



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C



EVALUACIÓN DEL CAMBIO EN EL CONTENIDO Y PERFIL DE
COMPUESTOS FENÓLICOS EN *Capsicum chinense* EN
INTERACCIÓN CON EL OOMICETO FITOPATÓGENO *Pythium*
ultimum

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRO EN CIENCIAS E INNOVACIÓN
BIOTECNOLÓGICA EN LA ESPECIALIDAD DE
CIENCIAS AGROINDUSTRIALES**

PRESENTA

IBT. IVÁN EMANUEL HERRERA POOL

MÉRIDA, YUCATÁN. JULIO 2019.

**EVALUACIÓN DEL CAMBIO EN EL CONTENIDO Y
PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN *Capsicum
chinense* EN INTERACCIÓN CON EL OOMICETO
FITOPATÓGENO *Pythium ultimum***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS E INNOVACIÓN
BIOTECNOLÓGICA EN LA ESPECIALIDAD DE
CIENCIAS AGROINDUSTRIALES**

PRESENTA

IBT. IVÁN EMANUEL HERRERA POOL

DIRECTOR: DRA. NEITH ARACELY PACHECO LÓPEZ

CO – DIRECTOR: DRA. ANA LUISA RAMOS DÍAZ

CO – DIRECTOR: DR. MANUEL ALEJANDRO LIZARDI JIMÉNEZ

ASESOR: DRA. TERESA DEL ROSARIO AYORA TALAVERA

ASESOR: DR. JUAN CARLOS CUEVAS BERNARDINO

MÉRIDA, YUCATÁN A JULIO DE 2019

Mérida, Yucatán a 5 de Julio de 2019

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.

PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Iván Emanuel Herrera Pool**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “EVALUACIÓN DEL CAMBIO EN EL CONTENIDO Y PERFIL DE COMPUESTOS FENOLICOS EN *Capsicum chinense* EN INTERACCIÓN CON EL OOMICETO FITOPATÓGENO *Pythium ultimum*” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Maestro en CIENCIAS E INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA CON TERMINACIÓN EN CIENCIAS AGROINDUSTRIALES durante el examen correspondiente.

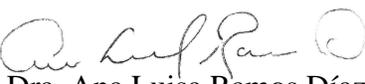
Y para que así conste firmamos la presente al día 5 del mes de Julio del año dos mil diecinueve.



Dra. Neith Aracely Pacheco López
Director de tesis



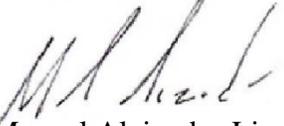
Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera
Asesora



Dra. Ana Luisa Ramos Díaz
Co-director de tesis



Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino
Asesor



Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez
Co-director externo de tesis

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho del Autor y la ley de la Propiedad Industrial le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollados pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de éste trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán, en todo caso por lo dispuesto por la ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.



IBT. Ivan Emanuel Herrera Pool

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto de ciencia de frontera del CONACyT (No. 35) “Cambios metabólicos y el sistema de transducción de señales asociados a la interacción de *Capsicum chinense* con *Pythium* sp.” del cual deriva este trabajo de tesis.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ), Unidad Sureste, por permitirme forma parte de la institución, y brindarme las instalaciones y equipos necesarios para realizar esta Tesis.

Al CONACyT por la beca proporcionada (número 814101/622230) durante el desarrollo del posgrado y por él cual fue posible finalizar este proyecto de tesis. Al CIATEJ por la beca complementaria proporcionada para mi estancia en Texas A&M University, College Station, TX, EE. UU.

A la mi directora, la Dra. Neith Pacheco, por dirigir con paciencia, dedicación y compromiso este proyecto de tesis, fungir de manera determinante en mi formación académica, por motivarme continuamente a seguir adelante y superarme a pesar de las dificultades. Gracias, Neith.

A mi Co-directora la Dra. Ana Luisa Ramos Díaz por co-dirigir la tesis y la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por su confianza, y por permitirme participar en este gran proyecto.

A mi Co-director el Dr. Manuel Alejandro Lizardi Jiménez por su confianza, sus recomendaciones y correcciones dirigidas a este trabajo de Tesis, y por haber sido clave en mi proceso de formación, y mi inserción en la labor científica.

A mis asesores, la Dra. Teresa del Rosario Ayora Talavera, y el Dr. Juan Carlos Cuevas Bernardino por sus valiosas observaciones y recomendaciones durante la realización de la Tesis.

A la Dra. Susanne Talcott y al Dr. Stephen Talcott, por recibirme en su laboratorio dentro del Departamento de Nutrición y Ciencias de los Alimentos durante mi estancia en Texas A&M University, College Station, TX.

A mis compañeros de laboratorio Nelly, Ana, José, Héctor y Jesús por sus consejos y aportaciones, y por haberme acompañado a lo largo de toda esta experiencia.

DEDICATORIAS

A William, quien formo parte de mi vida, y a quien siempre recordaré con mucho cariño

A mis padres quienes me han apoyado para lograr mis objetivos

CONTENIDO

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
ANTECEDENTES.....	6
□ Importancia económica del Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i>).....	6
Oomiceto fitopatógeno <i>Pythium ultimum</i>	7
□ Mecanismos de acción durante la interacción Planta-Patógeno.....	8
□ Compuestos fenólicos: generalidades, función biológica y estructura.....	9
□ Extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs) y no solubles (NEPs).....	14
□ Compuestos fenólicos solubles (EPs).....	14
□ Método de extracción convencional (EC).....	14
□ Técnicas avanzadas de extracción.....	15
□ Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	15
□ Compuestos fenólicos no solubles (NEPs).....	17
□ Extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) mediante hidrólisis ácida y alcalina	17
□ Métodos de cuantificación e identificación de compuestos fenólicos.....	18
□ Método espectrofotométrico	18
□ Método mediante cromatografía líquida (LC) acoplado a detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y/o espectrometría de masas (MS).....	19
□ Cromatografía líquida	19
□ Análisis mediante detector de arreglo de fotodiodos (PDA).....	20
□ Análisis mediante espectrometría de masas (MS).....	20
□ Compuestos fenólicos identificados en el género <i>Capsicum</i> mediante cromatografía líquida, detector de arreglo de fotodiodos y espectrometría de masas	21
□ Estudios del análisis de cambios del perfil y contenido de compuestos fenólicos del género <i>Capsicum</i> en interacción con microorganismos fitopatógenos	24
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS	29
CAPITULO 1:.....	30
Evaluación y análisis de la extracción de compuestos fenólicos en <i>Capsicum chinense</i>	30
1.1. INTRODUCCIÓN	31

1.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
1.2.1.	Reactivos químicos	34
1.2.2.	Material vegetal.....	34
1.2.3.	Pretratamiento de material vegetal	34
1.2.4.	Diseño de experimentos para la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)35	
1.2.4.1.	Extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs) mediante extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU).	37
1.2.4.2.	Ajuste de modelo de distribución gaussiana del contenido de fenoles totales (CFT) con diferentes parámetros de polaridad de los solventes.....	37
1.2.5.	Diseño de experimentos para la extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) 39	
1.2.5.1.	Pre-extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)	39
1.2.5.2.	Extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) mediante extracción ácida (EA) y alcalina (EB).	39
1.2.6.	Determinación del contenido de fenoles totales.....	40
1.2.7.	Análisis estadístico.....	41
1.3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
1.3.1.	Parámetros de polaridad de los solventes evaluados en la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)	42
1.3.2.	Efecto del solvente y el método de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos solubles (EPs) en hoja, tallo, raíz y fruto de <i>Capsicum chinense</i>	43
1.3.3.	Correlación de los parámetros de polaridad del solvente con el contenido compuestos fenólicos solubles (EPs) en hojas empleando un modelo de distribución gaussiana	52
	^d Desviación estándar del modelo.....	54
1.3.4.	Efecto de la extracción ácida (EA) y extracción alcalina (EB) sobre el contenido de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) en hoja, tallo y raíz de <i>Capsicum chinense</i>	56
1.4.	CONCLUSIONES	59
CAPITULO 2:.....		60
Análisis e identificación de compuestos fenólicos en <i>Capsicum chinense</i> mediante UPLC-PDA-ESI-MS.....		60
2.1.	INTRODUCCIÓN	61
2.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.2.1.	Reactivos químicos	63
2.2.2.	Extractos de compuestos fenólicos solubles (EPs) y no solubles (NEPs) de <i>Capsicum chinense</i> analizados mediante UPLC-PDA-ESI-MS.....	63
2.2.3.	Análisis cromatográfico mediante UPLC-PDA-ESI-MS	64
2.2.4.	Análisis estadístico.....	65

2.3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
2.3.1.	Compuestos fenólicos solubles (EPs) identificados en <i>Capsicum chinense</i> mediante UPLC-PDA-ESI-MS	66
2.3.2.	Análisis del efecto de la polaridad del solvente sobre la extracción de los principales compuestos fenólicos solubles (EPs) en hojas identificados en <i>Capsicum chinense</i>	80
2.3.3.	Compuestos fenólicos no solubles (NEPs) identificados en <i>Capsicum chinense</i> mediante UPLC-PDA-ESI-MS	83
2.4.	CONCLUSIONES	98
CAPITULO 3:		99
Análisis del cambio en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en <i>Capsicum chinense</i> frente a la interacción con <i>Pythium ultimum</i>		99
3.2.1.	Reactivos químicos	103
3.2.2.	Material vegetal y oomiceto fitopatógeno <i>P. ultimum</i>	103
3.2.3.	Preparación de plántulas de <i>C. chinense</i>	104
3.2.4.	Preparación de medio e inóculo de <i>P. ultimum</i>	104
3.2.5.	Preparación del sistema para la interacción de plántulas de <i>C. chinense</i> con <i>P. ultimum</i>	105
3.2.6.	Extracción de EPs y NEPs	107
3.2.7.	Determinación de CFT y análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS.....	107
3.2.8.	Análisis estadístico	107
3.3.1.	Contenido de EPs y NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	108
3.3.2.	Contenido de EPs y NEPs en fruto de plantas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	114
3.3.3.	Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de EPs y NEPs en diferentes tejidos de <i>Capsicum chinense</i> tras la infección producida por <i>P. ultimum</i>	116
3.3.4.	Mecanismo de defensa propuestos para <i>C. chinense</i> frente a la interacción con el oomiceto fitopatógeno <i>P. ultimum</i>	129
CONCLUSIONES GENERALES		135
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....		136
TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS		137
REFERENCIAS		139
ANEXOS.....		149
1.	Esquematización del sistema de extracción convencional	149
2.	Esquematización del sistema de extracción asistida por ultrasonido	149
3.	Análisis estadísticos de la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)	150
4.	Análisis estadísticos de la extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs)	152

5. Estructura y mecanismo de fragmentación propuesto para compuestos fenólicos identificados en <i>Capsicum chinense</i>	155
6. Análisis estadístico del efecto el solvente de extracción sobre el contenido de los principales fenólicos solubles (EPs) en <i>Capsicum chinense</i>	162
7. ANOVA simple y ANOVA multifactorial empleado para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos empleados sobre la extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) identificados por UPLC- PDA-ESI-MS.	164
8. ANOVA del efecto de la infección producida por <i>Pythium ultimum</i> sobre el contenido de compuestos fenólicos solubles y no solubles en <i>Capsicum chinense</i>	165

