



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Ingeniería Agroindustrial

“ESTUDIO DEL POTENCIAL BIOACTIVO EN PARTES NO COMESTIBLES
DE PLANTA DE CHILE (*Capsicum chinense*) ASPERJADAS CON PERÓXIDO
DE HIDRÓGENO”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

Ingeniero Agroindustrial

Presenta:

Hernán Núñez López

Dirigido por:

M.C. Ángela María Chapa Oliver

SINODALES

M.C. Ángela María Chapa Oliver

Presidente

Firma

Dr. Ramón Gerardo Guevara Gonzalez

Secretario

Firma

Q.A. Arturo Arana Juaristi

Vocal

Firma

Dr. Enrique Rico García

Suplente

Firma

M.C. Laura Mejía Teniente

Suplente

Firma

Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad

Centro Universitario
Querétaro, Qro. Marzo de 2013 México.

RESUMEN

Actualmente se busca una fuente de sustancias bioactivas que proporcionen estabilidad a la salud de la población que día a día se ve amenazada por el consumo de alimentos que generan radicales libres, sumamente dañinos para el bienestar, estudios recientes lo demuestran.

Se conoce que el chile habanero (*Capsicum chinense*) contiene compuestos bioactivos y que la mayor concentración de de estos se encuentran en el fruto de la planta. Por lo tanto, y partiendo del hecho de que todos los órganos forman parte de la planta, se puede inferir que los órganos no comestibles cuentan con la presencia de compuestos bioactivos. Además hay que destacar que en el cultivo del chile habanero solamente se utiliza el fruto, mientras que el resto de la planta genera desechos que finalmente ocasionan contaminación. Con base en lo anterior, el objetivo de éste trabajo es determinar el potencial bioactivo en las hojas de chile habanero (*Capsicum chinense*) a las cuales se les aplicó peróxido de hidrógeno como elicitor.

Se cuantificaron fenoles totales, flavonoides, capacidad antioxidante, altura de la planta y diámetro de la base del tallo. Los resultados mostraron que la aplicación de peróxido de hidrógeno no incremento significativamente la cantidad de bioactivos en las hojas. Sin embargo, se determinó que las hojas de chile habanero si contienen compuestos bioactivos y capacidad antioxidante aunque en niveles menores que los encontrados en el fruto pero en cantidades mayores que en otras especies de plantas.

(Palabras clave: Peróxido de hidrógeno, elicitor, fenoles, flavonoides, capacidad antioxidante)

SUMMARY

Currently looking for a source of bioactive substances that provide stability to the health of people who daily threatened by food consumption that generate free radicals, highly damaging for welfare, recent studies prove it.

It is known that the habanero pepper (*Capsicum chinense*) contains bioactive compounds and the highest concentration of these is found in the fruit of the plant. Therefore, and based on the fact that all organs are part of the plant, it can be inferred that the inedible organs have the presence of bioactive compounds. Also it is noteworthy that in growing habanero pepper only used the fruit, while the rest of the plant generates waste that ultimately cause pollution.

Based on the above, the aim of this work is to determine the potential bioactive in leaves of habanero pepper (*Capsicum chinense*) to which we applied hydrogen peroxide as elicitor.

Quantified total phenols, flavonoids, capacity antioxidant, plant height and diameter of the stem. The results showed that the application of hydrogen peroxide did not significantly increase the amount of bioactive leaves. However, it was determined that Habanero leaves contain bioactive compounds and antioxidant capacity although at lower levels than those found in the fruit but in amounts greater than other species of plants.

(Keywords: Hydrogen peroxide, elicitor, phenols, flavonoids, capacity antioxidant.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por permitirme realizar el presente trabajo satisfactoriamente, por brindarme todas éstas experiencias y aprendizaje.

A mi directora de tesis M.C. Ángela Chapa Oliver, por su apoyo y confianza que me brindo en todo momento de la realización de este proyecto. Así como los múltiples consejos y recomendaciones que ella me proporcionó.

A mis sinodales Dr. Ramón, Q.A. Arturo, Dr. Enrique y M.C. Laura, por el aprendizaje que me brindaron a lo largo de la elaboración de la presente Tesis y durante toda la carrera.

A Nataly y la Dra. Loarca, por la guía y ayuda que me dieron en el Laboratorio para el estudio que a continuación se presenta.

A mis compañeros de la carrera, quienes colaboraron y me apoyaron en la elaboración de esta Tesis.

A los chiles habaneros y a las hojas también, porque finalmente fueron el centro de mi atención durante todo este proceso.

A mi familia, quienes me han impulsado a seguir adelante, sus buenos consejos y ánimo que he recibido; especialmente para mi abuelo Antonio que aunque no esté físicamente, siempre vivirá en mi corazón y en mi pensamiento.

Le doy gracias a mis padres Lino y Mary por su incondicional apoyo brindado a lo largo de toda mi vida y de mi formación personal y profesional; sin lugar a duda un ejemplo a seguir.

Gracias.

INDICE GENERAL

Contenido	Pagina
RESUMEN	I
SUMMARY	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE	IV
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
I INTRODUCCION	1
1.1 Introducción	1
1.2 Descripción del problema	2
1.3 Justificación	3
1.4 Hipótesis y objetivos	3
II REVISION DE LITERATURA	5
2.1 Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>)	5
2.1.1 Origen y dispersión prehispánica del chile habanero	5
2.1.2 Taxonomía del chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>).	6
2.1.3 Morfología	6
2.1.4 Contenido nutricional	8
2.1.5 Pungencia de el chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>)	9
2.1.6 Aspectos agrícolas del cultivo (chile habanero)	11
2.1.6.1 Clima	11
2.1.6.2 Riego	11
2.1.6.3 Altitud	11
2.1.6.4 Ciclo fonológico del cultivo	11
2.2 Compuestos bioactivos	13
2.2.1 Antioxidante	15
2.2.1.1 Antioxidantes enzimáticos	16
2.2.1.2 Antioxidantes no enzimáticos	17
2.2.1.3 Capacidad antioxidante	18

2.2.2 Fenoles	19
2.2.3 Flavonoides	20
2.3. ERO (Especies reactivas del oxígeno)	22
2.3.1 Anión superóxido	23
2.3.2 Peróxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂)	24
2.3.3 Radical Hidroxilo (HO)	24
2.4 Estrés oxidativo	24
2.4.2 Daño oxidante	25
2.5 Elicitores	26
2.5.1 Elicitores bióticos	26
2.5.2 Elicitores abióticos	27
III METODOLOGIA	28
3.1 Sitio experimental	28
3.1.1 Características y preparación del invernadero	28
3.2 Material Vegetal	30
3.2.1 Sustrato y su manejo	31
3.3 Manejo del cultivo	31
3.3.1 Siembra	31
3.3.2 Plántula	31
3.3.3 Transplante	32
3.3.4 Poda en tallo	32
3.4 Manejo sanitario	32
3.4.1 Acciones culturales	32
3.4.2 Acciones preventivas	32
3.4.3 Acciones correctivas	33
3.5 Fertirriego	33
3.5.1 Manejo de riego.	34
3.6 Diseño experimental	35
3.6.1 Preparación y dosificación del peróxido de hidrógeno	36
3.7 Manejo de la muestra	37
3.8 Variables medidas	37
3.8.1 Altura de la planta	37

3.8.2 Diámetro del tallo	37
3.8.3 Obtención del extracto metanólico	38
3.8.4 Cuantificación de fenoles totales (FT)	38
3.8.5 Cuantificación de flavonoides	39
3.8.6 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH	39
3.9 Análisis estadístico	40
IV RESULTADOS	41
4.1 Altura de la planta	41
4.2 Diámetro del tallo de la planta	41
4.3 Flavonoides en hoja nueva y en hoja vieja	42
4.4 Fenoles totales en hoja nueva y en hoja vieja	44
4.5 Capacidad antioxidante en hoja nueva y en hoja vieja	46
V CONCLUSIONES	48
VI LITERATURA CITADA	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Valor nutritivo promedio de los chiles picantes por 100 gr. de producto.	8
2	Unidades Scoville de algunos chiles.	10
3	Descripción del ciclo fenológico del chile habanero.	13
4	Clasificación de compuestos bioactivos producidos por las plantas.	15
5	Clasificación de los flavonoides.	21
6	Manejo nutricional durante el desarrollo del cultivo.	34
7	Dosificación de los niveles de H ₂ O ₂ en los tratamientos.	36
8	Resumen de los datos obtenidos en el experimento	48

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura básica de un fenol.	19
2	Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo.	21
3	Ubicación Amazcala, El Marques, Qro.	28
4	Invernadero donde se llevó a cabo el experimento	29
5	Acomodo de las bolsas con sustrato y líneas de riego.	30
6	Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq).	31
7	Esquema del diseño experimental.	36
8	Altura de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.	41
9	Diámetro del tallo de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.	42
10	Medición de flavonoides en las hojas nuevas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.	43
11	Medición de flavonoides en las hojas viejas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.	43
12	Medición de fenoles totales en las hojas nuevas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.	44
13	Medición de fenoles totales en las hojas viejas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.	45
14	Medición de la capacidad antioxidante en las hojas nuevas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos .	46
15	Medición de la capacidad antioxidante en las hojas viejas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.	47

CAPITULO I

1.1 Introducción

México ocupa el segundo lugar en cuanto a la producción de chiles y tiene la mayor riqueza genética de los mismos, debido a la variedad de climas con los que cuenta el país. El chile junto con otras hortalizas fue la base de alimentación de las culturas Mesoamericanas, de esta manera México es lugar de origen y centro de distribución (Latournerie et al., 2002).

El chile habanero (*Capsicum chinense*) tiene como principal característica el ser uno de los más picosos del mundo. Además, cuenta con características antioxidantes y poder reductor proporcionadas por compuestos como el ácido clorogénico y el ácido caféico. Se ha encontrado que estos ácidos inhiben el crecimiento de células de cáncer de colon (Jayaprakasam et al., 2006) y reducen el daño por oxidación en glóbulos rojos (Gokalp et al., 2006). Otros compuestos involucrados en la capacidad antioxidante del chile habanero son la capsaicina y la D-hidrocapsaicina, que son considerados como antioxidantes y además son los responsables del picor del chile (Herrera et al., 2006).

Los bioactivos son sustancias que están presentes en pequeñas cantidades en las plantas, entre ellas el chile habanero (*Capsicum chinense*), y otros alimentos y ejercen un efecto benéfico en la salud. Asumen varias funciones, entre las que se encuentran enriquecer los alimentos, inducir alguna actividad biológica como capacidad antioxidante y funcionar como antibiótico y funcionalidad terapéutica en el cuerpo que resulta benéfico para nuestra salud (Drago et al., 2006)

Los compuestos bioactivos no son considerados esenciales para la salud humana, pero pueden tener un impacto sobre el efecto protector del sistema cardiocirculatorio, reducir la presión sanguínea, regular de la glucemia y la colesterolemia, reducir el riesgo de cáncer y mejorar la respuesta defensivo inmunitaria de nuestro cuerpo. (Palencia, 1999).

Los elicitores son compuestos que inician respuestas inducidas cuando se les brinda por algún medio a la planta, ya sea este foliar, nutricional, entre otros. Los elicitores son una manera práctica para inducir respuestas de la planta debido a que incluso pueden ser patentados, fabricados y aplicados a un número grande de plantas (Camarena, 2002). Esto con la finalidad de generar en mayor cantidad sustancias bioactivas, por mencionar algún ejemplo. Por lo anterior, se pretende determinar el potencial bioactivo de las hojas de plantas de chile asperjadas con peróxido de hidrógeno.

1.2 Descripción del problema

Los radicales libres son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior lo que les da una alta reactividad (Maldonado et al., 2010). Cuando la producción de sustancias altamente reactivas supera los mecanismos antioxidantes pueden ocasionar numerosas enfermedades como cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares (Beckman et al., 1990).

Entre los antioxidantes que se ingieren mediante la dieta destacan vitaminas, compuestos fenólicos, flavonoides, etc. (Delgado *et al.*, 2010). Estos compuestos neutralizan los radicales libres mediante diversos mecanismos entre los que destaca la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras, para prevenir el daño oxidante.

Se sabe que el chile habanero (*Capsicum chinense*) contiene compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y capsaicina que es la principal responsable de la pungencia de los chiles. Además hay que destacar que en el cultivo del chile habanero solamente se utiliza el fruto, mientras que el resto de la planta genera desechos que finalmente ocasionan contaminación.

Debido a esto el presente trabajo busca darle un uso más completo al resto de la planta, usando las hojas para estudiar y obtener compuestos bioactivos; los cuales se han estudiado principalmente en el fruto y no se cuenta con mucha

información sobre lo que sucede en el resto de la planta, en este caso las hojas.

