

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE CHILE CHILTEPÍN (*CAPSIUM ANNUUM* VAR. *GLABRIUSCULUM*) Y SU POTENCIAL EN EL BIOCONTROL DE *ALTERNARIA ALTERNATA* Y *FUSARIUM OXYSPORUM*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

M.C. ALFONSO RODRÍGUEZ MATURINO

DIRECTOR DE TESIS

DR. DANIEL GONZALEZ MENDOZA

CODIRECTOR

DRA. ROSALBA TRONCOSO ROJAS

EJIDO NUEVO LÉON, MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

NOVIEMBRE, 2013

La presente tesis titulada: **capacidad antioxidante de extractos de chile chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) y su potencial en el biocontrol de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum***, realizada por el alumno: Alfonso Rodríguez Maturino, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR:

Dr. Daniel González Mendoza

CO- DIRECTOR:

Dra. Rosalba Troncoso Rojas

ASESOR:

Dr. Onésimo Grimaldo Juárez

ASESOR:

Dra. Mónica Avilés Marín

ASESOR:

Dr. Carlos Enrique Ail Catzim

DEDICATORIA

A los dos grandes AMORES de mi vida:

Mi querida Hija: Génesis

Mi amada esposa: Idania; compañera de mil y un batallas.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo económico otorgado.

A la Universidad Autónoma de Baja California; pilar en mi formación académica.

A cada uno de los integrantes de mi comité; Dr. Daniel, Dra. Rosalba, Dra. Mónica, Dr. Ail y Dr. Onécimo, quien gracias a sus palabras de ánimo logré culminar una etapa tan importante de mi vida.

A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio de Biotecnología: Aura, Laura, Claudia, Emmanuel, Nivardo, Juan, Claudio, Ramiro.

A Sandra; secretaria de Coordinación de Posgrado; una excelente persona.

Al CIAD, en Hermosillo Sonora; en especial a aquellos quienes conforman el Laboratorio de Biotecnología Vegetal quienes amablemente me permitieron trabajar.

A Valentín y Fidel, compañeros de vida.

A MIS DOS GRANDES VIEJOS: MAMÁ Y PAPÁ

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN GENERAL	1
CAPÍTULO I	2
1.1. INTRODUCCIÓN	2
1.2. HIPÓTESIS	3
1.2.1. Hipótesis General	3
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Particulares	4
CAPÍTULO II	5
IMPORTANCIA DEL CHILTEPÍN (<i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>) Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL GÉNERO <i>Capsicum</i> .	
RESUMEN	5
2.1. Importancia económica del Chiltepín	6
2.2. Características agronómicas del Chiltepín	7
2.3. Compuestos bioactivos en el género <i>Capsicum</i>	12
2.3.1. Capsaicinoides presentes en <i>Capsicum</i>	13
2.3.2. Compuestos fenólicos presentes en <i>Capsicum</i>	15
2.3.3. Carotenoides en <i>Capsicum</i>	19

2.3.4. Saponinas en <i>Capsicum</i>	22
2.4. Conclusiones	24

CAPÍTULO III

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CHILTEPÍN (<i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>).	25
RESUMEN	25
3.1.INTRODUCCIÓN	26
3.2.MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.2.1. Colecta de frutos	28
3.2.2.Contenido de fenoles totales	28
3.2.3.Actividad antioxidante total	29
3.2.4.Mediciones del color extractable	30
3.2.5. Mediciones de carotenoides rojos y amarillos.	30
3.2.6. Separación e identificación de carotenoides de chiltepín	30
3.2.7. Extracción e identificación de compuestos fenólicos por HPLC en chiltepín y habanero	31
3.2.8.Análisis Estadístico	35
3.3.RESULTADOS	35
3.3.1.Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante total	35
3.3.2. Contenido de carotenoides rojos y amarillos	36
3.3.3. Color extractable	37
3.3.4. Identificación de carotenoides, ácidos fenólicos y flavonoides en Chiltepín	39

3.4.DISCUSIÓN	44
3.5.CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO IV	
COMPUESTOS BIOACTIVOS DE <i>Capsicum annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> Y SU EFECTO EN LA INHIBICIÓN DE <i>Alternaria alternata</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> CAUSANTES DE ENFERMEDADES POSCOSECHA.	48
RESUMEN	48
4.1.INTRODUCCIÓN	49
4.2.MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.2.1.Preparación de los extractos de Chiltepín	51
4.2.2.Extracción de compuestos bioactivos de frutos secos de Chiltepín	52
4.2.3.Aislamiento de los hongos	52
4.2.4.Actividad antimicótica efecto del extracto de chiltepín en el crecimiento micelial de los hongos fitopatogenos	53
4.2.5. Efecto del extracto de chiltepín en el número de esporas germinadas de <i>alternaria alternata</i> y <i>fusarium oxysporum</i>	54
4.2.6.Análisis estadístico	54
4.3.RESULTADOS	54
4.3.1 Efecto de los extractos de Chiltepín en el crecimiento de los hongos evaluados	54
4.3.2 Efecto de los extractos de Chiltepín en la germinación de esporas	58
4.3.3. DISCUSIÓN	61
5. Literatura citada	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1 Estructura química de los capsaicinoides	15
Figura 2.2 Estructura química del fenol	16
Figura 2.3 Estructura química básica de los flavonoides	17
Figura 3.1 Contenido de fenoles totales (a) y actividad antioxidante total (b) de chile Chiltepín y Habanero	32
Figura 3.2 Valores de carotenoides (fracción roja isocromática y fracción amarilla isocromática) de chile Chiltepín y Habanero, respectivamente. Medias $\pm$ ES; n= 3.	33
Figura 3.3 Cambio en el color extractable (unidades ASTA) de frutos de chile Chiltepín y Habanero. Medias $\pm$ ES; n= 3.	38
Figura 3.4 Cromatograma típico de HPLC de estándares de carotenoides a 450 nm. Picos (1): capsantina; (2): α -caroteno y (3) β - caroteno.	39
Figura 3.5 Cromatograma típico de HPLC de estándares de ácidos fenólicos a 280 nm. Picos (1): ácido gálico; (2): ácido clorogénico; (3) ácido cafeico; (4) ácido p- coumarico; (5) ácido ferúlico.	40
Figura 3.6 Cromatograma típico de HPLC de estándares de flavonoides a 280 nm. Picos: (1) rutina, (2) naringenina, (3) quercetina, (4) kaempferol.	41

Figura 3.7	Cromatograma de HPLC de los extractos de Chiltepín indicando la presencia de carotenoides (a), ácidos fenólicos (b) y flavonoides (c).	42
Figura 3.8	Cromatograma de HPLC de los extractos de Habanero indicando la presencia de ácidos fenólicos (a) y flavonoides (b).	43
Figura 4.1	Efecto de las saponinas de Chiltepín sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos a los cinco días de exposición.	55
Figura 4.2	Efecto de los compuestos fenolicos de Chiltepín sobre el sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos a los cinco días de exposición..	56
Figura 4.3	Efecto de los carotenoides de Chiltepín sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos después de cinco días de exposición.	57
Figura 4.4	Efecto de las saponinas del Chiltepín sobre el número de esporas germinadas de hongos fitopatógenos, a los cinco días después de la exposición.	58
Figura 4.5	Efecto de los compuestos fenólicos de Chiltepín sobre el número de esporas germinadas de hongos fitopatógenos a los cinco días de exposición.	60
Figura 4.6	Efecto de carotenoides de Chiltepin sobre el número de esporas germinadas de hongos fitopatogenos, cinco días después de la exposición.	61

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 3.1 Gradiente de elución para ácidos fenólicos.	33
Tabla 3.2 Gradiente de elución para la separación de flavonoides.	34

RESUMEN GENERAL

Los productos de origen químico en el control de enfermedades en alimentos de origen vegetal causadas por hongos fitopatógenos, antecede ya a varios años. Su uso ha llevado a un incremento de la contaminación ambiental, resistencia de patógenos y complicaciones en la salud. Como una alternativa se presenta el uso de extractos de plantas que presentan propiedades antifúngicas y son una fuente de compuestos bioactivos que pueden ser benéficos a la salud. En este sentido, el fruto del chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) que se encuentra presente en el Estado de Sonora representa una alternativa viable que podría ser considerada en el control de hongos fitopatógenos debido a la presencia de compuestos bioactivos. En el presente estudio, el análisis de los extractos de los frutos de Chiltepín por HPLC permitió la detección de los siguientes carotenoides: capsantina y α -caroteno. Así mismo, se identificaron los ácidos fenólicos: gálico, caféico, y ferúlico. En el caso de los flavonoides, el análisis del extracto de Chiltepín permitió la identificación de los siguientes compuestos: naringenina, y quercetina. Por otra parte, los extractos de saponinas, compuestos fenólicos y carotenoides de Chiltepín obtenidos mostraron un efecto diferencial sobre el crecimiento y germinación de esporas de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, dos hongos de importancia hortícola. La presencia de estos metabolitos secundarios en Chiltepín indica el posible potencial de esta planta para ser usada en la obtención de compuestos bioactivos con aplicación en el área de control de enfermedades poscosecha.

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCIÓN

El empleo y uso de productos de origen químico para el control de enfermedades en alimentos de origen vegetal, causado por hongos fitopatógenos, antecede ya a varios años. Sin embargo, gran parte de los fungicidas químicos utilizados a llevado a una resistencia a patógenos, contaminación al ambiente y complicaciones en la salud humana a través de enfermedades crónico- degenerativas (Palacios- Nava y Moreno- Tetlacuilo, 2004).

Una alternativa para la protección a los ecosistemas y la salud humana contra el riesgo asociado a plaguicidas, es el empleo de productos de origen natural o extractos vegetales, debido a la presencia de fitoquímicos que además de ser biodegradables, son menos dañinos al ser humano (Kumar et al., 2008). Para México, las especies vegetales del género *Capsicum* (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. pubescens*) han sido caracterizados por su alto consumo; que en conjunto se les considera una excelente fuente de compuestos bioactivos, sustancias biológicamente activas (vitaminas, polisacáridos, saponinas, polifenoles, terpenoides, isoflavonoides, indoles) confiriéndoles a la especie su color, sabor y aroma (Menichini et al., 2009; Hernández-Ortega et al., 2012)

Los compuestos bioactivos constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como parte del proceso de adaptación a las condiciones de estrés abiótico y biótico (Ghasemnezhad et al., 2011).

Aunque no son considerados nutrientes esenciales para la vida, si poseen un amplio rango de funciones tal como: anticancerígenos, antimutagénicos, antimicrobianas y antioxidantes (EL-Gendy et al., 2010; Boulekbache-Makhlouf et al., 2012).

En la región Noroeste de México una de las especies de *Capsicum* con importancia económica es el Chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*). Su gran aceptación en la cocina mexicana ha motivado el desarrollo de estudios que abordan aspectos de propagación *in vitro*, variabilidad genética, fitopatología y efecto de fertilizantes orgánicos (Votava et al., 2002; Valadez-Bustos et al., 2009; Pagan et al., 2010).

No obstante, estudios referentes a *C. annuum* var. *glabriusculum* sobre su actividad antioxidante y antimicótica así como la identificación, cuantificación y aplicación de sus compuestos bioactivos son escasos. Por lo que el presente trabajo de investigación pretende evaluar la actividad antioxidante y antimicótica de compuestos bioactivos presentes en extractos de Chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*).

1.2. HIPÓTESIS

12.1. Hipótesis General

La especie *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, (Chiltepín) presenta compuestos bioactivos que afectan los procesos de esporulación y desarrollo de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, hongos de importancia hortícola en México, bajo condiciones *in vitro*.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad antioxidante y antimicótica de los compuestos bioactivos presentes en extractos de Chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*).

1.3.2. Objetivos Particulares

- Determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, carotenoides totales, color extractable y capacidad antioxidante en extractos acuosos obtenidos de frutos de chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*)
- Identificar los compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) y carotenoides en extractos de chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*) por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Determinar el efecto antimicótico de extractos de *C. annuum* var. *glabriusculum* mediante ensayos *in vitro* en la inhibición del crecimiento micelial y germinación de esporas de fitopatógenos causantes de enfermedades de poscosecha.

CAPITULO II

IMPORTANCIA DEL CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) Y COMPUESTOS

BIOACTIVOS EN EL GENERO *Capsicum*

RESUMEN

El Chiltepín es uno de los recursos naturales de México. Se han realizado esfuerzos para propagar a las plantas de Chiltepín, sin embargo su domesticación ha sido complicada. Estudios recientes involucran el uso de fitohormonas como el ácido giberélico, el cual está implicado directamente en el control y promoción de la germinación de las semillas del Chiltepín. Por otra parte, la actividad biológica de los extractos de las diferentes especies del género *Capsicum* en el control de microorganismos está relacionada con la presencia de compuestos bioactivos como saponinas, compuestos fenolicos y carotenoides presentes en sus frutos. Adicionalmente, factores como el tipo de cultivar, estado de madurez, condiciones de cultivo y manipulación poscosecha pueden afectar la actividad biológica en los frutos de las especies de *Capsicum*. Estudios futuros deben ser encaminados en la evaluación del impacto de las condiciones edafoclimáticas en el contenido y actividad biológica de los compuestos bioactivos en las especies del género *Capsicum*.

Palabras clave: chile Chiltepín, compuestos bioactivos, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana

2.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CHILTEPIN

El género *Capsicum* es considerado un ingrediente indispensable en la preparación de alimentos. A nivel mundial tiene un alto impacto en la industria farmacéutica, alimentaria y de tipo cosmético (Valadez- Bustos, 2009). *Capsicum* sp es considerado uno de los cultivos vegetales de mayor importancia para México (Castañón- Nájera, 2011), por la generación de empleos y un alto derrame económico, producto de este tipo de labores agrícolas. La FAO (2006) establece una derrama económica producto de estas actividades agrícolas a nivel mundial de US \$ 2, 811, 590, 000, mientras que en México es de US \$ 576, 690, 000. Aunque México es considerado el centro de origen y país a nivel mundial con la mayor diversidad genética, son China, Turquía, y E.U., los principales países productores (Valadez- Bustos, 2009). Dentro de los cultivos hortícolas, las diferentes especies de chile son considerados uno de los vegetales más importantes a nivel nacional, lo que ha permitido cubrir diferentes necesidades biológicas en la sociedad (Aguilar-Meléndez, 2006).

El Chiltepín es uno de los recursos naturales de la región noroeste de México. En la sierra sinaloense alcanza un valor comercial de \$100.00 pesos mexicanos por 250 g aproximadamente, ya que su cosecha implica internarse en la selva baja caducifolia y recorrer kilómetros para poder obtenerlo (Araiza-Lizarde et al., 2011). Además, las personas de la región que lo colectan lo obtienen sin ninguna técnica, pues extraen la planta en su totalidad desde la raíz, lo que ocasiona una menor producción en la siguiente temporada de cosecha.

De acuerdo a Pedraza-Robles y Gómez (2008), durante la época de mayor oferta llega a desplazar a otros tipos de chile por su agradable sabor y grado de pungencia. Además su precio puede variar de \$40 hasta \$800 por kilogramo, llegando a alcanzar hasta 40 veces el valor de los chiles serranos y de los chiles jalapeños.

En un seguimiento de precios del fruto de Chiltepín desde 1998 a la fecha, Medina-Martínez et al. (2006), reportaron que éste ha alcanzado precios promedio de \$ 70.00 por un kilo en fresco (verde), y para 1999 fue de \$ 60.00 en el mercado regional. De manera adicional, un segundo sondeo en el mercado regional para enero del 2001 y hasta junio del 2002, las colectas se vieron disminuidas en términos reales debido a la aleatoridad de las precipitaciones y la presencia de altas temperaturas (hasta 42°C en la zona de estudio), lo cual incrementó el precio del Chiltepín seco a un promedio de 400 a 450 pesos por kilogramo.

2.2. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DEL CHILTEPIN

Los hallazgos más antiguos del Chiltepín se remontan al siglo XVI, en donde Baltasar de Obregón en 1584, se refiere a la presencia del Chiltepín como espesura de montes, entretejido con tunales silvestres y árboles espinosos. Posteriormente, Ignacio Pfefferkorn en 1756 hace referencia sobre la existencia de dos especies vegetales, una de índole doméstica y la otra de tipo silvestre, así como la diferencia de picor entre ambas; refiriéndose a esta última como Chiltepín (Bañuelos, 2008). La especie presenta un amplio rango de distribución, desde la parte sur de E.U. hasta el norte de Sudamérica (Hernández- Verdugo et al., 2001; Votava et al., 2002).

Tewksbury et al. (1999), reporta su distribución para México por la parte del Pacífico (desde Sonora hasta Chiapas) así como del Golfo (desde Tamaulipas hasta la península de Yucatán).

La taxonomía de la planta de chile corresponde a la división *Magnoliophila*; clase *Magnoliopsida*; orden *Solanales*; familia *Solanaceae*; género *Capsicum*. Este género es uno de los más grandes de la subfamilia *Solanoideae*, con 1250 especies, su taxonomía es compleja debido a la variabilidad de las formas existentes en las especies cultivadas y a la diversidad de los criterios utilizados en su clasificación. Los frutos del género *Capsicum*, está formado por más de 200 variedades con cinco principales especies: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens*, y *Capsicum pubescens* (Menichini et al., 2009). Entre estas variedades se encuentra *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Bañuelos et al., 2008).

En México, el nombre más común para referirse a *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Heiser y Pickersgill) es el de Chiltepín; aunque tiene una amplia variedad de nombres como: chile piquín, chile pico de paloma, chile de monte, pájaro pequeño, chile mosquito, diente de tlacuache, milchili, ululte entre muchos más (Long, 1998). El Chiltepín es una planta perenne de altura entre 1 y 2 metros, crece de manera silvestre en suelos franco arenosos, cuyo fruto es una baya redonda de 3- 6 mm de diámetro y crece en forma eréctil (Montoya- Ballesteros, 2010).

Generalmente es una planta compacta redonda de 1.5 metros de diámetro, con hojas de peciolo delgados de 1 a 2.5 cm de largo, estrechamente alados, limbo ovado a lanceolado-ovado, de 1 a 4 cm de ancho y de 2 a 6 cm de largo; flores solitarias con cáliz de 1.5 a 2 mm de largo; corola blanca de 6 a 9 mm de diámetro; los frutos son bayas globosas ó elipsoidales de 6 a 8 mm de diámetro; las semillas son amarillas de 2.5 a 3 mm (Coronado et al., 2013). En estado inmaduro los frutos del chiltepín presentan una coloración verde para después tornarse a color rojo. Las plantas alcanzan su madurez reproductiva entre los seis y diez meses de edad, teniendo una etapa de floración en los meses de mayo a agosto y la fructificación de junio a octubre (Gentry, 1942). La planta vive en lugares serranos, depende de una temperatura entre 15 y 30 °C, luz (fotoperiodo de 14 horas oscuridad y 10 horas luz), humedad relativa entre 75-100% (Villalón et al., 2013). Para su óptimo crecimiento requiere de una vegetación denominada matorral arborescente de tipo espinoso en selvas bajas caducifolias (Montoya – Ballesteros, 2010). Por otra parte, Nabhan et al. (1990) establece el desarrollo de la especie en sitios montañosos cercanos a márgenes de arroyos y cañones, bajo la protección de árboles. Estos datos concuerdan con lo establecido por Bañuelos et al., (2008) quien hace referencia a una asociación vegetal típica de la var. *glabriusculum* hacia plantas nodrizas que crean un microclima que favorece la sobrevivencia de las plántulas, tal como Tepeguaje (*Lysiloma watsonii*), Mezquite (*Prosopis velutina*), Cumaro (*Celtis reticulata*) y el Garambullo (*Celtis pallida*) principalmente; esto para la región de Sonora.

