánchez, R.M. y Gámez-Meza N. (2009). Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cáscara de uva (*Vitis vinifera* L.) de mesa cultivada en el noroeste de México. *CyTA - Journal of Food*.

Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil-Hernández, A. (2010). Compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal y obesidad. *Nutrición Clínica en Medicina.* 4 (3): 138-152.

Ni, Y.; Su, M.; Lin, J.; Wang, X.; Qiu, Y.; Zhao, A.; Chen, T.; Jia, W.(2008) Metabolic profiling reveals disorder of amino acid metabolism in four brain regions from a rat model of chronic unpredictable mild stress. *FEBS Lett.* 582, (17), 2627-2636.

Ocampo-Velásquez, V.R., Herrera-Ruiz, G., González-Chavira, M.M., Torres-Pacheco, I. (2011) “Simulación del crecimiento y desarrollo del chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) bajo condiciones de invernadero.” *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 2 (3): 385-397.

Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L) *J Sci food Agric.* 85: 935-942.

Overman, A. R. (1984). “Estimating crop growth rate with land treatment”, *J. Environ. Eng. Div.* 110:1009-1012.

Palevitch, D. y Craker, L. E. (1995). Nutritional and medicinal importance of red pepper (*Capsicum spp.*). *J. Herbs Spices Med. Plants* 3:55-83.

Piñol, M. T., y Palazón, J. (1993). *Metabolismo Secundario. Fisiología y Bioquímica Vegetal*. España: Interamericana Mc Graw-Hill.

Proctor, R H., McCormick, S. P., Alexander, N. J., Desjardins, E. (2009). Evidence that a secondary metabolic biosynthetic gene cluster has grown by gene relocation during evolution of the filamentous fungus *Fusarium*. *Molecular Microbiology*, 74 (5): 1128-1142.

Quezada, S M., Llorente, C. G., Hernández, A. G. (2010). Review Compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal y obesidad. *Nutr Clin Med*; IV (3): 138-152.

Rahman, M. L., Inden, H. (2012). Antioxidant content and quality of fruits as affected by nigari, an effluent of salt industries, and fruit ages of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Agri. Sci.* 4:10, 105-115.

Raskin, I.(1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 43, (1), 439-463.

Reséndiz, M. R. C. (2010). “Evaluación Agronómica de variedades de chile morrón manejadas con diferentes tipos de poda y densidad de población”. Departamento de Fitotecnia. Instituto de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo.

Rhouma, A.; Ben Daoud, H.; Ghanmi, S.; Ben Salah, H.; Romdhane, M.; Demak, M.(2009) Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. *J. Plant Pathol.* 339-345.

Rivas-San Vicente, M.; Plasencia, J.(2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *J. Exp. Bot.* 62, (10), 3321-3338.

Ruiz-Cruz, S.; Alvarez-Parrilla, E.; Laura, A.; Martinez-Gonzalez, A. I.; Ornelas-Paz, J. D.; Mendoza-Wilson, A. M.; Gonzalez-Aguilar, G. A.(2010) Effect of different sanitizers on microbial, sensory and nutritional quality of fresh-cut jalapeno peppers. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5, (3), 331.

Saleh, Maya., Trinchieri, G. (2010). Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nature reviews immunology* 11, 9-20. Doi:10.1038/nri2891.

Sgroppo, C. S., and Perey, M. V. (2009). Using mild heat treatment to improve the bioactive related compounds on fresh-cut green bell peppers. *International Journal of food science & technology*. 44, 1793-1801.

Shiple, M. M.; Wellington, K.; Rao, A.; Ritchie, T.; Vogtsberger, R. C.(2012) Fatty Acid Composition of a Burrowing Mayfly, *Hexagenia limbata* (Ephemeroptera: Ephemeridae), from a North Central Texas Lake. *J. Kans. Entomol. Soc.* 85, (3), 245-258.

Silva, C. L.; Haesen, N.; Câmara, J. S.(2012) A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra high pressure liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables. *J. Chromatogr.* 1260, 154-163.