LISTA DE FIGURAS

ANTECEDENTES

Figura 1. Clasificación y estructura básica de los compuestos fenólicos (presentado de acuerdo con la clasificación propuesta por Soto et al., 2015).....	12
Figura 2. Ruta metabólica simplificada para la síntesis de compuestos fenólicos.	13
Figura 3. Esquematación de principio de extracción sólido-líquido (SLE) a partir de matrices vegetales empleando métodos convencionales	15
Figura 4. Esquematación del principio de extracción asistida por ultrasonido (EAU) en matrices vegetales (modificado de Medina-Torres et al., 2017).....	16
Figura 5. Representación de la unión de compuestos fenólicos con las diferentes estructuras de la pared celular vegetal (Modificado de Acosta-Estrada et al., 2013)	17

CAPITULO 1: Análisis y evaluación en la extracción de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense*

Figura 1. 1. Contenido compuestos fenólicos solubles (EPs) en hoja de <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itzá obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción convencional (EC) utilizando diferentes solventes (Hx: hexano, AcOEt: acetato de etilo, Ace: acetona, MeOH: metanol, Ace 80%: acetona al 80%, MeOH 80%: metanol al 80%, MeOH 50%: metanol al 50%, MeOH 20%: metanol al 20%, AcOH 1%: ácido acético al 1%, A: agua).....	46
Figura 1. 2. Contenido de compuestos fenólicos solubles (EPs) en raíz y tallo de <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itzá obtenidos mediante extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU) utilizando diferentes solventes (Hx: hexano, AcOEt: acetato de etilo, Ace: acetona, MeOH: metanol, Ace 80%: acetona al 80%, MeOH 80%: metanol al 80%).....	49
Figura 1. 3. Contenido de compuestos fenólicos solubles (EPs) en frutos de <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itzá obtenido mediante extracción convencional (EC) empleando diferentes solventes (Hx: hexano, AcOEt: acetato de etilo, Ace: acetona, MeOH: metanol, MeOH 80%: metanol al 80%, MeOH 50%: metanol al 50%, Ace 20%: acetona al 20%, MeOH 20%: metanol al 20%, AcOH 1%: ácido acético al 1%, A: agua).	51
Figura 1. 4. Gráficos de modelo de distribución gaussiana. Las gráficas de distribución gaussiana fueron obtenidas al correlacionar el CFT con la constante dieléctrica (A y B), el índice de polaridad (C y D) y el parámetro de solubilidad polar (E y F) de los solventes empleados en las extracción de compuestos fenólicos de hojas de <i>C. chinense</i> . Los datos para los gráficos se obtuvieron empleado dos métodos, extracción asistida por ultrasonido (EAU: modelo A, C y E) y extracción convencional (EC: modelo B, D y F). -- Banda de confianza (95%), -- Banda de predicción (95%), -- Distribución Gaussiana, • Parámetro de polaridad (constante dieléctrica, índice de polaridad o parámetro de solubilidad polar) vs CFT.....	55
Figura 1. 5. Contenido de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) presentes en raíz, tallo y hoja extraídos mediante hidrólisis ácida (EA) y alcalina (EB), con solvente acuoso (SA) y orgánico (SO). AM: HCl 2N/Metanol, AA: HCl 2 N, BM: NaOH 2N/Metanol al 80%, BA: NaOH 2N.....	58

CAPITULO 2: Análisis e identificación de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* mediante UPLC-PDA-ESI-MS

Figura 2. 1. Principales compuestos identificados en extractos de raíz, tallo, hoja y fruto de <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itza obtenidos a través de cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA).....	67
Figura 2. 2. Porcentaje de rendimiento de los principales compuestos identificados en <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itza (A: N-cafeoyl putrescina, B: Ácido clorogénico, C: Lycoperodine 1, D: Apigenina-6,8-di-C-hexosido, E: Ácido vanílico-4-β-O-glucósido, F: Phloretin-5,6-di-C-hexosido, G: Luteolina-7-O-(2-apiosil) hexosido, H: Apigenina-7-O-(2-apiosil) hexosido, I: Diosmetina-7-O-(2-apiosil) hexosido, J: Luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido, K: Apigenina-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido, L: Chrysoeriol-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido) vs constante dieléctrica (CD) de los solventes de extracción.....	82
Figura 2. 3. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (20 compuestos), tallo (16 compuestos) y hoja (7 compuestos) de <i>Capsicum chinense</i> obtenidos mediante extracción ácida (EA) con solvente orgánico (SO). Código de tratamiento: AM. Señal analítica tomada a 290 nm.	94
Figura 2. 4. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (20 compuestos), tallo (16 compuestos) y hoja (7 compuestos) de <i>Capsicum chinense</i> obtenidos mediante extracción ácida (EA) con solvente orgánico (SO). Código de tratamiento: AM. Señal analítica tomada a 290 nm.	95
Figura 2. 5. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (15 compuestos), tallo (10 compuestos) y hoja (10 compuestos) de <i>Capsicum chinense</i> obtenidos mediante extracción alcalina (EB) con solvente acuoso (SA). Código de tratamiento: BA. Señal analítica tomada a 290 nm.....	96
Figura 2. 6. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (14 compuestos), tallo (11 compuestos) y hoja (13 compuestos) de <i>Capsicum chinense</i> obtenidos mediante extracción alcalina (EB) con solvente orgánico (SO). Código de tratamiento: BM. Señal analítica tomada a 290 nm.....	97

CAPITULO 3: Análisis del cambio en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* frente a la interacción con *Pythium ultimum*

Figura 3. 1. Preparación del sistema de infección de raíces de <i>Capsicum chinense</i> con <i>P. ultimum</i>	106
Figura 3. 2. Contenido EPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i> . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.	109
Figura 3. 3. Contenido de NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i> . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas. ...	112
Figura 3. 4. Porcentaje de distribución EPs y NEPs en raíz, tallo y hoja de plántula de <i>C. chinense</i> infectada y no infectada con <i>P. ultimum</i>	113
Figura 3. 5. Distribución porcentual y contenido de EPs y NEPs en fruto de plantas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i> . Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.	116
Figura 3. 6. Mecanismo de defensa en raíces de plántulas de <i>C. chinense</i> frente a la interacción con el oomiceto fitopatógeno <i>P. ultimum</i> . La acumulación de NEPs en estructuras de la pared celular forma parte de HR en el sitio local de la infección. También se propone la posible acumulación de ROS que en conjunto con los EPs son sustrato de POD.	130

Figura 3. 7. El mecanismo de SAR es inducido en fruto de plantas de *C. chinense* frente a la interacción en raíz con el oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*. Se propone la señalización mediada por ROS desde el sitio local de la infección, lo que produce la activación de genes responsables de la codificación de la PAL y permite la acumulación de EPs como N-cafeoyl putrescina, derivados de apigenina, luteolina y ácidos hidroxicinámicos. 131

Figura 3. 8. Mecanismo de acción propuesto para N-cafeoyl putrescina frente a la infección de *P. ultimum*. En el sitio de infección producida por *P. ultimum* el compuesto N-cafeoyl putrescina es catalizado en dos subunidades (putrescina y ácido cafeico) por peroxidasas encontradas en la pared celular primaria, estas subunidades son utilizadas como sustrato para la formación de un dominio polialifático y poliaromático durante la suberización. 133

Figura 3. 9. Sitio de formación del dominio polialifático y poliaromático durante la suberización. La formación de ambos dominios se produce en la lamilla media y compuesta ubicada entre las paredes celulares de dos células adyacentes..... 133

LISTA DE TABLAS

ANTECEDENTES

Tabla 1. Estudios enfocados en la identificación de compuestos fenólicos en <i>Capsicum</i> spp. mediante herramientas cromatográficas.	22
Tabla 2. Estudios y análisis de cambios en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en <i>Capsicum</i> spp. frente a la interacción con patógenos.....	25

CAPITULO 1: Análisis y evaluación en la extracción de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense*

Tabla 1. 1. Diseño experimental para la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs) en fruto, hoja, tallo y raíz de <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itzá mediante extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU) empleando diferentes solventes.	36
Tabla 1. 2. Diseño experimental para la extracción de compuestos fenólicos de la fracción no solubles en hoja, tallo y raíz de <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itzá mediante extracción ácida (EA) y alcalina (EB).....	40
Tabla 1. 3. Parámetros de polaridad: Constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar de los solventes evaluados en la extracción de compuestos fenólicos en <i>Capsicum chinense</i> Var. Chichen Itzá.....	43
Tabla 1. 4. Constante “a” (máximo valor de CFT), “b” (coeficiente de distribución) y X_0 (valor del parámetro de polaridad) de la ecuación de distribución gaussiana, correlación de Pearson al correlacionar el contenido de fenoles totales (CFT) empleando extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción convencional (EC) con la constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar, y prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.....	54

CAPITULO 2: Análisis e identificación de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* mediante UPLC-PDA-ESI-MS

Tabla 2. 1. Compuestos fenólicos solubles (EPs) identificados en extractos de raíz, tallo, hoja y fruto de <i>Capsicum chinense</i> mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC) con arreglo de fotodiodos (PDA) y espectrometría de masas (MS).....	77
Tabla 2. 2. Compuestos fenólicos solubles (EPs) hidrolizados identificados en extractos de hoja de <i>Capsicum chinense</i> mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC) con arreglo de fotodiodos (PDA) y espectrometría de masas (MS).....	79
Tabla 2. 3. Compuestos fenólicos identificados en extractos de raíz, tallo y hoja de <i>Capsicum chinense</i> var. Chichen Itzá mediante UPLC-PDA. Se muestra el λ_{max} de la huella espectral (210 a 400 nm) para cada compuesto, los tratamientos con los que son extraíbles (AM, BM, AA, BA) y su distribución en los tejidos en plántulas de chile habanero	90
Tabla 2. 4. Compuestos fenólicos identificados en extractos de raíz, tallo y hoja de <i>Capsicum chinense</i> var. Chichen Itzá mediante UPLC-PDA-ESI-MS. Se muestra el λ_{max} de la huella espectral (210 a 400 nm), los fragmentos obtenidos mediante espectrometría de masas para cada compuesto, los tratamientos con los que son extraíbles (AM, BM, AA, BA) y su distribución en los tejidos en plántulas de chile habanero	92

Tabla 2. 5. Área integrada de los compuestos fenólicos no solubles (NEPs) detectados e identificados en los cromatogramas de extractos de raíz, tallo y hoja de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá obtenidos mediante UPLC-PDA. Se muestra el área integrada ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) de los cromatogramas obtenidos con una señal analítica de 290 nm (comparación de medias mediante método de Tukey). EA: extracción ácida, EB: extracción alcalina; SA: solvente acuoso, SO: solventes orgánico; AA: HCl 2N, AM: HCl 2N/MeOH, BA: NaOH 2N, BM: NaOH 2N/MeOH al 80% (condiciones de extracción establecidas en el apartado 1.2.5.2). 93

CAPITULO 3: Análisis del cambio en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* frente a la interacción con *Pythium ultimum*