Aun cuando se han realizado esfuerzos para propagar a las plantas de Chiltepín, su domesticación ha sido complicada. Esto debido a que el chiltepín requiere de cierto tipo de suelo, humedad y sombra, condiciones que solo se las brinda el medio ambiente natural. El Chiltepín que se siembra en maceta no tiene la forma, el color, el tamaño ni el sabor de los que se dan en la sierra (Bañuelos et al., 2008).

No obstante, la semilla puede germinar en un ambiente natural después de haber sido previamente ingerida por las aves, pasando por su tracto digestivo y defecarlas, contribuyendo de esta manera a su distribución y germinación (Bañuelos et al., 2008). Las semillas de Chiltepín pueden presentar una latencia exógena por la presencia de compuestos químicos en la cubierta externa de la semilla, los cuales inhiben la germinación. Por lo que el consumo del fruto y el paso de las semillas por el tracto digestivo de las aves, "lava" los inhibidores de la testa permitiendo su germinación. Este tipo de latencia se ha observado en las semillas de pitaya agria (*Stenocereus gummosus*), por lo que para germinar deben ser ingeridas por aves como el pájaro carpintero (*Melanerpes uropygialis*) (Rojas-Aréchila et al., 2001). Nota: "Aréchila" no coincide con la referencia

En condiciones experimentales, la germinación varía según los diferentes parámetros físico-químicos (temperatura, humedad, luz y fitohormonas). Estudios recientes involucran el uso de fitohormonas como el ácido giberélico (AG), el cual está implicado directamente en el control y promoción de la germinación de las semillas. En este sentido, Hernández (2004), evaluó el efecto de 500 ppm de ácido giberélico sobre semillas de Chiltepín en cajas de petri, enriquecidas con agar.

Se observó que las semillas tratadas con ácido giberélico en condiciones de 10 horas (h) luz, germinan en un 45.43%. Similares resultados fueron reportados por Araiza-Lizarde et al. (2011), quienes demostraron un incremento en la germinación de las semillas del 90% al emplear una dosis de 400 ppm por 20 h, confirmando la efectividad del ácido giberélico. No obstante los estudios sobre germinación de Chiltepín en México, muestran resultados contrastantes. Estudios realizados por Almanza (1998) encontraron que el uso de dosis de 10 ppm de AG en la germinación de semillas de Chiltepín, los porcentajes de germinación fueron alrededor del 4%. En contraste, Ramírez-Meraz et al. (2003), emplearon 5 000 ppm de AG y lograron un 66% de germinación, mientras que Hernández-Verdugo et al. (2006), encontraron menor efectividad con 250 y 500 ppm de AG, con promedios de 46 y 43% de germinación en dos años estudio con semilla de chile silvestre. Por su parte, García-Federico et al. (2010), demostraron que el tratamiento de semillas de Chiltepín con productos comerciales de AG e hidrotermia provocaron un efecto benéfico en dos variantes de la calidad fisiológica de la semilla chile piquín (germinación y vigor de la semilla). Así mismo, De la Rosa et al. (2012), reportan que la exposición previa de semillas de chile simojovel a NaCl, y subsiguiente tratamiento con ácido giberélico (300 ppm), incrementó significativamente la germinación de dichas semillas (91.75%). Finalmente, estudios encaminados a evaluar el efecto de las fitohormonas sobre la calidad del fruto y compuestos bioactivos presentes en Chiltepín son necesarios.

Estudios realizados por Vergara (1982) demostraron que el uso de fitohormonas en concentraciones de 100 a 500 ppm, pueden favorecer el desarrollo de plántulas de Chiltepín con malformaciones, con bajo vigor y muerte en los primeros días.

2.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN EL GÉNERO *Capsicum*

Los chiles son ampliamente consumidos en el mundo en forma de alimentos y como aditivos en la industria alimentaria. Las especies de *Capsicum* han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades o malestares como artritis, reumatismo, malestares estomacales, problemas dermatológicos, etc., formando parte esencial en la medicina tradicional de diversas regiones como la India, América y China.

Las propiedades medicinales de las especies de *Capsicum* están relacionadas con la presencia de compuestos bioactivos como capsaicinoides, compuestos fenólicos, y carotenoides, entre otros, presentes en los frutos de los chiles (Obboh y Rocha, 2008; Adedayo et al., 2010). Diversos estudios han demostrado que especies de *Capsicum* contienen una amplia gama de compuestos fitoquímicos como las vitaminas C, A y E, compuestos fenólicos, capsaicinoides y carotenoides con propiedades antioxidantes y/o antimicrobianas.

Por otra parte, autores como Ribeiro et al. (2007) mencionan la presencia de péptidos antimicrobianos en *Capsicum annuum* L., que pueden actuar sobre la organización celular de la pared celular de ciertas levaduras de importancia médica afectando la formación de pseudohifa, representando una alternativa para la generación de nuevos medicamentos.

2.3.1. CAPSAICINOIDES PRESENTES EN *Capsicum*

El consumo de chile se debe principalmente a su sabor pungente o picante, causado por la presencia de capsaicinoides. Las diferentes especies de *Capsicum* pueden variar en grado de picor, lo que se relaciona con la capacidad de acumular capsaicinoides. El chile habanero (*Capsicum chinense*) es considerado el de mayor picor. Sin embargo, algunas variedades de *Capsicum* pueden alcanzar niveles similares, como es el caso del Chiltepín (Montoya-Ballesteros et al. 2010).

Los principales capsaicinoides son capsaicina, dihidrocapsaicina, norcapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina, los cuales se diferencian por la longitud de sus cadenas alifáticas (Lambert y Sum, 2006). De estos compuestos, la capsaicina (N-((4-hidroxi-3-metoxifenil)metil)-8-metil(6-nonenamida) y la dihidrocapsaicina (N-((4-hidroxi-3-metoxi-fenil)metil)-8-metilnonanamida) aportan más de 90% del total del picor (Manirakiza et al. 2003). Los capsaicinoides se sintetizan y acumulan en el tejido de la placenta. Su estructura química consiste en un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso. La porción fenólica es la vainillilamina, que se forma a partir de la fenilalanina por medio de la ruta de los fenilpropanoides, El ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina. Las diferencias estructurales de los diversos capsaicinoides residen en la naturaleza de la cadena lateral que puede ser de 9 u 11 carbonos de largo, con un número variable de enlaces dobles colocados en diferentes posiciones (Vázquez-Flota et al., 2007).

Los capsaicinoides, además de participar en el picor del fruto, son compuestos que presentan diferentes actividades biológicas con efectos benéficos para la salud humana, entre las que destacan la estimulación del sistema cardiovascular (Govindarajan y Sathyanarayana, 1991), la capacidad anti-inflamatoria (Anogianaki et al., 2006), y efecto anticancerígeno (Choi et al., 2006; Reyes-Escogido et al., 2011). Además es el ingrediente activo para armas de seguridad como gases lacrimógenos (Busker y van Helden, 1998). Estudios previos han reportado que la actividad biológica de estos compuestos depende de la longitud de la cadena lateral, la cual es alta principalmente entre los carbonos 8 y 9 (Barbero et al., 2010).

Por otra parte, se ha reportado la capacidad antioxidante de los capsaicinoides en diferentes tipos de chile, como en chile bell rojo (Guil-Guerrero et al., 2006), chile picante rojo (Materska y Perucka, 2005), jalapeños y serranos (Álvarez-Parrilla et al., 2011). Evidencias experimentales reportan que esta actividad antioxidante se debe a que actúan como donadores de hidrógeno.

Además de estas propiedades, los carotenoides presentan actividad antimicrobiana. Massod et al (1994) establecieron que la actividad antimicótica mostrada por *Capsicum annuum* se debió a la capsantina y la capsaicina. Wilson et al. (1997) reportaron que las variedades de *Capsicum annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens* inhibieron hasta en un 90% la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*. Similares resultados fueron registrados por Kraikruan et al (2008) quienes al probar diferentes concentraciones de capsaicina encontraron que la inhibición de la germinación del conidio de *Colletotrichum capsici*, ocurre a dosis de 50 ppm y 100 ppm.

Moreno-Limón et al. (2012), reportaron que los extractos de chile piquín (*Capsicum annum* L. var *aviculare*) inhibieron significativamente el crecimiento radial de *Aspergillus flavus*. Por su parte, Veloso et al (2013) reportaron la presencia de una actividad antimicrobiana de la capsaicina frente a cinco especies de hongos y nueve aislados de dos especies de oomycetos, sugiriendo que la cadena lateral de capsaicinoides presentan mayor actividad inhibitoria que la parte fenólica del compuesto.

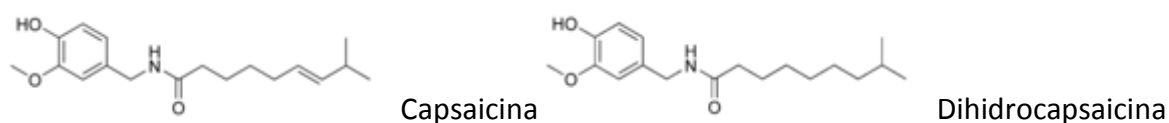


Figura 2.1. Estructura química de los capsaicinoides

2.3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN *Capsicum*

Las principales funciones de los compuestos fenólicos en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a diferentes tipos de estrés causados por agentes abióticos (radiación, sequía, sustancias químicas) y bióticos (ataque por patógenos), siendo secretados como mecanismo de defensa (Cohen y Kennedy, 2010). En general son sintetizados por la vía del ácido shikímico o la vía del ácido malónico. Su estructura química está conformada por anillos aromáticos con grupos hidroxilo; lo que les da una alta actividad antioxidante (Figura 2.1.). Son hidrosolubles, ya que en su mayoría están unidos a azúcares formando glucósidos (Chrestel et al., 2000).

Entre los compuestos fenólicos naturales se encuentran los fenoles monocíclicos, o ácidos fenólicos, los flavonoides, los fenilpropanoides, las quinonas fenólicas y las coumarinas.

Los ácidos fenólicos y los flavonoides se diferencian principalmente en que los ácidos fenólicos tienen un anillo único al que se le unen diversos grupos sustituyentes como grupos hidroxilo, carboxilo y metilo; mientras que los flavonoides están formados por más de dos anillos fenólicos (Croteau et al., 2000). Los ácidos fenólicos son derivados hidroxilados del ácido benzóico y del ácido cinámico. Los derivados del ácido benzóico son los ácidos protocatéico, gálico, vanílico, hidroxibenzóico y sirínico. Mientras que los ácidos derivados del cinámico son el caféico, ferúlico, *o*-cumárico, sináptico y *p*-cumárico (Mattila y Kumpulainen, 2002).

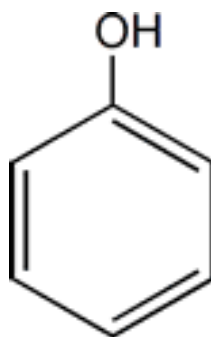


Figura 2.2. Estructura química del fenol.

Los flavonoides son polifenoles que poseen al menos 2 subunidades fenólicas (Figura 2.2.). Los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos (Robbins, 2003). Estos compuestos son derivados fenólicos sintetizados en cantidades sustanciales por las plantas.

Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2-fenilbenzopirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano.

La actividad antioxidante de los distintos grupos de compuestos depende de la estructura individual y del número de oxidrilos sustituyentes, así como del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C (Velioglu et al., 1998). Los taninos o polifenoles poliméricos tienen mayor actividad antioxidante que los fenoles monoméricos simples (Hagerman et al., 1998).

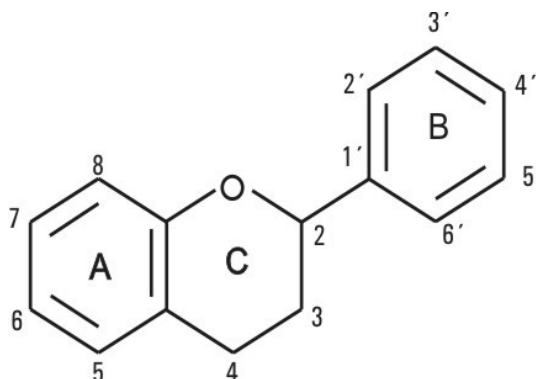


Figura 2.3. Estructura química básica de los flavonoides.

Los compuestos fenólicos están presentes en una gran diversidad de chiles, tanto en formas libres como unidas. Aquellos que presentan enlaces tipo β -glucósidos, pueden sobrevivir la digestión estomacal, logrando alcanzar el colon, lugar donde son liberados y ejercen su efecto benéfico (Oboh y Rocha, 2008).

Entre los compuestos fenólicos que contribuyen a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, así como actividad contra alergias, inflamación, hipertensión, artritis, entre otros, se encuentra el resveratrol, ácido gálico y quercetina (Yao et al., 2007).

Estudios recientes realizados por Materska y Perucka (2005) en el pericarpio de cuatro cultivares de *Capsicum annuum* L., encontraron que la fracción de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en estos cultivares participan de manera importante en la capacidad antioxidante de los frutos. Por su parte, Al-Fartosy y Zearah (2013) encontraron que flavonoides obtenidos de *Capsicum annum* L. mostraron efectos bactericidas frente a bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus aureus*) y negativas (*Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *E. coli*). No obstante, es importante considerar que el efecto de estos compuestos pueden variar de acuerdo al tipo de cultivar, estado de madurez, condiciones de cultivo y manipulación poscosecha, afectando la actividad antioxidante y antimicrobiana presente en los frutos (Alvarez-Parilla et al., 2011). Trabajos realizados por Butcher et al. (2012), demostraron la presencia de una variación en el contenido de flavonoides y capsaicinoides en frutos de seis cultivares de chile habanero al crecer en ambientes específicos. Lo cual abre la posibilidad de emplear las variaciones de estos compuestos en programas de mejoramiento de estos cultivares de chile habanero u otras especies de *Capsicum*.

Por su parte, Khan et al. (2013), encontraron que el establecimiento de asociaciones de hongos endófitos (*Penicillium resedanum* LK6) con plantas de chile (*Capsicum annuum* L.), también pueden favorecer la síntesis de flavonoides como daidzina, daidzeina y m-glicitina, los cuales ayudan a disminuir el efecto de altas temperaturas en la planta, al reducir procesos de lipoperoxidación

2.3.2. CAROTENOIDES EN *Capsicum*

Los carotenoides son un grupo de compuestos bioactivos de gran importancia en diversos organismos. Estos compuestos son importantes pigmentos naturales encontrados en una amplia diversidad de plantas, algas, bacterias y hongos, además de algunos animales (Hornero-Méndez et al., 2000). En organismos fotosintéticos, están presentes en un complejo denominado pigmento-proteína de los fotosistemas; donde atrapan la luz y transfieren la energía a las clorofilas, jugando un papel importante como foto- protección de las moléculas clorofílicas (Hirschberg, 2001). Estos son responsables de los colores atractivos en flores, frutas y vegetales; coloración amarilla, naranja y rojo (Deli et al., 2001). Además juegan un importante papel en atraer animales para actuar como polinizadores y agentes de dispersión a través de las semillas. En su consumo por el ser humano, presentan acciones biológicas como antioxidantes, que al atrapar radicales libres, logran reducir el riesgo de enfermedades crónico degenerativas. Además, algunos de ellos (β - caroteno, β - criptoxantina, etcétera) tienen actividad de provitamina A (Della y Pogson, 2006).

Las actividades de protección antioxidante incluyen la desactivación de los radicales libres y la captura de especies de oxígeno reactivas como el oxígeno molecular singulete. Químicamente los carotenoides son tetraterpenoides de 40 átomos de carbono, una estructura simétrica y lineal formada por ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos. Su biosíntesis es a partir de isopentenil pirofosfato, lo que produce características estructurales más evidentes, presencia de dobles enlaces conjugados, así como ramificaciones de grupos metilo; situados en posiciones constantes (Bartley y Scolnik, 1995; Maoka et al., 2001).

Existen dos clasificaciones importantes de los carotenoides: carotenos (β - caroteno, α - caroteno, licopeno) y xantofilas (luteína, zeaxantina, capsantina, capsorubina), diferenciándose en que el primer grupo contiene carbono e hidrógeno, en tanto que el segundo posee además oxígeno (Bartley y Scolnik, 1995; Maoka et al., 2001).

Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides que se encuentran naturalmente. El caroteno de mayor importancia en las plantas es el β - caroteno, la luteína y la xantofila. De las especies de carotenos asociadas a los chiles del género *Capsicum*, se encuentran: α y β -caroteno como precursor de vitamina A, violaxantina, capsantina, capsorubina, y capsantina 5,6-epóxido (Wall et al., 2001). En el proceso de maduración de las especies del género *Capsicum*, se induce la síntesis de carotenoides, los cuales contienen nueve enlaces dobles conjugados en la cadena central poliénica con diferentes grupos finales (Hornero-Méndez et al., 2002). Esto conduce a cambios en las propiedades del cromóforo de cada pigmento, lo que permite tener dos clasificaciones isocromáticas: rojo y amarillo (Hornero-Méndez et al., 2000).

La fracción roja en los chiles del género *Capsicum* está representada por la capsantina, capsorubina y capsantina-5,6 epóxido principalmente; en tanto que la fracción amarilla comprende zeaxantina, violaxantina, β -caroteno, y β -criptoxantina (Hornero- Méndez et al., 2000).

Por otra parte, Hervert-Hernández et al. (2010) encontraron que durante la digestión *in vitro* de frutos de chile de árbol, chipotle, morita y guajillo, la presencia de β -caroteno y zeaxantina, representan los principales compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes. Similares resultados fueron registrados por Collera-Zuñiga et al. (2005), quienes al evaluar la composición de carotenoides de tres variedades comerciales de *Capsicum annuum* (ancho, guajillo y mulato) encontraron que los principales carotenoides fueron β -caroteno y β -cryptoxanthina, los cuales son precursores de la vitamina A.

Estudios recientes muestran la presencia de una variación existente entre *Capsicum chinense*, *C. annuum*, y *C. frutescens* en donde cultivares de coloración roja presentan altos niveles de β -caroteno. En contraste, los chiles tipo Serrano, Tabasco y Jalapeño presentan altos valores de capsantina y ausencia de β -caroteno (Giuffrida et al., 2013). Lo cual indica que la especie de *Capsicum* puede influir sobre la presencia y concentración de un compuesto bioactivo específico en los frutos de *Capsicum*. Los carotenoides presentes en *Capsicum* que han mostrado un efecto sobre el crecimiento de hongos (*Aspergillus flavus*) y la producción de sus toxinas (aflatoxinas) son capsantina y capsorubina (Santos et al., 2010).