- Silva, L.R., Azevedo, J., Pereira, M. J., Valentão, P., Andrade, P. B., (2013). Chemical assessment and antioxidant capacity of pepper (*Capsicum annuum* L.) Seed. *Food Chem. Toxicology*. 53, 240-248.
- Sima, R.M., Maniutiu, D.N., Cenariu, D., Lazar, V., Sima, N.F. (2010). The impact of cultura system and fertilization type on yield and fruit quality of greenhouse tomatoes. *AAB Bioflux*, 2:49-55
- Simonne, A.; Simonne, E.; Eitenmiller, R.; Mills, H.; Green, N.(1997) Ascorbic Acid and Provitamin A Contents in Unusually Colored Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). *J. Food Compos. Anal.* 10, (4), 299-311.
- Storey, R.; Davies, H.(1992) Tuber quality. In *The potato crop*, Harris, P., Ed. Springer: Champam & Hall, London, UK, pp 507-569.
- Sukrasno, N. y Yeoman, M. M. (1993). Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* f rui ts, *Phytochemistry*. 32: 839– 844.
- Sun, T. y Tanumihardjo, S. A. (2007). An Integrated Approach to Evaluate Food Antioxidant Capacity. *Journal of Food Science*.72:R159 –R165.
- Taheri-Garavand, A., Rafiee, S., & Keyhani, A. (2011). Study on Effective moisture diffusivity, activation energy and mathematical modeling of thin layer drying kinetics of bell pepper. *Australian Journal Of Crop Science*, 5(2), 128-131.
- Tao, f., Yokozawa, M., Zhang, Z. (2009). Modeling the impacts of weather and climate variability on crop productivity over a large area: A new process-based model development, optimization and uncertainties analysis. *Agric. For. Meteorol.* 149:831-850.
- Teixeira, A.; Martins, V.; Noronha, H.; Eiras-Dias, J.; Gerós, H.(2014) The First Insight into the Metabolite Profiling of Grapes from Three *Vitis vinifera* L. Cultivars of Two Controlled Appellation (DOC) Regions. *Int. J. Mol. Sci.* 15, (3), 4237-4254.
- Terras, F. R.; Goderis, I. J.; Van Leuven, F.; Vanderleyden, J.; Cammue, B. P.; Broekaert, W. F., In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* **1992**, 100, (2), 1055-1058.
- Tikunov, Y.; Lommen, A.; de Vos, C. R.; Verhoeven, H. A.; Bino, R. J.; Hall, R. D.; Bovy, A. G.(2005) A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.* 139, (3), 1125-1137.
- Torres-Schumann, S.; Godoy, J. A.; Pintor-Toro, J. A., (1992) A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18, (4), 749-757.

Treviño, M. B.; O'Connell, M. A.(1998) Three Drought-Responsive Members of the Nonspecific Lipid-Transfer Protein Gene Family in *Lycopersicon pennellii*Show Different Developmental Patterns of Expression. *Plant Physiol.* 116, (4), 1461-1468.

Upchurch, R. G.(2008) Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* 30, (6), 967-977.

Van Straten, G., Van Willigenburg, G., Van Henten, E., Van Ooteghem, R., (2011). Optimal control of greenhouse cultivation. CRC Press, Boca Raton, FL.

Vazquez-Cruz, M.A., Torres-Pacheco, I., Miranda-Lopez, R., Cornejo-Perez, O., Osornio-Rios, R., Romero-Troncoso, R., Guevara-Gonzalez, R.G. (2010). Potential of mathematical modeling in fruit quality. *African Journal of Biotechnology*, 9, 260-267.

Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X. y Zubik, L. (1998). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46: 3630–3634.

Wachtel, R. E. (1999). Capsaicin. *Regist. Anest. Pain Med.* 24:361-363.

Wahyuni, Y.; Ballester, A.-R.; Sudarmonowati, E.; Bino, R. J.; Bovy, A. G.(2011) Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 72, (11), 1358-1370.

Wahyuni, Y.; Stahl-Hermes, V.; Ballester, A.-R.; de Vos, R. C.; Voorrips, R. E.; Maharijaya, A.; Molthoff, J.; Zamora, M. V.; Sudarmonowati, E.; Arisi, A. C. M.(2014) Genetic mapping of semi-polar metabolites in pepper fruits (*Capsicum* sp.): towards unravelling the molecular regulation of flavonoid quantitative trait loci. *Mol. Breed.* 33, (3), 503-518.

Warren, W.J., Hand, D.W. and Hannah, M.A. (1992) “Light interception and photosynthetic efficiency in some glasshouse crops”. *J. Exp. Bot.* 43:363-373.