Tabla 3 1. Contenido de EPs y NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	112
Tabla 3 2. Contenido de EPs y NEPs presentes en fruto de plantas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	114
Tabla 3.3. Análisis mediante UPLC-PDA de EPs en raíz, tallo y hojas de plántulas de <i>Capsicum chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>Pythium ultimum</i>	117
Tabla 3.4. Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de EPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	122
Tabla 3 5. Análisis mediante UPLC-PDA de EPs en fruto de plantas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	123
Tabla 3.6. Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de EPs en fruto de plantas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	126
Tabla 3 7. Análisis mediante UPLC-PDA de NEPs en raíz, tallo y hojas de plántulas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	127
Tabla 3 8. Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de <i>C. chinense</i> infectadas y no infectadas con <i>P. ultimum</i>	128

LISTA DE ABREVIATURAS

Símbolo	Significado
A	Agua
Ace	Acetona
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
ACV	Análisis de componentes de varianza
BS	Base seca
CD	Constante dieléctrica
CFT	Contenido de fenoles totales
DAD	Arreglo de diodos (por sus siglas en inglés)
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño (por sus siglas en inglés)
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
EC	Extracción convencional
EPs	Compuestos fenólicos solubles (por sus siglas en inglés)
FN	Fase normal
FR	Fase reversa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (por sus siglas en inglés)
HR	Respuesta hipersensible (por sus siglas en inglés)
Hx	Hexano
MDDE	Extracción dual asistida por microondas y destilación simultanea (por sus siglas en inglés)
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas (por sus siglas en inglés)
NEPs	Compuestos fenólicos no solubles (por sus siglas en inglés)
NO	Óxido nítrico
P'	Índice de polaridad
PAL	Fenilalanina amonio liasa (por sus siglas en inglés)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (por sus siglas en inglés)
PCD	Muerte celular programada (por sus siglas en inglés)
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos (por sus siglas en inglés)
PHWE	Extracción presurizada con agua caliente (por sus siglas en inglés)
POD	Peroxidasa (por sus siglas en inglés)
PPO	Polifenol oxidasa (por sus siglas en inglés)
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (por sus siglas en inglés)
PSP	Parámetro de solubilidad polar
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
RRC	Relacionadas a la resistencia constitutiva (por sus siglas en inglés)
RRI	Relacionadas a la resistencia inducida (por sus siglas en inglés)
RRMs	Metabolitos relacionados a la resistencia (por sus siglas en inglés)
RRPs	Proteínas relacionadas a la resistencia (por sus siglas en inglés)
SAR	Resistencia sistemática adquirida (por sus siglas en inglés)
SFE	Extracción de fluidos supercríticos (por sus siglas en inglés)
SLE	Extracción solido-líquido (por sus siglas en inglés)
TR	Tiempo de retención
UV-VIS	Luz ultravioleta del espectro visible (por sus siglas en inglés)
UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficiencia (por sus siglas en inglés)

**EVALUACIÓN DEL CAMBIO EN EL CONTENIDO Y
PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN *Capsicum
chinense* EN INTERACCIÓN CON EL OOMICETO
FITOPATÓGENO *Pythium ultimum***

RESUMEN

El presente trabajo se enfocó en la evaluación del cambio en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* durante la interacción con el oomiceto fitopatógeno *Pythium ultimum*, tomando en consideración que *C. chinense* es un cultivo de interés comercial y cultural en la región de la península de Yucatán, y que estos metabolitos secundarios tienen significancia en los procesos de adaptación de las plantas frente a condiciones de estrés como la interacción con patógenos.

Los objetivos planteados fueron A) Evaluar los métodos de extracción de compuestos fenólicos en *C. chinense*. B) Identificar el perfil de compuestos fenólicos en *C. chinense*. C) Evaluar el cambio contenido y perfil de compuestos fenólicos en *C. chinense* frente a la interacción con *Pythium ultimum*. D) Modelar el mecanismo que explique los cambios de compuestos fenólicos durante la interacción de *C. chinense* con *P. ultimum*.

En virtud de lo anterior, se evaluó la extracción compuestos fenólicos solubles (EPs) y no solubles (NEPs) en plántula y fruto de *C. chinense*. Se evaluaron dos métodos (EAU y EC) y diferentes solventes de extracción. Los resultados mostraron que el solvente de extracción tiene un efecto significativo sobre el contenido de EPs, y se obtiene un alto contenido de EPs con MeOH al 50%. Se obtuvo una mayor cantidad de EPs en hoja ($\mu = 12.25$ mg EAG/g BS), con respecto a tallo ($\mu = 3.36$ mg EAG/g BS) y raíz ($\mu = 2.21$ mg EAG/g BS), en fruto se observó un promedio de EPs de 21.48 mg EAG/g BS. Mediante un modelo de distribución gaussiana, los resultados indicaron que existe una importante correlación ($R: 96$) entre el contenido de EPs y la polaridad (constante dieléctrica) de los solventes de extracción. Con relación a los NEPs, se evaluó el efecto de la extracción ácida y alcalina. Los resultados

mostraron una mayor distribución de NEPs fue observado en raíz ($\mu = 16.62$ mg EAG/g BS), en comparación con tallo ($\mu = 11.76$ mg EAG/g BS) y hoja ($\mu = 10.55$ mg EAG/g BS).

Posteriormente, mediante UPLC-PDA-ESI-MS se determinó el perfil de EPs y NEPs en raíz, tallo, hoja y fruto de *C. chinense*. Se logró la identificación tentativa de 39 EPs y 42 NEPs distribuidos en los diferentes tejidos. Los principales EPs identificados fueron N-cafeoyol putrescina, ácido clorogénico, derivados de apigenina, luteolina, chrysoeriol, y diosmetina, mientras que los NEPs consistían principalmente en ácidos hidroxicinámicos como derivados de ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, y ácido cumárico de acuerdo con su huella espectral en la UV (190 a 400 nm). También se identificó en raíz la presencia de N-feruloyl putrescina y N-feruloyl tiramina.

Para finalizar, se determinó el cambio en el contenido y perfil de EPs y NEPs en plántula y fruto de *C. chinense* durante la infección en raíz producida por *P. ultimum*. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en el contenido de EPs entre plántulas infectadas y no infectadas, sin embargo, se observó una acumulación significativa de NEPs en raíz. Por su parte, en fruto se observó la acumulación de EPs y una disminución en el contenido de NEPs durante la infección producida en la raíz. Los resultados obtenidos mediante UPLC-PDA-ESI-MS mostraron una acumulación significativa de N-cafeoyol putrescina en fruto durante la infección, lo que sugiere que este compuesto tiene un papel importante en el mecanismo de defensa de *C. chinense*. En correlación con los resultados obtenidos se propuso el mecanismo de acumulación de N-cafeoyol putrescina y su posible mecanismo de acción frente a la infección producida por *P. ultimum*.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en el contenido y perfil de compuestos fenólicos como parte de la respuesta de *Capsicum chinense* frente a la interacción con el oomiceto *Pythium ultimum*, el cual, es considerado un fitopatógeno con un importante impacto económico en diversos cultivos de interés comercial (Kamoun *et al.*, 2014). Esto como parte del proyecto de ciencia de frontera del CONACyT (No. 35) denominado “Cambios metabólicos y el sistema de transducción de señales asociados a la interacción de *Capsicum chinense* con *Pythium* sp.”

Inicialmente se presentan los fundamentos básicos que complementan el desarrollo del presente trabajo, el cual está integrado en los siguientes capítulos:

En el primer capítulo “Evaluación y análisis de la extracción de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense*” se estudió el efecto del solvente y el método de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos solubles (EPs por sus siglas en inglés) y no solubles (NEPs por sus siglas en inglés) en extractos crudos obtenidos a partir de diferentes tejidos de plántula (raíz, tallo y hoja) y fruto de *C. chinense*. Estos resultados permitieron determinar el efecto de la polaridad de diferentes solventes sobre el contenido de EPs empleando modelos de distribución gaussiana. También se evaluó el efecto de la extracción ácida y alcalina sobre el contenido de NEPs en los diferentes tejidos de plántula. En términos generales se determinó la distribución de EPs y NEPs en diferentes tejidos de *C. chinense*.

En el segundo capítulo “Análisis e identificación de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* mediante UPLC-PDA-ESI-MS” se muestran los resultados derivados de la separación, detección e identificación de EPs y NEPs en extractos crudos obtenidos a partir

de diferentes tejidos (raíz, tallo, hoja y fruto) de *C. chinense* empleando cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UPLC por sus siglas en inglés) acoplado a un detector de fotodiodos (PDA por sus siglas en inglés) y espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés). También se evaluó el efecto de la polaridad del solvente sobre la eficiencia de extracción de los principales EPs presentes en hoja de *C. chinense*, y el efecto de los diferentes tratamientos de extracción ácida y alcalina sobre el contenido de los NEPs detectados en los diferentes tejidos de plántula.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el primer y segundo capítulo se establecieron los criterios para establecer las condiciones de extracción y análisis de EPs y NEPs en diferentes tejidos de *C. chinense* durante la interacción con el oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*.

En el tercer capítulo “Análisis del cambio en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* frente a la interacción con *Pythium ultimum*” se establece la interacción del oomiceto fitopatógeno *P. ultimum* en raíces de plántulas de *C. chinense*, y se evalúan los cambios en el contenido de EPs y NEPs, así como el perfil cromatográfico mediante UPLC-PDA-ESI-MS de los diferentes tejidos de plántula. Este mismo procedimiento de análisis se realiza para evaluar los cambios de EPs y NEPs como parte de la respuesta sistemática en fruto obtenido de plantas de *C. chinense* infectadas en la raíz.

Para finalizar, se discute acerca del posible mecanismo de acción de los principales compuestos fenólicos acumulados durante la infección, se establecen las conclusiones generales, las perspectivas y recomendaciones relacionadas a este trabajo.

ANTECEDENTES

▪ **Importancia económica del Chile habanero (*Capsicum chinense*)**

El chile habanero (*C. chinense*) es un cultivo tradicional del sureste mexicano con alto impacto cultural y comercial en el mercado nacional e internacional; es decir, es un producto agrícola importante en la dieta de la población en la península de Yucatán, es representativo debido a la alta pungencia que producen sus frutos con respecto a otras especies de chiles, y su producción genera empleos y divisa para el país (Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2018).

De acuerdo con la Planeación Agrícola Nacional (2017-2030) publicado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), México es el principal exportador de chiles y pimientos del mundo, lo que equivale al 3.5% del PIB agrícola nacional, y 986.5 miles de toneladas de estos productos agrícolas son exportados (SAGARPA, 2016).

Con relación a lo anterior, en la península de Yucatán la producción de chile habanero cuenta con >300 hectáreas de cultivo, las cuales producen un total de 3,520 toneladas en los estados de Yucatán, Quintana Roo y Campeche, lo que en el mercado equivale a un ingreso de 79,523,700 de pesos (SIAP, 2015). Además, actualmente la región cuenta con la denominación de origen de este cultivo (WIPO, 2010) y se ha desarrollado la normativa correspondiente (NOM-189-SCFI-2017) para regular las características de calidad de este cultivo agrícola.