Lo anterior ha sido previamente confirmado por Singh y Chittende (2008), quienes observaron que extractos de *Capsicum* ricos en capsaicina presentaron un efecto antimicótico sobre los hongos *Sphaeropsis sapinea* y *Leptographium procerum* en condiciones *in vitro*. Por otra parte, Xing et al. (2006) demostraron que microcápsulas de capsaicina tienen actividad antimicótica contra hongos filamentosos como *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger* a concentraciones de $590 \mu\text{g mL}^{-1}$. En donde el modo de acción de este compuesto puede ser debido a que la capsaicina podría alterar la permeabilidad de la membrana y generar una disrupción de la membrana del microorganismo (Tsuchiya, 2001). En contraste, Fieira et al. (2013), observaron que el uso de la capsaicina en concentraciones de $122.16 \mu\text{g mL}^{-1}$, no reduce la incidencia del moho azul cuando se aplica a manzanas, únicamente retrasa el crecimiento del hongo en los primeros 14 días del ensayo *in vivo*.

Estos resultados podrían ser debido a propiedades del fruto como nivel de pH, y nutrientes presentes como vitaminas y minerales (Vasanth et al., 2006). En este sentido Kurita et al., (2002) sugieren el uso de técnicas de biología molecular como microarreglos de ADN, para analizar el mecanismo antimicrobiano de la capsaicina y la posible relación entre genes claves de estrés osmótico y la biosíntesis de la membrana celular.

2.3.3. SAPONINAS EN *Capsicum*

Las saponinas son una familia de metabolitos secundarios que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Su nombre procede del Latín “Sapo”, debido a las propiedades detergentes que presenta.

Las saponinas son consideradas moléculas glicoalcaloides esteroidales o esteroides, triterpenoides constitutivos con una o más cadenas de azúcares. Sus partes de glicona son principalmente oligosacáridos, dispuestos ya sea de una forma lineal o ramificada, adheridos a grupos hidroxilo a través de una unión acetal (Vincken et al., 2007).

Los triterpenos de saponinas se encuentran distribuidos de forma natural en diferentes partes de plantas dicotiledóneas, mientras que las saponinas esteroidales son menos distribuidas y usualmente se observan en familias de monocotiledóneas, específicamente en *Dioscoreaceae*, *Agavaceae* y *Liliaceae* (Lanzotti, 2006; Podolak et al., 2010). En las plantas la presencia de estos compuestos está relacionada con su sistema de defensa; ya que diversos estudios han mostrado que extractos de plantas ricos en saponinas poseen actividad antimicótica (Barile et al., 2007).

En *Capsicum*, estudios realizados por De Lucca et al. (2002) aislaron de frutos secos de *Capsicum frutescens* L. la saponina CAY- 1, la cual es una saponina tipo esteroidal basada en gitogenina y cuya estructura química la conforman cuatro glucosas y una galactosa adheridas al carbono número tres del grupo esteroidal.

Esta saponina en estudios *in vitro* ha mostrado su actividad antimicótica en concentraciones menores de 20 μ M frente a una amplia diversidad de patógenos tal como: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Colletotrichum* sp, *Botrytis* sp, *Candida albicans*, *Pneumocystis carinii*, *Phomopsis obscurans*, *P. viticola*, *Trichophyton* y *Microsporon canis* (Renault et al., 2003; Stergiopoulou et al., 2006).

En donde el mecanismo de acción de la saponina CA-1 está asociado con su habilidad para interactuar con esteroides presentes en la membrana del hongo y causar pérdida en la integridad celular formando poros transmembranales (Podolak et al., 2010). No obstante, aun cuando existe evidencia científica sobre la actividad antimicótica de las saponinas, éstas han sido realizadas principalmente en levaduras y hongos de importancia médica y pocos estudios se han llevado a cabo en hongos de importancia agrícola.

2.4. CONCLUSIONES

Existe información actualizada sobre el incremento de la germinación del Chiltepín en condiciones controladas. Es necesario el desarrollo de trabajos encaminados a evaluar los efectos en el crecimiento, sugiriéndose para ello nuevas investigaciones con la finalidad de analizar la calidad del fruto y sus semillas.

Asimismo, existe información científica limitada sobre el contenido de compuestos bioactivos en Chiltepín, sus propiedades antioxidantes y sus posibles efectos en el control de enfermedades postcosecha. Sus propiedades en el control de microorganismos están relacionadas con la presencia de compuestos bioactivos como saponinas, compuestos fenólicos y carotenoides. La actividad biológica de los compuestos bioactivos presentes en el género *Capsicum* puede variar de acuerdo al tipo de cultivar, estado de madurez, condiciones de cultivo y manipulación poscosecha afectando la actividad biológica en los frutos. Estudios futuros deben ser encaminados en la evaluación del impacto de las condiciones edafoclimáticas en el contenido y actividad biológica de los compuestos bioactivos en las especies de *Capsicum*, específicamente del Chiltepín.

CAPITULO III

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CHILTEPÍN (*Capsicum annuum* *var. glabriusculum*)

RESUMEN

Los compuestos fenólicos, carotenoides (rojos y amarillos), color extractable (pigmentos totales) y actividad antioxidante en frutos de Chiltepín y Habanero fueron investigados. El chile Habanero fue significativamente alto en el contenido de fenoles (5.92 ± 0.47 mg EAG/g p.s.) que el chile Chiltepín (4.85 ± 0.23 mg EAG/ g p.s.). Por otra parte, el contenido más alto en cuanto a actividad antioxidante fue encontrado en el chile Chiltepín (11.10 ± 1.6 mg de EAG/ g de peso seco). En contraste, el chile Habanero presentó los valores más bajos de actividad antioxidante total. En este sentido, el chile Habanero presentó el contenido más bajo (14 mg/ g de peso seco) de carotenoides (fracción isocromática amarilla); mientras que en el chile Chiltepín se encontraron niveles más altos de la fracción isocromática amarilla (36 mg/ g de peso seco). Finalmente, el Chiltepín presentó el valor más alto de color extractable (80 unidades ASTA) que el Habanero (40 unidades ASTA). Por lo tanto, el chile Chiltepín y Habanero son buenos prospectos para desarrollar variedades con niveles altos de compuestos bioactivos.

Palabras clave: chile Chiltepín, chile Habanero, compuestos fenólicos, contenido de carotenoides, color extractable, actividad antioxidante.

3.1. INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN), son esenciales para el suministro de energía, desintoxicación, señales químicas y función inmune (Rodríguez-Maturino *et al.*, 2012). Son continuamente producidos en el cuerpo humano y controlados por enzimas endógenas (superóxido dismutasa, peroxidasa glutatión y catalasa). No obstante, cuando existe una sobre-producción de estas especies, una exposición a sustancias oxidantes externas o un fallo en los mecanismos de defensa; el daño a biomoléculas valiosas (ADN, lípidos, proteínas) puede ocurrir (Aruoma, 1998). Diversos estudios han demostrado que el consumo de vegetales, frutas o sus derivados proporcionan una amplia variedad de sustancias fitoquímicas (antioxidantes) que pueden estar asociadas con la reducción de enfermedades degenerativas como diabetes, riesgo coronario, y ciertos tipos de cáncer (Tamimi *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007).

Entre los diversos fitoquímicos que pueden estar presentes en las plantas, se tiene a los compuestos fenólicos en formas libres y unidas. Los de tipo unido, principalmente en la forma de β - glucósidos, presentan una estructura que les permite mantenerse estables durante su paso en el sistema digestivo humano, lo cual garantiza que lleguen al colon intactos para posteriormente ser absorbidos y ejercer su bioactividad (Oboh y Rocha, 2007). Entre las hortalizas que representan un alto impacto por su valor comercial y cultural se tiene al chile (*Capsicum annuum* L.) (Valadez- Bustos, 2009).

Los frutos de las especies de chile son conocidas por ser una fuente importante de compuestos bioactivos como carotenoides y compuestos fenólicos que desempeñan un papel relevante como precursores de vitamina A y como antioxidantes (Antonious *et al.*, 2006). Se conocen alrededor de 20 a 30 especies de *Capsicum* pero únicamente cinco (*Capsicum annuum* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L. y *C. pubescens* Ruiz & Pavon) han sido domesticadas y cultivadas (Pino *et al.*, 2006).

Entre las plantas de la familia Solanacea, el chile Chiltepín (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*) es cosechado y consumido principalmente en la parte noroeste de México. En contra parte, el consumo del fruto del chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) se limita principalmente a la región suroeste de México. En estudios recientes, Forero *et al.* (2009) determinó en el chiltepín que el contenido de compuestos volátiles (hexil isopentanoato, hexil 2- metilbutanoato, limoneno, hexil isohexanoato, (E)-2- hexanal, isopentil isopentanoato y (Z)- 3- hexenil isopentanoato) es mucho mayor en etapas verdes que en frutos rojos. Por otra parte, Montoya- Ballesteros *et al.* (2010) observó que frutos de chiltepín en etapas de madurez rojas y verdes presentaron diferencias en el color, pungencia, así como en el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina.

En tanto, Antonious *et al.* (2006) reportaron que frutos de chile Habanero son conocidos por ser excelentes fuentes de fitoquímicos, incluyendo vitaminas A y C, compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides. Adicionalmente, varios estudios han estimado que el género *Capsicum*, son el segundo vegetal mas consumido por la población Mexicana después de los tomates con un consumo de aproximadamente 7 a 9 kg/ persona por año (Ornelas-Paz *et al.*, 2008; Álvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

Por lo tanto, es importante caracterizar el contenido de compuestos bioactivos de ambas especies, principalmente del Chiltepín que es consumido por la población mexicana. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar los compuestos fenólicos, color extractable (pigmentos totales) y actividad antioxidante presente en frutos deshidratados de chile Chiltepín y su respectiva comparación con el chile Habanero.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. COLECTA DE FRUTOS

Frutos frescos de Chiltepín (*C. annuum* L. var. *glabriusculum*) y Habanero (*C. chinense*) respectivamente, fueron comprados en mercados regionales de Mexicali, México. Los frutos de cada tipo de chile fueron lavados, y la porción comestible de muestras frescas fueron secadas usando un horno eléctrico de convección forzada a 65 °C por 24 horas.

3.2.2. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles totales en frutos de ambos tipos de chile fue determinado con el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo al método de Slinkard y Singleton (1977), modificado por Khandaker *et al.* (2008), usando ácido gálico como un compuesto fenólico estándar. Para ello, 300 mg de biomasa seca fue macerada en un tubo eppendorf, con 1.5 mL de metanol (80%), a 4 °C y centrifugados a 14000 rpm. La mezcla de reacción consistió de mezclar 30 µL del extracto obtenido con 90 µL de Na₂CO₃ y 150 µL del reactivo Folin- Ciocalteu en un microplato con 96 pozos.

Después de 30 minutos, las lecturas de absorbancia fueron realizadas a una longitud de onda de 725 nm en un espectrofotómetro KC- 4 (Biotek 2[®] Instruments, Inc. Winooski, Vt.). El contenido de fenoles totales de muestra fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/ g p.s.) a través de la curva de calibración con ácido gálico (0 a 300 µg/ mL).

3.2.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Este ensayo está basado sobre la reducción del Mo (VI) a Mo (V) por el extracto y subsecuente formación de un complejo verde fosfato/ Mo (V) a pH ácido (Prieto *et al.*, 1999). El extracto (0.1 mL) fue mezclado con 3 mL de la solución reductora (0.6 M ácido sulfúrico, 28 mM de fosfato de sodio y 4 Mm de molibdato de amonio). Los tubos fueron incubados a 95 °C por 90 minutos. La mezcla fue enfriada a temperatura ambiente, y la absorbancia de la solución fue leída a 725 nm (Thermo Scientific Genesys 20) contra el blanco. La capacidad antioxidante fue expresada como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco (mg EAG/ g peso seco).

3.2.4. MEDICIONES DEL COLOR EXTRACTABLE

La determinación se realizó de acuerdo al proceso metodológico propuesto por The American Spice Trade Association (ASTA). Muestras individuales de 0.3 g de frutos de ambos chiles previamente molidos fueron mantenidos en 100 mL de acetona (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA).

La mezcla fue agitada y mantenida en oscuridad por un periodo de 6 horas a temperatura ambiente. Una alícuota de esta solución fue usada para la medición espectrofotométrica (Thermo Scientific Genesys 20) a 460 nm. Las unidades ASTA fueron calculadas de la siguiente manera: $ASTA\ 20 = \frac{Absorbancia}{16.4 \times l \times Peso\ de\ la\ muestra\ (g)}$

Donde l es un factor de corrección para el aparato, el cual es calculado de la absorbancia de una solución estándar de dicromato de potasio, sulfato de amonio y sulfato de cobalto.

3.2.5. MEDICIONES DE CAROTENOIDES ROJOS Y AMARILLOS.

Las fracciones isocromáticas de carotenoides rojos (R= capsantina y capsorrubina) y amarillos (A= β - caroteno, β - criptoxantina, zeaxantina) de carotenoides totales fueron evaluadas de acuerdo al método reportado por Hornero- Méndez y Mínguez- Mosquera (2001). Los carotenoides de Chiltepín y Habanero fueron extraídos de muestras deshidratadas colocando 300 mg de muestra en 30 mL de acetona con agitación constante por una hora en oscuridad. La mezcla homogenizada fue centrifugada a 6000 rpm por cinco minutos. El sobrenadante fue separado y la absorbancia fue leída a 472 (amarillo) y 508 (rojo) nm usando un espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 20). Las mediciones de carotenoides rojos y amarillos fueron expresadas como mg/ 100 g de peso seco.

3.2.6. SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CAROTENOIDES DE CHILTEPÍN

La separación y cuantificación de los carotenoides se realizó con el método desarrollado por Mínguez-Mosquera y Hornero-Méndez (1994). El método emplea una columna de fase reversa de C_{18} y un sistema de elución binario de acetona y agua.

La metodología fue la propuesta por Hornero-Méndez *et al.*, (2000), usando inicialmente 75% de acetona e incrementándose la concentración hasta 95% por 5 min, manteniendo la concentración por 7 min. La velocidad de flujo fue de 1.5 mL/min, y la inyección de la muestra fue de 20 µL y medida a 450 nm. Los carotenoides se identificaron comparando sus tiempos de retención con los obtenidos para los estándares comerciales: capsantina, α -caroteno y β -caroteno (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO.).

3.2.7. EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR HPLC EN CHILTEPÍN Y HABANERO

Los compuestos fenólicos presentes en Chiltepín y Habanero fueron obtenidos mediante una extracción metanólica. Para ello se pesaron 300 mg de biomasa y se mezcló con una solución de metanol conteniendo 2 g/L de 2,3 ter-butil-4-hidroxianisol (BTH) y 10% de ácido acético en una proporción de 85:15 (v/v). La mezcla se sónico por 30 min y se llevó a 10 mL con agua grado HPLC. El producto obtenido se pasó a través de un filtro de 0.2 µm (Millipore Co., MA, USA). El filtrado se recolectó en un tubo de 1.5 mL y se guardaron hasta su uso a -20 °C cubierto con aluminio para mantener la estabilidad de los compuestos fenólicos.

La detección de los compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con gradiente de elución (GEHPLC), con una bomba de HPLC cuaternaria modelo 9012 equipada con un detector UV modelo 9050 y una columna Prodigy 5u ODS3 100A (250 mm longitud, 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula) (Ruelas et al., 2006; Sánchez-Estrada et al., 2009).

Se utilizaron dos métodos para la separación de los compuestos fenólicos: a) ácidos fenólicos y b) flavonoides. Para la separación de los ácidos fenólicos se utilizó el gradiente de elución mostrado en la tabla 3.1 (Ruelas et al., 2006), empleando metanol grado HPLC J. T. Baker (solución A) y ácido fórmico al 5% más 95% de agua grado HPLC (solución B). Se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min y se detecta a una longitud de onda de 280 nm. Los ácidos fenólicos se identificaron comparando sus tiempos de retención con los obtenidos para los estándares comerciales: ácido gálico, ácido hidrobénzoico, ácido vanílico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido felúrico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico, ácido *o*-coumarico, y ácido cinámico (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO, USA).

En el segundo métodos, los flavonoides se separaron utilizando el gradiente de elución mostrado en la tabla 3.2, empleando 95% de metanol grado HPLC (J. T. Baker) más 5% de acetonitrilo (solución A) y ácido fórmico al 5% más 95% de agua grado HPLC (solución B). Se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min y se detectó a una longitud de onda de 270 nm (Justesen et al., 1998; Cervantes-García et al., 2013).

Los flavonoides se identificaron comparando sus tiempos de retención con los obtenidos para los estándares comerciales: naringenina, kaempferol, rutina y quercetina (Sigma-Aldrich Chemical Co. St. Louis, MO.).

Tabla 3.1. Gradiente de elución para ácidos fenólicos.

Tiempo (min)	Solvente A (Metanol 100%)	Solvente B (Ácido fórmico 5% + Agua 95%)
0	12%	88%
8	24%	76%
22	24%	76%
32	36%	64%
33	36%	64%
42	48%	52%
43	12%	88%
50	12%	88%

Fuente: Modificado de Ruelas et al. (2006).

Tabla 3.2. Gradiente de elución para la separación de flavonoides.

Tiempo (min)	Solvente A (Metanol 95% + Acetonitrilo 5%)	Solvente B (Ácido fórmico 5% + Agua 95%)
0	15%	85%
5	15%	85%
10	30%	70%
15	32%	68%
22	33%	67%
27	50%	50%
39	95%	5%
46	95%	5%
50	15%	85%

Fuente: Modificado de Justesen et al., (1998).

3.2.8. Análisis Estadístico

Las diferencias significativas entre muestras de frutos de Chiltepín y Habanero fueron analizadas usando el programa Kruskal–Wallis (Statistical Package versión 5.5, Statsoft, USA).

3.3 RESULTADOS

3.3.1. CONTENIDO DE FENOLES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

En este estudio, variaciones significativas fueron observadas en el contenido de compuestos fenoles totales de diferentes especies seleccionadas de *Capsicum*. En la Figura 3.1a, se puede observar que el contenido de fenoles totales en Chiltepín (4.85 ± 0.23 mg EAG/g peso seco) fue significativamente menor comparado a frutos de Habanero (5.92 ± 0.47 mg EAG/g peso seco).

Por otro lado, en la evaluación de la actividad antioxidante total, el chile Chiltepín (11.10 ± 1.6 mg de EAG /g de Peso Seco) presentó actividades antioxidantes significativas ($p < 0.05$) con respecto al chile Habanero (8.20 ± 0.6 mg of EAG /g de peso seco) que presentó valores bajos de actividad antioxidante total (Figura 3.1b). En este sentido, el orden de actividad antioxidante total de los extractos de los chiles puede ser visto como Chiltepín > Habanero.