1.3 Justificación

Es importante a nivel científico generar investigaciones para el chile habanero (*Capsicum chinense*) con la finalidad de aumentar la cantidad de metabolitos secundarios, entre los que prevalece la capsaicina, la hidrocapsaicina y los antioxidantes (Vázquez-Flota, *et al.* 2007) generados a través de elicitores. Se ha demostrado que la aplicación de elicitores, en éste caso peróxido de hidrógeno, tiene influencia sobre la producción de antioxidantes en diferentes especies de plantas.

Se conoce que la mayor concentración de compuestos bioactivos se encuentran en el fruto de la planta de chile habanero (*Capsicum chinense*) y partiendo del hecho de que todos los órganos forman parte de la planta, se puede inferir que los órganos no comestibles cuentan con la presencia de compuestos bioactivos. Con base en lo anterior, se pretende dar un uso extra a los desechos (hojas) para tener un aprovechamiento mayor de la planta.

1.4 Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Aplicaciones foliares de peróxido de hidrógeno, incrementan el potencial bioactivo de las hojas de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*).

Objetivo general

Determinar el potencial bioactivo en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*) inducidas con peróxido de hidrógeno.

Objetivos Particulares

- Determinar el contenido de flavonoides y fenoles totales en hojas de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*) asperjadas con peróxido de hidrógeno.
- Evaluar la capacidad antioxidante en hojas de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*) asperjadas con peróxido de hidrógeno.

CAPITULO II REVISION DE LITERATURA

2.1 Chile habanero (*Capsicum chinense*)

El chile fue uno de los primeros cultivos domesticados en Mesoamérica por lo que ahora se ha convertido en un ingrediente casi obligado en la comida mexicana (Barreiro, 1998; Maroto, 1995). El género *Capsicum*, al cual pertenecen todos los chiles cultivados, es originario de los trópicos de América y México es el país del mundo con la mayor variedad genética de *Capsicum* (Latoumerie et al., 2002). Su riqueza genética se debe en gran parte a la diversidad de climas y suelos, pero también a las prácticas tradicionales de cultivo que efectúan los pequeños productores utilizando las semillas de los frutos seleccionados de las plantas nativas. El chile junto con otras hortalizas fue la base de alimentación de las culturas Mesoamericanas. México es lugar de origen y centro de distribución. El uso de especies de *Capsicum* para sazonar la comida no es una práctica reciente, ya que era algo muy común, antes de que Colon llegara a las Antillas (Latoumerie et al., 2002).

El chile habanero (*Capsicum chinense*) estuvo confinado en el continente americano en la época precolombina. Los primeros exploradores españoles y portugueses, encontraron los frutos tan pungentes que lo introdujeron rápidamente a Europa y Asia. Se han encontrado remanentes arqueológicos que han permitido determinar que el chile habanero (*Capsicum chinense*) se domesticó en diferentes partes de América, principalmente México (7000 A.C.) (Tun y Dzul, 2001).

2.1.1 Origen y dispersión prehispánica del chile habanero

El chile habanero proviene de las tierras bajas de la cuenca Amazónica y de ahí se dispersó a Perú durante la época prehispánica. La distribución también se dirigió hacia la cuenca del Orinoco (ubicada actualmente en territorios de Colombia y Venezuela) hacia Guyana, Surinam, la Guyana Francesa y las Antillas del Caribe (Andrews, 1995).

Se ha sugerido que la introducción prehispánica del chile habanero en el Caribe se debió a migraciones indígenas de agricultores y alfareros procedentes de Sudamérica, pertenecientes a grupos arahuacos (originarios de Puerto Rico), quienes viajaron por las Antillas menores hasta llegar a Puerto Rico, La Española (República Dominicana y Haití), Jamaica y Cuba, entre los años 250 d. C. y 1000 d. C. (Andrews, 1995)

2.1.2 Taxonomía del chile habanero (*Capsicum Chinense*).

La clasificación del cultivo de chile puede establecerse fácilmente hasta el nivel de género, pero debido a su gran diversidad, la diferenciación a nivel de especie y variedad es muy complicada (Tun y Dzul, 2001).

La clasificación taxonómica para el chile habanero (*Capsicum chinense*) es la siguiente:

Reino: Plantae – Plantas

Subreino: Tracheobionta – Plantas Vasculares

Superdivisión: Spermatophyta – Plantas con semillas

División: Magnoliophyta – Plantas con flores

Clase: Magnoliopsida – Dicotiledóneas

Subclase: Asteridae

Superorden: Asterales Takht.

Orden: Solanales Juss. Ex Bertch & J. Presl.

Familia: Solanaceae Juss.

Género: *Capsicum* L.

Especie: *Capsicum chinense* Jacq. (USDA, 2003).

2.1.3 Morfología

El chile habanero es una planta de ciclo anual, pudiendo alcanzar hasta 12 meses de vida, dependiendo del manejo agronómico. Su altura es variable,

pero en los cultivares comerciales puede variar entre 75 y 120 cm. (Tun y Dzul, 2001)

Algunas características del chile habanero son las siguientes:

Semilla: Las semillas son lisas, ovaladas y pequeñas (2.5 a 3.5 mm); tienen testa de color café claro a café oscuro y su periodo de germinación varía entre ocho a quince días (Tun y Dzul, 2001).

Raíz: La planta tiene raíz pivotante y un sistema radicular bien desarrollado. Dependiendo de las características del suelo y las prácticas del manejo que se le proporcionen; pueden alcanzar longitudes mayores a 2 metros (Tun y Dzul, 2001).

Tallo: El tallo es grueso, erecto, glabro y robusto. Generalmente las plantas tienen tendencia a formar tres tallos en la primera ramificación, que ocurre entre la décima y duodécima hoja verde, para después seguir bifurcándose, con un crecimiento semi-determinado. Después de la primera trifurcación muy raramente las tres ramas alcanzan el mismo desarrollo (Tun y Dzul, 2001).

Hoja: Las hojas son simples, lisas; alternas y de forma lanceolada. Su tamaño es variable lo mismo que su color, el cual puede presentar diferentes tonos de verde dependiendo de la variedad. Pueden ser glabras o pubescentes y el grado de pubescencia también depende de la variedad (Tun y Dzul, 2001).

Flor: Las flores son de color blanco y su tamaño varía entre 1.5 a 2.5 cm de diámetro de corola. Estos órganos surgen en cada ramificación y se pueden presentar racimos de hasta seis flores, dando lugar a un promedio de tres frutos (Tun y Dzul, 2001).

Fruto: Los frutos se clasifican como una baya poco carnosas. Son huecos y tienen entre tres y cuatro lóculos. Las semillas se alojan en la placenta que es de color blancuzco y seco y no están envueltas por mucosa. Las membranas de los lóculos por lo general no se prolongan hasta el centro. El color en tiempo

de maduración puede ser amarillo, rojo, anaranjado o café (Tun y Dzul, 2001). Todos los frutos de *Capsicum chinense* tienen el mismo olor característico, independientemente del color de maduración (Ochoa, 2001).

2.1.4 Contenido nutricional

El chile posee un alto contenido nutricional y es una fuente de vitaminas, particularmente de la A y C. El consumo de los chiles picantes generalmente es bajo (1 a 4 gramos *per capita*). Además de su empleo como alimento o condimento, los chiles también se usan en la medicina y algunos están valorados como plantas ornamentales (Tun y Dzul, 2001).

La tabla siguiente muestra el valor nutritivo promedio de los chiles picantes por cada 100 gramos de producto.

<u>Características</u>	<u>Valor</u>
Materia seca (gr.)	34.6
Energía (Kcal.)	116
Proteína (gr.)	6.3
Fibra (gr.)	15
Calcio (mg.)	86
Fierro (mg.)	3.6
Caroteno (mg.)	6.6
Tiamina (mg.)	0.37
Rivoflavina(mg.)	0.51
Vitamina C (mg)	96

Tabla 1. Valor nutritivo promedio de los chiles picantes por 100 gr. de producto.

Fuente: Grubben (1977).

El chile habanero cuenta con características antioxidantes y poder reductor, proporcionadas por compuestos como el ácido clorogénico y el ácido caféico. Los cuales se ha encontrado que inhiben el crecimiento de células de cáncer de colon (Jayaprakasam et al., 2006) y reducen el daño por oxidación en

glóbulos rojos (Gokalp et al., 2006). Otros compuestos involucrados en la capacidad antioxidante del chile habanero son la capsaicina y la D-hidrocapsaicina, que son considerados como antioxidantes y además son los responsables del picor del chile (Herrera et al., 2006).

2.1.5 Pungencia del chile habanero (*Capsicum chinense*)

Aunque son una buena fuente de vitaminas A y C los chiles no fueron domesticados por eso, sino por su sabor y pungencia. La característica picante era tan conocida por los antiguos mexicanos que, incluso, se tiene referencia que el chile fue usado como un arma química en los conflictos entre antiguas comunidades indígenas. Se encendía una hoguera y se arrojaba chiles secos. Los humos producidos durante la quemazón asfixiaban a los enemigos, haciéndolos toser y llorar. En la vida cotidiana, los mexicas castigaban a sus hijos haciéndolos respirar el humo de una fogata en la que se quemaban chiles secos (López, 2003).

Aunque existen muchas variedades de chile que no son picantes y que son usadas principalmente en fresco o como colorantes en diversas especialidades culinarias, la gente identifica al chile con lo picante; que es su característica distintiva. Debido a que las variedades silvestres son picantes, puede suponerse que los antiguos americanos que iniciaron la domesticación del chile, la hicieron con variedades picantes. Lo anterior sugiere que fue precisamente esta característica la que lo hizo atractivo para el hombre, no obstante que, evolutivamente, la pungencia fue desarrollada como una defensa de las plantas contra la depredación, principalmente de mamíferos (López, 2003).

La pungencia de los chiles se debe a la capsaicina, o más precisamente, a un grupo de sustancias de naturaleza alcaloide llamadas capsaicinoides. Estos compuestos son tan potentes que un ser humano puede detectar lo picante de una gota disuelta en más de 100 mil gotas de agua. La estructura química de los capsaicinoides es muy similar y varían solamente en lo largo de la cadena hidrocarbonada y en la presencia o ausencia de un doble enlace en dicha cadena. La principal característica que comparten estas moléculas es una

estructura aromática llamada grupo vanilil. Así, los capsaicinoides son parte de una familia de compuestos químicos llamados vaniloides. De todos los capsaicinoides los responsables del 90% de la pungencia de los chiles son: la capsaicina, conocida como 8-metil-N-vanilil-6-nonamida y la hidrocapsaicina (López, 2003).

La escala de unidades Scoville es un sistema de medición del picor de los chiles inventada por Wilbur Scoville durante la primera década del siglo XX. Su objetivo era determinar la máxima dilución del extracto de chile en la que aun fuera detectable el picor. De esta manera, si un habanero ha sido determinado en 200 000 unidades, significa que se necesitan 200 000 partes de solución para diluir una parte de extracto de habanero hasta el punto en que el picor aun pueda ser detectado. Hoy en día se emplea la cromatografía de líquidos de alta resolución para medir el contenido de capsaicina en los chiles. Este método mucho más preciso, mide los niveles de capsaicina a partes por millón que pueden ser convertidas a unidades Scoville.

La unidad máxima de picor es la de la capsaicina pura con 16 millones de unidades Scoville. En México el chile habanero ocupa el primer lugar el picor y a nivel internacional también es uno de los primeros (López, 2003).

La tabla siguiente muestra el picor de algunos chiles.

Chile	Unidades Scoville
Capsaicina Pura	16000000
Habanero	150 000 - 325 000
Piquin	500 00 - 100 000
Manzano	300 00 - 6 0000
Capsicum baccatum	300 00 - 5 0000
De árbol	150 00 - 3 0000
Serrano	100 00 - 2 0000
Jalapeño	2 500 - 1 0000
Mirasol / cascabel	2 500 - 5 000

Tabla 2: Unidades Scoville de algunos chiles. Fuente: López, 2003.

2.1.6 Aspectos agrícolas del cultivo (chile habanero)

2.1.6.1 Clima

Las temperaturas adecuadas para su crecimiento van desde los 25°C a los 38 °C. El cuaje del fruto no ocurre a temperaturas inferiores a 15 °C. La temperatura gobierna el ritmo del desarrollo del cultivo y la coloración del fruto, lo cual está relacionado con su calidad. Si la temperatura del ambiente alcanza 28 °C, el color rojo, cuyo pigmento principal es el compuesto carotenoide denominado “capsanthin” (que influencia el 35% del color rojo, cuyo 65% está integrado por los 31 pigmentos carotinoides restantes), se inhibe quedando los frutos de color amarillo (Tun y Dzul, 2001).

2.1.6.2 Riego

La planta de chile habanero demanda una cantidad de agua relativamente alta, de 550 a 700 mm por planta al día. El mayor consumo se da durante las etapas de floración, fructificación y llenado de fruto. El cultivo requiere de una humedad del suelo entre el 80 y 90% de humedad aprovechable. Si el agua es insuficiente, la planta se estresa dando como resultado el aborto de los botones florales y frutos inmaduros (Tun y Dzul, 2001).