Wegehenkel, M., Mirschel, W. (2005). Crop growth, soil water, and nitrogen balance simulation of three experimental field plots using the Opues model: A case of study. *Ecological modeling*, 190:116-132.

Wu X, Prior R. L. (2005). Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2589-2599.

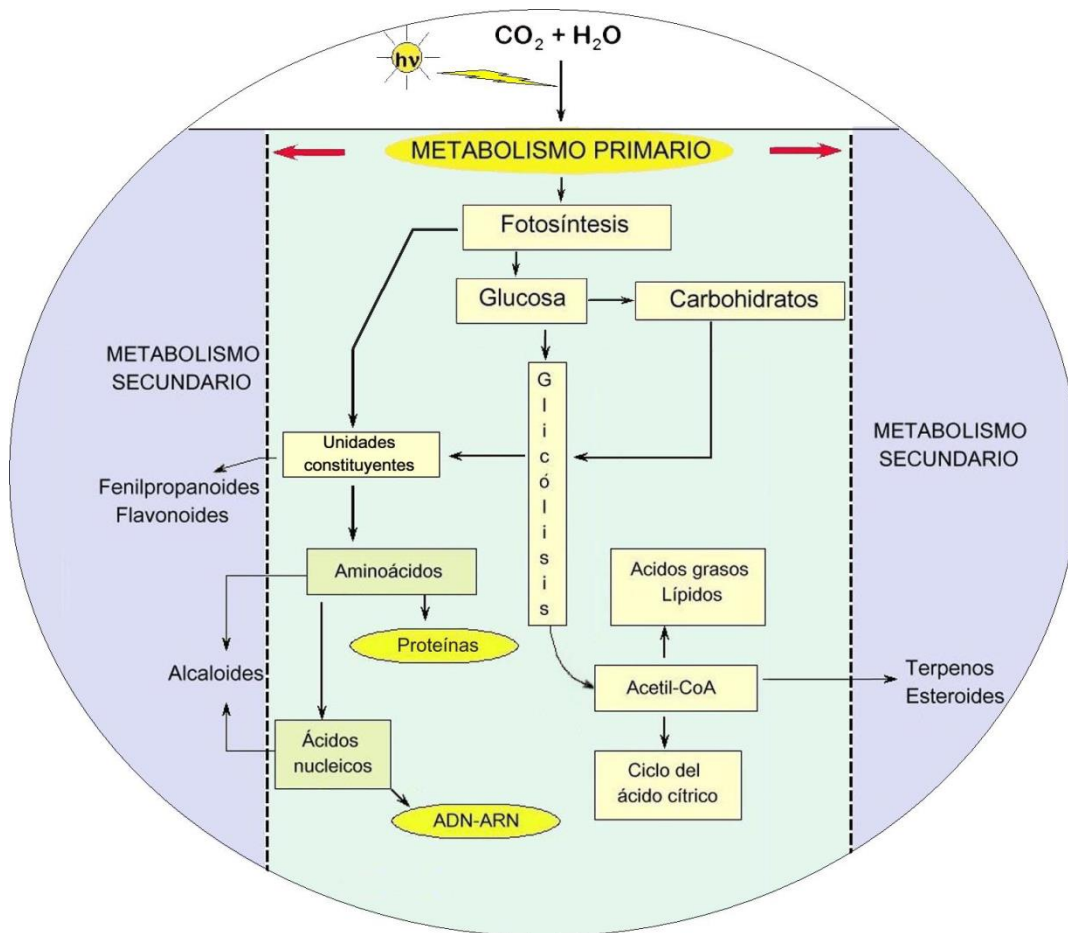
Xue, H.; Upchurch, R.; Kwanyuen, P.(2006) Ergosterol as a Quantifiable Biomass Marker for *Diaporthe haseolorum* and *Cercospora kikuchi*. *Plant Dis.* 90, (11), 1395-1398.

Zaghloul, Y.; Abbassy, S.; Elakhdar, E.(2011) The Effect of E-Selen Antioxidant on the Fatty Acids Content of the Homogenate of Unirradiated and Irradiated Pupae of *Ceratitis Capitata*.