El interés comercial dirigido hacia este cultivo se debe principalmente a que sus frutos presentan una alta pungencia, la cual se atribuye a la acumulación de capsaicinoides; este grupo de metabolitos ha adquirido un amplio número de aplicaciones en la industria alimenticia y farmacéutica, y a través de la diversificación de sus posibles usos ha

incrementado su importancia y valor comercial (Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2018). Además, se trata de una buena fuente de nutrientes, como compuestos fenólicos (Butcher *et al.*, 2012), capsaicinoides (Bosland y Baral, 2007), carotenoides y ácidos orgánicos (Topuz y Ozdenir, 2007) con potenciales propiedades biológicas que promueven efectos positivos para la salud (Materska y Perucka 2005; Cao *et al.*, 2015).

Oomiceto fitopatógeno *Pythium ultimum*

Los oomicetos son un grupo de protistas filamentosos, se tratan de microorganismos diploides, tienen la capacidad de formar micelio y dispersar oósporas como estructuras de resistencia para sobrevivir en el suelo hasta entrar en contacto con un nuevo hospedero, y tienen la capacidad de formar esporangios para la liberación de zoosporas, las cuales son células biflageladas empleadas como mecanismos de colonización (Thines y Kamoun, 2010).

Entre los principales oomicetos de importancia económica está *Pythium ultimum* con capacidad de infectar semillas y raíces en el suelo de más de 300 especies de plantas. Durante el proceso de infección *Pythium ultimum* emplea hifas que penetran el tejido vegetal mediante la secreción de fitotoxinas, enzimas proteasas y lipasas; su principal estrategia es la inducción de la muerte de las células vegetales de su hospedero para poder alimentarse, por lo que, se considera un microorganismo necrótico. Este oomiceto habita comúnmente en el campo, estanques y materia vegetal en descomposición, pero a diferencia de otras especies del género *Pythium* es capaz de colonizar tejido vivo. (Van West *et al.*, 2003; Zerillo *et al.*, 2013; Kamoun *et al.*, 2014).

▪ **Mecanismos de acción durante la interacción Planta-Patógeno**

Los patógenos son capaces de producir elicitores llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), estos incluyen péptidos, metabolitos, componentes de la pared celular, enzimas y toxinas empleadas para suprimir el mecanismo de defensa de la planta. De igual modo, derivado del daño producido durante la infección se producen patrones moleculares asociados al daño (DAMPs por sus siglas en inglés). En estados avanzados de la infección los microorganismos necrotrofos y hemibiotrofos producen una importante cantidad de enzimas cutinasas, xilanasas, celulasas, pectina liasas y lacasas para descomponer la pared celular de hospedador, lo que produce la liberación de DAMPs. Los DAMPs y PAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrón (PRRs por sus siglas en inglés) en la membrana plasmática; tras el reconocimiento se desencadena una cascada de señalizaciones químicas dirigidas a la activación del mecanismo de defensa de la planta (Kushalappa *et al.*, 2016).

Tras establecerse el contacto, el hospedero activa defensas inducibles dirigidas que le permiten llevar a cabo la contención del patógeno, algunas de estas estrategias son la rápida muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés), que forma parte de la llamada respuesta hipersensible (HR por sus siglas en inglés), el reforzamiento de la pared celular, síntesis de metabolitos secundarios (RRMs por sus siglas en inglés) y proteínas relacionadas a la resistencia (RRPs por sus siglas en inglés), y en condiciones favorables es posible que se establezca la resistencia a subsiguientes infecciones, la cual se denomina resistencia sistemática adquirida (SAR por sus siglas en inglés) (Kushalappa *et al.*, 2016).

Los RRM denominados fitoanticipinas se producen de manera constitutiva (RRC por sus siglas en inglés) en plantas en crecimiento, se almacenan en tricomas, glándulas y capas de

células epidérmicas en formas no tóxicas, y son liberados durante el ataque de un patógeno. Por otro lado, están los compuestos de bajo peso molecular, y cuya síntesis es inducida *de novo* después de la invasión del patógeno; estas son conocidas como fitoalexinas (RRI por sus siglas en inglés) (Ahuja *et al.*, 2011). Las plantas producen una gran diversidad de estos compuestos entre los que podemos encontrar compuestos fenólicos, terpenoides y ácidos grasos con propiedades antimicrobianas. Estos metabolitos pueden neutralizar al patógeno o formar polímeros más complejos que se depositan en la pared celular para reforzarla. La síntesis de estos compuestos tiene una importancia importante en la resistencia de las plantas frente al ataque de patógenos (Kushalappa *et al.*, 2016).

- **Compuestos fenólicos: generalidades, función biológica y estructura**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en todas las plantas que se encuentran distribuidos en diferentes órganos; su contenido y perfil dependen de cada especie, la variedad y las condiciones ambientales; su importancia radica en que cumplen diversas funciones biológicas y ecológicas esenciales en los procesos de adaptación (De la Rosa *et al.*, 2019), por ejemplo, pueden actuar como atractores de polinizadores, en el mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos (Novo *et al.*, 2017), como atractores de microorganismos benéficos en la rizosfera (Badri y Vivanco, 2009), en el mecanismo de dispersión de semillas, como protección frente a la irradiación UV y el estrés oxidativo (Agati *et al.*, 2012; Verna y Shukla, 2015; León-Chan *et al.*, 2017), es decir, su presencia influye en la capacidad que tienen las plantas para competir y sobrevivir en su entorno (Naikoo *et al.*, 2019).

En cuanto a su estructura, los compuestos fenólicos se caracterizan por la presencia de uno o varios anillos aromáticos unidos a grupos hidroxilo como sustituyentes. Con relación a su estructura pueden clasificarse de manera general como compuestos fenólicos simples (ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, y cumarinas), aquellos que presentan un grupo fenol en su estructura, y como polifenoles (flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas) caracterizados por la presencia de más de un grupo fenol en su estructura (**Figura 2**) (Soto *et al.*, 2015).

Los principales grupos de compuestos fenólicos se describen a continuación (Soto *et al.*, 2015):

- **Ácidos fenólicos:** Estos compuestos están presentes tanto en forma soluble como unidos a otras estructuras, se dividen en dos principales grupos, ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos. Los primeros presentan un esqueleto común C6 – C1 y los segundos un esqueleto C6 – C3. Estos varían en número y posiciones de grupo hidroxilo y metoxilo unidos en el anillo aromático.
- **Cumarinas:** Son compuestos derivados del ácido cinámico por ciclación de la cadena lateral del ácido o – cumárico. Comúnmente se encuentran en formas glicosiladas.
- **Flavonoides:** Se trata de un grupo de compuestos que comprende más de 10,000 diferentes estructuras (Agati *et al.*, 2012). La estructura consiste en un esqueleto básico de 15 carbonos (C6 – C3 – C6); el anillo A es derivado de la ruta del ácido malónico, y el anillo B de la fenilalanina a través de la ruta del ácido shikímico. Los patrones de sustitución en el anillo C resulta en varias clases de flavonoides, entre las que se puede mencionar a los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanones, flavanoles y antocianinas, siendo la chalcona un intermediario de la síntesis de cada

uno de ellos. Estos se acumulan en las vacuolas y son sintetizados durante condiciones de estrés como el producido por el exceso de luz UV; son efectivos compuestos efectivos “atrapando” especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Agati *et al.*, 2009). También exhiben diferentes funciones, que van desde la pigmentación, atracción de polinizadores y la defensa frente a diversos factores de estrés biótico y abiótico. En el caso de los isoflavonoides estos están reportados como un grupo de compuestos con propiedades antagónicas contra patógenos, y son reconocidos como fitoalexinas debido a que son sintetizados en respuesta a infecciones fúngicas y bacterianas con el propósito de limitar la progresión de infecciones.

- **Estilbenos:** Son un pequeño grupo de fenilpropanoides caracterizados por poseer una cadena principal de 1,2 – difeniletieno. La mayoría de los estilbenos vegetales son derivados de la unidad básica de trans – resveratrol. Estos son acumulados en formas libres y glicosiladas.
- **Taninos:** Son compuestos fenólicos con peso molecular de 500 a 3000 Da, su hidrólisis tiene como consecuencia la liberación de ácido gálico y elágico, los cuales son sus principales constituyentes.
- **Ligninas:** Son agentes estructurales del alto peso molecular conformados por tres subunidades: Alcohol cumarílico, coniferílico y sinapílico. Su principal función es estructural, aunque se sabe que tiene propiedades antifúngicas y antimicrobianas.
- **Lignanós:** Están formados por dos unidades de fenilpropano, se encuentran presentes en frutas, semillas, granos y vegetales. Su esqueleto básico es un dímero C6 – C3.

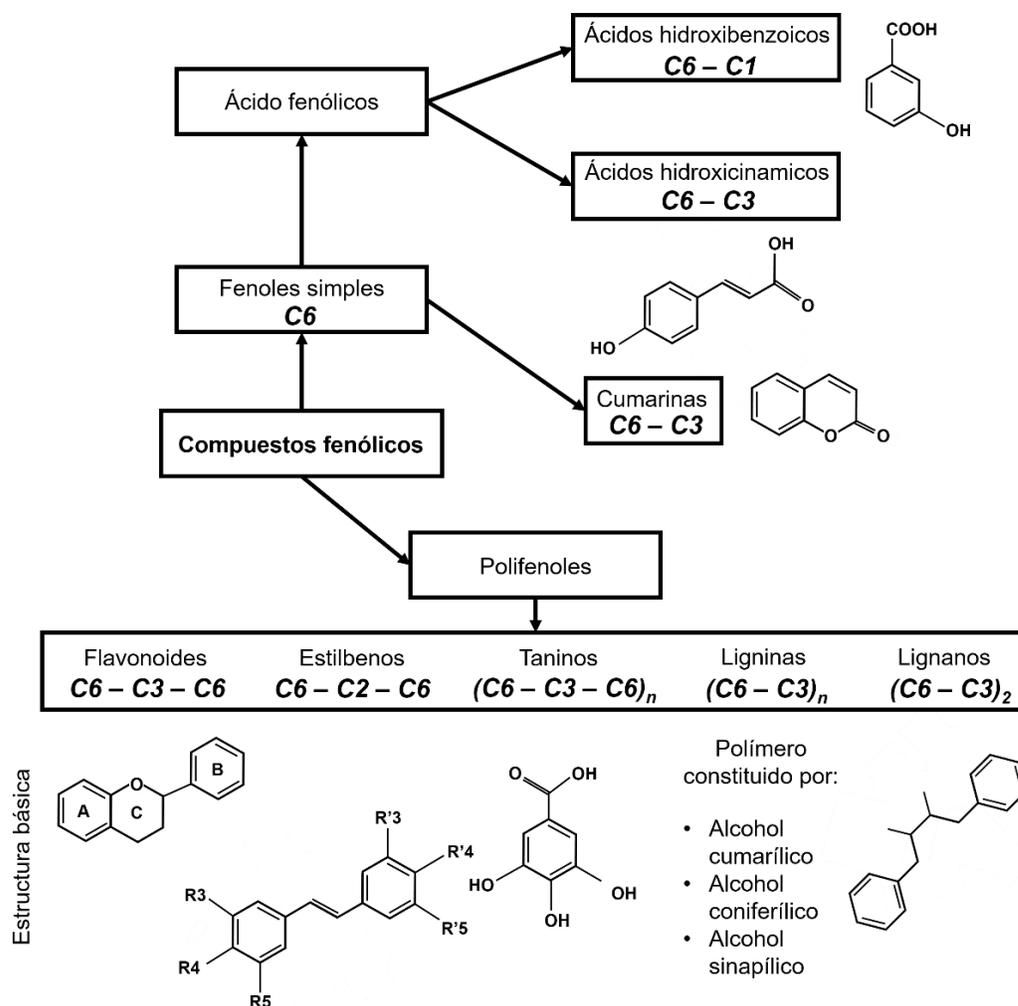


Figura 1. Clasificación y estructura básica de los compuestos fenólicos (presentado de acuerdo con la clasificación propuesta por Soto *et al.*, 2015).