2.1.6.3 Altitud

Para un desarrollo óptimo, el chile habanero debe sembrarse a alturas que varían de 100 a 400 metros sobre el nivel del mar (msnm). Y se puede adaptar hasta niveles de 3000 msnm. (Tun y Dzul, 2001).

2.1.6.4 Ciclo fonológico del cultivo

Los ciclos que se presentan para este cultivo, en fechas ideales para su desarrollo se muestran en la tabla siguiente:

Etapa	Duración	Mes	Actividad
Semilla Germinación	8-10 días	Marzo	Preparación del sustrato 15 días antes de elaborar el semillero. Se riega el semillero cada dos días. El semillero se debe mantener bajo sombra con buena ventilación.
Planta en Pílon	2.5 a 3 meses	Junio	Se obtienen con alturas mínimas de 0.20 m. Se aplica un biofoliar al mes de germinada la semilla. Se riega diario. Aplicación de caldo botánica de Nim, Linaza y agua para control de insectos. Buen manejo del riego y aplicación de agua de ceniza y cal para controlar el mal del talluelo en el semillero.
Trasplante	15 días	Junio a Julio	Preparación del terreno o invernadero 20 días antes del trasplante. Con el establecimiento del invernadero. Plantas con alturas de 0.20-0.25 m. se incorpora abono orgánico elaborado 15 días antes, en el agujero donde se siembra la planta. Se aplica un caldo botánico de Nim, Linaza para control de insectos en el trasplante. Se aplica agua de ceniza con cal para el control de hongos.
Floración	15-30 días	Agosto	La floración se inicia después del trasplante, aunque algunas veces en el semillero se manifiesta a inicios de esta. Se le aplica un biofertilizante, para nutrir mejor las plantas y obtener un mejor desarrollo de las mismas. Aplicación de un caldo botánico de ruda silvestre y de castilla, cebolla, tabaquillo, tabacón, piperáceas y piñón, para controlar las hormigas.
Cosecha	1 mes	Octubre	La primera cosecha se obtiene dos meses

			después de iniciada la floración. El fruto se corta con pedicelo, para evitar la infestación de hongos y el deterioro de la planta si se hace rasgado el fruto, ya que se obtiene dos cosechas. El color del fruto para su cosecha debe ser amarillo o rojo brillante. Se obtienen 3 a 4 Kg/planta.
Recuperación	1 mes	Noviembre	Se realiza el aporcado de las plantas, para un mejoramiento de las mismas y un mejor sostén. Se incorpora un abono orgánico, para la nutrición del suelo. El tiempo de recuperación es de aproximadamente 1 mes, después de la primera cosecha.
Floración	15-30 días	Diciembre	Se inicia la floración un mes después del periodo de la recuperación de las plantas. Se aplica un biofertilizante, para nutrir mejor las plantas y obtener un mejor desarrollo de las mismas. Aplicación de un caldo botánico de ruda silvestre y de castilla, cebolla, tabaquillo, tabacón, piperáceas y piñón, para controlar las hormigas, y también aplicar un insecticida orgánico para controlar la mosca blanca.
Cosecha	1 mes	Febrero	La segunda cosecha se obtiene dos meses después de iniciada la floración. El fruto se corta con pedicelo; para evitar la infestación de hongos. El color del fruto para su cosecha debe de ser amarillo o rojo brillante. Se obtiene de 1 a 2 Kg/planta.

Tabla 3. Descripción del ciclo fenológico del chile habanero (ECAO, 2002).

2.2 Compuestos bioactivos

Los bioactivos son sustancias que están presentes en pequeñas cantidades en las plantas y otros alimentos, cuyas sustancias ejercen un efecto benéfico produciendo una mejora en la salud. Asumen varias funciones, entre las que se

encuentran enriquecer los alimentos, inducir alguna actividad biológica como capacidad antioxidante y funcionar como antibiótico y funcionalidad terapéutica en el cuerpo que resulta benéfico para la salud. Al igual que las plantas se benefician de su presencia, ya que las protegen de agentes patógenos, también aportan beneficios a la salud humana. A pesar de que están consideradas como no tóxicas, y que se siguen descubriendo nuevos efectos positivos, precisan de un marco regulador sobre los niveles máximos de seguridad, como ya se ha hecho con las vitaminas y minerales (Drago et al., 2006)

Los compuestos bioactivos no son considerados esenciales para la salud humana, pero pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad. Son indispensables a largo plazo para nuestra salud. Estos compuestos intervienen ejerciendo un efecto protector del sistema cardiocirculatorio, reducen la presión sanguínea, regulan de la glucemia y la colesterolemia, reducen el riesgo de cáncer y mejoran la respuesta defensivo inmunitaria de nuestro cuerpo (Palencia, 1999).

Los compuestos bioactivos están agrupados en tres grupos principales: a) compuestos fenólicos (taninos, fitoestrógenos y cumarinas), b) compuestos nitrogenados (alcaloides, glicósidos cianogénéticos, glucosinolatos, aminiácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de proteasas; y c) terpenos (lactonas sesquiterpénicas , glicósidos cardiacos, saponinas (Ikan,1991).

Existen más de 2.000 fitoquímicos (bioactivos) en las plantas, que se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales. De estos compuestos los terpenos, los fenoles y los tioles, son los más estudiados (Aponte, 2008).

Clasificación	Sustancia activa	Fuente alimentaria
Terpenos	Carotenoides	Zanahoria, espinaca, acelga, perejil, pimentón rojo, apio, frutas cítricas.
	Fitoesteroles	Brócoli, coliflor, pepino, productos de soya, tomate, berenjena, pimentón.

	Capsaicina	Ají, chile y pimiento.
	Saponinas	Ajo, cebolla.
Fenoles	Isoflavonas	Zanahoria, brócoli, coliflor, pepino, tomate, pimiento,
	Lignanos	Auyama, ajonjolí, centeno, soya, frijoles, granos de trigo,
	Flavonoides	Apio, cebolla, coliflor, brócoli, perejil, soya, tomate,
	Antocianinas	Repollo morado y cebolla morada. Piel de frutas como manzana, pera, uva,
	Catequinas	Cereza y té verde.
	Taninos	Manzanas y frambuesas
Tioles	Compuestos Organosulfurados	Coliflor, lechuga, acelga, brócoli, ajo, cebolla, cebollin, col de Bruselas, rábano, mostaza y frutas cítricas.

Tabla 4. Clasificación de compuestos bioactivos producidos por las plantas.

Fuente: INN. Dirección de Investigaciones Nutricionales.2008.

2.2.1 Antioxidante

Un antioxidante es una sustancia, que incluso en concentraciones muy pequeñas, disminuye o evita la oxidación de un sustrato toda vez que resulta un agente reductor más potente. Puede considerarse un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de oxidorreducción. Los antioxidantes se han clasificado de diferentes maneras, pero la más utilizada es la que establece las diferencias según su estructura química y función biológica, dividiéndolos así en enzimáticos y no enzimáticos (Hicks-Gómez, 2007).

Los antioxidantes que se encuentran en las plantas, cumplen importantes funciones de protección y estabilización frente a las especies activas de oxígeno (Youdim y Joseph, 2001).

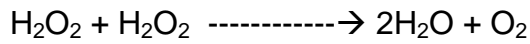
Los antioxidantes pueden ser de diversa naturaleza, como la vitamina C, la vitamina E, carotenoides, fenoles, flavonoides, entre otros. Estos difieren unos de otros tanto en su mecanismo como en su sitio de acción. Existe evidencia científica de que los compuestos antioxidantes de frutas y vegetales pueden prevenir el daño oxidativo en las células, con lo que se reduce el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, entre otras (Prior, 2003; Choi *et al.*, 2004; Kuti, 2004).

Los chiles son una magnífica fuente de antioxidantes susceptibles de ser utilizados en la dieta. Contienen flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitamina A, ácido ascórbico, tocoferoles, y también constituyentes antioxidantes específicos como los capsaicinoides. Los capsaicinoides (capsaicina y la hidrocapsaicina) son capaces de inhibir la peroxidación lipídica catalizada por cationes Fe^{3+} y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad producida por cationes cobre. Este efecto es atribuido a la capacidad de estos compuestos para formar complejos con estos metales reducidos, actuando además como donadores de hidrógenos (Fernández, 2007).

2.2.1.1 Antioxidantes enzimáticos

Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar las ERO (Especies Reactivas del Oxígeno) por diferentes mecanismos. Entre estas enzimas se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasas (GSH -Px) (Hicks-Goméz, 2007).

- a) Superóxido dismutasas (SOD). Las isoenzimas de SOD son metalo enzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido para producir oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
- b) Catalasa (CAT). Esta enzima antioxidante transforma el H_2O_2 en agua. En las células la catalasa se ha localizado en el citosol, mitocondrias, y organelos subcelulares. Esta enzima cataliza la siguiente reacción:



- c) Glutati3n peroxidasa. Las peroxidasas catalizan la reducci3n de H_2O_2 mediante diversos donadores de electrones. La localizaci3n de esta isoenzima sugiere que participa en la protecci3n contra los efectos adversos de los hidroper3xidos de la dieta.

2.2.1.2 Antioxidantes no enzimáticos

Entre los antioxidantes no enzimáticos se encuentran los siguientes (Hicks-Gom3ez, 2007):

- a) La vitamina E. Conformada por la mezcla de cuatro tocoferoles. Esta mol3cula se considera el principal antioxidante liposoluble y se encuentra tanto en el plasma vinculado con los l3pidos circulantes como en las membranas celulares.
- b) Vitamina C. Entre los agentes oxidantes hidrosolubles el primero que destaca es la vitamina C, la cual es una mol3cula disponible en todos los compartimientos del cuerpo humano y tambi3n se encuentra presente en diversas plantas, entre ellas el chile habanero (*Capsicum chinense*.) Esta vitamina puede participar como agente estabilizador de radicales libres al funcionar como reductor mono electr3nico de los radicales O_2 y HO, modificando su estado redox al formar el radical libre semideshidroascorbato que despu3s es oxidado a deshidroascorbato por la reducci3n e inactivaci3n de otro an3n super3xido. A pesar de las caracter3sticas antes mencionadas la vitamina C no es considerada como un antioxidante ideal debido a que puede presentar propiedades pro oxidantes, debido a que es probablemente el 3nico agente reductor de la c3lula que en presencia de O_2 (al que reduce formando H_2O_2) es capaz de reducir el Fe^{3+} , el cual a su vez puede reaccionar con H_2O_2 por medio de la reacci3n de Fenton y dar lugar al radical mas reactivo: el HO \cdot .

- c) Glucosa. La glucosa reacciona con HO^\cdot con una eficiencia similar al manitol, sin embargo se debe tener en cuenta que durante el metabolismo aeróbico de la glucosa y por reacciones adicionales, como su auto-oxidación, ella misma contribuye a la generación de diversas ERO, proceso que se incrementa en la hiperglucemia en un paciente diabético.

2.2.1.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante es la medida en que responde la suma de todos los antioxidantes presentes en alguna muestra, ante la presencia de algún oxidante, para lo cual se han establecido algunas técnicas estandarizadas. La mayoría de las células y organismos de nuestro planeta se enfrentan a ambientes con agresores oxidativos. Todo inicia con el empleo del oxígeno como la molécula oxidante final del metabolismo aeróbico y oxidativo, el cual realizan la mayoría de los organismos del planeta. Ello hace que las células mantengan una alta concentración de productos oxidantes del metabolismo, especies reactivas de oxígeno y en muchas ocasiones radicales libres (Winterbourn, 2008).

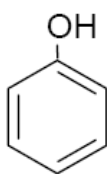
En forma general, un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente. Sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena (Hansberg, 2002).

Los sistemas antioxidantes se pueden medir de diferentes formas específicas y el sistema amortiguador antioxidante global se puede evaluar con las pruebas de capacidad antioxidante total. La mejora tecnológica e interpretativa de estos

métodos ha permitido profundizar en el conocimiento básico de las formas de defensa de la célula. También ha multiplicado los estudios de capacidad antioxidante desde sustancias puras hasta organismos complejos, sirviendo incluso para métodos de diagnóstico y de evaluación de la efectividad de los tratamientos (Quintanar y Calderón, 2009).

2.2.2 Fenoles

Los compuestos que poseen un grupo hidroxilo unido en forma directa con el anillo bencénico se llaman fenoles (Figura 1). Entonces, fenol es el nombre específico para el hidroxibenceno y es el nombre general para la familia de compuestos que se derivan de éste último (Salomons et al., 2000).



Fenol

Fig.1 Estructura básica de un fenol

Los fenoles son compuestos químicos ampliamente distribuidos en las plantas como producto de su metabolismo secundario, algunos de los cuales son indispensables para su funcionamiento y otros son útiles en los mecanismos de defensa bajo situaciones de estrés (Kim et al., 2003) y contra el ataque de organismos patógenos (Bakan et al., 2003). El consumo de estos fitoquímicos se ha vinculado con beneficios a la salud, debido a sus propiedades antioxidantes (Gallardo et al., 2006) y anticancerígenas (Zhaohui y Moghadasian, 2008).