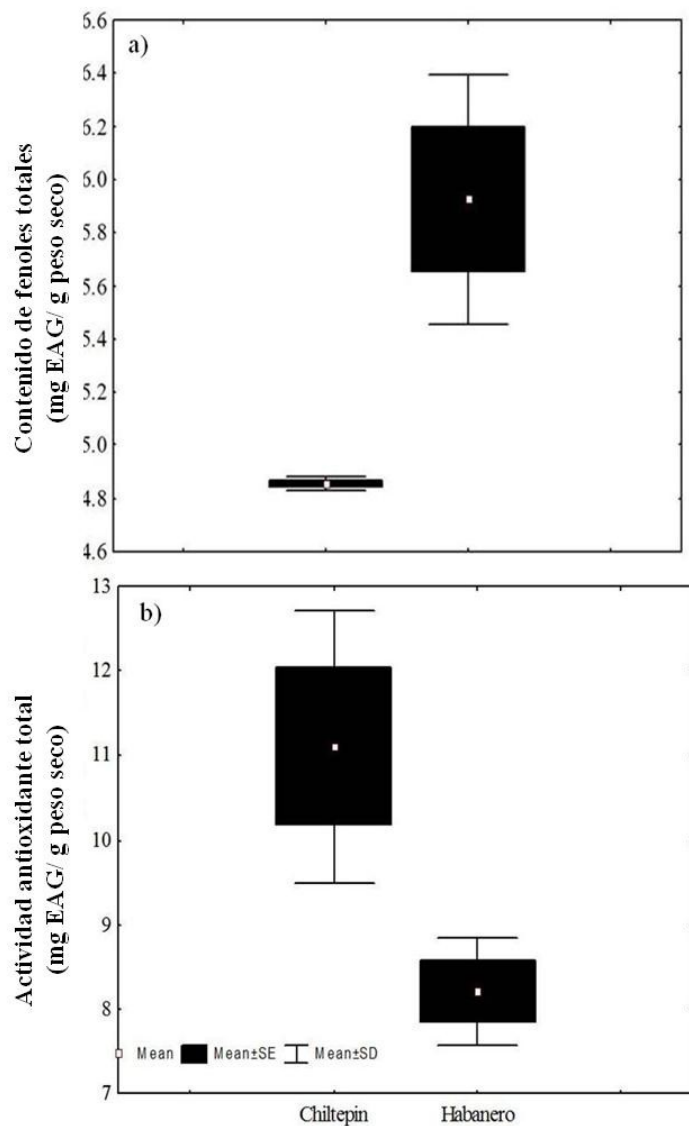


Figura 3.1 Contenido de fenoles totales (a) y actividad antioxidante total (b) de chile Chiltepin y Habanero.

3.3.2. CONTENIDO DE CAROTENOIDES ROJOS Y AMARILLOS

Los carotenoides están ampliamente distribuidos en la naturaleza, los cuales tienen importantes funciones en las plantas. En el presente estudio, los resultados del análisis presentan que el Chiltepin tiene niveles altos de carotenoides, con respecto a chile Habanero,

particularmente en términos de fracción isocromática amarilla lo cual incluye carotenoides de la Pro- vitamina A (β - caroteno y β - criptoxantina) y en menor concentración la fracción roja isocromática la cual incluye capsantina y capsorubina (Fig. 3.2.) El análisis no paramétrico ANOVA Kruskal–Wallis presentó diferencias significativas en concentraciones unidades ASTA entre ellas para el Chiltepin ($p < 0.01$).

Figura 3.2 Valores de carotenoides (fracción roja isocrómica y fracción amarilla isocromica) de chile Chiltepín y Habanero, respectivamente. Medias $\pm$ ES; n = 3.

3.3.3. COLOR EXTRACTABLE

Alternativamente, los análisis del color extractable (Unidades ASTA 20) fueron usadas como medida del contenido total del pigmento. En el presente estudio el Chiltepín fue caracterizado por acumular altas concentraciones de unidades ASTA con respecto al chile Habanero (Fig. 3.3). El análisis no paramétrico ANOVA Kruskal–Wallis presentó diferencias significativas en concentraciones de unidades ASTA entre ellos ($P = 0.014$).

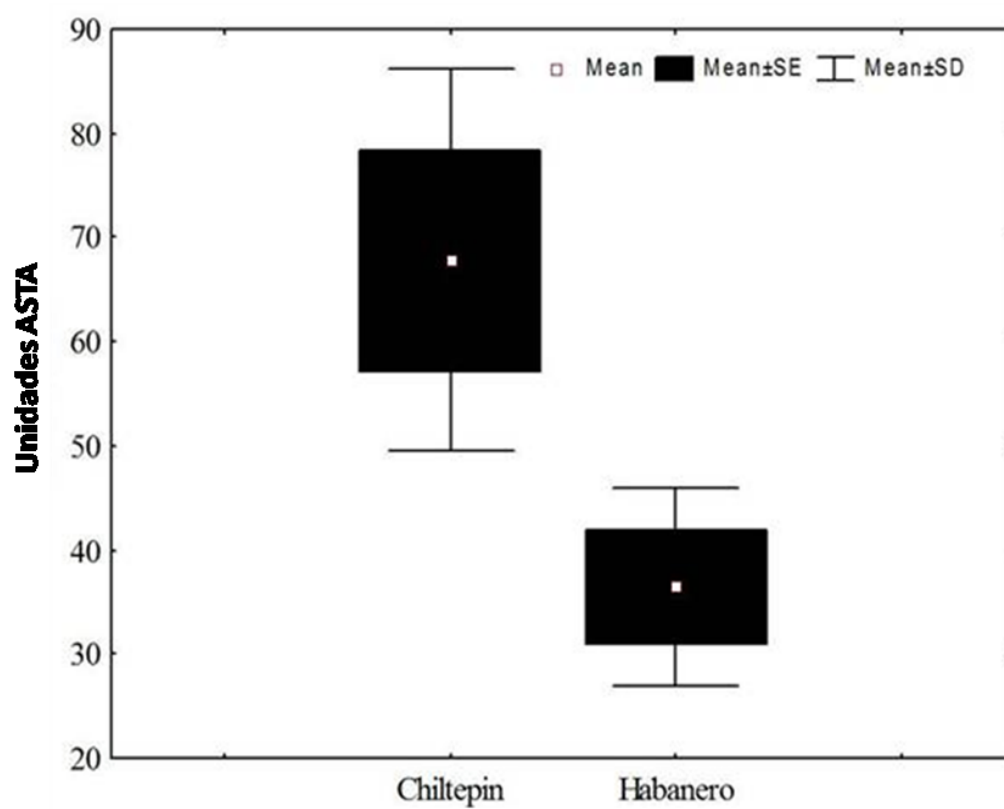


Figura 3.3 Cambio en el color extractable (unidades ASTA) de frutos de chile Chiltepín y Habanero. Medias $\pm$ ES; $n = 3$.

3.3.4. IDENTIFICACION DE CAROTENOIDES, ÁCIDOS FENÓLICOS, Y FLAVONOIDES EN CHILTEPÍN

En la figura 3.4, se muestra el cromatograma correspondiente a la separación de los estándares de los carotenoides por HPLC.

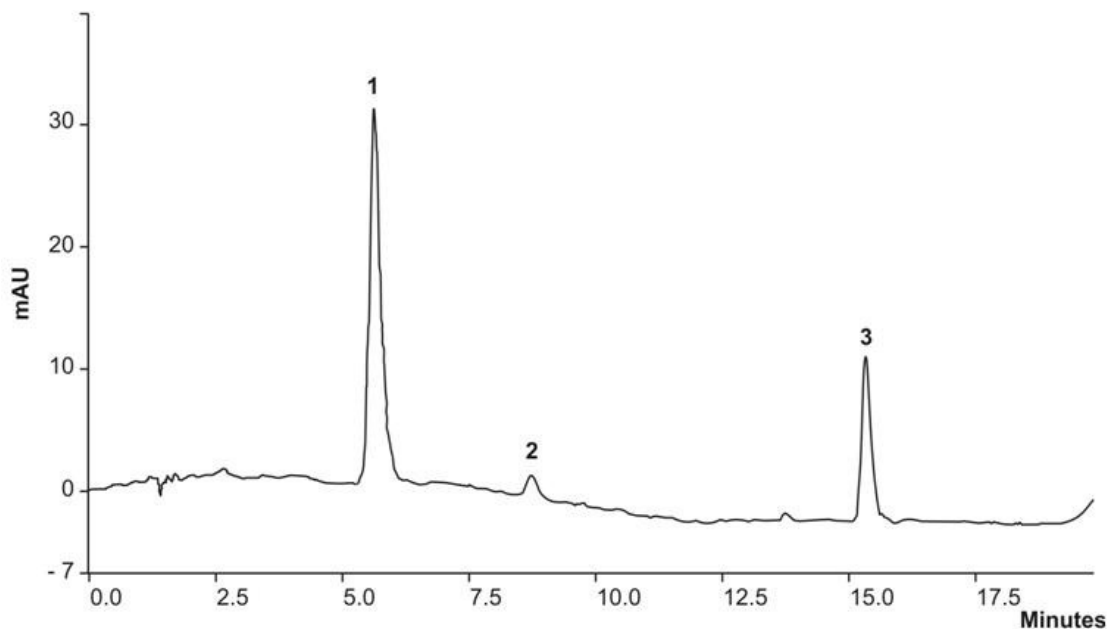


Figura 3.4. Cromatograma típico de HPLC de estándares de carotenoides a 450 nm. Picos: (1): capsantina; (2): α -caroteno y (3) β - caroteno.

Por otra parte, el análisis de los ácidos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución, permitió la detección de los siguientes estándares a los siguientes tiempos de retención: ácido gálico (4.12 min), ácido clorogénico (8.36 min), ácido caféico (9.914min), ácido *p*-cumárico (14.06 min), y ácido ferúlico (18.44 min) (Figura 3.5).

Al igual que en los ácidos fenólicos, el método utilizado para la detección de flavonoides por cromatografía líquida de alta (HPLC), permitió la separación de los estándares comerciales de flavonoides utilizados en este estudio (Figura 3.6.)

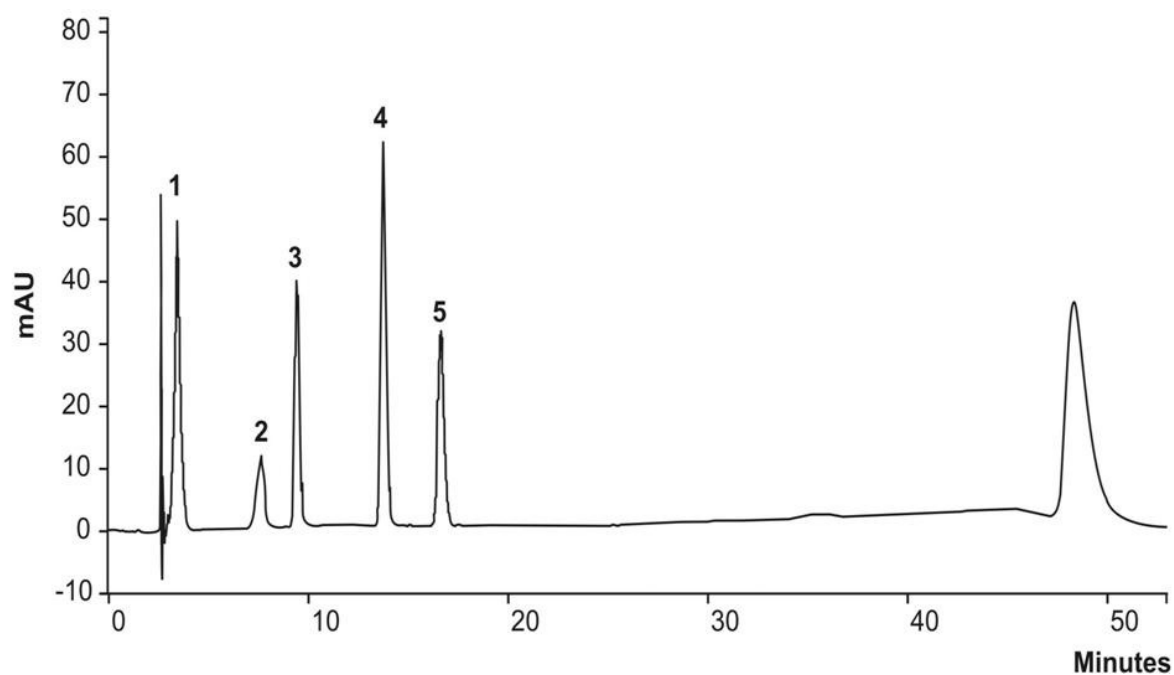


Figura 3.5. Cromatograma típico de HPLC de estándares de ácidos fenólicos a 280 nm. Picos (1): ácido gálico; (2): ácido clorogénico; (3) ácido cafeico; (4) ácido *p*-coumárico; (5) ácido ferúlico.

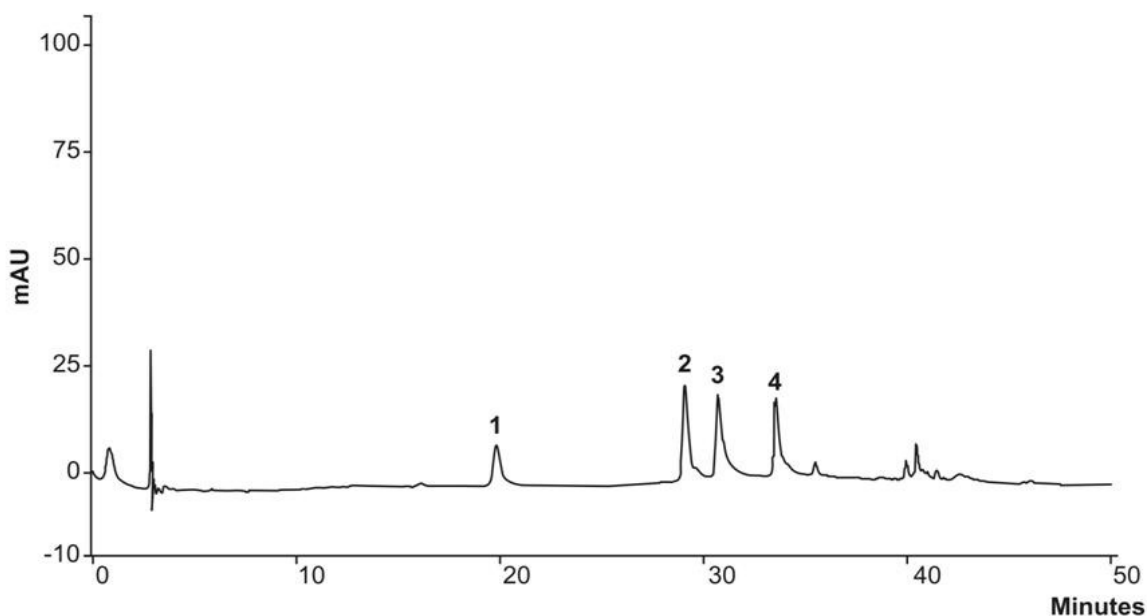


Figure 3.6. Cromatograma típico de HPLC de los estándares de flavonoides a 280 nm.

Picos: (1) rutina, (2) naringenina, (3) quercetina, (4) Kaempferol.

El análisis de los extractos de los frutos de Chitepín por HPLC permitió la detección de varios picos claramente definidos, los cuales al compararse con los tiempos de retención obtenidos con los estándares de carotenoides se identificó la presencia de capsantina y α -caroteno (Figura 3.7 a). Así mismo, en el caso de los ácidos fenólicos se identificó la presencia de los siguientes ácidos: gálico, caféico, y ferúlico (Figura 3.7 b).

En el caso de los flavonoides, el análisis del extracto de Chiltepin permitió la identificación de picos claramente definidos, los cuales al compararse con los tiempos de retención obtenidos en los estándares de flavonoides, se identificó la presencia de naringenina, y quercetina (Figura 3.7c).

Por otra parte, el análisis de los extractos de los frutos de Chile Habanero mediante HPLC permitió la detección de varios picos claramente definidos, los cuales correspondieron a los siguientes ácidos fenólicos: gálico, clorogénico, cafeico, vanílico, *p*-coumárico, hidroxibenzoico

y ferúlico (Figura 3.8a). Con respecto a los flavonoides presentes en los extractos de Habanero, el análisis mostro únicamente la presencia de quercetina (Figura 3.8 b).

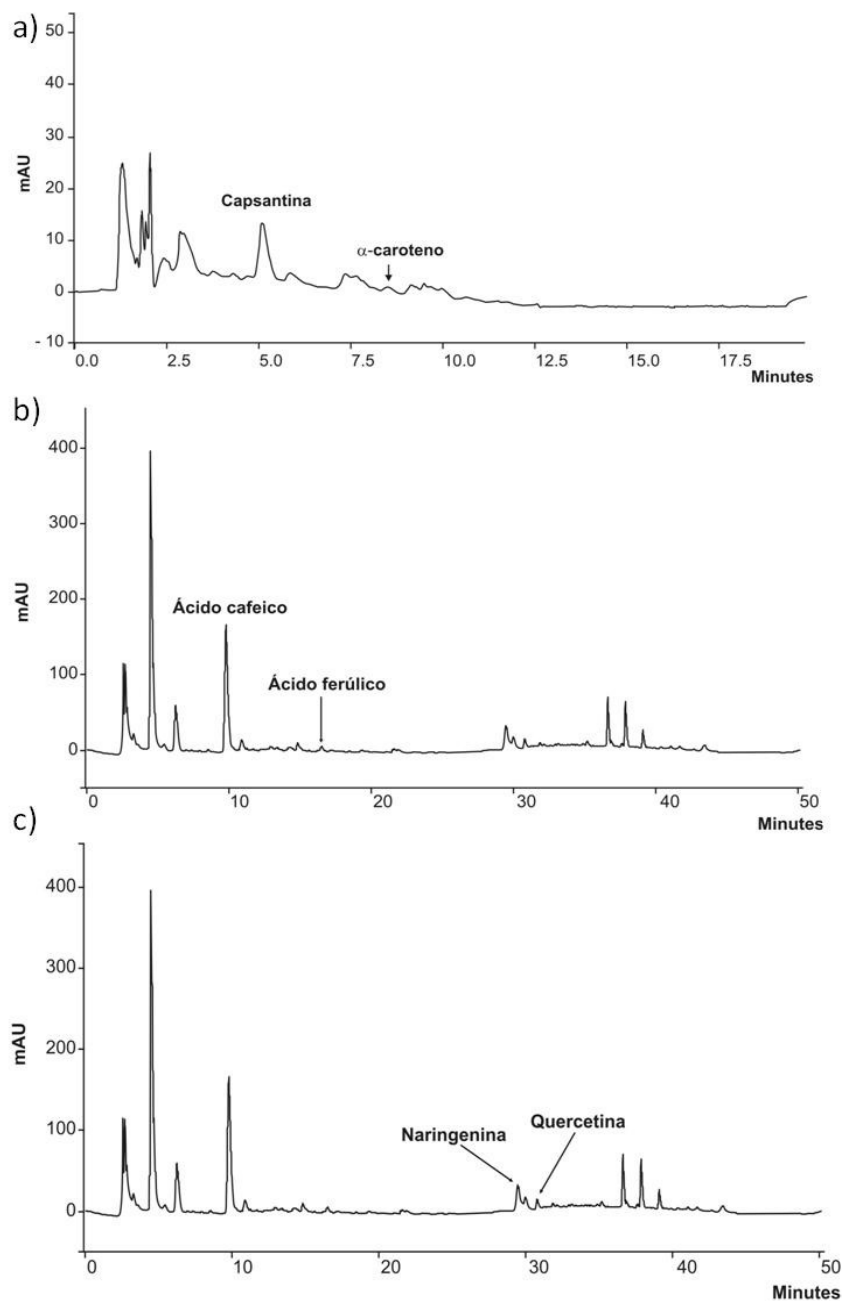


Figure 3.7 Cromatograma de HPLC de los extractos de Chiltepín indicando la presencia de carotenoides (a), ácidos fenólicos (b) y flavonoides (c).