Estos compuestos pueden ser sintetizados a partir de la ruta del ácido shikímico, considerada la principal ruta en la cual los precursores fenilpropanoides son sintetizados a partir de la L-fenilalanina por la fenilalanina amonio liasa (PAL). Por otra parte, la ruta del ácido malónico aporta el grupo malonil-CoA que en conjunto con el ácido p-cumaroyl-CoA son empleados para la síntesis de flavonoides y estilbenos (**Figura 1**) (De la Rosa *et al.*, 2019; Naikoo *et al.*, 2019; Kushalappa *et al.*, 2016).

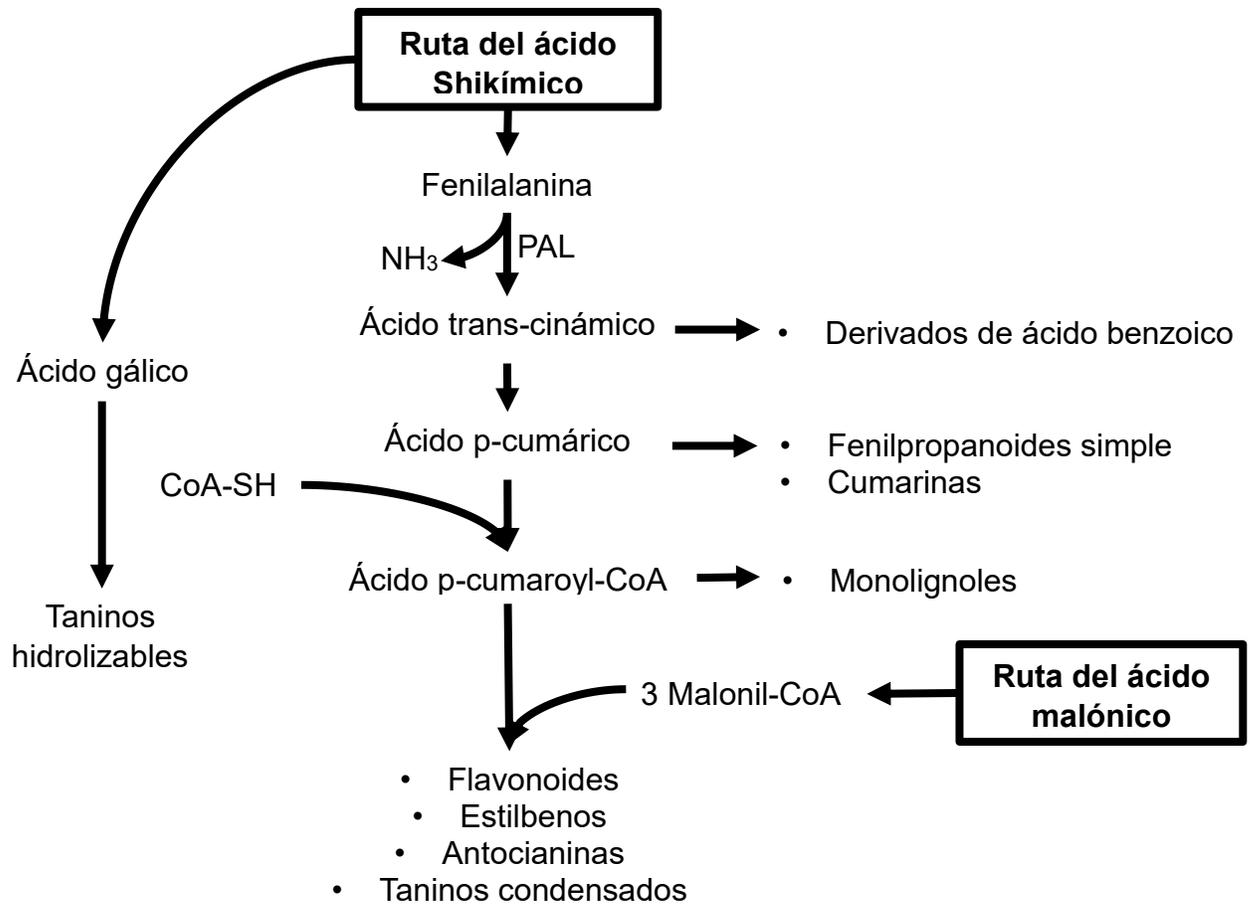


Figura 2. Ruta metabólica simplificada para la síntesis de compuestos fenólicos.

- **Extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs) y no solubles (NEPs)**

En el estudio de compuestos fenólicos es requerido el desarrollo de protocolos de extracción que permitan evaluar su contenido y perfil en matrices vegetales, esto con el fin de medir posibles cambios en las respuestas metabólicas producidas por alteraciones en el entorno de las plantas. Con relación a lo anterior, a continuación, se describe los métodos empleados en la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs) y no solubles (NEPs):

- **Compuestos fenólicos solubles (EPs)**

Los EPs son aquellos compuestos de bajo peso molecular, generalmente almacenados en las vacuolas de las células vegetales, y son extraíbles fácilmente empleando extracción sólido-líquido (SLE) mediante métodos de extracción convencional (EC) como la maceración o técnicas avanzadas de extracción como la extracción asistida por ultrasonido (EAU), utilizando solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona, o bien empleando mezclas de solventes (Naczki y Shahidi, 2006; Shirsath *et al.*, 2012; Medina-Torres *et al.*, 2018)

- **Método de extracción convencional (EC)**

Las técnicas EC refieren a aquellas que únicamente consiste en la aplicación de calor, agitación y el ingreso de solvente dentro de las células vegetales, lo que permite la solubilización y solvatación de los compuestos de interés, este proceso se ve favorecido por fenómenos de difusión mediante la formación de un gradiente de concentración (**Figura 3**). En relación con los compuestos fenólicos, se debe mencionar que, al tratarse de un grupo de metabolitos con un amplio rango de polaridades, la selectividad, el perfil y el contenido de los compuestos fenólicos dependerá del solvente utilizado (Bae *et al.*, 2012a; Loizzo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2017; Alonzo-Carrillo *et al.*, 2017; Días *et al.*, 2017; Hoyong *et al.*, 2018).

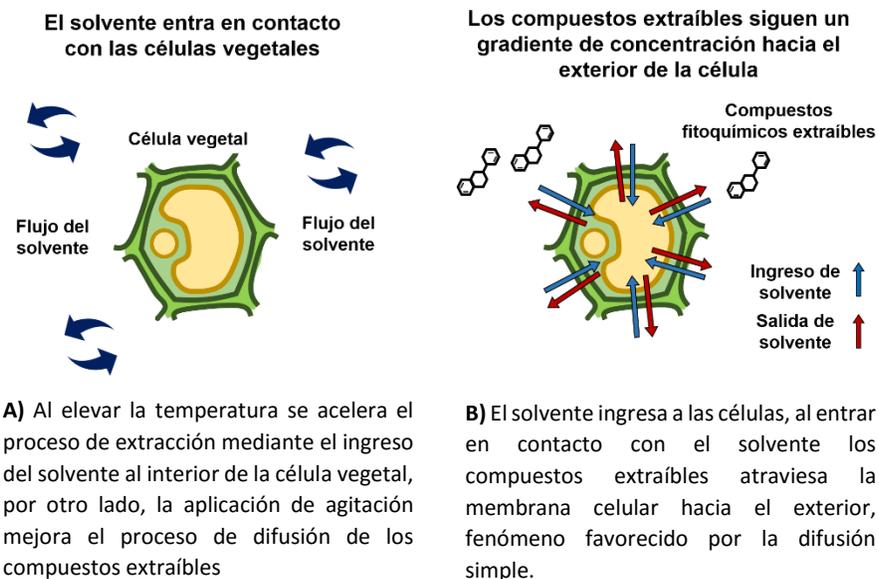


Figura 3. Esquematización de principio de extracción sólido-líquido (SLE) a partir de matrices vegetales empleando métodos convencionales

- **Técnicas avanzadas de extracción**

Estas técnicas se caracterizan por ser rápidas, automatizadas, reproducibles y selectivas en comparación con técnicas convencionales, algunas de estas son: extracción líquida a presión (PLE por sus siglas en inglés), extracción asistida por ultrasonido (EAU), extracción presurizada con agua caliente (PHWE por sus siglas en inglés), extracción dual asistida por microondas y destilación simultánea (MDDE por sus siglas en inglés), y extracción de fluidos supercríticos (SFE por sus siglas en inglés) (Alonso-Carrillo *et al.*, 2017; Días *et al.*, 2017, Medina-Torres *et al.*, 2017).

- **Extracción asistida por ultrasonido (EAU)**

De las técnicas de extracción antes mencionadas la extracción asistida por ultrasonido (EAU) ha sido ampliamente utilizada en matrices vegetales para la obtención de compuestos fenólicos. El principio consiste en la generación de ondas ultrasónicas que producen la formación de burbujas en el solvente de extracción. Las burbujas sufren fenómenos de rarefacción y compresión hasta alcanzar un tamaño inestable y posteriormente colapsan. El

colapso de las burbujas tiene como consecuencia la disrupción de la pared celular, lo cual permite el ingreso del solvente al interior de la célula vegetal y permite la liberación de los compuestos fitoquímicos ahí contenidos (**Figura 4**) (Medina-Torres *et al.*, 2017).

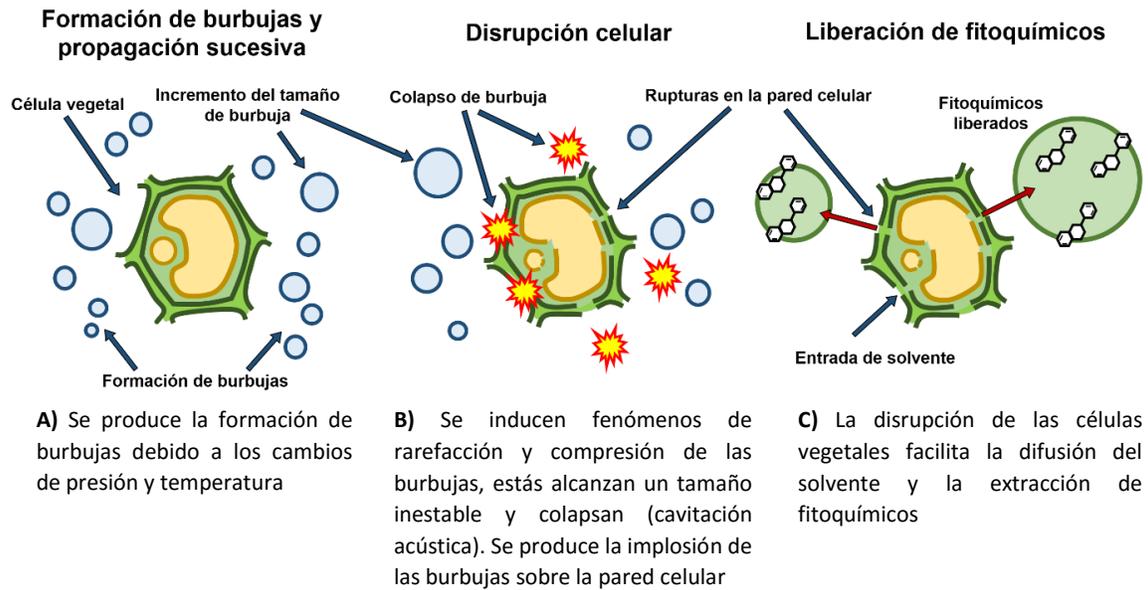


Figura 4. Esquematización del principio de extracción asistida por ultrasonido (EAU) en matrices vegetales (modificado de Medina-Torres *et al.*, 2017)

- **Compuestos fenólicos no solubles (NEPs)**

Los NEPs son compuestos poliméricos de alto peso molecular o moléculas de bajo peso molecular que generalmente se encuentran asociados a estructuras de la pared celular (**Figura 5**), esto mediante enlaces covalentes, aunque también pueden encontrarse unidos mediante puentes de hidrogeno e interacción hidrofóbicas. En el estudio de compuestos fenólicos enlazados a estructuras de la pared celular, la hidrólisis ácida y alcalina son las formas más comunes para liberarlos (Acosta-Estrada *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2016; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017).