Los polifenoles tienen acción antioxidante, pueden reducir la peroxidación de los lípidos. El consumo frecuente de frutas y vegetales frescos se asocia con una menor incidencia de cáncer en humanos y en carcinogénesis experimental. Los polifenoles se hallan preferentemente en las capas más superficiales de

verduras, frutas, cereales y otras semillas, para proteger de la oxidación los tejidos de las capas inferiores. Son también anticoagulantes, antimicrobianos, inmunoestimulantes y reguladores de la presión arterial y de la glucemia (Palencia, 1999).

2.2.3 Flavonoides

Flavo proviene del latín *flavus* y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el del oro. El término flavonoide, se refiere a un grupo de compuestos aromáticos, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno. Se encuentran ampliamente distribuidos entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas. Por ende se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, chile habanero, etc (Escamilla et al., 2009).

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C) (Andersen y Markham, 2006). Formando así un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6, común en la mayoría de los flavonoides (Figura 2). Los flavonoides se clasifican con base en las variaciones presentes en el anillo pirano.

Los flavonoides se sintetizan en las plantas partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico respectivamente. Al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides y más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Grotewold, 2006).

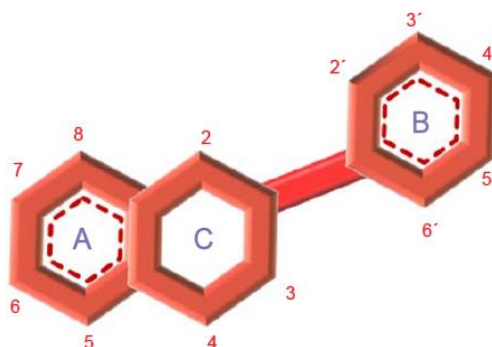


Fig.2 Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo.

Al ser parte fundamental de la biología vegetal, los flavonoides responden a la luz controlando los niveles de las auxinas (hormonas vegetales) reguladoras del crecimiento; intervienen en la diferenciación de las plantas y potencian la polinización al conferir coloración. Debido a esto, se encuentran en numerosos frutos, plantas y semillas; existiendo más de 5,000 distintos flavonoides (Ross y Kasum, 2002). En la Tabla 5 se presenta la clasificación de los flavonoides.

Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

Tabla 5. Clasificación de los flavonoides (Ross y Kasum, 2002).

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además

de la inhibición de las oxidasas: lipoxigenasa, cicloxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Aunado a esto, se ha encontrado que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa y al mismo tiempo estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa (Groot y Rauen, 1998).

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, bloqueando la acción deletérea de estas sustancias sobre las células. La protección antioxidante de los flavonoides se ha corroborado en: queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio, tejido nervioso y en lipoproteínas de baja densidad (Escamilla et al., 2009). Además, los flavonoides reducen el riesgo de cáncer por su acción antioxidante, bloqueando el acceso de los carcinógenos a las células, suprimiendo los cambios malignos en las células, interfiriendo con el enlace de las hormonas a las células, quelando los metales, induciendo a las enzimas a modificar su carcinogenicidad, estimulando la respuesta inmune o combinación de estas acciones (Palencia, 1999).

2.3 ERO (Especies reactivas del oxígeno)

El oxígeno (O_2) es básicamente una molécula oxidante, hasta el punto en que las células que lo usan para su metabolismo es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas, pueden incrementar su valor. En condiciones normales las células metabolizan la mayor parte del oxígeno (O_2) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que un pequeño porcentaje (en torno al 5%) forman tres intermediarios tóxicos dos de los cuales son, literalmente, radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (crecimiento, desarrollos activos o procesos

inflamatorios) ocurre una mayor demanda tisular de O_2 y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes (Avello y Suwalsky, 2006).

La segunda gran fuente de ERO también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonucleares, los monolitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su misión, están dotadas de diversas proteínas, así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como el peróxido de hidrogeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños (Avello y Suwalsky, 2006).

Los oxidantes pueden también proceder del exterior, directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias. Algunos ejemplos lo constituyen la contaminación ambiental, luz solar, radiaciones ionizantes, concentraciones elevadas de oxígeno, pesticidas, metales pesados, humo de tabaco, etc. Sin embargo el papel de los radicales libres no debe ser abordado solo desde una perspectiva negativa o patológica. Estos compuestos cumplen una función fisiológica al participar, en condiciones normales, en la defensa frente a infecciones, en el metabolismo normal, fagocitosis e inflamación (Avello y Suwalsky, 2006).

2.3.1 Anión superóxido

Cuando una molécula de oxígeno acepta un electrón se convierte en un radical con carga negativa, conocido como anión superóxido (O_2^-) (Hicks-Gómez, 2007).

El oxígeno usado por los organismos aeróbicos se reduce hasta agua mediante el sistema de transporte de electrones que incluye la acción de coenzimas y citocromos de la cadena respiratoria mitocondrial. A éste nivel, el anión superóxido lo produce el complejo I (NADH:ubiquinona óxido- reductasa), en la interfase entre la ubiquinona y el complejo III (ubiquinol: citocromo C óxido reductasa). Ésta producción de anión superóxido se debe a la formación del

intermediario semiubiquinona, que es una radical libre capaz de reducir de manera monoelectrónica al O_2 . Se considera que alrededor de 1-2 % del oxígeno que se consume en la respiración mitocondrial, escapa en forma de anión superóxido (Hicks-Gómez, 2007).

2.3.2 Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 se forma por la dismutación del O_2^- , que se cataliza por la enzima superóxido dismutasa (SOD). En medio acuoso, el O_2^- se dismuta de manera espontánea generando H_2O_2 y oxígeno molecular. La vida media del H_2O_2 en los seres vivos depende de las enzimas que lo metabolizan, como son la catalasa (CAT) y la peroxidasa (GSH-Px) (Hicks-Gómez, 2007).

El H_2O_2 está involucrado en las respuestas de aclimatación y tolerancia a bajas temperaturas. Por ejemplo, el frío inhibe la actividad de la catalasa, lo que incrementa el contenido de H_2O_2 y la susceptibilidad al estrés oxidativo en plantas transgénicas, por lo que un aumento en la expresión de la actividad catalasa podría incrementar la tolerancia al estrés por frío (Neil, *et al.*, 2002).

2.3.3 Radical Hidroxilo (HO)

La coexistencia de O_2^- y de H_2O_2 en un medio biológico, que inevitablemente contiene hierro o cobre, es muy peligrosa pues favorece la formación del radical HO^\cdot . Este radical es un oxidante en extremo reactivo que interactúa con diversas biomoléculas a velocidades solo limitadas por su difusión y, entre otros productos, da lugar a una siguiente generación de radicales libres provenientes de las moléculas con las que reaccionó. Tiene una vida media de 1×10^{-9} segundos y su radio promedio de acción es de 3 nanómetros. El radical hidroxilo también puede generarse por la rotura hemolítica del enlace oxígeno-oxígeno del H_2O_2 (Hicks-Gómez, 2007)

2.4 Estrés oxidativo

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se les asocian juegan un papel central en el equilibrio de la funcionalidad del cuerpo (homeostasis), que es el normal funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado fisiológico de los organismos. (Avello y Suwalsky, 2006).

En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tal como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos, y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a esos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce el daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo al desarrollo de enfermedades, algunas ya mencionadas como lo son aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer (Gutteridge y Halliwell, 1990).

2.4.2 Daño oxidante

El daño oxidante es el resultado de la oxidación y el rompimiento de biomoléculas (lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos), ocasionado por el ataque directo de las especies reactivas del oxígeno, que, en casos agudos generan productos moleculares de daño detectables en los fluidos biológicos. Sin embargo cuando este mismo tipo de daño se genera de manera persistente conduce al desarrollo acumulativo (crónico) de alteraciones con daño estructural (aterosclerosis, fibrosis, amiloidosis) y funcional (inhibición de actividades enzimáticas, inmunológicas y hormonales entre otras) del organismo (Hicks-Gómez, 2007).

Los diferentes tipos de estrés disparan una amplia gama de respuestas en la planta que pueden ocasionar una reducción en las tasas de crecimiento y productividad como consecuencia de las alteraciones del metabolismo celular y la expresión genética. (Miranda y Castro, 2009).

2.5 Elicitores

El concepto de activador desde el inicio, fue utilizado para moléculas capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en la planta, en ausencia del patógeno (Albersheim y Valent 1978, Keen *et al.* 1972). En la actualidad, esta definición, se ha generalizado y aceptado para cualquier molécula química que pueda estimular mecanismos de defensa o asociados con la respuesta de defensa en las plantas. Estas moléculas activadoras hacen referencia a un amplio ámbito de compuestos, los cuales pueden ser derivados a partir de plagas, de plantas o de otros microorganismos así como a partir de preparados biológicos de origen vegetal o de análogos producidos sintéticamente. Las moléculas activadoras no deben ser tomadas como sustitutos de fungicidas, sino como, una alternativa adicional dentro de una estrategia de manejo integrado (Lyon y Newton, 2000).

En la década de 1970, el concepto elicitor se utilizó para denominar a aquellas moléculas capaces de activar la síntesis de fitoalexinas en la planta (Riveros, 2010). Los elicitores son compuestos que inician respuestas inducidas cuando se les brinda por algún medio a la planta, ya sea foliar, nutricional, entre otros. Los elicitores son una manera práctica para inducir respuestas de la planta debido a que incluso pueden ser patentados, fabricados y aplicados a un número grande de plantas por tecnología de aspersión por ejemplo (Camarena, 2002).

2.5.1 Elicitores Bióticos

En éste grupo se encuentran el quitosán, micelio de hongos, bacterias y levaduras, además de algunos microorganismos y moléculas que actúan como

señales endógenas en los mecanismos de defensa de las plantas (Zhao et al. 2005).

2.5.2 Elicitores Abióticos

En éste grupo se encuentran la temperatura, luz UV, sales de metales pesados, pH, peróxido de hidrógeno, etc., alterando el funcionamiento biológico de las células y favoreciendo la liberación de los metabolitos secundarios al medio de cultivo (Bhuiyan y Adachi 2003; Engelmann et al., 2009; Hakamatsuka et al., 1991; Liu y Dixon 2001).

CAPITULO III METODOLOGIA

3.1 Sitio experimental

3.1.1 Características y preparación del invernadero

El experimento se desarrolló en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Amazcala, el cual pertenece al municipio del Marques, Querétaro (Figura 3). Este municipio se localiza al Noroeste del estado de Querétaro, entre los 20° 31' y 20° 58' de latitud Norte. Su longitud se halla entre los 100° 09' y los 100° 24' del Oeste. La Cabecera Municipal, La Cañada, tiene una altura sobre el nivel del mar de 1 850 mts y se ubica a 7 km de la capital del estado. Limita al oeste con el municipio de Querétaro, al Norte con el estado de Guanajuato, al Este con el municipio de Colón y al Sur con los municipios de Huimilpan y Pedro Escobedo (INEGI, 2010).

La temperatura media anual (TMA) es de 18-24° C. Los meses más calurosos son Mayo y Junio, con temperaturas máximas de 36° C, en tanto que los más fríos son en Diciembre y Enero, registrándose temperaturas mínimas de -3° C. La precipitación pluvial anual promedio es de 400-500 mm datos de la estación climatológica de Nogales y el Zamorano. La evaporación potencial media anual en el Valle es el orden de 2,050 a 2,200 mm. (INEGI, 2010).



Fig.3 Ubicación de Amazcala, El Marques, Qro.

El trabajo se desarrolló en un invernadero de 108 m² (9 mx12 m) con 5 m de altura. El invernadero tenía una estructura tipo capilla a doble capa, con una cubierta plástica de polietileno de 800 galgas en espesor y con doble capa en el techo (Figura 4). Contaba con estructura de tubos galvanizados de PTR de 2 pulgadas.



Fig.4 Invernadero donde se llevó a cabo el experimento.

El invernadero se preparó para el cultivo del chile habanero (*Capsicum chinense*) de la siguiente manera:

1. Tres días antes del trasplante, el interior del invernadero se desinfectó con Fullgro a una concentración de 1 ml por cada litro de agua. Lo anterior se hizo para evitar cualquier tipo de contaminación debido al cultivo establecido anteriormente en el invernadero. Se cerraron las puertas y las ventanas por 2 días para que actuara el desinfectante.
2. Se desinfectó la superficie del suelo con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 10 mL/Lt de agua. Esta solución se aplicó con una mochila motorizada Maruyama MSO73D Japan LTD de 25 litros de capacidad.
3. Se cubrió toda la superficie del invernadero con plástico blanco (acolchado) para promover una buena sanidad y distribución de luz dentro del invernadero y evitar de esta manera que proliferen las malas hierbas.
4. Se llenaron las bolsas a $\frac{3}{4}$ de su capacidad con sustrato (piedra pomez), fuera del invernadero. Acumulando un total de 288 bolsas.