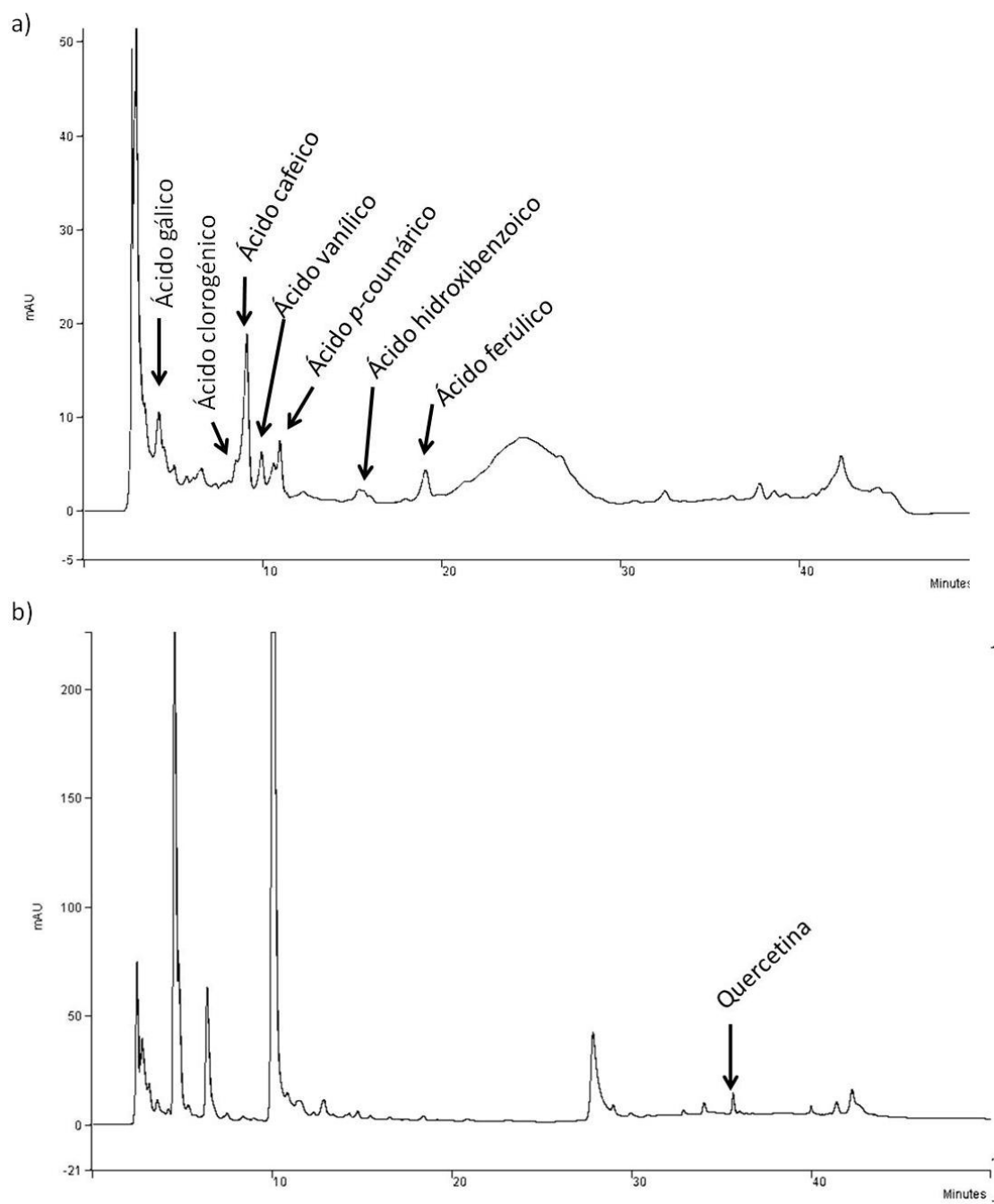


Figure 3.8. Cromatograma de HPLC de los extractos de Habanero indicando la presencia de ácidos fenólicos (a) y flavonoides (b).

3.4. DISCUSIÓN

Los chiles (*Capsicum* sp) son conocidos por su riqueza en micronutrientes y compuestos bioactivos (por ejemplo, compuestos fenólicos), y su consumo ha sido distintivamente reconocido por ser un factor importante para la salud. En el presente estudio, los resultados observados en Chiltepín son comparables con el contenido de fenoles totales observados en otras especies (Antonoius et al., 2006).

En este sentido, los resultados presentan que el contenido de fenoles de Chiltepín rojo fue superior que el contenido de fenoles presente en *C. annuum* var. *aviculare* (Tepin) y *C. chinense* respectivamente (Oboh y Rocha 2007; Núñez- Ramírez et al., 2011). Esto puede ser atribuido a la extractibilidad incrementada de compuestos fenólicos debido a la ruptura de las paredes celulares durante el tratamiento térmico (por ejemplo, 65 °C), lo que puede causar que los compuestos fenólicos sean liberados con mayor facilidad que en material fresco (Scalzo et al., 2004; Ornelas-Paz et al., 2008).

Las diferencias en la actividad antioxidante observadas entre los chiles Chiltepín y Habanero fueron debidas posiblemente a la diversidad y complejidad de compuestos antioxidantes presentes en los frutos de ambos chiles. En este sentido, varios estudios presentan que existen diferencias en la actividad antioxidante en chiles, lo cual es atribuido a diferentes causas como fertilización, madurez del fruto y temperatura (Menichini et al., 2009; Núñez-Ramírez, 2011; Álvarez-Parrilla et al., 2011). Por otra parte, los resultados obtenidos en esta investigación, no presentaron correlación entre los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de frutos de Chiltepín y Habanero evaluados respectivamente.

Es posible que la capacidad antioxidante pudo ser afectada por la presencia de carotenoides. Estos compuestos pueden actuar como antioxidantes, con funciones que incluyen protección de membranas contra daño causado por radicales libres y retraso en procesos de envejecimiento (Bulda et al., 2008). De esta manera, el bajo contenido de carotenoides de la fracción roja isocromática observado en frutos de Chiltepín y Habanero pudo ser debido a una mutación (supresión) en los genes los cuales codifican para la enzima sintaza capsantina- capsorrubina (CCS) que impide la síntesis de pigmentos rojos (Rodríguez-Burruezo et al., 2009). En consecuencia, frutos de Chiltepín y Habanero contienen únicamente carotenoides naranjas y amarillos. Estos resultados son importantes debido a que carotenoides presentes en los chiles particularmente el amarillo/ naranja, (β - criptoxantina y β - caroteno) son precursores de la vitamina A, con una alta actividad antioxidante (Wall et al., 2001).

No obstante, el presente estudio mostró mediante el análisis de HPLC, la presencia de α - caroteno, el cual no puede convertirse en retinol en los animales con la misma eficacia que el β -caroteno (el anillo del α -caroteno no puede convertirse en el organismo en g-ionona); por lo que, el α -caroteno se transforma en retinol con la mitad de eficiencia que el β - caroteno (Meléndez- Martínez et al., 2004).

Por otra parte, la presencia de capsantina era de esperarse ya que es un pigmento que proporciona la coloración roja al chiltepín. La capsantina es sintetizada durante la carotenogénesis, y se encuentra de forma abundante en las superficies polares de lipoproteínas, su conversión es mucho más rápida en el cuerpo humano con respecto al licopeno (Rodríguez-Burruezo et al., 2009).

Esta molécula participa como un compuesto funcional debido a su actividad antioxidante y antitumoral, aunque no presenta actividad de provitamina A. En estudios epidemiológicos se ha vinculado el consumo de alimentos ricos en este compuesto con una reducción de procesos carcinogénicos en colon (Kim *et al.*, 2009).

En el caso de los compuestos fenólicos, la detección del ácido cafeico y ferúlico es de gran relevancia ya que estos compuestos están relacionados con la presencia de un potencial anticarcinogénico y muestran una alta actividad antioxidante (Gorinstein *et al.* 2009). Ambos ácidos (cafeico y ferúlico) también pueden conjugarse con sacáridos, reaccionar con óxidos de hidrógeno y proteger a las membranas fosfolipídicas de la peroxidación por radiación UV (Staniforth *et al.*, 2006). En el caso de flavonoides la presencia de quercetina y naringenina están relacionada con una alta actividad antioxidante y agente protector de daño a las membranas por radicales libres y protección de células del cerebro que permiten una mejora de la memoria (Sun *et al.*, 2007). Adicionalmente, este estudio presentó que los frutos de ambas especies del género *Capsicum* poseen altas concentraciones de unidades ASTA con respecto al reporte de otras especies de *Capsicum* (Méndez-Trujillo *et al.*, 2005; Eissa *et al.*, 2007).

Por tanto, el Chiltepín y Habanero son buenos prospectos para el desarrollo de variedades con altos niveles de compuestos bioactivos (por ejemplo carotenoides amarillos y naranjas). Finalmente, el presente estudio proporciona información importante y útil para investigadores a fin de aumentar la capacidad antioxidante y el valor funcional con énfasis en el chile Chiltepin para industrias alimenticias y nutraceuticas.

3.5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan que los frutos de chile Chiltepín y Habanero tienen propiedades antioxidantes altas, por tanto, se considera un vegetal de importancia en la nutrición humana. Es de importancia saber cuál es la contribución de un producto alimenticio en las necesidades nutricionales diarias. Estudios futuros incluirán la identificación de los componentes antioxidantes restantes en las fracciones acuosas semi- purificada y el estudio de los efectos antimicóticos de estos extractos acuosos.

CAPITULO IV

Compuestos bioactivos de *Capsicum annum* var. *glabriusculum* y su efecto en la inhibición de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* causantes de enfermedades de poscosecha.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto *in vitro* de saponinas, fenoles y carotenoides extraídos de frutos de chiltepín sobre hongos de importancia hortícola. Los resultados mostraron que extractos de saponinas afectaron significativamente el número de esporas al pasar de 1.6×10^6 a 5.8×10^5 esporas para *Alternaria alternata* al quinto día de exposición. En el caso de *Fusarium oxysporum*, el extracto de saponinas generó un efecto inhibitorio al tercer día (26.66%), y no existieron diferencias significativas con respecto a la inhibición observada al final del experimento (24.74%). Los compuestos fenólicos de Chiltepín presentaron una reducción de 41.28% del crecimiento de *Alternaria alternata* durante los primeros tres días después de la exposición, con respecto al testigo. En el caso de *Fusarium oxysporum*, los resultados mostraron un efecto inhibitorio no significativo desde el tercer día de exposición, con un incremento no significativo al quinto día después de la exposición. Por otra parte, el efecto de los extractos de carotenoides, generaron un efecto inhibitorio de 39.5% a 38.5% en el crecimiento de *Alternaria alternata* a los tres y cinco días respectivamente, después de iniciado el experimento. Caso contrario se observó en el desarrollo de *Fusarium oxysporum*, donde las cepas tratadas con los extractos de carotenoides no generaron efectos inhibitorios significativos en los primeros días de exposición.

Palabras claves: extractos, compuestos bioactivos, chiltepín, hongos fitopatógenos

4.1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas son consideradas como las principales causas de podredumbres en la etapa de poscosecha en frutas y hortalizas durante su almacenamiento y transporte, las cuales originan pérdidas económicas significativas en la fase de comercialización (Gatto et al., 2011). Entre los hongos causantes de pudriciones poscosecha en frutas y hortalizas se pueden mencionar a *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* (Thomma, 2003; Nur et al., 2011). El principal método de control de estos fitopatógenos se basa en el uso de fungicidas químicos (Song et al., 2004; Allen et al., 2004). Sin embargo, el incremento de exigencias regulatorias en el uso de agroquímicos, el incremento de resistencia por parte de los fitopatógenos a los principios activos de las formulaciones y una mayor conciencia de parte de los consumidores de contar con alimentos inocuos (Sharma et al., 2009), ha conducido al desarrollo de alternativas o medidas complementarias para reducir la presencia de hongos poscosecha en las frutas y hortalizas y el uso de agroquímicos (Chebotar et al., 2009).

Entre las alternativas para reducir la presencia de infecciones fúngicas en poscosecha se tiene el uso de extractos vegetales. Esto debido a que las plantas durante su ciclo de vida pueden generar diversos productos naturales que están implicados en la defensa de las plantas. Estos productos naturales o metabolitos secundarios involucran una serie de fitoquímicos con actividad antimicrobiana que incluye terpenoides, compuestos fenólicos, fenilpropanoides, estilbenos, alcaloides y saponinas (Dixon 2001).

Estos metabolitos secundarios tienen la ventaja de ser rápidamente degradados en el suelo, generalmente no presentan un efecto tóxico a mamíferos, y pueden ser empleados en el sistema de agricultura orgánica y sustentable (Okwu y Nnamdi, 2008). Los compuestos fenólicos (*eg.*, fenoles y flavonoides) se caracterizan por tener efectos antioxidantes y antimicrobianos, pueden actuar como reductores de estrés oxidativo y quelatantes de metales (Pietarinen et al., 2006).

El efecto de estos compuestos se ha observado principalmente en hongos causantes de problemas de salud en humanos (*Candida spp*), en donde los mecanismos involucrados pueden ser la inhibición de la germinación de las esporas del hongo (Harborne y Williams, 2000; Cushnie y Lamb, 2006), así como la inactivación de la síntesis de aminoácidos mediante interferencia en la reacción entre fosfoenolpiruvato, eritrosa 4 fosfato y producción de ácido shikímico, lo que resulta en la producción de triptófano, evitando la producción de fenilalanina o tirosina (Castro , 2004). Lo anterior fue observado por Pagnussatt et al. (2013) quienes encontraron que compuestos fenólicos de extractos de microalgas, afectaron el desarrollo de *Fusarium graminearum* mediante la inhibición de la síntesis de aminoácidos. Las saponinas son otros metabolitos secundarios con una marcada actividad antimicrobiana y comúnmente son clasificadas como fitoanticipinas, las cuales se encuentran en plantas antes del ataque por fitopatógenos (VanEtten et al., 1994). Su actividad antimicótica es debido a su habilidad para formar complejos con esteroides generando un incremento en la permeabilidad de membrana del contenido celular de hongos (Light y van Staden, 2004).

Por otra parte, la presencia de carotenoides (*eg.*, capsantina y capsorubina) que son componentes claves que participan en la coloración roja del género *Capsicum* spp., durante los procesos de maduración pueden llegar a tener un efecto antimicrobiano (Moreno-Limon et al., 2012). Dewitt et al. (2000), mencionan que la capsicina, la capsicidina, el capsidol, los capsianósidos y la capsicodendrina, pueden tener propiedades antibacteriales y fungicidas. Por otra parte, Wilson et al. (1997), observaron una alta actividad antifúngica en diversas variedades de *Capsicum annuum*, *C. chinense* y *C. frutescens*, los cuales inhibieron hasta en un 99% la germinación de esporas de *Botrytis cinerea*.

No obstante, estudios sobre el uso del chile Chiltepín (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*) para el control de fitopatógenos, el cual es cosechado y consumido principalmente en la parte noroeste de México, son escasos. De tal forma que en el presente estudio se planteó el objetivo de evaluar el efecto *in vitro* de extractos de frutos de chiltepín sobre hongos de importancia hortícola.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS DE CHILTEPÍN

Chiles de Chiltepín (*C. annum* L. var. *glabriusculum*) fueron obtenidos de mercados regionales de Mexicali, B.C., México durante el mes de febrero a marzo del 2011. Los frutos se lavaron con agua destilada por tres ocasiones para eliminar partículas adheridas y fueron secados a 65 °C por 24 horas en una estufa convencional (GRIEVE, Model LO- 201C, Round Lake- ILLINOIS USA).

4.2.2. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE FRUTOS SECOS DE CHILTEPÍN

Para la obtención de los extractos de Chiltepín se empleó 1 g de muestra deshidratada de Chiltepín que fue colocado en un tubo de plástico Falcon con capacidad de 50 mL y se añadieron 10 mL de *n*-hexano para el caso de saponinas, y el mismo volumen de acetona para el caso de compuestos fenólicos y carotenoides. Las muestras se dejaron en reposo por 24 horas en un shaker electrónico bajo oscuridad (Environ shaker lab line 3527, Melrose Park, IL, USA). Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm, 18 min a 20 °C, y al finalizar el sobrenadante fue colectado en un nuevo tubo de 50 mL. El sobrenadante fue nuevamente sujeto a 2 subsecuentes extracciones repitiendo los pasos anteriores de agitación y centrifugación. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue colocado en rota-evaporador para eliminar el solvente. El producto obtenido fue colocado en campana de extracción por toda la noche para permitir que todo el solvente fuera evaporado. Finalmente, las muestras obtenidas fueron almacenadas hasta su posterior uso.

4.2.3. AISLAMIENTO DE LOS HONGOS

Cultivos de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* aislados previamente de tejidos infectados de muestras vegetales fueron crecidos en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés), e incubados a 27 °C. Los patógenos fueron identificados macro y microscópicamente, de acuerdo a las claves reportadas por Simmons (2000), y Leslie y Summerell (2006). Subcultivos de los fitopatógenos en PDA fueron realizados de acuerdo a lo propuesto por Tsrer et al., (2001) para mantener viable las cepas de patógenos a emplear.