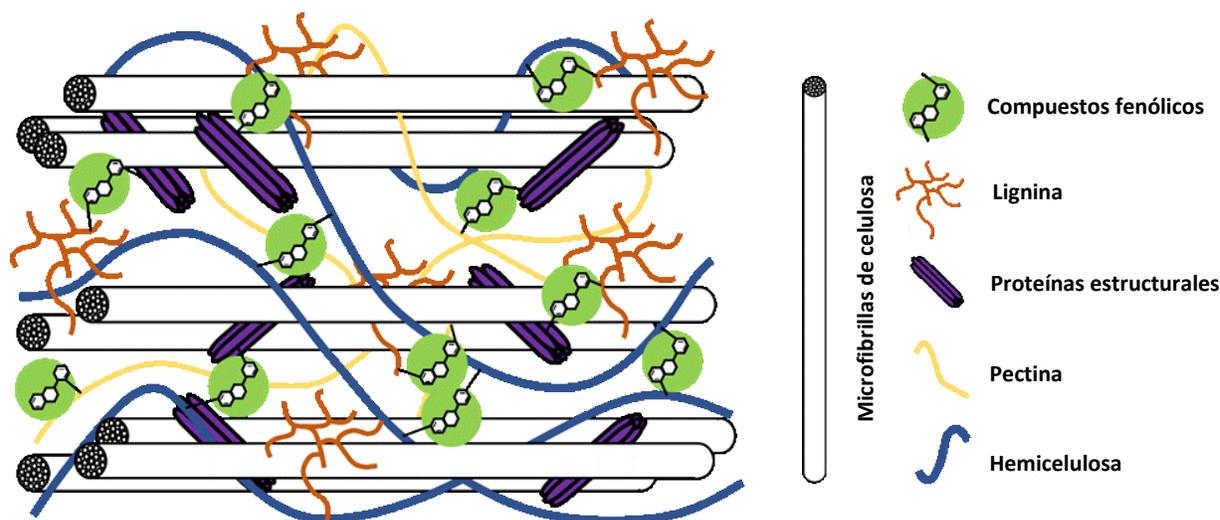


Figura 5. Representación de la unión de compuestos fenólicos con las diferentes estructuras de la pared celular vegetal (Modificado de Acosta-Estrada *et al.*, 2013)

- **Extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) mediante hidrólisis ácida y alcalina**

La hidrólisis ácida puede ser utilizada para obtener un alto rendimiento de compuestos fenólicos cercano al contenido real en comparación que al emplear hidrólisis alcalina; es capaz de producir la ruptura de los enlaces glucosídicos y en general deja los enlaces éster intactos, sin embargo, produce la degradación y cambios conformacionales en los

compuestos extraídos (Acosta-Estrada *et al.*, 2013; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017). La preparación de solventes más empleados en la extracción ácida son el butanol/HCl (95:5 v/v) y metanol/H₂SO₄. En cuanto a las condiciones óptimas de extracción, estas pueden variar dependiendo de la matriz vegetal, sin embargo, en general se emplea un tiempo aproximado de 1 h a 100°C. (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017).

Por su parte, la hidrólisis alcalina es capaz de romper los enlaces éster que unen a los ácidos fenólicos a polisacáridos de la pared celular, este tratamiento no suele causar la degradación de compuestos fenólicos. En la extracción alcalina generalmente se utilizan concentraciones de 2 a 4 M de NaOH a una temperatura de 60°C con tiempos de extracción que van desde los 15 min hasta las 4 h (Acosta-Estrada *et al.*, 2013; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017).

▪ **Métodos de cuantificación e identificación de compuestos fenólicos**

Los extractos crudos obtenidos a partir de una matriz vegetal pueden contener una gran diversidad de metabolitos secundarios, por lo cual, para el análisis del contenido y perfil de compuestos fenólicos deben emplearse diferentes herramientas para su, separación, detección, identificación y cuantificación. A continuación, se describen algunos métodos y herramientas empleadas para su análisis.

▪ **Método espectrofotométrico**

La determinación de compuestos fenólicos se puede apoyar en técnicas espectrofotométricas como el ensayo de Folin-Ciocalteu; el principio de esta técnica consiste en la determinación de contenido de compuestos fenólicos midiendo la capacidad reductora en extractos vegetales, sin embargo, esta técnica puede sobreestimar el contenido de compuestos fenólicos al reaccionar con otras sustancias con capacidad reductora, por lo que se considera que no es específica. Otro método es el empleado en la determinación del contenido de

flavonoides utilizando el método colorimétrico basado en la interacción de los compuestos fenólicos con el Al^{+3} , sin embargo, al igual que la técnica anterior es posible sobreestimar el contenido de flavonoides totales (Singleton y Rossi *et al.*, 1965; Naczki y Shahidi, 2006).

- **Método mediante cromatografía líquida (LC) acoplado a detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y/o espectrometría de masas (MS)**

El empleo de cromatografía líquida (LC por sus siglas en inglés) acoplada a detector de arreglo de fotodiodos (PDA por sus siglas en inglés) y espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) es una herramienta ampliamente utilizada en estudios de metabolómica en la identificación de compuestos fenólicos (Wood, 2008; Mandal y Chakraborty, 2013). A continuación, se describen los elementos de esta herramienta de análisis.

- **Cromatografía líquida**

La cromatografía de líquidos (LC) es una herramienta versátil capaz de lograr la separación de diversos analitos en una muestra problema. En la cromatografía la separación depende del peso molecular, la estereoquímica, la polaridad y las modificaciones secundarias de los analitos. Están reportados principalmente dos métodos para el estudio de compuestos fenólicos, la fase reversa (FR) y la fase normal (FN). La primera es ampliamente utilizada en el estudio de compuestos fenólicos solubles, las fases móviles más comunes son agua (acidificada a pH 2 - 4 con ácido fórmico o ácido acético) y metanol o acetonitrilo, mientras que como fase estacionaria es común el uso de columnas C18 (columnas hidrofóbicas compactadas con cadenas alifáticas de 18 carbonos unidas a una base de sílica) (Wood, 2008; Mandal y Chakraborty, 2013; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017; Gu *et al.*, 2018)

- **Análisis mediante detector de arreglo de fotodiodos (PDA)**

Uno de los instrumentos de detección más utilizados es el PDA, mediante el cual los compuestos fenólicos son detectados de manera general de 240 – 285 nm, los ácidos hidroxycinámicos a 320 nm, las flavonas y flavonoles a 350 – 365 nm y las antocianinas a 460 – 560 nm. (Domínguez-Rodríguez et al., 2017). El uso de técnicas cromatográficas es común en la identificación de compuestos fenólicos, sin embargo, el uso de detectores de UV o PDA no proveen información estructural de los compuestos separados. En relación con lo anterior, la identificación empleando un detector de PDA depende de que el tiempo de retención (TR) coincida con la de un compuesto estándar conocido y su huella espectral en la UV-VIS, lo que limita el proceso de identificación a los compuestos previamente reportados de los cuales se cuenta con estándares analíticos (Wood, 2008; Mandal y Chakraborty, 2013)

- **Análisis mediante espectrometría de masas (MS)**

Entre las principalmente técnicas de caracterización estructural se encuentra la espectrometría de masas (MS), debido a que es una herramienta efectiva para determinar el peso molecular, la fórmula molecular y realizar la caracterización estructural de compuestos fenólicos a partir de matrices vegetales. Esta herramienta permite la ionización de los compuestos separados por cromatografía, y produce la formación de iones con cargas positivas y negativas. Posteriormente, los iones son detectados y analizados con un algoritmo computarizado. La adquisición de datos permite analizar los compuestos ionizados en modo ion positivo $[M - H]^+$ y negativo $([M - H]^-)$. El ion de mayor abundancia es considerado el pico base, el ion de mayor masa un espectro del ion molecular, mientras que los de menor masa corresponden a sus fragmentos. En conjunto esta información es útil para la

caracterización estructural e identificación de estas moléculas (Wood, 2008; Mandal y Chakraborty, 2013; Gu *et al.*, 2018).

▪ **Compuestos fenólicos identificados en el género *Capsicum* mediante cromatografía líquida, detector de arreglo de fotodiodos y espectrometría de masas**

En la **Tabla 1** se muestra el listado de trabajos publicados en los que se ha determinado el perfil de compuestos fenólicos del género *Capsicum* empleando herramientas cromatográficas en estudios de metabolómica. La mayoría de estos estudios se enfoca en la determinación del perfil de compuestos fenólicos en frutos de *C. annuum* debido a su importancia comercial. Mediante el empleo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) o ultra alta eficiencia (UPLC/UHPLC) acoplado a PDA o detector de UV se observa la identificación de diversos compuestos como quercetina, luteolina, apigenina, kaempferol, ácido sinápico, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico y ácido cumárico en frutos de *C. annuum* (Chen y Kang, 2003; Bae *et al.*, 2012b; Bae *et al.*, 2014; Loizzo *et al.*, 2013; Materska *et al.*, 2015; Sachadyn *et al.*, 2016; León-Chan *et al.*, 2017), sin embargo, también se observa que, en la mayoría de los casos se realiza el análisis de flavonoides y ácidos fenólicos en formas glicosiladas. A través del empleo del detector de MS se observa que muchos compuestos fenólicos presentes en frutos se encuentran en formas glicosiladas, por lo que, se identifican una diversidad importante de derivados de luteolina y apigenina en frutos y hojas de *C. annuum* (Park *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Juárez *et al.*, 2016).

Tabla 1. Estudios enfocados en la identificación de compuestos fenólicos en *Capsicum* spp. mediante herramientas cromatográficas.