5. Se colocaron 2 filas de bolsas con sustrato, una fila junto a la otra, dejando una distancia de 0.35 metros de centro a centro de cada bolsa. La distribución de las bolsas se muestra en la Figura 5.

6. Las bolsas de sustrato se saturaron con agua acidificada. El agua se acidificó con Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) y Ácido Nítrico (HNO_3) hasta alcanzar un pH de 5.5.



Fig.5 Acomodo de las bolsas con sustrato y líneas de riego.

3.2 Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) híbrido, de la variedad Chichen Itzá de crecimiento indeterminado, porte generativo y muy precoz. Las semillas fueron de la empresa Seminis Vegetable Seeds S.A. de C.V. traídas de Celaya Gto. El fruto que ésta semilla brinda tiene un tamaño de aproximadamente 7 cm. de largo, de color naranja y altamente picosos (Figura 6).



Fig.6 Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq).

3.2.1 Sustrato y su manejo

Como contenedor se utilizaron bolsas negras con capacidad de 20 litros (saturando la bolsa a $\frac{3}{4}$ partes). El sustrato empleado fue piedra pómez, obtenido de la región. Este sustrato sirvió como sostén y soporte de la planta. El sustrato fue previamente lavado con agua acidificada con Acido Sulfúrico y acido Nítrico hasta alcanzar un pH de 5.5.

3.3 Manejo del cultivo

3.3.1 Siembra

Las semillas se sembraron en charolas de unicel (previamente desinfectadas) de 200 cavidades, usando Peat moss de la marca Sunshine Sungro Horticulture. Para la siembra, primero se colocó una ligera capa de Peat Moss humedecido, se ajustó con los dedos ($\frac{1}{2}$ de la cavidad ya apretado) y se colocó la semilla. El espacio sobrante se rellenó con vermiculita. Las charolas se colocaron en una cámara de germinación a una temperatura de 25°C y una humedad relativa entre 95-98%. La germinación de las semillas ocurrió a los 6 días después de la siembra.

3.3.2 Plántula

Después de la emergencia de las plántulas, éstas fueron llevadas dentro del invernadero con el fin de aclimatarlas a su nuevo lugar de desarrollo. Durante

15 días se regaron diariamente con agua y los siguientes 15 días con solución Steiner al 50% (Steiner,1984).

3.3.3 Transplante

El transplante se llevo a cabo a los 76 días después de la siembra, cuando las plantas presentaron de 4 a 6 hojas verdaderas.

3.3.4 Poda en tallo

A los 22 días después del transplante, se podaron las hojas que se encontraban debajo de la primera bifurcación de cada planta, para tener solamente 2 tallos en cada planta.

3.4 Manejo sanitario

3.4.1 Acciones culturales

Se colocó un tapete sanitario a la entrada del invernadero con sales cuaternarias al 3%. Se cuidó que las puertas del invernadero se abrieran solo una a la vez para evitar la entrada de insectos. Iniciando el experimento y durante el mismo se quitó la maleza que empezaba a crecer dentro del invernadero.

Se desinfectaron las manos, herramientas y sustrato con hipoclorito de sodio al 30%. Se utilizaron trampas acromáticas adhesivas de color amarillo y azul de 100 cm x 30 cm para monitoreo de insectos.

3.4.2 Acciones preventivas

Para el control de hongos se usó un fungicida preventivo: Captan 50. Cobres: Triadimefon y sulfato de cobre. Azufres: Azufre 720 FW. Repelentes a base de extractos de plantas: PHC Neem, extracto de ajo, Biocrack, Insect-Neem.

3.4.3 Acciones correctivas

Se utilizó el antibiotico Bactricin y agroquimicos de amplio espectro como Talsar 100 CE, Bifentrina, Triadimefon, Protectin Abamectina, Condifor.

3.5 Fertirriego

El sistema de riego fue por goteo. Debido a las dimensiones del invernadero que era relativamente pequeño, se usó 1 cabezal de riego.

Se utilizó un tinaco con capacidad de 2,500 Litros. Para la distribución del agua se empleó una bomba marca Evans de 1 Hp de potencia con un filtro antes de la bomba. Sobre cada línea de riego se instalaron 6 líneas de riego con mangueras de 18 mm de diámetro y además se utilizaron goteros que brindaban un gasto de 4 litros/hora.

La solución nutritiva base fue la solución universal Steiner (Steiner,1984). La concentración de la solución dependió de la etapa fenológica del cultivo. Así, las concentraciones usadas fueron las siguientes:

- 1° Fase: Crecimiento al 70% de concentración,
- 2° Fase: Floración al 100% de concentración,
- 3° Fase: Fructificación al 100% de concentración.

La solución Steiner se preparó utilizando las fuentes comerciales de Nitrato de Calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sulfato de Magnesio ($\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Nitrato de Potasio (KNO_3), Fosfato monopotásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), Sulfato de Potasio (K_2SO_4), Quelatos de (Fierro, Manganeso, Cobre, Zinc), Acido Bórico (H_3BO_3), Acido Nítrico (HNO_3) y Acido Sulfúrico (H_2SO_4). El manejo nutricional se muestra en la tabla 6.

Compuesto	Primera fase, 70% (Crecimiento) (gr/m ³).	Segunda fase al 100% (Floración) (gr/m ³).	Tercera fase al 100% (Fructificación) (gr/m ³).
NH ₄ H ₂ PO ₄ (Fosfato monoamónico)	301.87	345	0
KH ₂ PO ₄ (Fosfato Monopotásico)		0	490
K ₂ SO ₄ (Sulfato DE potasio)	535.9	523.5	678.5
Ca(NO ₃) ₂ 7H ₂ O (Nitrato de calcio)	1327.1	2100	2125
KNO ₃ (Nitrato de potasio)	0	326	1414
Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O (Nitrato de Magnesio)	409.9	0	160
Mg(SO ₄)7H ₂ O (Sulfato de Magnesio)	0	1475	1537.5
H ₂ SO ₄ (Acido Sulfurico 98%)	77	77	77
HNO ₃ (Acido Nitrico)	202.5	202.5	202.5
Quelato de Hierro	26.5	28.75	38
Quelato de Manganese	8.33	8.75	12.5
Quelato de cobre	0.5	0.5	0.5
Quelato de zinc	1.36	1.5	2
Acido Bórico	4.34	6.25	6.25
Relacion N/K	1.4	1.5	1.65

Tabla 6. Manejo nutricional durante el desarrollo del cultivo

3.5.1 Manejo de riego.

El sistema de riego se activó de manera manual. El riego se hizo de la siguiente manera:

- a) Después de que emergieron las plántulas, se regó con agua solamente hasta saturar completamente.

- b) De los seis hasta los 35 días después de la siembra las charolas se regaron con solución Steiner al 50% una vez al día hasta que el sustrato llegó a saturación.
- c) Durante el primer día hasta los 32 días después del trasplante “etapa de crecimiento” se regó con solución Steiner al 70%. Se programaron tres riegos (9:00, 12:00 y 15:00 horas), con una duración de tres minutos dando un gasto total de 630 ml/planta/día.
- d) Durante los 33 hasta los 62 días después del trasplante “etapa de floración” se regó con solución Steiner (1984) al 100%. Se programaron 3 riegos (9:00, 12:00 y 15:00 horas), con duración de tres minutos cada uno dando un gasto total de 1,050 ml/planta/día.
- e) Durante los 63 hasta los 93 días después del trasplante “etapa de fructificación” se regó con solución Steiner al 100%. Se programaron 4 riegos (9:00, 12:00, 15:00 y 17:00 horas), con una duración de siete minutos cada uno, dando un gasto total de 1,960 ml/planta/día.

3.6 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con 6 repeticiones y 12 plantas por unidad experimental. El factor de variación fue la concentración de peróxido de hidrógeno y se utilizaron 4 niveles: 0, 6, 14 y 18 mM. El tamaño de la muestra constituida del 50% de cada repetición. El número de plantas a muestrear en cada tratamiento fue de 36 plantas y el total de plantas a muestrear 144 para cada variable. El diseño experimental y el acomodo de los tratamientos se muestran en la Figura 7.

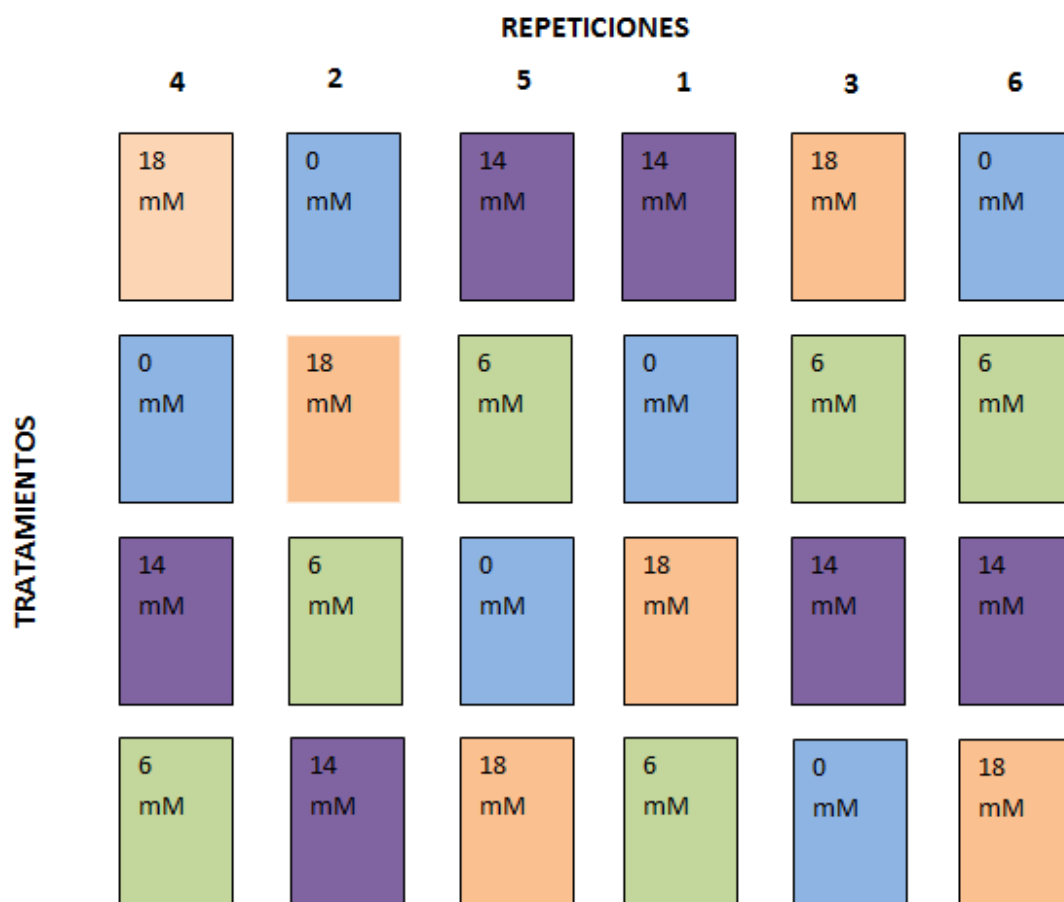


Fig.7 Esquema del diseño experimental

3.6.1 Preparación y dosificación del peróxido de hidrógeno

Los tratamientos se repartieron al azar con sus respectivas repeticiones como se muestra en la Tabla 7.

Tratamiento	Niveles de H ₂ O ₂ en mM.	Dosis de H ₂ O ₂ para 1Lt de H ₂ O des-ionizada (ml)	Color del Tratamiento
1	0	0	
2	6	183.9	
3	14	429.1	
4	18	551.67	

Tabla 7. Dosificación de los niveles de H₂O₂ en los tratamientos.

Se llevaron a cabo 12 aplicaciones de peróxido de hidrogeno de 0, 6, 14 y 18 mM cada una. Se aplicó por aspersion foliar hasta punto de goteo de acuerdo a lo reportado por Ramírez-Flores et al. (2006). La aplicación se hizo con un atomizador manual en la zona foliar de las plantas a partir de los 20 días después del trasplante. Las aplicaciones posteriores se llevaron a cabo semanalmente hasta concluir el ciclo del cultivo.

3.7 Manejo de la muestra

Se colectaron hojas nuevas (20 a 30 de parte superior de la planta) y viejas (20 a 30 de parte inferior de la planta) al final del experimento, tomando suficientes hojas de manera aleatoria para cada tratamiento. Las hojas se guardaron en bolsas de papel estraza número 8, y se llevaron al refrigerador a temperatura de 4 a 6° C para conservar las hojas en buen estado para después llevarlo al laboratorio y realizar las pruebas correspondientes.