4.2.4. ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA EFECTO DEL EXTRACTO DE CHILTEPÍN EN EL CRECIMIENTO MICELIAL DE LOS HONGOS FITOPATOGENOS

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó mediante la técnica del pozo en agar. Para ello se prepararon placas de petri con medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA). En el centro de la placa se colocó un pequeño círculo de agar más micelio tomado de cada una de las cepas a evaluar. Posteriormente en cada placa de petri se realizaron seis perforaciones de 5 mm de diámetro distribuidas en las orillas de cada placa, en las cuales se colocó respectivamente 30 µL de una concentración estandarizada de 100 mg/mL del extracto de saponinas, compuestos fenólicos y carotenoides, considerando los trabajos de Riaz et al. (2009), y Kappel et al. (2008). Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada uno de los hongos evaluados. Las placas se incubaron a 25±2°C por cinco días, tomando como resultado positivo la aparición de un halo de inhibición del crecimiento micelial alrededor de las perforaciones. La actividad inhibitoria de cada tratamiento se midió cada 24 h por cinco días y los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición de crecimiento comparado con el control (0% de extracto) usando la siguiente fórmula:

$$(\%) \text{ Inhibición de crecimiento} = \left[\frac{DC - DT}{DC} \right] \times 100$$

Donde DC= diámetro del control y DT= diámetro de la colonia del hongo tratado con extracto de acuerdo a Pandey et al., (1982).

4.2.5. EFECTO DEL EXTRACTO DE CHILTEPÍN EN EL NÚMERO DE ESPORAS GERMINADAS DE *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*

El efecto de los extractos de saponinas, compuestos fenólicos, y carotenoides obtenidos de Chiltepín sobre la germinación de esporas se realizó mediante el conteo del número de esporas germinadas posterior a la aplicación de los extractos. Para tal fin se preparó una suspensión de esporas de 1×10^8 esporas/mL a partir de cultivos de cinco días de edad de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente. Posteriormente, se preparó una solución de 100 mg/mL del extracto de cada compuesto bioactivo (saponinas, compuestos fenólicos, y carotenoides). Los extractos preparados se adicionaron a la suspensión de esporas preparada de cada hongo fitopatógeno (1×10^8 esporas/mL). Alícuotas de 10 μ L de cada suspensión de esporas tratada con los extractos, se colocaron por triplicado en porta objetos y se incubaron en una cámara húmeda a 25 °C. Se monitoreó la germinación de esporas mediante la examinación al microscopio en objetivo de 40X, cada 24 horas por cinco días.

4.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones y se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ ($p < 0,05$). Además, se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico SAS, (2000).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efecto de los extractos de Chiltepín en el crecimiento micelial

En este estudio las saponinas extraídas de Chiltepín mostraron un efecto inhibidor en el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

En la Figura 4.1 se puede observar que el crecimiento de *A. alternata* fue inhibido en un 18.35 y 18.76%, al tercer y quinto día de exposición al extracto de saponinas, respectivamente. Sin embargo, estos porcentajes no fueron diferentes significativamente. Asimismo, las saponinas ejercieron un efecto inhibidor en *Fusarium oxysporum*, observándose una inhibición del crecimiento micelial de 26.66 y 24.74%, al tercer y quinto día, respectivamente. Estos porcentajes de inhibición fueron mayores en *F. oxysporum* con respecto a *A. alternata*, indicando que las saponinas de Chiltepín ejercieron un mayor efecto antimicótico en *F. oxysporum*.

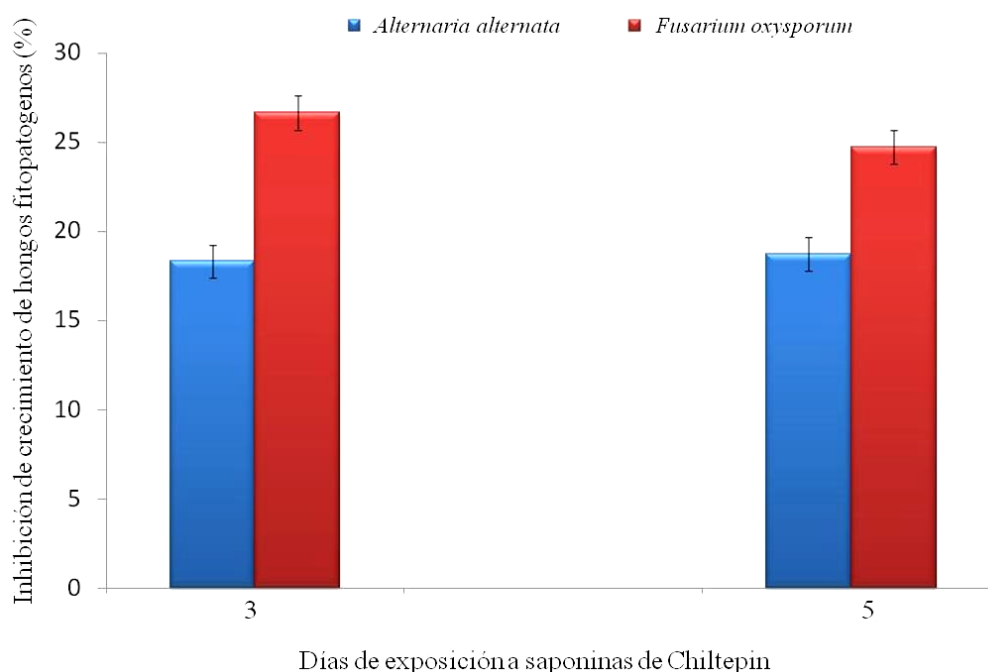


Figura 4.1 Efecto de las saponinas de Chiltepín sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos a los cinco días de exposición.

La Figura 4.2 muestra los resultados obtenidos del efecto de los compuestos fenólicos de Chiltepín sobre *A. alternata* y *F. oxysporum*. Se observó que estos compuestos inhibieron el crecimiento micelial de *A. alternata*, registrándose valores del 41.28 y 38.46% a los tres y cinco días después de la exposición, respectivamente; porcentajes que no fueron diferentes significativamente.

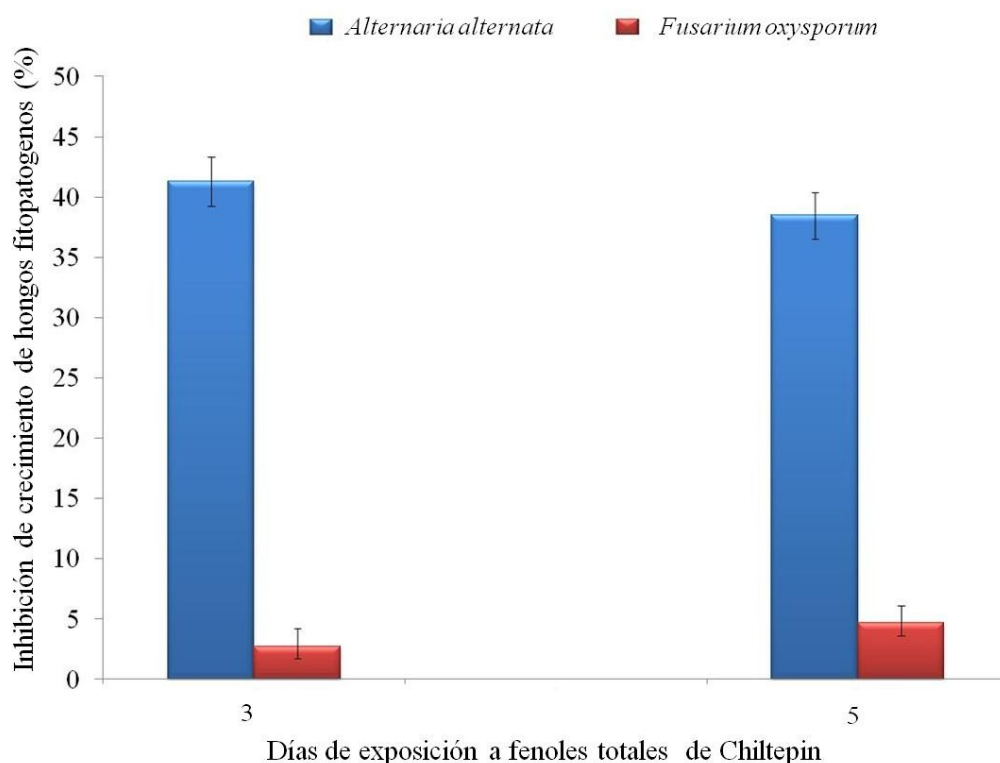


Figura 4.2 Efecto de los compuestos fenólicos de Chiltepín sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos a los cinco días de exposición.

En el caso del hongo *Fusarium oxysporum*, los compuestos fenólicos ejercieron un menor efecto inhibitorio al observarse que su crecimiento fue inhibido en un 2.5 y 4.8%, a los tres y cinco días después de la exposición.

En este caso, los compuestos fenólicos ejercieron un mayor efecto inhibitorio en *A. alternata* con respecto a *F. oxysporum*. Por otra parte, los carotenoides extraídos de Chiltepín también generaron un efecto inhibitorio en los hongos fitopatógenos evaluados. El crecimiento micelial de *A. alternata* fue inhibido en un 39.5 y 38.5% a los tres y cinco días después de la exposición, respectivamente. Sin embargo, estos porcentajes no fueron diferentes significativamente. Caso contrario se observó en el crecimiento de *F. oxysporum*, donde los carotenoides ejercieron un bajo efecto inhibitorio en las cepas tratadas con los extractos en los primeros tres días de exposición. No obstante, al quinto día se observó un mayor efecto inhibidor (20.3%) en el crecimiento de este fitopatógeno (Figura 4.3).

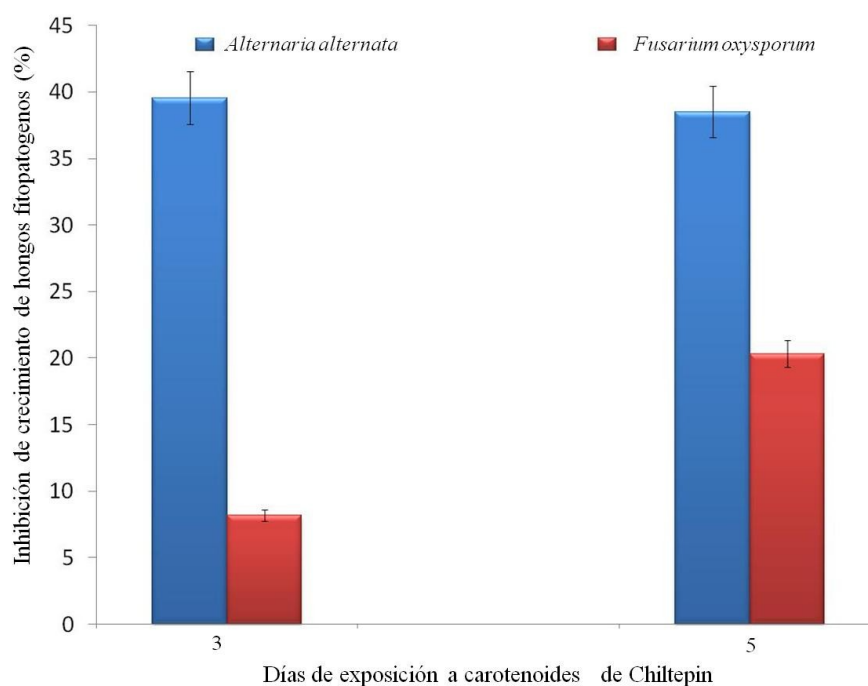


Figura 4.3 Efecto de los carotenoides de Chiltepín sobre el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos después de cinco días de exposición.

4.3.2 Efecto de los extractos de Chiltepín en el número de esporas germinadas

Los diferentes extractos de Chiltepín fueron evaluados sobre la germinación de esporas de dos hongos fitopatógenos de importancia hortícola, observándose que el número de esporas germinadas disminuyó en forma diferencial como respuesta a los extractos. El efecto de las saponinas de Chiltepín en la germinación de esporas de hongos fitopatógenos a los cinco días después de la exposición, es mostrado en la Figura 4.4

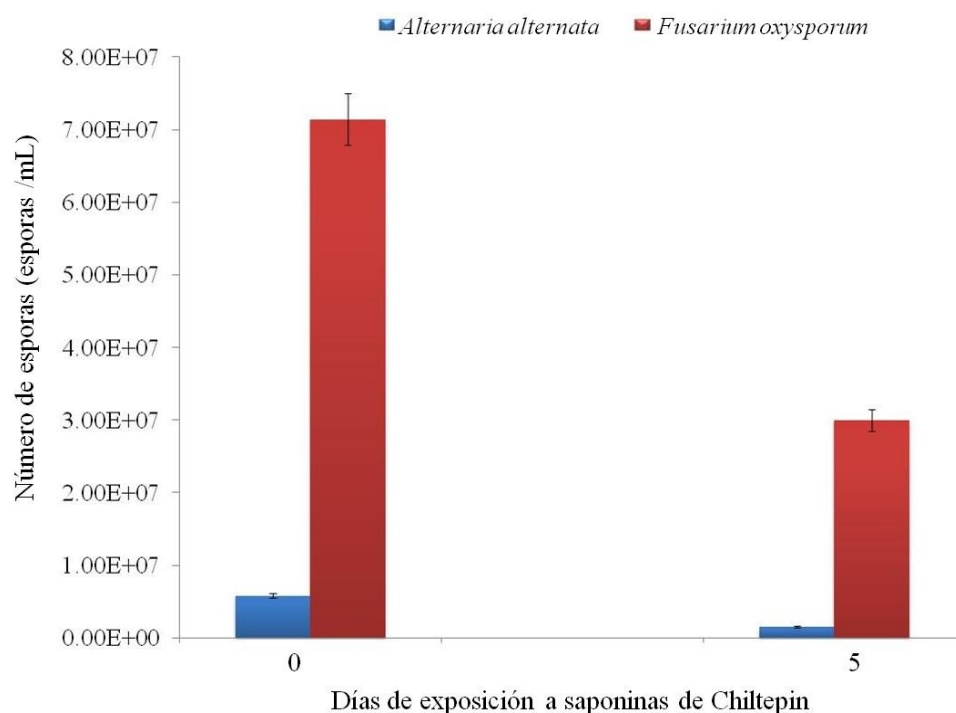


Figura 4.4 Efecto de las saponinas del Chiltepín sobre el número de esporas germinadas de hongos fitopatógenos, a los cinco días después de la exposición.

Las saponinas ejercieron un efecto inhibitor significativo en *A. alternata* al disminuir el número de esporas germinadas de 1.6×10^6 a 5.8×10^5 al quinto día de exposición, lo cual indica un 63.75% de inhibición en la germinación de esporas.

Asimismo, las saponinas presentaron un efecto inhibitor en el número de esporas germinadas de *F. oxysporum*, observándose una disminución de 7.1×10^6 a 2.9×10^6 de esporas germinadas, correspondiendo éstos valores a un 60% de inhibición.

La Figura 4.5, presenta los resultados del efecto de los compuestos fenólicos de Chiltepín sobre el número de esporas geminadas de los hongos fitopatógenos a los cinco días después de la exposición. Se registró un efecto inhibitorio en *A. alternata*, al disminuir el número de esporas germinadas de 1.13×10^7 a 5.7×10^6 al quinto día de exposición, lo cual representa un 49.56% de inhibición.

En el caso de *F. oxysporum*, los resultados mostraron que los compuestos fenólicos también presentaron un efecto inhibitor en la germinación de esporas de este fitopatógeno. Se observó una disminución en el número de esporas germinadas de 1.0×10^7 a 0.95×10^7 , a los cinco días de exposición. Sin embargo, esta disminución no fue significativa.

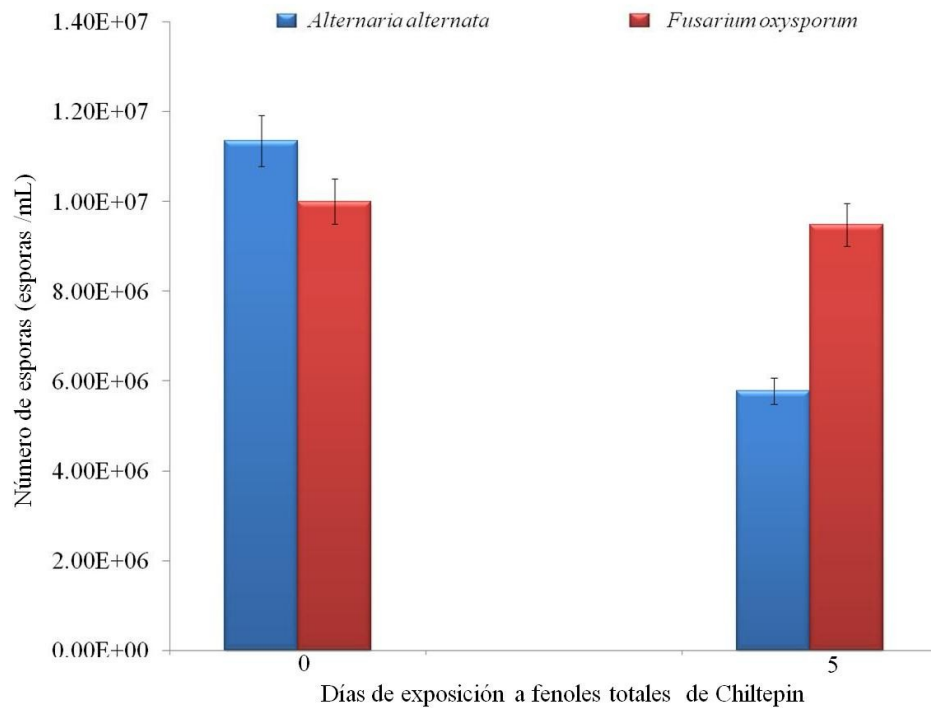


Figura 4.5. Efecto de los compuestos fenólicos de Chiltepín sobre el número de esporas germinadas de hongos fitopatógenos a los cinco días de exposición.

Por otra parte, los carotenoides extraídos de Chiltepín generaron un efecto inhibitorio en la germinación de esporas de ambos fitopatógenos a los cinco días después de la exposición (Figura 4.6). Se observó una disminución significativa en el número de esporas germinadas de *A. alternata*, al disminuir de 1.13×10^7 a 7.5×10^6 de esporas germinadas, lo cual representó un 33.63% de inhibición.

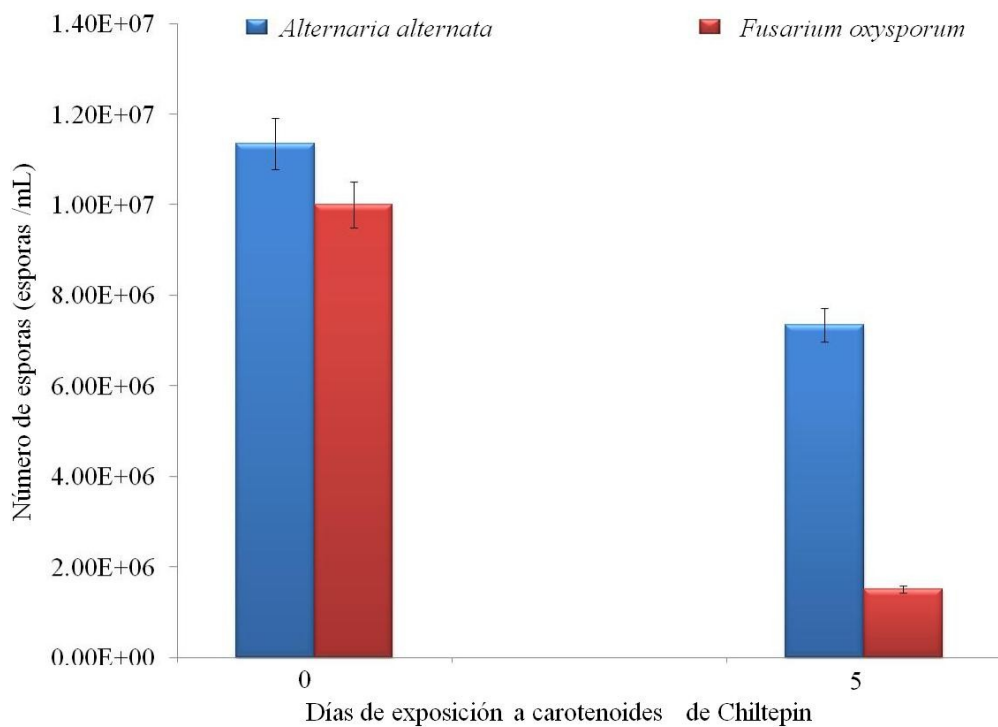


Figura 4.6. Efecto de carotenoides de Chiltepín sobre el número de esporas germinadas de hongos fitopatógenos, cinco días después de la exposición.