Compuesto	Especie (órgano)	Análisis*	Referencia
<ul style="list-style-type: none"> • Quercetina 3-O-rhamnosido-7-O glucósido • Ácido sinápico-E-glucósido • Apigenina-6-C-glucósido-8-C-arabinosido • Luteolina-6-glucósido-8-C-arabinosido • Luteolina-7-O-(2-aposil) glucósido • Quercetina-3-O-rhamnosido 	<i>C. annuum</i> (fruto)	HPLC-DAD	Sachadyn <i>et al.</i> , 2016
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido clorogénico • Luteolina-7-O-glucósido • Apigenina-7-O-glucósido 	<i>C. annuum</i> (fruto)	UPLC-PDA	León-Chan <i>et al.</i> , 2017
<ul style="list-style-type: none"> • Quercetina • Luteolina • Kaempferol • Apigenina 	<i>C. annuum</i> (fruto)	HPLC-PDA	Bae <i>et al.</i> , 2012
<ul style="list-style-type: none"> • Sinapoyl-E-glucósido • Quercetina-3-O-rhamnosido-7-O-glucósido • Luteolina-7-O-(2-aposil) glucósido • Quercetina-3-O-rhamnosido • Ácido sinápico • Quercetina • Luteolina 	<i>C. annuum</i> (fruto)	HPLC-DAD	Materska <i>et al.</i> , 2015
<ul style="list-style-type: none"> • Quercetina • Luteolina • Kaempferol • Apigenina • Miricetina 	<i>C. annuum</i> <i>C. chinense</i> (fruto)	HPLC-PDA	Bae <i>et al.</i> , 2014
<ul style="list-style-type: none"> • N-caffeyol putrescina • Caffeyol-O-hexosido • Feruloyl-O-glucósido • Kaempferol-O-pentosil-dihexosido • Luteolina-7-O-(2-aposil) glucósido • Quercetina-3-O-rhamnosido • Dihydroxiflavona-O-hexosido 	<i>C. annuum</i> (fruto)	HPLC-MS	Park <i>et al.</i> , 2012
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido p-hidroxibenzoico • Ácido vanílico • Ácido cafeico • Ácido clorogénico • Ácido p-cumárico • Ácido ferúlico • Quercetina • Catequina • Luteolina • Kaempferol • Miricetina 	<i>C. annuum</i> (fruto)	HLPC-UV	Chen y Kang, 2013
<ul style="list-style-type: none"> • Apigenina • Quercetina • Luteolina 	<i>C. annuum</i> (fruto)	HPLC-UV	Loizzo <i>et al.</i> , 2013

Continuación de **Tabla 1**

<ul style="list-style-type: none"> • Quercetina-3-glucósido-7-rhamnosido • Quercetina-3-sambubiosido-7-rhamnosido • Rutin • Quercetina-glucósido • Quercetina-rhamnosido • Luteolina-6,8-di-C-glucósido • Luteolina-6-C-hexosido-8-C-pentosido • Luteolina-6-C-pentosido-8-C-hexosido • Luteolina-8-C-hexosido • Luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) glucósido • Luteolina acetil glucósido • Ácido cafeico glucósido • Ácido cafeico • Ácido clorogénico • Ácido cumárico 	<i>C. annuum</i> (fruto)	UHPLC-MS	Juániz <i>et al.</i> , 2016
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido clorogénico • Luteolina-6,8-di-C-hexosido • Quercetina-3-O-rhamnosido-7-O-hexosido • Apigenina-6,8-di-C-hexosido • Luteolina-6-C-hexosido-8-C-pentosido • Luteolina-6-C-pentosido-8-C-hexosido • Apigenina-6-C-pentosido-8-C-hexosido • Apigenina-6-C-hexosido-8-C-pentosido • Luteolina-6-C-hexosido • Luteolina-8-C-hexosido • Luteolina-6-C-(6-malonil) hexosido-8-C-pentosido • Quercetina-3-O-rutinosido • Luteolina-7-O-(2-apiosil) hexosido • Quercetina-3-O-glucosido • Quercetina-3-O-rhamnosido • Luteolina-7-O-2-(2-apisil-6-acetyl) hexosido • Luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido • Chrysoeriol-7-O-(2-apiosil-6-acetyl) glucósido 	<i>C. annuum</i> (fruto)	HPLC-PDA/MS	Mikulic-Petkovsek <i>et al.</i> , 2013
<ul style="list-style-type: none"> • N-feruloyl tiramida 	<i>C. annuum</i> (tallo)	HPLC-PDA/MS	Novo <i>et al.</i> , 2017
<ul style="list-style-type: none"> • N-caffeyol putrescina • Ácido clorogénico • Ácido clorogénico metil éster • Ácido clorogénico butil éster • Delphinidin-3-(4-trans-coumaroyl-L-rhamnosil (1-6)-glucopiranosido)-5-O-glucopiranosido • Luteolina-7-O-apiofuranosil (1-2) glucopiranosido • Luteolina-7-O-glucopiranosido • Apigenina-7-O-apiofuranosil (1-2) glucopiranosido • Apigenina-7-O-glucopiranosido 	<i>C. annuum</i> (hojas)	HPLC-MS	Kim <i>et al.</i> , 2014

*HPLC: High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficiencia); UPLC/UHPLC: Ultra-high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de ultra alta eficiencia); PDA/DAD: Photodiode array detector/diode array detector (detector de arreglo de fotodiodos/arreglo de diodos); MS: Mass spectrometry (espectrometría de masas).

- **Estudios del análisis de cambios del perfil y contenido de compuestos fenólicos del género *Capsicum* en interacción con microorganismos fitopatógenos**

En la **Tabla 2** se muestran los estudios publicados en los que se ha evaluado la significancia de los compuestos fenólicos durante la interacción del género *Capsicum* con diversos patógenos. En los trabajos publicados por Gayoso *et al.* (2004), Owen-Going *et al.* (2008) y Jayawardana *et al.* (2016), se ha evaluado el cambio en el contenido de EPs y NEPs en diferentes tejidos de plantas de *C. annuum* durante la infección local en raíces producida por *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, y *Colletotrichum gloeosporioides* respectivamente, y se ha observado el incremento principalmente de NEPs, sin embargo, estos estudios se limitan a determinar el contenido mediante ensayos de espectrofotométricos, por lo que, no se cuenta con información acerca del perfil de los compuestos fenólicos involucrados en el mecanismo de defensa en plantas de *C. annuum*. Por su parte, Mikulic-Petkovsek *et al.* (2013) y Park *et al.* (2012) han evaluado el cambio en el perfil de compuestos fenólicos mediante HPLC acoplado MS, por lo que, han podido definir los principales cambios en la infección producida por patógenos del género *Colletotrichum* en frutos de *C. annuum*. Algunos de estos cambios involucran la síntesis de fenol amidas como N-cafeoyl putrescina, y diversos flavonoides (principalmente luteolina y apigenina) y algunos ácidos hidroxicinámicos. Otro trabajo, es el presentado por Novo *et al.* (2017), quienes han evaluaron estos cambios como parte de la respuesta sistemática en tallos cuando la infección es producida en raíces de plantas de *C. annuum*. Estos autores, discuten que las fenol amidas como N-feruloyl tiramida tiene un rol importante en la resistencia de plantas de *C. annuum* frente a la infección producida por *Verticillium dahliae*, debido a que contribuyen en el fortalecimiento de las pared celulares como mecanismo de defensa.

Tabla 2. Estudios y análisis de cambios en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en *Capsicum* spp. frente a la interacción con patógenos

Interacción planta-patógeno	Sitio de infección	Análisis*	Referencia
<i>C. annuum</i> – <i>P. capsici</i>	Infección local en raíces de plántulas de 15 días postgerminación	EPs/NEPs en raíz, tallo y hojas mediante espectrofotometría (Folin-Ciocalteu)	Gayoso <i>et al.</i> , 2004
<i>C. annuum</i> – <i>P. capsici</i>	Infección local en raíces	NA	Hu-Zhe <i>et al.</i> , 2005
<i>C. chinense</i> – <i>P. capsici</i>	Infección local en raíces de plántulas con 2 semanas postgerminación	NA	Caamal-Chan <i>et al.</i> , 2011
<i>C. annuum</i> – <i>P. aphanidermatum</i>	Infección local en raíces en plantas con 5-6 semanas en sistema hidropónico	EPs/NEPs en raíz, tallo y hojas mediante espectrofotometría (Folin-Ciocalteu)	Owen-Going <i>et al.</i> , 2008
<i>C. annuum</i> – <i>P. capsici</i>	Infección local en raíces de plantas con 2 meses postgerminación	NA	Woo-Jin <i>et al.</i> , 2004
<i>C. annuum</i> – <i>C. gloeosporioides</i>	Infección local en frutos	EP/NEPs mediante espectrofotometría (Folin-Ciocalteu)	Jayawardana <i>et al.</i> , 2016
<i>C. annuum</i> – <i>C. coccodes</i>	Infección local en frutos	EPs mediante HPLC-PDA/MS	Mikulic-Petkovsek <i>et al.</i> , 2013
<i>C. annuum</i> – <i>C. gloeosporioides</i>	Infección local en frutos	EPs mediante HPLC-MS	Park <i>et al.</i> , 2012
<i>C. annuum</i> – <i>Verticillium dahliae</i>	Infección local en raíces de plantas con 10 semanas postgerminación	EPs/NEPs en tallos mediante espectrofotometría (Folin-Ciocalteu) y HPLC-MS	Novo <i>et al.</i> , 2017

*EPs: Extractable phenolics (compuestos fenólicos solubles); NEPs: Non-extractable phenolics (compuestos fenólicos no solubles); HPLC: High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficiencia); PDA: Photodiode array detector (detector de arreglo de fotodiodos); MS: Mass spectrometry (espectrometría de masas); NA: No aplica.

JUSTIFICACIÓN

Capsicum chinense es un cultivo ampliamente conocido debido a la sensación de pungencia que producen sus frutos, atributo que debe a la presencia de capsaicinoides, y que le han permitido diversificar su número de aplicaciones, lo cual a su vez ha tenido como consecuencia un aumento en la apreciación y valor comercial de este producto en el mercado nacional e internacional.

Durante el desarrollo este cultivo es susceptible a una serie de factores bióticos y abióticos que pueden reducir la posibilidad de la planta de completar su crecimiento y desarrollo, y por tanto la posibilidad de desarrollar frutos de calidad y en las cantidades demandadas por los diversos mercados.

Los factores bióticos involucran la exposición a diversos organismos, y muchas de estas interacciones son mediadas en la rizosfera. En consecuencia, las raíces de las plantas son blancos frecuentes del ataque de patógenos. Uno de los más importantes, estudiados y clasificado por diversos autores como de los más devastadores en una gran variedad de cultivos es el oomiceto fitopatógeno *Pythium ultimum*, que junto con otro grupo de microorganismos patogénicos son responsables de múltiples enfermedades que producen el marchitamiento de plántulas provocando pérdidas económicas importantes en cultivos de interés comercial como el chile habanero.

A pesar de este pronóstico, las plantas por su parte también han desarrollado mecanismos para defenderse en un entorno altamente dinámico, siendo capaces de producir una gran diversidad y cantidad de compuestos fitoquímicos secretados e inducibles para repeler, inhibir, o eliminar directa o indirectamente a estos microorganismos. Uno de los grupos de

metabolitos secundarios involucrado en estas funciones de suma importancia para la supervivencia y adaptación de las plantas son los compuestos fenólicos, los cuales fungen como mecanismo de defensa y median la resistencia frente al ataque de patógenos.