3.8 Variables medidas

3.8.1 Altura de la planta

Se midió la altura de las plantas elegidas al azar con un flexómetro. Midiendo desde la base del sustrato hasta la parte del ápice del tallo principal. Se empezó a medir a partir de los 26 días después del trasplante, y de allí en adelante cada semana hasta la hora de la colecta de la muestra.

3.8.2 Diámetro del tallo

El diámetro del tallo fue medido con un vernier electrónico marca Stainless Hardened. Se midió el tallo principal, a 1 centímetro del sustrato. De igual forma que la altura, se empezó a medir 26 días después del trasplante, y de allí en adelante cada semana hasta la hora de la colecta de la muestra.

3.8.3 Obtención del extracto metanólico

Una vez colectada la muestra, esta se secó en el horno a 45 °C por 48 horas con la finalidad de extraer la humedad. Posteriormente, la muestra se molió para obtener el extracto.

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martínez et al., (2002). Se pesaron 50 g de muestra previamente liofilizada, se colocó en un matraz y se mezcló con 12.5 ml de metanol. El matraz fue protegido de la luz y se mantuvo en agitación (HAAKE modelo SWB20 a 40 rpm) por 24 horas a 25°C. Después se centrifugó a 4000 g por 10 minutos, en una centrífuga Hermle Z 323 K (Hermle Labortechnik, Alemania). El extracto obtenido se utilizó para la cuantificación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante.

3.8.4 Cuantificación de fenoles totales (FT)

La prueba de fenoles totales se llevó a cabo en Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

La determinación de fenoles totales se hizo mediante el método espectrofotométrico de FOLIN-CIOCALTEU (Singletón et al., 1999). El cual se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu. Éste reactivo está formado por una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida se absorbe a una longitud de onda de 764 nm

Se llevó a cabo una curva de calibración para utilizarla en la cuantificación de los fenoles totales. Para ello se utilizó como estándar una solución de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 μ L a 80 μ L en intervalos de 10 μ L y se completó el volumen de cada uno a 500 μ L con agua destilada. A cada uno de los estándares y muestras previamente preparadas se

les adicionó 125 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N a una relación 50:50, se agitó y se le adicionó 625 μL de Na_2CO_3 al 20%. Las muestras se dejaron reposar en la oscuridad por 2 hrs a temperatura ambiente. Se obtuvo la absorbancia con un espectrofotómetro.

En el caso de las muestras (extractos de las hojas de chile) se tomaron 50 μL del extracto, adicionando 200 μL de agua destilada, 125 μL del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y 625 μL de Na_2CO_3 al 20%. Las muestras se dejaron reposar en la oscuridad por 2 hrs a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo se agregaron 300 μL de la muestra en cada pozo de la placa con su respectivo blanco (agua). Se obtuvo la absorbancia. El valor obtenido se expresó como μg equivalentes de ácido gálico (GA) por gramo de muestra seca (μg Eq AG/g ms).

3.8.5 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se desarrolló por el método sugerido por Oomah et al., (2005). Se mezclaron 50 μL de extracto metanólico con 180 μL de agua destilada y con 20 μL de una solución de 2- aminoetildifenilborato (10g/L) y fueron adicionados a una placa de 96 pozos. Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 404 nanómetros con un espectrofotómetro lector de placa. Las absorbancias obtenidas se compararon con una curva estándar de rutina (0-50 μL /mL). El contenido de flavonoides fue expresado como microgramos equivalentes de rutina por gramo de muestra.

3.8.6 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH

La determinación de capacidad antioxidante se llevó cabo por el método de DPPH utilizando la técnica propuesta por Fukumoto y Mazza (2000), adaptada a micro placa. Para ello se añadieron 20 μL de extracto metanólico y 200 μL de solución DPPH en una micro placa de 96 pozos. Se preparó un control de 20 μL de metanol y 200 μL de DPPH. Las muestras se prepararon por triplicado y se leyeron cada 10 minutos durante 90 minutos a una longitud de onda de 540 nanómetros en un lector de Elisa (Spectra MAX 190, Molecular Devices). La

placa se mantuvo cubierta en la oscuridad y a temperatura ambiente entre las lecturas. La actividad antioxidante se tomó como el porcentaje de decoloración de DPPH, utilizando la ecuación de Burda y Oleszek (2001):

$$\text{ARA} = [\text{Abs. Muestra} / \text{Abs. Control}] \times 100$$

Donde ARA: Actividad Antirradical, Abs.Muestra: absorbancia de la muestra a 520 nanómetros y Abs.Control: absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

3.9 Análisis estadístico

Todas las variables medidas se analizaron en el paquete estadístico JMP 5.0.1®. A los resultados de cada tratamiento y repetición se les hizo la prueba de Tukey, usando un análisis de varianza (ANOVA), correlación de variables y comparación de medias con una significancia de $p < 0.05$ para todas las variables evaluadas.

CAPITULO IV RESULTADOS

4.1 Altura de la planta

Se midió la altura final de las plantas a las 12 semanas después del transplante (Figura 8). No existieron diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo se pudo observar que al aumentar la concentración de peróxido de hidrógeno la altura de la planta disminuía. Así, la mayor altura la obtuvieron las plantas tratadas con 0 mM de peróxido de hidrogeno, consiguiendo una altura promedio de 85.75 cm, y la altura menor la obtuvieron las plantas tratadas con 18 mM de peróxido de hidrogeno, teniendo una altura promedio de 76.25 cm (Figura 8). De esta manera, la aplicación del elicitor está afectando en el crecimiento de la planta. Debido a que el elicitor induce una respuesta de estrés en la planta, esta estaría destinando más energía al metabolismo secundario, lo que se ve reflejado en un crecimiento más lento.

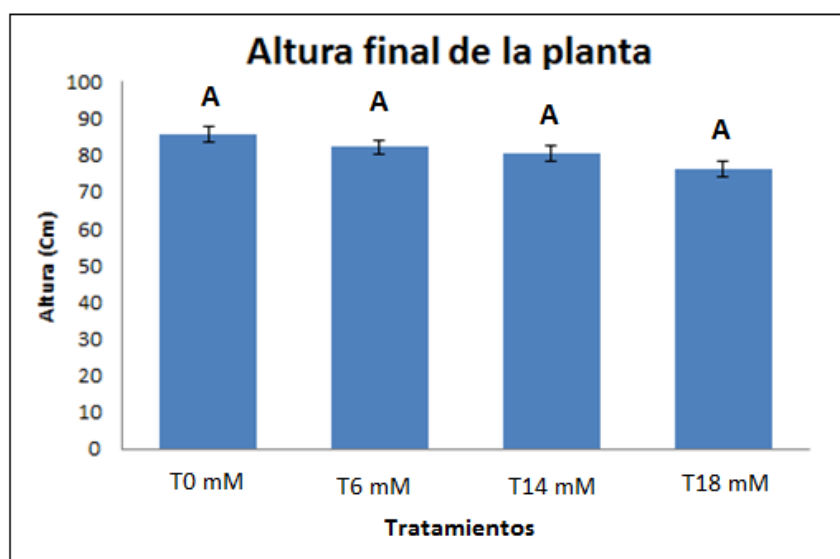


Fig.8 Altura de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

4.2 Diámetro del tallo de la planta

Se midió el diámetro de la planta a las 12 semanas del transplante (Figura 9). No hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo el mayor diámetro lo presentan las plantas tratadas con peróxido de hidrogeno 6mM con

un promedio de 14.705 mm y el menor diámetro lo tuvieron las plantas tratadas con peróxido de hidrógeno 18 mM, con un promedio de 14.409 mm. Con base en el resultado anterior, se observó que las plantas tratadas con 6 mM de peróxido de hidrógeno crecieron menos en comparación con las control pero tuvieron un tallo mucho más grueso.

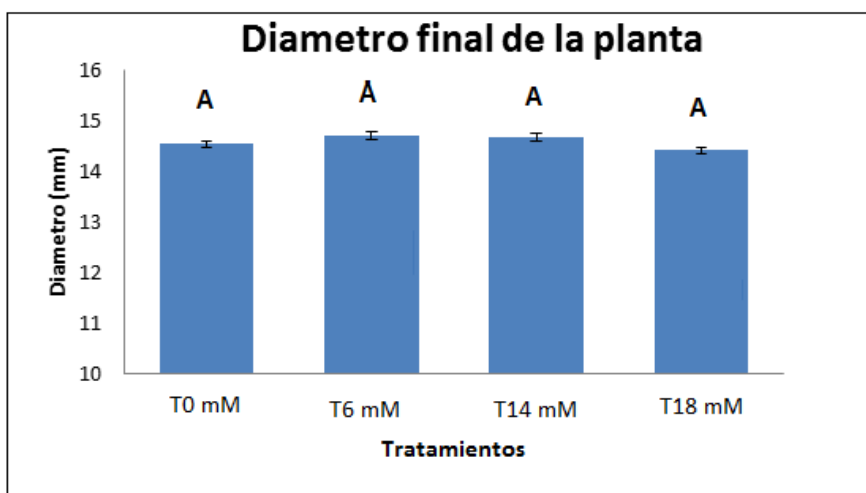


Fig.9 Diámetro del tallo de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

4.3 Flavonoides en hoja nueva y en hoja vieja

En el presente trabajo se midió la cantidad de flavonoides totales en hojas nuevas y viejas de la planta de chile habanero (Figura 10 y 11). Respecto a las hojas nuevas no existieron diferencias significativas entre los tratamientos, obteniéndose un promedio de 17580 μg eq de rutina/g. Sin embargo, se observa que la concentración de 6 mM de peróxido de hidrógeno es en la que se obtuvo el mayor contenido de flavonoides (Figura 10).

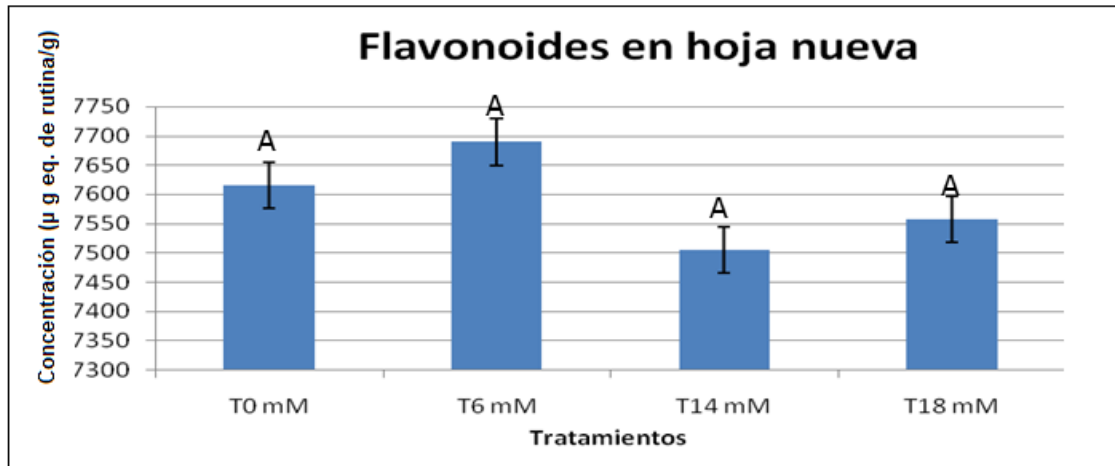


Fig.10 Medición de flavonoides en las hojas nuevas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

Lo que respecta a hojas viejas se observa que si hay diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 11). Los tratamientos con mayor cantidad de flavonoides son en los que se usaron 0 y 14mM con 18753 µg de rutina/g y 18789 µg de rutina/g respectivamente.

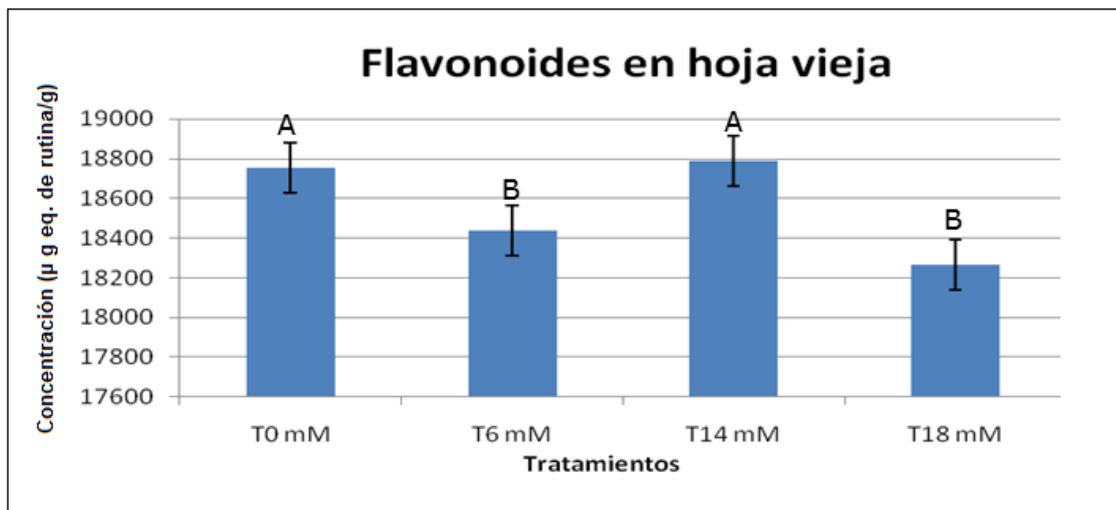


Fig.11 Medición de flavonoides en las hojas viejas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

Para el caso de hojas viejas la aplicación de peróxido de hidrógeno 6 y 18 mM afectó de manera negativa la cantidad de flavonoides. La concentración de 14

mM se comportó muy similar al control. Por lo que la aplicación del elicitor no aumento el contenido de flavonoides en las hojas viejas.