Asimismo, los carotenoides ejercieron un efecto inhibitor en *F. oxysporum*, observándose que el número de esporas germinadas disminuyó significativamente al pasar de 1.0×10^7 a 1.5×10^6 al final del experimento, correspondiendo en este caso a un 85% de inhibición.

4.3.3 DISCUSIÓN

Los extractos de plantas pueden ser una alternativa o complemento a los fungicidas sintéticos para el control de hongos, por las propiedades antimicóticas, baja

o nula toxicidad y poca persistencia en el ambiente comparado con los compuestos químicos (Mahlo et al., 2010; Corato et al., 2010).

Recientemente la presencia de metabolitos secundarios en las especies de *Capsicum*, se han asociado con compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas (Brito-Argáez et al., 2010).

En este estudio se pudo observar que las saponinas, compuestos fenólicos y carotenoides extraídos de Chiltepín ejercieron un efecto inhibitor en los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Este efecto inhibitor fue observado tanto en el crecimiento micelial como en la germinación de esporas, encontrándose que los diferentes extractos presentaron mayor inhibición en la germinación de esporas con respecto al crecimiento micelial.

Ambos fitopatógenos presentaron una inhibición en su crecimiento micelial por efecto de las saponinas; sin embargo, el efecto fue mayor en el hongo *F. oxysporum*. La inhibición generada por el extracto de saponinas se podría atribuir a algún tipo de saponinas que podría formar complejos con los esteroides de las membranas celulares del hongo y producir grandes poros en las mismas alterando su permeabilidad y lisando la célula (Baumann et al., 2000; Simons et al., 2006). Similares resultados fueron observados al tratar hongos de importancia dermatológica como *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* y *Microsporum canis* y la levadura *Candida* con las saponinas CAY-1 y la SC-2, derivadas de *Capsicum frutescens*, y *Solanum chrysotrichum*, respectivamente. Adicionalmente, en ese estudio se observó una

disminución de la germinación del conidio e hifa, debido a que la saponinas pudieron generar cambios en las membranas celulares y afectar la morfología de la pared celular ocasionando que la membrana citoplasmática se separara de la pared y se desintegrara (Stergiopoulou et al., 2008). Por su parte, De Lucca et al., (2002, 2008) demostraron cambios en la permeabilidad celular por las dos saponinas mencionadas anteriormente, obtenidas y purificadas de *Capsicum frutescens* (chile cayenne) que afectaron la germinación de conidios de *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, y *F. graminearum*.

Por otra parte, el efecto antimicótico de los compuestos fenólicos extraídos de Chiltepín observado en este estudio fue diferente entre los hongos *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, registrándose que éstos compuestos ejercieron un menor efecto inhibitor en *F. oxysporum*. Las esporas de *Alternaria alternata* fueron más sensibles al efecto inhibitor de los compuestos fenólicos. Estos resultados coinciden con los reportados por Ruelas et al. (2006), quienes observaron que la aplicación de los ácidos fenólicos clorogénico, cafeico y vanílico a una concentración de 500 mM, inhibió la germinación de esporas de este patógeno en un 30%. Por otra parte, los resultados observados en *F. oxysporum* pueden ser debidos a que este fitopatógeno es más resistente al efecto antimicótico de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de Chiltepín. Es posible que la presencia de ciertos compuestos fenólicos que han mostrado efecto inhibitorio sobre *Fusarium* spp., se encuentre en bajas concentraciones en los extractos de Chiltepín. En un estudio realizado por Ahn et al. (2005), encontraron que el ácido gálico y metil galato aislados

de *Galla rhois* actúan inhibiendo la ruta de señalización relacionada con el ciclo de la adenil ciclasa que participa en la formación del apresorio de *Magnaporthe grisea*. Similares resultados fueron obtenidos por Carrillo-Parra et al., (2012), en donde observaron que el incremento de las concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides pueden inhibir de manera diferencial a *Coniophora puteana* y *Trametes versicolor*. Estos resultados muestran la posible participación de los compuestos fenólicos con la pared celular del hongo inhibiendo la actividad de algunas enzimas fúngicas, afectando la germinación de esporas y el crecimiento del micelio (Vidhyasekaran, 2007). Así mismo se ha reportado que estos compuestos pueden formar complejos con proteínas solubles y extracelulares, generando una disrupción de la pared celular de los hongos (Harborne y Baxter, 1999). La inhibición de rutas enzimáticas vitales como el sistema enzimático P450 oxidasa dependiente, mediante el bloqueo de las enzimas hidrolasas esteroidales de esta ruta por flavonoides presentes en Chiltepín, es otra posibilidad (Treutter, 2005).

La actividad antimicótica de los carotenoides extraídos de Chiltepín, también fue observado en este estudio. El crecimiento de los hongos *Alternaria alternata* y *F. oxysporum* fue inhibido por la exposición a los carotenoides, observándose una mayor inhibición en *A. alternata*. Estos resultados concuerdan con estudios recientes realizados por Moreno-Limón et al. (2012), quienes mencionan que los extractos etanólicos de frutos de Chiltepín puede tener capacidad inhibitoria del crecimiento de hongos como *Aspergillus flavus*, debido a la presencia de capsantina. En este sentido, estudios realizados por Santos et al. (2010), lograron la disminución del crecimiento y

producción de aflatoxinas de *Aspergillus flavus*, al usar una mezcla de carotenoides denominado Capsantal FS-30 a base de capsantina y capsorubina. La actividad antimicrobiana de los carotenoides ha sido poco estudiada. Cucco et al. (2007), sugirieron que el β -caroteno puede llevar a la acumulación de lisozimas, las cuales pueden digerir las paredes celulares bacterianas y de esa forma ejercer un efecto antibacterial.

Sung et al (2007), indicaron que el carotenoide licopeno causó un daño significativo en las membranas de *Candida albicans*, resultando en la destrucción de la integridad de la membrana.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que la actividad antimicótica de los extractos de Chiltepín se presentó de manera diferencial, siendo los compuestos fenólicos y carotenoides los que presentaron mayor efecto inhibitorio en *A. alternata*; mientras que las saponinas ejercieron el mayor efecto inhibitorio en *F. oxysporum*. Estos resultados sugieren que los compuestos bioactivos de Chiltepín presentan cierta especificidad en su efecto antimicótico sobre diversos hongos fitopatógenos.

Por otra parte, se debe considerar que las propiedades químicas de los solventes tales como polaridad pueden impactar diferencialmente en la eficiencia de los compuestos bioactivos. En este sentido, Bae et al. (2012), reportaron que el uso de diferentes solventes (hexano, acetato de etilo, acetona, metanol y metanol-agua) puede afectar la capacidad antioxidante de compuestos bioactivos presentes en Chile.

Por lo que futuros estudios deben ser encaminados a evaluar el efecto antimicótico de las saponinas, compuestos fenólicos y carotenoides, presentes en Chiltepín usando diferentes mezclas de solventes. La evaluación del efecto antimicótico de los extractos de Chiltepín en otras especies de hongos de importancia agrícola, también debe ser considerada, así como la posible realización de pruebas en condiciones de campo

5. LITERATURA CITADA

Adedayo B.C., Oboh G., Akindahunsi A.A. (2010) Changes in the total phenol content and antioxidant properties of pepper fruit (*Dennettia tripetala*) with ripening. Afr J Food Sci., 4:403–409

Aguilar-Meléndez A. (2006). Ethnobotanical and molecular data reveal the complexity of the domestication of chiles (*Capsicum annuum* L.) in Mexico. Ph.D. dissertation, University of California, Riverside, California, USA.

Ahn Y.J., Lee H.S., Oh H.S., Kim H.T., Lee Y.H. 2005. Antifungal activity and mode of action of *Galla rhois*-derived phenolics against phytopathogenic fungi. Pest. Biochem. Physiol. 81:105-112.

Al-Fartosy A.J.M., Zearah S. A. (2013). Antioxidant, Antibacterial and Cytotoxicity Activities of Flavonoid Extract From *Capsicum annum* L. Seeds. Iraqi National Journal of Chemistry, 49:100-112.

Allen T. W., Enebak S. A., Carey W. A. (2004). Evaluation of fungicides for control of species of *Fusarium* on longleaf pine seed. Crop Protect. 23: 979-982

- Almanza E. J. G. (1998). *Estudios ecofisiológicos, métodos de propagación y productividad del chile piquín (Capsicum annuum L. var aviculare Dierb.)* D. & E. Tesis, Esc. De graduados Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Alvarez-Parrilla E., de la Rosa L.A., Amarowicz R., Shahidi F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *J. Agric. Food Chem.*, 12: 163-173.
- Anogianaki A., Negrev N.N., Shaik Y.B., Castellani M.L., Frydas S., Vecchiet J., Tete S., Salini V., De Amicis D., De Luttis M.A., Conti F., Caraffa A., Cerrulli G. (2006). Capsaicin an irritant anti-inflammatory compound. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2(6), 1-4.
- Antonius G.F., Kochhar T.S., Jarret R.L., Syder J.C. (2006). Antioxidants in hot pepper: variation among accesions. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, 41:1237-1243
- Araiza Lizarde N., Araiza Lizarde E., Martinez Martinez J. G. (2011). Evaluación de la germinación y crecimiento de Plántula de Chiltepín (*Capsicum annuum* L variedad *glabriusculum*) en invernadero. *Rev. Colomb. Biotecnol.*,13:170-175.
- Aruoma O.I. (1998). Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 75: 199-212

- Bae H., Jayaprakasha G.K., Jifon J., Patil B.S. (2012). Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry*, 130:751–758
- Bañuelos, N., Salcido, L., Gardea, A. (2008). *Estudios Sociales. Etnobotánica del chiltepín*. Universidad de Sonora., pp. 2-29.
- Barbero, G.F., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Palma, M., Macias, F.A., Barroso, C.G. (2010). Application of Hansch's model to capsaicinoids and capsinoids: a study using the quantitative structure-activity relationship. A novel method for the synthesis of capsinoids. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 3342-3349.
- Barile E., Bonanomi G., Antignani V., Zolfaghari B., Sajjadi S.E., Scala F., Lanzotti V. (2007). Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry*, 68: 596-603
- Bartley G.E., Scolnik P.A. (1995). Plant carotenoid: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell* 7: 1027–1038
- Baumann E., G. Stoya A. Volkner W., Richter C., Lemke W., Linss. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochem.*, 102: 21-35.
- Boulekbache-Makhlouf L., Slimani S., Madani K. (2012). Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 41: 85-89

- Brito-Argáez L., Moguel-Salazar F., Zamudio F., González-Estrada T., Islas-Flores I. (2009). Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. *Asian J. Biochem.*, 4: 77-87
- Bulda O., Rassadina V., Alekseichuk H., Laman N. (2008). Spectrophotometric measurement of carotenes, xanthophylls, and chlorophylls in extracts from plant seeds. *Russ. J. Plant Physiol.*, 55: 544-551.
- Busker RW, van Helde, H.P. (1998). Toxicologic evaluation of pepper spray as a possible weapon for the Dutch police force: risk assessment and efficacy. *American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 19:309-316.
- Butcher J.D., Crosby K. M., Yoo K.S., Patil B.S., Ibrahim, A.M.H., Leskovar D. I., Jifon J. L. (2012). Environmental and Genotypic Variation of Capsaicinoid and Flavonoid Concentrations in Habanero (*Capsicum chinense*) Peppers. *HortScience*, 47:574-579
- Carrillo-Parra A., Rosales M., Wehenkel C., Foroughbakhch R., González H., Garza F.(2012). Phenols and flavonoids concentration and fungistatic activity of wood and bark of five common tropical species. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15: 621 – 628
- Castañón-Nájera G., Ramírez-Meraz M., Ruiz-Salazar R., Mayek-Pérez N. (2011). Aplicación de marcadores AFLP para explorar heterosis en *Capsicum* spp. *Phyton*, 80: 53-58

- Castro H. G . (2004). Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabólitos secundários. 2. ed. Viçosa: UFV, 113 p.
- Cervantes-Garcia D., Troncoso-Rojas R., Sanchez-Estrada A., Daniel Gonzalez-Mendoza D., Grimaldo-Juarez, O. (2013). Production of Phenolics and Flavonoids Compounds in *Euglena gracilis* under Copper Stress. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7 : 93-100.
- Chebotar V.K., Makarova N.M., Shaposhnikov A.I., Kravchenko L.V. (2009). Antifungal and phytostimulating characteristics of *Bacillus subtilis* Ch-13 rhizospheric strain, producer of biopreparations. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45:419-423.
- Choi S.H.L., Bong-Soon S., Kozukue, E., Kozukue N., Levin C., Friedman, M. (2006). Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9024-9031.
- Chrestel Q., Bernard G., Jacques V., Claude B.M. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.*, 72: 35-42.
- Cohen Seth D., Kennedy J. A. (2010). Plant Metabolism and the Environment: Implications for Managing Phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 :620-643

- Collera-Zúniga O., Jiménez F.G. and Gordillo R.M. (2005). Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. Food Chemistry, 90: 109-114.
- Corato U., Maccioni O., Trupo M., Di Sanzo G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi, Crop Protection, 29:142-147.
- Coronado G.M.A., Córdova Y.A., García P.M., Santiago H.V.G., Vásquez N.R.A. 2013. Estrategias de Mercado para productos elaborados a base de Chiltepín en la sierra de Sonora. Revista Mexicana de Agronegocios, 32: 359-370
- Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000): Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan B. et al. (eds): Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists (Rockville, Madison): 1250–1318.
- Cucco M, Guasco B, Malacarne G, Ottonelli R. 2007. Effects of b-carotene on adult immune condition and antibacterial activity in the eggs of the Grey Partridge, *Perdix perdix*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 147: 1038-1046.
- Cushnie T.P.T., Lamb A.J. (2006). Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26: 343-356
- De la Rosa M., Arce L., Villarreal, J.A., Ibarra L., Lozano J. (2012). Germinación de semillas de chile simojovel (*Capsicum annuum* L.) previamente expuestas a NaCl y ácido giberélico. *Phyton (B. Aires)* 81:165-168.

- De Lucca A. J., Bland J. M., Vigo C. B., Cushion M., Selitrennikoff C. P., Peter J., Walsh T. J. (2002). CAY-1, a fungicidal saponin from *Capsicum* sp fruit. *Medical Mycology*, 40:131-137.
- De Lucca, A. J., Klich, M., Boue, S., Cleveland, T. E., Sien, T. and Walsh, T. J. (2008). Fungicidal activity of plant saponin CAY-1 for fungi isolated from diseased *Vitis* fruit and stems. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59: 67-72.
- De Rivas, S. and Thomas, C. M. (2005). Molecular Interactions Between Tomato and the Leaf Mold Pathogen *Cladosporium Fulvum*. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 395-436.
- Deli J., Molnár P., Matus Z., Toth G. (2001). Carotenoid composition in the fruits of red paprika (*Capsicum annuum* var. *lycopersiciforme rubrum*) during ripening; biosynthesis of carotenoids in red paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1517–1523
- Della Penna D., Pogson B.J. (2006). Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 711–738
- Dewitt D., Stock M.T., Hunter K. (2000). *Los Poderes Curativos de los Chiles, Remedios y Los Poderes Curativos de los Chiles, Remedios y Recetas para mejorar vida y salud*. Editorial Diana. México.
- Dixon R. A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843–847.

- Eissa A.H., Mostafa B.E., Hussein A.S. (2007). Capsaicin content and quality characteristics in different local pepper varieties (*Capsicum annum*) and acid-brine pasteurized purre. *J. Food Technol.*, 5: 246- 255.
- EL-Gendy K.S., Aly N.M., Mahmoud F.H., Kenawy A., El-Sebae A.K. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 215–221
- FAO. (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database results. <http://faostat.fao.org>. Cited 18 Jun 2008.
- Fieira C., Oliveira F., Perez C. R., Machado A., Rodrigo Coelho A..2013. In vitro and in vivo antifungal activity of natural inhibitors against *Penicillium expansum*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 33, suppl.1: 40-46.
- Forero M.D., Quijano E.C., Pino A.J. (2009). Volatile compounds of Chile pepper (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*) at two ripening stages. *Flavour. Fragr. J.*, 24: 25-30
- García Federico A., Montes Hernández S., Rangel Lucio J.A., García Moya E., Mendoza Elos M. (2010). Respuesta fisiológica de la semilla chile piquín [*Capsicum Annuum* var. *Glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill] al ácido giberélico e hidrotermia. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1: 203-216.

- Gatto M.A., Ippolito A., Linsalata V., Cascarano N.A., Nigro F., Vanadia S., Di Venere D. (2011). Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biol Technol.*, 61:72-82
- Gentry S. H. (1942). Rio Mayo plants: A study the flora and vegetation of the Rio Mayo, Sonora. Publication 527. Carnegie Institution of Washington. p. 234
- Ghasemnezhad M., Sherafati, M., Payvast G.A. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of fivecoloured bell pepper *Capsicum annum* fruits attwo different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3:44-49
- Giuffrida D., Dugo P., Torre G., Bignardi C., Cavazza A., Corradini C., Dugo G. (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chem.* 140:794-802
- Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y.-S., Vearasilp, S., Suhaj, M., Ham, K.-S., Heo, B.-G., Cho, J.-Y., Jang, H.G. (2009). The comparative characteristics of snake and kiwi fruits. *Food and Chemistry Toxicology*, 47: 1884-1891.
- Govidarajan VS., Sathyanarayana M.N. (1991). *Capsicum*-production, technology, chemistry and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism: structure, pungency, pain and desensitization sequences. *CRC Crit. Rev. International Journal of Food Sciences and Nutrition* 29, 435-474.