Zhang, D.; Hamauzu, Y.(2004) Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.* , 88, (4), 503-509

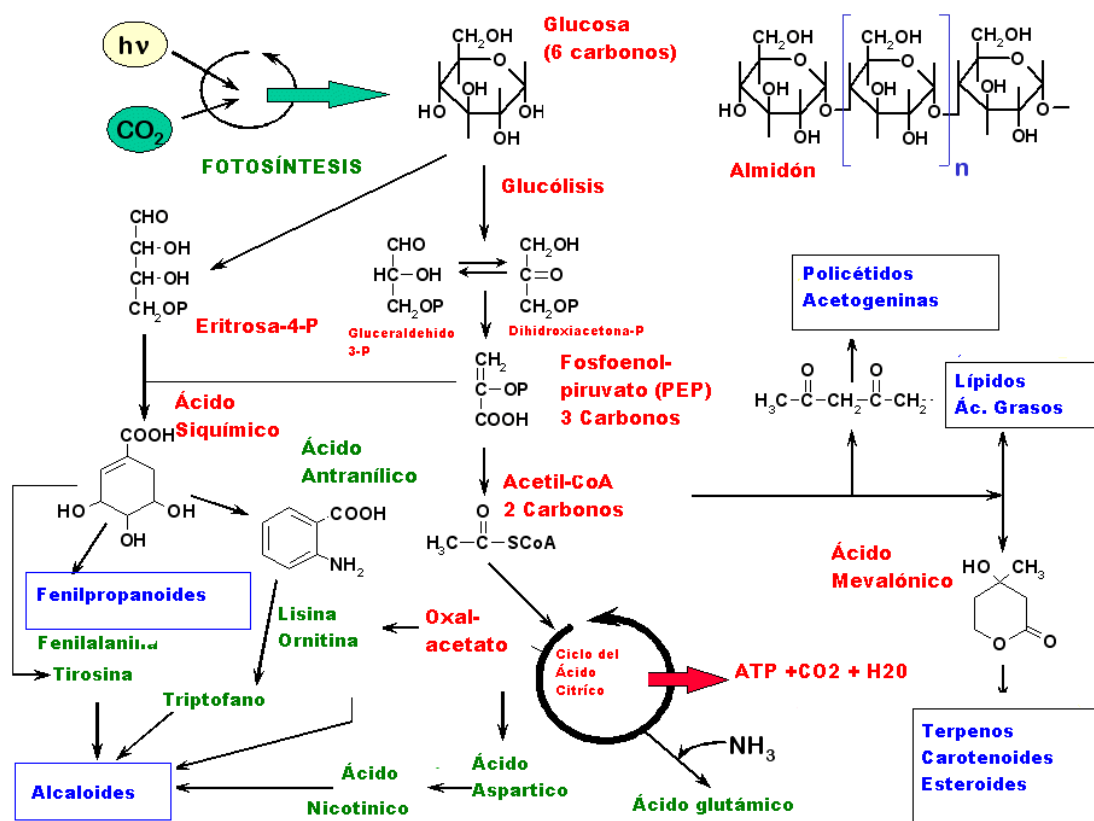
ANEXO 1

Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.



ANEXO 2

Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario



ANEXO 3

Algunas de las aplicaciones de compuestos bioactivos en actividades relacionadas con la agricultura.

Uso	Biopolímero	Propiedades aprovechables	Referencia	Cultivo
Protección en plantas	Quitosan	Fungicida	Barka <i>et al.</i> , (2004) Lafontaine y Henhamou, (1996)	Uva de vino, tomate
Liberación controlada de agroquímicos	Quitina y Quitosan	Formación de hidrogeles, labilidad de derivados	Mc Cormick <i>et al.</i> , (1982), Teixeira <i>et al.</i> , (1990), Hirano, (1978), Palma <i>et al.</i> , (2005)	Arándano
Estimulación del crecimiento	Quitosan	Bioestimulante	Nge <i>et al.</i> , (2006)	Orquídea
Biocidas	Quitosan	Antimicrobiana	Lui <i>et al.</i> , (2007) Hadwiger y McBride (2006) Bautista-Baños <i>et al.</i> , (2006)	Tomate, papa, hortalizas
Estimulador de Crecimiento	Ácido salicílico	Bioestimulante	Gunes, 2008	Girasoles
Biocidas	Peróxido de hidrogeno	Antimicrobiana	Choi <i>et al.</i> , (2007)	Chile
Protección en plantas	Peróxido de Hidrogeno	Fungicida	Torres, 2002	Arabidopsis thaliana