De acuerdo con Molina (2009), en su estudio de diversas variedades de chiles, encuentra el valor más alto de flavonoides en chile serrano con 160 μg de rutina/ g. Por otro lado, Vargas-Álvares et al., (2005) en su estudio de flavonoides hecho sobre hojas de guayaba bajo condiciones de estrés (efecto de poda), registra 1041 μg de quercetina /g., cuyo valor es mayor a cuando no tiene poda. Finalmente Martínez (2007), el su evaluación de extractos orgánicos de semilla de *Heliocarpus terebinthinaceus*, obtuvo 23730 μg de rutina/ g. Por lo tanto, las hojas de chile habanero resultan una fuente interesante de flavonoides puesto que poseen un contenido mucho mayor incluso que el fruto del chile serrano.

4.4 Fenoles totales en hoja nueva y en hoja vieja

En el presente trabajo se midió la cantidad de fenoles totales en hojas nuevas y en hojas viejas de la planta de chile habanero (Figura 12). En las hojas nuevas se observa que si hay diferencia significativa entre los tratamientos, teniendo mayor cantidad de fenoles las hojas tratadas con 6 y 0 mM con 870 μg equivalentes de ácido gálico (GA) por gramo de muestra seca (μg Eq AG/g ms) y 860 μg Eq AG/g ms, respectivamente.

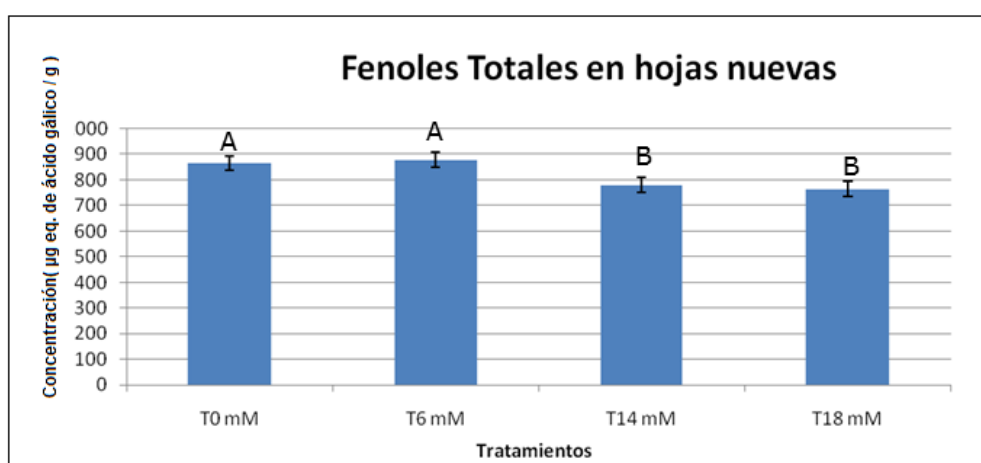


Fig.12 Medición de fenoles totales en las hojas nuevas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

Para el caso del tratamiento con 6 mM de peróxido de hidrógeno, no existió diferencia significativa en el contenido de fenoles en comparación con el tratamiento control (Figura 12). Por otro lado, los tratamientos con 14 y 18 mM de peróxido de hidrógeno mostraron diferencias significativas con respecto al control, siendo menor el contenido de fenoles totales en dichos tratamientos. Lo anterior indica que la aplicación de peróxido de hidrógeno no aumenta la cantidad de fenoles totales en las hojas nuevas de chile sino al contrario, lo disminuye.

En las hojas viejas se tiene un comportamiento estadístico similar al de las hojas nuevas con mayor cantidad de fenoles en las hojas tratadas con 0 y 6mM obteniendo 864 μg Eq AG/g ms y 877 μg Eq AG/g ms respectivamente (Figura 13). Mientras que en las tratadas con 14 y 18 mM la cantidad de fenoles fue menor en comparación con el tratamiento control.

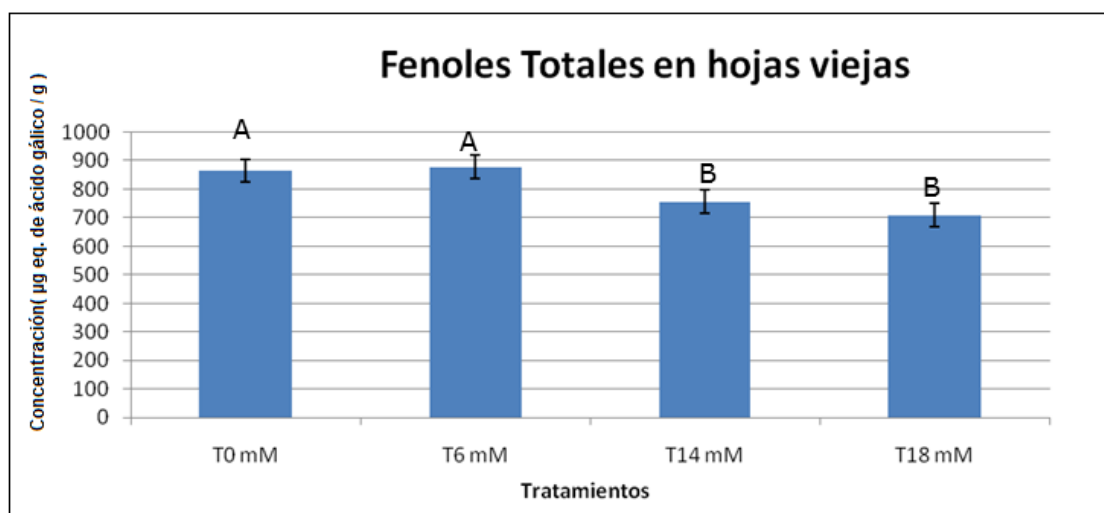


Fig.13 Medición de fenoles totales en las hojas viejas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

Zhang y Hamauzu (2003), encontraron en su estudio en chile pimienta (rojo verde y amarillo) un contenido de fenoles totales que oscila entre 9.2-15.4 mg /100g de peso fresco. Considerando que el chile pimienta tiene un 87% de humedad; el valor reportado corresponde aproximadamente a 1219 microgramos/gramo de peso seco. Estos valores son más altos que los

obtenidos en el presente estudio. Por otro lado, Gutiérrez et al., (2008), realizaron un estudio en el cual se determinó el contenido de fenoles de 14 plantas malezas usadas para alimentación animal. Encontraron en la planta *D. molliculum* el contenido más alto de fenoles totales con la cantidad de $125,82 \pm 0,40 \mu\text{g/g}$ peso seco. Finalmente cabe mencionar que Ornelas-Paz et al., (2010) reportaron un total de compuestos fenólicos de $2307.8 \mu\text{g}$ de ácido gálico /g en habanero y $2549.7 \mu\text{g}$ en jalapeño.

El contenido de fenoles totales es mucho menor si se compara con el reportado en los frutos, sin embargo, para ser las hojas de la planta, no son niveles demasiado bajos comparados con otras especies.

4.5 Capacidad antioxidante en hoja nueva y en hoja vieja

Finalmente se midió la capacidad antioxidante de las hojas de chile habanero. Existieron diferencias significativas entre los diversos tratamientos. No existieron diferencias significativas entre el tratamiento control y las concentraciones 6 y 18 mM, sin embargo la concentración 6 mM fue la que tuvo el mayor porcentaje de actividad antirradical con 92.8% de inhibición. Por otro lado la concentración 14 mM fue la que presento menor porcentaje de inhibición.

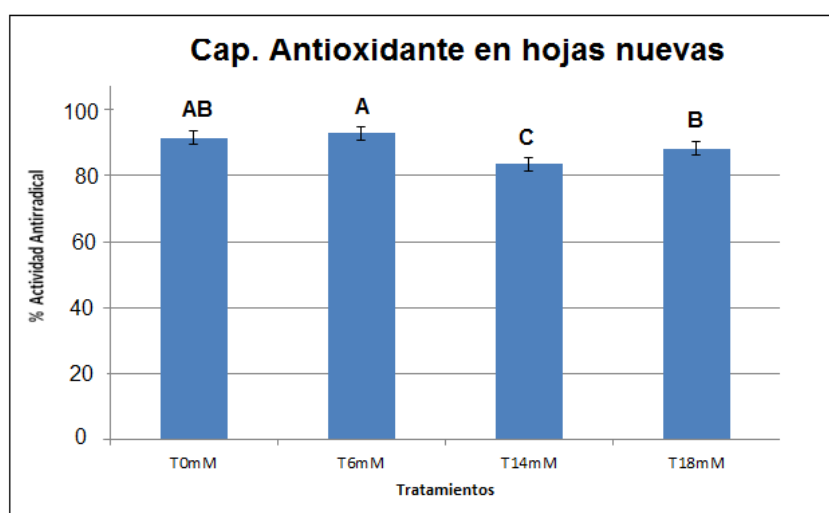


Fig. 14 Medición de la capacidad antioxidante en las hojas nuevas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

Con respecto a las hojas viejas también existieron diferencias significativas entre los tratamientos, obteniendo 95.2% de inhibición las hojas tratadas con 0mM de peróxido de hidrógeno, sin tener diferencias significativas con las que fueron tratadas con 18 mM. La concentración 6 mM presentó diferencia significativa con respecto a la control, siendo menor en las plantas elicidadas. Por lo tanto, en las hojas viejas, la aplicación de peróxido de hidrógeno no aumentó la capacidad antioxidante sino al contrario, lo disminuyó.

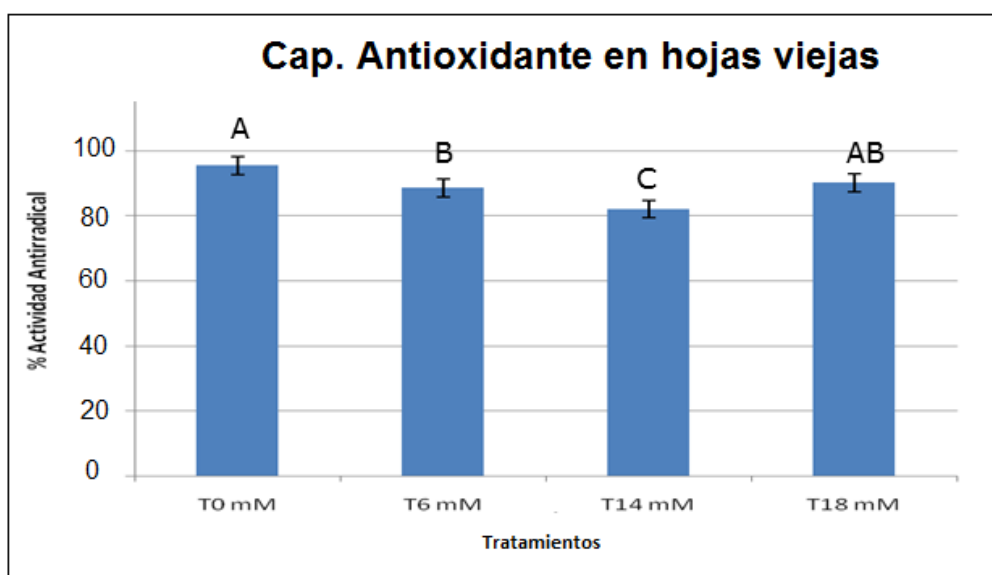


Fig. 15 Medición de la capacidad antioxidante en las hojas viejas de la planta de chile habanero en los diversos tratamientos.

Un estudio realizado por Molina (2009), muestra que el chile Bell y Caribe presentaron alrededor del 60.41 y 83.44% de inhibición, lo que demuestra que tiene una alta actividad antioxidante. Mientras que Matsufuji et al., (2007), quienes realizaron un estudio sobre las diferencias de la capacidad antioxidante entre las distintas coloraciones del pericarpio de chile Bell (*C. annuum L.*), encontraron que la mayor inhibición del radical se presenta en el chile Bell rojo (al rededor del 90 %).

En seguida se presenta una tabla que contiene el resumen de los resultados obtenidos en el experimento.