- Guil-Guerrero J.L., Martínez-Guirado, C., Reboloso-Fuentes, M.M., Carrique-Pérez A. (2006). Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. Eur. Food Res. Technol., 224: 1-9.
- Hagerman A.E., Reidl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfield P.W., Tiechel, T.L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46:1887–1892.
- Harborne J. B., Williams C. B. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, 55: 481–504
- Harborne J.B., Baxter H. (1999). Handbook of Natural Flavonoids. 2 vols. Wiley, Chichester
- Hernández S. V. (2004). Efecto de la luz, temperatura y ácido giberélico sobre la germinación de semillas de poblaciones de chiles silvestres. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. Primer Convenio Mundial del Chile, p. 441.
- Hernández-Ortega M., Ortiz-Moreno A., Hernández-Navarro M.D., Chamorro-Cevallos G., Dorantes-Alvarez L., Necoechea-Mondragón H. (2012). Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Biomedicine and Biotechnology, ID 524019, doi:10.1155/2012/524019

- Hernández–Verdugo S., Luna–Reyes R., Oyama K. (2001). Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanacea) from Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 226: 129–142.
- Hernández-Verdugo S., Sánchez-Peña P., Villareal Romero M. (2006). Variación entre poblaciones y años: algunos factores que promueven o regulan la germinación de semillas en chile silvestre. 3^{ra}. Convención Mundial de Chile. Chihuahua y Delicias, Chihuahua, México. 105-111 pp.
- Hervert-Hernández D., Sáyago-Ayerdi S. G., Goñi I. (2010). Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3399-3406.
- Hirschberg J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion Plant Biology*, 4: 210–218.
- Hornero-Méndez D., Costa-García J., and Mínguez-Mosquera M.I. (2002). Characterization of carotenoid high-producing *Capsicum annuum* cultivars selected for paprika production. *J. Agr. Food Chem.* 50:5711–5716.
- Hornero-Méndez D., Gomez-Ladron de Guevara R., Mínguez Mosquera M.I. (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3857–3864

- Hornero-Méndez D., Mínguez-Mosquera M.I. (2001). Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. J. Agric. Food Chem., 49: 3584-3588
- Justesen U., Knuthsen P., Leth T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. J Chromatogr A., 799: 101–110.
- Kappel V.D., Costa G.M., Scola G., Silva F.A., Landell M.F., Valente P., Souza D.G., Vanz D.C., Reginatto F.H., Moreira J.C. (2008) Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages, Journal of Medicinal Food, 11: 267-274
- Khan A.L., Waqas M., Hamayun M., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A., Lee I.J.(2013).Co-synergism of endophyte *Penicillium resedanum* LK6 with salicylic acid helped *Capsicum annuum* in biomass recovery and osmotic stress mitigation. BMC Microbiol. 1:13:51.
- Khandaker L., Ali M.B., Oba S. (2008). Total polyphenol and antioxidant activity of red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) as affected by different sunlight level. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci., 77: 395-401.
- Kim J.H., Kim S.J., Park H.R., In Choi J., Cheoul Ju Y., Chang Nam K., Kim S.J., Lee S.C. (2009). The different antioxidant and anticancer activities depending on the colour of oyster mushroom. J. Med. Plants Res., 3:1016-1020.

- Kraikruan W., Sangchote S., Sukprakan S. (2008). Effect of capsaicin on germination of *Colletotrichum capsiconidia*. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 42:417-422
- Kumar M.S., Kirubanandan S., Sripriya R., Sehgal P.(2008). Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. *J Surg Res.*,144:94–101
- Kurita S., Kitagawa E., Kim C., Momose Y., and Iwahashi H. 2002. Studies on the antimicrobial mechanism of capsaicin using yeast DNA microarray. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66: 532 – 536
- Lambert J.W., Sum, A.K. (2006). Molecular dynamics study of the properties of capsaicin in an 1-Octanol/water system. *The Journal of Physical Chemistry*, 110, 2351-2357.
- Lanzotti V. (2006).The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr A*. 1112(1-2):3-22.
- Light M.E., Van Staden J. (2004). Biological activities and plant distribution of saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94: 219-243
- Long, J., (1998) *Capsicum y cultura: la historia del chilli*. México, D. F., Fondo de Cultura Económica
- Mahlo S.M., McGaw L.J., Eloff J.N. (2010). Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens, *Crop Protection*, 29: 1529-1533
- Manirakiza, P., A. Covaci A., Schepens P. (2003). Pungency principles in *Capsicum* – analytical determinations and toxicology. *In: De, A. K. (ed) Capsicum. The Genus Capsicum*. Taylor and Francis. London. pp: 71-86.

- Maoka T., Fujiwara Y., Hashimoto K., Akimoto N. (2001). Isolation of a series of apocarotenoids from the fruit of the red paprika *Capsicum annuum* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 1601–1606.
- Massod A., Dogra J.V.V., Jha A.K. (1994). The influence of colouring and pungent anents of red chilli (*Capsicum annuum*) on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Letters in Applied Microbiology, 18: 184-186.
- Materska M., Perucka L. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). J. Agric. Food Chem. 53: 1750-1756.
- Mattila P., Kumpulainen J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diodearray detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3660–3667
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M. and Heredia, F. J. (2004), Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Arch Latinoam Nutr., 54, 149-154.
- Méndez-Trujillo V., González-Mendoza D., Gutiérrez-Miceli F.A. (2005). Carotenoid content and color of new cultivars inextractable chile pepper. Chapingo Mag. Hortic. Ser., 11: 215-218.
- Menichini F. R., Tundis M., Bonesi . (2009).The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. Food Chemistry, 114:553–560

- Menichini F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G., De Cindio B., Houghton P.J., Menichini F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv habanero. *Food Chem.*, 114: 553-560
- Mínguez-Mosquera M. I., Hornero-Méndez D. (1994). Comparative study of the effect of paprika processing on the carotenoids in peppers (*Capsicum annuum*) of the Bola and Agridulce varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1555-1560
- Montoya-Ballesteros L.C., Gardea-Bejar A., Ayala-Chavez G.M., Martinez-Núñez Y.Y., Robles-Ozuna L.E. (2010). Capsaicinoids and color in chilpetin (*Capsicum annuum* var. *aviculare*). Processing effect on sauces and pickles. *Mex. J. Chem. Eng.*, 9: 197-207
- Moreno-Limón S., González-Solís L.N., Salcedo-Martínez S.M., Cárdenas-Ávila M.L., Perales-Ramírez A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp". *Polibotánica*, 32: 193-205.
- Moreno-Limón S., Salcedo-Martínez S.M., Cárdenas-Ávila M.L., Hernández-Piñero J.L., Núñez-González M.A. (2012). Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var. *aviculare*) sobre el crecimiento in vitro de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica* 34, 171-184.

- Nabhan, G., Slater, M. and Yarger, L. (1990). "New Crops Small Farmers in Marginal Lands? Wild Chiles as a Case Study". En: M. Altieri M. and S. Hecht, S. (eds.) *Agroecology and Small Farm Development*, EUA, pp. 19-34.
- Núñez-Ramírez F., González-Mendoza D., Grimaldo-Juárez O., Díaz L.C. (2011). Nitrogen fertilization effect on antioxidants compounds in fruits of habanero chili pepper (*Capsicum chinense*). *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 827-830.
- Nur Ain Izzati M.Z., Siti Nordahliwate M.S., Nur Azlina J., Darnetty A.A., Salleh B. (2011). Isolation and identification of *Fusarium* species associated with *Fusarium* ear rot disease of corn. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 34: 325-330
- Oboh G, Rocha JBT (2007). Polyphenols in red pepper (*Capsicum annum* var. *aviculare* (Tepin) and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver. *Eur. Food Res., Technol.*, 225: 239-247.
- Oboh G., Rocha J.B.T. (2008). Water extractable phytochemicals from *Capsicum pubescens* (tree pepper) inhibit lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents in brain: in vitro. *Eur Food Res Technol.*, 226:707–713
- Okwu D.E., Nnamdi F.U. (2008). Evaluation of the chemical composition of *Dacryodes Edulis* and *Raphia Hookeri* Mann and Wendl exudates used in herbal medicine in South Eastern Nigeria. *Afr. J. Trad. Comp. Alt. Med.*, 5:194-200
- Ornelas-Paz J.J., Yahia E.M., Gardea-Bejar A.A. (2008). Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and

- relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography-APCI+ time of flight mass spectrometry. *Postharvest Biol. Technol.*, 50: 145-152.
- Pagán I., Betancourt M., de Miguel J., Piñero D., Fraile A.(2010) Genomic and biological characterization of *Chiltepín yellow mosaic virus*, a new tymovirus infecting *Capsicum annuum* var. *aviculare* in Mexico. *Arch Virol.*, 155: 675–684
- Pagnussatt F. A ., Kupski L., Toralles Darle F., Freitas Filoda P., Medeiros Del Ponte É., Garda-Buffon J., Badiale-Furlong E.(2013). *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas , 33, supl. 1,
- Palacios-Nava M.E., Moreno-Tetlacuilo L.M.A. (2004). Diferencias en la salud de jornaleras y jornaleros agrícolas migrantes en Sinaloa, México. *Salud .Publica Mex.*,46;286-29
- Pandey D.K., Tripathi N.N., Tripathi R.D., Dixit S.N. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Pflanzenkrankheid Pflanzenschutz*, 89:344-349
- Pedraza Robles, L. C. y Gómez A. A. (2008). Análisis exploratorio del mercado y la comercialización de chile piquín (*Capsicum. annuum*, var. *Aviculare*) en México.<http://www.eumed.net/rev/tecsistecat/n5/prgg.htm>
- Pietarinen S.P., Willför S.M., Vikström F.A., Holmbom B.R. (2006) Aspen knots, a rich source of flavonoids. *J Wood Chem Technol.*, 26: 245–258.

- Podolak I., Galanty A., Sobolewska D.(2010).Saponins as cytotoxic agents: a review.Phytochem. Rev., 9:425–474
- Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application of vitamin E. Anal. Biochem., 269: 337-341
- Ramírez-Meraz, M., Pozo, O.C., Rodríguez del Bosque, L.A., Medina, T.M.H., Villalón, M. (2002). Production technology for piquin pepper (*Capsicum annuum* var. arvivulare). Proceedings of the 16th International Pepper Conference, Tampico, Tamaulipas, Mexico, pp. 12-13.
- Recetas para mejorar vida y salud. Editorial Diana. México.
- Renault S., De Lucca A.J., Boue S., Bland J.M., Vigo C.B., Selitrennikoff C.P.(2003). CAY-I, a novel antifungal compound from cayenne pepper. Med. Mycol., 41:1-7
- Reyes-Escogido M.L., Gonzalez-Mondragon EG., Vazquez-Tzompantzi E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. Molecules, 16: 1253-1270.
- Riaz T., Khan S.N., Javaid A. (2009). Effect of co-cultivation and crop rotation on corm rots disease of *Gladiolus*. Sci. Hort. 121: 218-222.
- Ribeiro S.F.F., Carvalho A.O., Cunha M.D., Rodrigues R., Cruz L.P., Melo V.M.M., Carvalho A. O., Cunha M.D., Rodrigues R., Cruz L.P. , Melo V.M.M., Vasconcelos I.M., Melo E.J.T., Gomes V.M. (2007). Isolation and characterization of novel

- peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. *Toxicon*, 50: 600–611
- Robbins R.J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51: 2866–2887
- Rodriguez-Burruezo A., Prohens J., Raigon M.D., Nuez F. (2009). Variation for bioactive compounds in aji (*Capsicum baccatum* L.) and rocoto (*C. pubescens* R. & P.) and implications for breeding. *Euphytica*, 170:169-181.
- Rodriguez-Maturino A., Valenzuela-Solorio A., Troncoso-Rojas R., Gonzalez-Mendoza D., Grimaldo-Juarez O., Aviles-Marin M., Cervantes-Diaz L. (2012). Antioxidant activity and bioactive compounds of Chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) and Habanero (*Capsicum chinense*): A comparative study. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 1758-1763.
- Rojas-Aréchiga M., Casas A. Vázquez-Yanes C. (2001). Seed germination of wild and cultivated *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) from the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central México. *Journal of Arid Environments*, 49:279-287
- Ruelas, C., Tiznado-Hernandez M. E., Sanches-Estrada A., Robler-Burgueno M. R., Troncoso-Rojas R. (2006) . Changes in phenolic acid content during *Alternaria alternate* infection in tomato fruit. *J. Phytopathol.* 154:236-244.
- Sánchez-Estrada A., Tiznado-Hernández M.E., Ojeda-Contreras A.J., Troncoso-Rojas,R. (2009).Induction of defense mechanism against *Fusarium oxysporum* in netted

- melon (*Cucumis melo*) fruit with bio-elicitor. Journal of Phytopathology., 157: 24-32
- Santos L., Marín Sanchis V., and Ramos A.J. (2010). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Capsicum powder samples available on the Spanish market. Food Chemistry, 122:26–830
- Sauri-Duch P.E., Mabot R. (2006). Change in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum Chinense* Jack. Cv. Habanero) at two ripening stages. J. Food Chem., 94: 394-396.
- Scalzo R.L., Iannocari T., Summa C., Morelli R., Rapisarda P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. Food Chem., 85: 41-47.
- Sharma R.K., Agrawal M., Marshall F.M.(2009). Heavy metal in vegetables collected from production and market sites of tropical urban area of India. Food Chem.Toxicol., 47: 583-591
- Simmons E.G. (2000). Alternaria themes and variations (244-286): species on Solanaceae. Mycotaxon 65: 1-115.
- Simons V., Morrissey J. P., Latijnhouwers M., Csukai M., Cleaver A., Yarrow C., Osbourn, A. (2006). Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. Antimicrob Agents Chemother, 50, 2732–2740

- Singh T., Chittende, C. (2008). In-vitro antifungal activity of chill extracts in combination with *Lactobacillus casei* against common sapstain fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 62: 364–367.
- Slinkard K., Singleton V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.*, 28: 49-55.
- Song W., Zhou L., Yang C., Cao X., Zhang L., Liu X. (2004). Tomato Fusarium Wilt and its chemical control strategies in a hydroponic system. *Crop Protect.*, 23 :243–247
- Staniforth V., Chiu L.T., Yang N.S. (2006) Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *Carcinogenesis* 27:1803–1811.
- Stergiopoulou T., De Lucca A.J., Scm T., Meletiadiis J., Boue S., Walsh T.J. (2006). Antifungal activity of a steroid saponin (CAY-I) against dermatophytes. Abstract M-302, p. 398. 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Am. Society for Microbiology, Washington, DC
- Stergiopoulou T., De Lucca A. J., Meletiadiis J., Sein T., Boue S. M., Schaufele R., Roilides E., Ghannoum M., Walsh T. J. (2008). In vitro activity of CAY-1, a saponin from *Capsicum frutescens*, against *Microsporum* and *Trichophyton* species. *Medical Mycology*, 46: 805-810.
- Sun, S.W., Yu, H.Q., Zhang, H., Zheng, Y.L., Wang, J.J., Luo L. (2007). Quercetin attenuates spontaneous behavior and spatial memory impairment in D-

- galactose-treated mice by increasing brain antioxidant capacity. *Nutrition Research*, 27:169–175.
- Sung WS, Lee IS, Lee DG. 2007. Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by lycopene in *Candida albicans*. *J. Microbiol Biotechnol* 17(11), 1797-1804.
- Tamimi R.M., Hankinson S.E., Campos H., Spiegelman D., Zhang S., Colditz G.A.(2005). Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and risk of breast cancer. *Am J Epidemiol.*, 161:153–157.
- Tewksbury J., Nabhan G., Norman D., Suzan H., Tuxill J., Donovan J. (1999). In situ conservation of wild chiles and their biotic associates. *Conservation Biology*, 13: 98–107.
- Thomma B.P. (2003). *Alternaria* sp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4:225–236
- Treutter D. (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 7 581–591
- Tsrer L., Hazanovsky M., Mordechi-Lebiush S., Sivan S. (2001). Aggressiveness of *Verticillium dahliae* isolates from different vegetative compatibility groups to potato and tomato. *Plant Pathology* 50: 477-482.
- Tsuchiya H (2001). Biphasic membrane effects of capsaicin, an active component in *Capsicum* species. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 295–299.

- Valadez-Bustos M.G., Aguado-Santacruz G.A. (2009). In vitro propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes. In Vitro Cellular & Developmental BiologyPlant, 45 :650-658.
- Valadez-Bustos G., Aguado-Santacruz G.A., AguilarRincon H.V., Espitia-Rangel E., Montes-Hernandez S., Robledo-Paz A.(2009). In vitro propagation and agronomic performance of regenerated chili pepper (*Capsicum* spp.) plants from commercially important genotypes. In vitro cellular & developmental biology-plant, 45: 650-658
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J.(2007). Antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol., 39:44–84
- VanEtten H.D., Mansfield J.W., Bailey J., Farmer E.E. (1994). Letter to the editor: two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. Plant Cell, 1191-1192
- Vasanth R.P., Jayasankar, S., and Lay W. (2006). Variation in total phenolics and antioxidant capacity among European plum genotypes. Sci. Hortic. 108: 243–246.
- Vázquez-Flota F Miranda-Ham M.L., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., Nieto-Pelayo Y. (2007). La Biosíntesis de Capsaicinoides, el principio picante del Chile. Rev. Fitotec. Mex. 30(4), 353-360.

- Velioglu Y. S., Mazza G., Gao L., Oomah B. D. (1998).Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural Food & Chemistry*, 46: 4113–4117
- Veloso J., Prego C., Varela M.M., Carballeira R., Bernal A., Merino F., Díaz J.(2013).Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biol (Stuttg)*. doi: 10.1111/j.1438-8677.2012.00717
- Vergara S. J.(1982). Estudio preliminar de la germinación en chile piquín (*Capsicum frutescens* L.) Monterrey, N. L., México. I. T. E. S. M.
- Vidhyasekaran P. (2007). Plant defense activators: precise application technology Handbook of Molecular Technologies in Crop Disease ManagementHaworth Press, New York.
- Villalón H., Medina T., Soto J. M., Rodríguez L. A., Pozo O., Ramírez M., Garza F., López R., López A.R., M. Lara L. (2013). Efecto de diferentes intensidades de luz en la producción de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var aviculare). *Revista Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León* en prensa
- Vincken J.P., Heng L., de Groot A., Gruppen H.(2007).Review Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68:275-97.
- Votava E.J., Nabham G.P., Bosland P.W. (2002) Genetic diversity and similarity revealed via molecular analysis among and within an *in situ* population and ex

- situ* accessions of chiltepin (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Conserv Genet*, 3: 123–129.
- Wall M.M., Waddell C.A., and Bosland P.W. 2001. Variation in β -carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *HortScience* 36:746–749.
- Wall M.M., Wadell C.A., Bosland P.W. (2001). Variation in β - carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *Hort. Sci.*, 36: 746-749.
- Wilson C.L., Solar J.M., El Ghaouth A., Wisniewski M.E. (1997). Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*". *Plant Disease*, 81: 2.
- Xing F.B., Cheng G.X., and Yi K.K. (2006). Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*, .102: 1318-1321.
- Yao P., Nussler A., Liu L., Hao L., Song F., Schirmeier A., and Nussler N.(2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *Journal of Hepatology* 47: 253–61.