Tratamiento	Tipo de hoja	Fenoles ($\mu\text{g/g}$)	Flavonoides ($\mu\text{g/g}$)	Cap. Antiox (%)
0	Nueva	870.02	17615.78	91.49
	Vieja	864.63	18753.94	95.29
6	Nueva	860.12	17689.47	92.83
	Vieja	877.88	18436.84	88.56
14	Nueva	779.35	17505.26	83.58
	Vieja	757.19	18789.47	81.99
18	Nueva	764.00	17557.89	88.22
	Vieja	710.30	18267.10	90.14

Tabla 8. Resumen de los datos obtenidos en el experimento.

CAPITULO V CONCLUSIONES

Se determinó el potencial bioactivo de las hojas de las plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*). La aplicación foliar de peróxido de hidrógeno influye en el contenido de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante y esto depende de la concentración del elicitador y de la edad de la hoja.

Para el caso de fenoles totales, la aplicación de 6 mM de peróxido de hidrógeno tuvo mayor influencia en las hojas viejas que en las hojas nuevas aumentando su cantidad.

La cantidad de flavonoides no se vio modificada significativamente al aplicar las diferentes concentraciones del elicitador. Sin embargo, se obtuvieron cantidades mayores en las hojas viejas en comparación con las hojas nuevas.

El porcentaje de inhibición resultó mayor en las plantas control lo que indica que la aplicación del elicitador no aumentó la capacidad antioxidante de las hojas. Esto fue tanto para las hojas nuevas como para las viejas.

Por lo tanto, la aplicación de peróxido de hidrógeno no aumenta significativamente la cantidad de compuestos bioactivos en las hojas de la planta de chile habanero. Sin embargo, se determinó que las hojas de chile habanero si contienen compuestos bioactivos y capacidad antioxidante aunque en niveles menores que los encontrados en el fruto pero en cantidades mayores que en otras especies de plantas.

VI LITERATURA CITADA

Albersheim, P., Valent, B.S. 1978. Host-pathogen interactions in plants: plants when exposed to oligosaccharides of fungal origin defend themselves by accumulating antibiotics

Andrews, J. Peppers. 1995. The domesticated capsicums. University of Texas Press. Austin, Texas.

Andersen, O.M., Markham, K.R. 2006. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRC, Taylor and Francis.

Aponte, M., Calderón, M., Delgado, A., Herrera, I., Jiménez, Y., Ramírez, Z., Rojas, J., Toro, Y. 2008. Fitoquímicos. División de Investigaciones de Alimentos (D.I.A.). División de Nutrición en Salud Pública. Caracas, Venezuela.

Avello, M., Suwalsky, M., 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Universidad de Concepción, Chile. No. 494. pp. 161-172.

Bakan, B., Bily, D. Melcion, B. Cahagnier, C. Regnault-Roger, B. J. R. Philogene, y D. Richard-Molard. 2003. Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. J. Agric. Food Chem. 51: 2826-2831.

Barreiro, P. M. 1998. Una hortaliza de México para el mundo. Claridades Agropecuarias No.56. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México, D.F.

Beckman, J. y Cols. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci; 87: 1620-1624.

Bhuiyan, M.N.H., Adachi, T. 2003. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca*. *J Plant Physiol* 160:1117–1124.

Burda, S. y Oleszek, W. 2001. Antioxidant and Antirradical Activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49:2774-2779.

Cabrera, S. M.L., Salinas, M. Y., Velázquez, C. G., Espinoza, T. E. 2009. Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del granos del maíz y s relación con las propiedades físicas. Programa de Maíz. Instituto Nacional de Investigación forestales, agrícolas y pecuarias (INIFAP). Chapingo. Estado de México.

Camarena, G. G. 2002. Octadecanoides como reguladores de la defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*. Vol. 8.No. 002.Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, Mexico. pp 107-112.

Cardador, M., Castano, T., Loarca-Piña,G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1.*Food Add Contam* 19:62-69.

Drago, S. M., López, L. M., Sains, E. T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 37, No. 004. Asociación Farmacéutica Mexicana, Distrito Federal, México. pp 58-68

Dwyer, J. 1996. Is there a need to change the American Diet?. In: *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and treatment*. *Adv. Experim. Med. Biol.* 401:192-193. 1996.

ECAO. 2002. Manual de producción de Chile Habanero Ecológico. Peten. Guatemala. pp. 20.

Engelmann, N.J., Reppert, A., Yousef, G., Rogers, R.B., Lila, M.A. 2009. In vitro production of radiolabeled red clover (*Trifolium pretense*) isoflavones. *Plant Cell Tiss Org Cult* 98:147–156.

Escamilla, J. C., Cuevas, M. Y., Guevara, F. J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Facultad de Medicina. Vol. 52 No. 2. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de enfermedades de neurodegenerativas. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. México.*

Fukumoto, L.R. y Mazza, G. 2000. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compound. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3597-3604.

Gallardo, C., L. Jiménez, y M-T. García-Conesa. 2006. Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chem.* 99: 455-463.

Gokalp, O., Uz, E., Cicek, E., Yilmaz, H. R., Ozer, M. K., Altunbas, A. y Ozcelik, N. 2006. Ameliorating role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against isoniazid induced oxidative damage in red blood cells. *Mol Cell Biochem.*

Grotewold, E. 2002. *The science of flavonoids.* New York: Springer, 2006.

Hansberg W. . “Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje bioquímico” 26: pp.19-54.

Groot, H., Rauen, U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol.* 3: 249-55.

Gutiérrez, A. M., Ortiz, G. A., Mendoza, C.A. 2008. Medición de flavonoides y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.*

Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y., Sankawa, U. 1991. Induced isoflavonoids from copper chloride-treated stems of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry* 30:1481–1482.

Herrera, H. M. G., Torres P. I., González C. M., Mora A, A., Guzmán M. S.H. 2006. Presencia de compuestos relacionados con la salud en dos especies de chile” Unidad de Biotecnología. Campo experimental Bajío, Centro de Investigación Regional del Centro. INIFAP

Hicks-Gómez ,J. 2007.”Bioquímica ”Segunda edición.México: McGRAHILL. p 689-708.

Ikan, R. 1991. Natural products: a laboratory guide. Academic Press. San Diego. 360 p.

INEGI, Instituto Nacional de estadística, Geografía e Informática. 2010. <http://www.inegi.org.mx>.

Jayaprakasam, B., Vanisree,M., Zhang, Y., Dewitt, D. L. y Nair, M. G. 2006. Impact of alkil esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. J. Agric. Food Chem.

Kim, D.O., O. K. Chun, Y. J. Kim, H. Y. Moon, and C. Y. Lee. 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. J. Agric. Food Chem. 51 (22): 6509-6515.

Laborde, J. A. y O. Pozo. 1984. Presente y pasado del chile en México. Publicación especial No. 85. INIA, SARH. México. D.F.

Latournerie, M. L., J. L. C., M. Pérez. G. Castañon S. A., Rodríguez, L. M. A.R. y P. Ramirez. 2002. Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. Rev. Fitotec. Mex. 25: 25-33.

Liu, C.J., Dixon, R.A. 2001.Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylaiton of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. Plant Cell 13:2643–2658.

López R.G. O. 2003. Chilli: la especial del nuevo mundo. Ciencias.No. 69. Universidad Autónoma de México Distrito Federal, México. pp.66-75.

Lyon, G.D., Newton, A.C., 2000. Implementation of elicitor mediated induce resistance in agriculture. In *Induced plant defenses against pathogens and herbivores. Biochemistry, Ecology and Agriculture*. Agrawal, AA; Tuzun, S; Bent, E. Eds. St. Paul, Minnesota, USA, APS Press. p. 299-318.

Mapas y municipios del estado de Querétaro. En red. Disponible en: <http://www.queretaro.gob.mx/municipios.aspx?q=RrRbGx+QAUjZ790U1IIKg==#Información Geográfica>.

Maroto, J. V. 1995. Horticultura herbácea especial. 4ª edición. Mundi- Prensa. Madrid, España.

Martínez, J. C. 2002. El uso del ADN mitocondrial para descubrir las migraciones precolombinas al Caribe: Resultados para Puerto Rico y expectativas para la República Dominicana. *Journal of Caribbean Amerindian History and Antropology*.

Martínez, V., J.B. 2007. Evaluacion de la actividad antioxidante de extractos organicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca.

Matsufuji, H. , Ishikawa, K. , Nunomura, O. , Chino, M. y Takeda M. 2007. Antioxidant content of different coloured sweet peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.). *International Journal of Food Science and Technology*. 42:1482–1488.

Miranda, H. M. L., Castro C. L. 2009. El Estrés oxidativo en plantas. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.

Molina, Q.A. 2009. Contenido de compuestos fitoquímicos y su relación con la capacidad antioxidante de extractos de pimientos (*Capsicum annum L.*) cultivados en el noreste de México. Universidad de Sonora. División de ciencias biológicas y de la salud. Departamento de investigaciones científicas y tecnológicas. Posgrado en biociencias. Hermosillo, Sonora.

Morrison R. T., Boyd R. N. 1990. Química orgánica. Quinta edición. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México. Pearson Educación Addison Wesley Iberoamericana S.A.

Neill, S., Desikan, R., Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5:388-395.

Ochoa, A.N. 2001. Usos y propiedades del chile habanero. Seminario de chile habanero. Fundación produce Yucatán. SAGARPA, INIFAP. Mérida Yucatán. pp. 2-5.

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

Ornelas-Paz J.J., Martínez, B. J.M., Ruiz, C. S, Santana, R. V, Ibarra, J. V., Olivas, G.I., Pérez, M. J.D. 2010. Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. *Food Chem* 119:1619–1625.

Palencia, M. Y. 1999. Sustancias Bioactivas en Alimentos. Universidad de Zaragoza, España. Consultado el 22 de Octubre de 2012 en: www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf.

Quintanar, E. M., Calderón, S. J. 2009. La capacidad antioxidante total, bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, vol. 28, núm. 3. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. pp. 89-101

Ramírez, F. J., Ochoa, M., Rodríguez, M. y Mora, A. 2006. Efecto del ácido acetil salicílico, miel y melaza en la movilidad y concentración de TSWV. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2): 239-243.

Real Academia Española. 2001. *Diccionario de la Lengua Española*. 22a ed. España: Mateu cromo artes gráficas, S. A.

Riveros, A. Alba, E. 2010. *Inducción de Resistencia en plantas Interacción: Planta-Patógeno*. Universidad de Tolima Ibagué. Colombia.

Riveros, A. S., 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. *Manejo Integrado de Plagas*. No. 61. Costa Rica. pp 4-1.

Robertson, A. y M. N. Hall. 1989. A critical investigation into the flavonost method for thea. *Food Chem.* 34, 57-70. In: Martínez, V., J.V. 2007. Oaxaca

Ross, J.A., Kasum, C.M. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr*; 22: 19-34.

Salomons, T.W., y Graham. 2000. *Química orgánica*, 2da. Edición. Editorial Limusa, México. pp. 1121-1129.

Singleton, V.L., Orthofer, R. y Lamuela-Reventos, R. M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol.* 229: 152-178.

Sumaya, M., Ma. T., Suárez, D. T., Cruz, C, N., Alanís, G. E., Sampedro, José G. 2010. Innovación de productos de alto valor agregado a partir de la tuna mexicana. *Revista Mexicana de Agronegocios*, vol. XIV, núm. 27. Sociedad Mexicana de Administración Agropecuaria A.C: Universidad Autónoma de la Laguna: UAAAN México. Pp 435- 441.

Sun, T. , Xu, Z. , Wu, C. -T. , James, M. , Prinyawiwatkui , W. y No, H.K. 2007.

Antioxidant activities of different colored sweet peppers (*Capsicum annuum L.*).
Journal of Food Scienc

Tun, Dzul J.C., 2001. Chile habanero. Características y Tecnología de
Producción .SAGARPA, INIFAP., México

Trujillo, A. J. 2001. Descripción varietal del chile habanero (*Capsicum chinense J.*). Seminario de Chile Habanero. Fundación produce Yucatán. SAGARPA.INIFAB.Mérida Yucatán.

Vargas, Á. D., Soto, H. M., Gonzalez, H. V.A., Engleman, E.,M.,Martínez-G., A.2005. Variacion del contenido de flavonoides en hojas de guayaba en condiciones de estrés. Revista Chapingo. Serie horticultura, vol.11. Num. 1. Universidad Autónoma de Chapingo. México.

Winterbourn, C.C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat Chem Biol 4:278-86.

Wike, C. 1997. Así comían los Aztecas. Esplendor del México Antiguo. Editorial del Valle de México, Mexico.Tomo II, pp. 983-99.

Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv 23:283–333.

Zhaohui, Z., y M. H. Moghadasian. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. Food Chem. 109 (4): 691-702.

Zhang, D., Hamauzcu, Y. 2003. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of Green, red and yellow peppers. Science of Funcional Foods. Graduate School of Agriculture. Shinshu University, 8304 Miniامي-minowa, Kami-ina, Nagano Japan.