A través del presente trabajo se espera conocer el perfil de compuestos fenólicos presentes en *C. chinense*, identificar aquellos que son inducidos frente a la interacción con *P. ultimum*, observar los efectos fisiológicos directos e indirectos de esta interacción, y caracterizar el comportamiento de estas moléculas frente al ataque de este patógeno.

Este estudio es parte de un desarrollo de ciencia básica que pretende mejorar la comprensión de la función biológica de este grupo de metabolitos secundarios a través de la ampliación del estado de conocimiento de los cambios de estos compuestos durante la interacción *C. chinense* – *P. ultimum*, a su vez este permitirá aumentar las posibilidades de lograr desarrollos dirigidos en mejorar la productividad y el funcionamiento en un ecosistema dinámico de cultivos locales como *C. chinense*, ofreciendo potenciar las oportunidades para implementar estrategias de control contra patógenos como *P. ultimum*.

HIPÓTESIS

Se desarrolla la modificación del contenido y perfil de compuestos fenólicos en diferentes tejidos como parte del mecanismo de defensa de *Capsicum chinense* durante la interacción en raíces con el oomiceto fitopatógeno *Pythium ultimum*

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la interacción de *Pythium ultimum* sobre el contenido y perfil de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* inducidos local y sistemáticamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- I. Evaluar los métodos de extracción de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense*.
- II. Identificar el perfil de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense*.
- III. Evaluar el contenido y el perfil de compuestos fenólicos en los diferentes tejidos de *Capsicum chinense* durante la interacción con *Pythium ultimum*.
- IV. Formular el mecanismo que explique los cambios de compuestos fenólicos durante la interacción de *Capsicum chinense* con *Pythium ultimum*

CAPITULO 1:
Evaluación y análisis de la extracción de compuestos
fenólicos en *Capsicum chinense*

1.1.INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense*) es uno de los más representativos cultivos del sureste mexicano con una gran importancia cultural y comercial (Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2018). Este posee la protección de denominación de origen (PDO por sus siglas en ingles), lo cual, distingue los cultivos de chile habanero producidos en la península de Yucatán de los producidos en otras regiones y países (WIPO, 2010). Para obtener las características de calidad (establecido en la NOM-189-SCFI-2017) y productividad, es necesario que las plantas tengan un adecuado estado fisiológico, y la capacidad de responder a los constantes cambios en el medio ambiente con el fin de completar su desarrollo; esto involucra mecanismos de adaptación y supervivencia en los que participan la producción de metabolitos secundarios (Verna y Shukla, 2015; Madani *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos son uno de los principales metabolitos secundarios presentes en todas las plantas, y tienen una gran significancia en los procesos de adaptación de las plantas en su medio ambiente, debido a que poseen un amplio rango de funciones biológicas y ecológicas. Estos pueden actuar como atractores de polinizadores, como mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos (Novo *et al.*, 2017), atractores de microorganismos benéficos en la rizosfera (Badri y Vivanco, 2009; Verna y Shukla, 2015), favorecer la dispersión de semillas, y protección frente a la irradiación UV y estrés oxidativo (Agati *et al.*, 2012; León-Chan *et al.*, 2017). Estos se encuentran distribuidos en diferentes tejidos de la planta , localizados en diversas estructuras de las células vegetales (Guan-Lin *et al.*, 2017), y su contenido y perfil puede variar según la especie, la variedad y las condiciones ambientales (Naikoo *et al.*, 2019).

Una fracción importante de estos compuestos se encuentra almacenada en las vacuolas de las células vegetales y son considerados la fracción soluble de compuestos fenólicos (EPs por sus siglas en inglés), la cual, puede ser extraída utilizando métodos de extracción convencional (EC) como la maceración, o técnicas avanzadas como la extracción asistida por ultrasonido (EAU), mediante el uso de solventes orgánicos como metanol, etanol y acetona o mezclas de solventes (Naczki y Shahidi, 2006; Shirsath *et al.*, 2012; Medina-Torres *et al.*, 2018). En relación con los solventes, diferentes parámetros de polaridad basados en sus propiedades para interactuar con diferentes solutos han sido propuestas, como la constante dieléctrica, el índice de polaridad, y el parámetro de solubilidad polar (Snyder *et al.*, 1978; Hansen, 2007). Algunos autores han reportado que estos parámetros son útiles para predecir el rendimiento de los compuestos fitoquímicos a partir de matrices vegetales (Wang *et al.*, 2016; Álvarez *et al.*, 2017; Rybiński-Fryca *et al.*, 2018; Hoyong *et al.*, 2018).

Algunos estudios han evaluado el efecto del solvente de extracción sobre el contenido de EPs en extractos obtenidos a partir de frutos de *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* y *Capsicum frutescens*, sin embargo, la influencia de parámetros de polaridad de solvente y el efecto del método de extracción sobre la obtención de compuestos fenólicos solubles o extraíbles en *C. chinense* no ha sido estudiada detalladamente (Bae *et al.*, 2012; Loizzo *et al.*, 2015; Días *et al.*, 2017).

Además de los EPs, una fracción importante de compuestos fenólicos se encuentra asociada a macroestructuras como polisacáridos y proteínas de la pared celular primaria en las células vegetales y son conocidos como la fracción no soluble (NEPs por sus siglas en inglés) (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017). Estos se encuentran principalmente unidos mediante enlaces covalentes, aunque también pueden encontrarse unidos a través de puentes de

hidrogeno e interacciones hidrofóbicas (Pérez-Jiménez y Torres, 2011; Guan-Lin *et al.*, 2017). En el estudio de compuestos fenólicos enlazados a estructuras de la pared celular, la hidrólisis ácida y alcalina son las formas más comunes para liberarlos (Acosta-Estrada *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2016).

El desarrollo de protocolos de extracción de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos es importante en el estudio de matrices vegetales como *C. chinense*, para poder evaluar las complejas respuestas metabólicas causadas por cambios o alteraciones en estos cultivos en interacción con el medio ambiente. Sin embargo, la mayoría de los estudios solo han evaluado la extracción de EPs en fruto del género *Capsicum*. y poca atención se ha dado al estudio de la extracción de compuestos fenólicos en plantas de chile habanero. En relación con lo anterior, el principal objetivo fue A) Evaluar el efecto del solvente y método de extracción sobre el contenido de EPs en hoja, raíz, tallo y frutos de *C. chinense*. B) Correlacionar el CFT con tres parámetros de polaridad (constante dieléctrica, índice de polaridad, y parámetro de solubilidad polar) a través de un modelo de distribución gaussiana. C) Evaluar el efecto de diferentes tratamientos de extracción sobre el contenido de NEPs presentes en plántulas de *C. chinense*.

1.2.MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados fueron Folin-Ciocalteu (2N), ácido gálico monohidratado ($\geq 98.0\%$), ácido acético ($\geq 99.7\%$) y acetato de etilo ($\geq 99.9\%$) adquirido en SIGMA – Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.); carbonato de sodio (Na_2CO_3), ácido clorhídrico ($\geq 36.5\%$), metanol ($\geq 99.90\%$) y acetona ($\geq 99.6\%$) adquiridos en Avantor J. T. Baker (Radnor, PA, EE. UU.); n – hexano ($\geq 95.0\%$) adquirido en Fermont (Monterrey, NL, MX). El agua ultrapura fue obtenida de un sistema de filtración Milli – Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).

1.2.2. Material vegetal

Las plántulas de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá con 45 días postgerminación fueron adquiridas de un productor local en la comunidad de Suma, Yucatán, México (Marzo – 2018).

Los frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá) fueron adquiridos en un invernadero experimental del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ A. C.) Unidad sureste (Noviembre, 2018)

1.2.3. Pretratamiento de material vegetal

Se removió la fracción de sustrato adherido a las raíces realizando repetidos lavados con agua destilada, posteriormente con ayuda de una tijera los principales órganos fueron seccionados en hoja, tallo y raíz. El material fresco de fruto, hoja, tallo y raíz fue congelado en nitrógeno líquido y pulverizado en un molino (KRUPS, GX41000, México). Las muestras fueron liofilizadas (Labconco, Benchtop 6 L, EE. UU.) a 0.070 mbar y - 50°C durante 48 h. Se determinó el tamaño de partícula de los materiales obtenidos y la humedad de las muestras por el método de termobalanza (OHAUS, MB45, EE. UU.).

1.2.4. Diseño de experimentos para la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)

Se evaluaron dos factores sobre el contenido EPs en de raíz, tallo y hoja de *Capsicum chinense*, el método de extracción (Factor A), para el cual se evaluó la extracción convencional (EC) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU); y el solvente de extracción (Factor B) en el que se evaluaron diferentes solventes puros y mezclas binarias. En fruto solamente se evaluó el efecto del solvente de extracción (Factor B) sobre el contenido de EPs empleando EC como método de extracción (**Tabla 1.1**).

Para la extracción de EPs a partir de hojas se propuso un diseño factorial 2x10, en el cual, se evaluaron ambos métodos (EC y EAU) utilizando como solventes, hexano, acetato de etilo, acetona, metanol, acetona al 80%, metanol al 80%, metanol al 20%, metanol al 50%, ácido acético al 1%, y agua. En la extracción de EPs a partir de tallo y raíz se propuso un diseño factorial 2x6, en el cual, se evaluaron ambos métodos (EC y EAU) utilizando como solventes, hexano, acetato de etilo, acetona, metanol, acetona al 80% y metanol al 80% (**Tabla 1.1**). En la extracción de EPs a partir de fruto se evaluó únicamente EC utilizando como solventes, hexano, acetato de etilo, acetona, metanol, acetona al 20%, metanol al 80%, metanol al 20%, metanol al 50%, ácido acético al 1%, y agua (**Tabla 1.1**). La variable de respuesta estudiada en todos los diseños de experimentales fue el contenido de fenoles totales (CFT) expresado en mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de base seca (BS).

Tabla 1. 1. Diseño experimental para la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs) en fruto, hoja, tallo y raíz de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá mediante extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU) empleando diferentes solventes.

Tejido Vegetal	Factores	
	A: Método de extracción	B: Solvente
	Niveles	Niveles
Hoja*	EC/EAU	Hx: Hexano AcOEt: Acetato de etilo MeOH: Metanol Ace: Acetona Ace 80%: Acetona al 80% MeOH 80%: Metanol al 80% MeOH 20%: Metanol al 20% MeOH 50%: Metanol al 50% AcOH 1%: Ácido acético al 1% A: Agua
Tallo/Raíz*	EC/EAU	Hex: Hexano AcOEt: Acetato de etilo MeOH: Metanol Ace: Acetona Ace 80%: Acetona al 80% MeOH 80%: Metanol al 80%
Fruto*	EC	Hex: Hexano AcOEt: Acetato de etilo MeOH: Metanol Ace: Acetona Ace 20%: Acetona al 20% MeOH 80%: Metanol al 80% MeOH 20%: Metanol al 20% MeOH 50%: Metanol al 50% AcOH 1%: Ácido acético al 1% A: Agua

*Diseño experimental independiente para cada tejido de *Capsicum chinense*

1.2.4.1. Extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs) mediante extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU).

Para la extracción de EPs las muestras liofilizadas (200 mg) fueron colocadas en tubos cónicos de 15 mL (Falcon™) y se les adiciono 10 mL de solvente. La EC se realizó empleando una placa de calentamiento (Thermo Scientific, Modelo No. SP131325Q, China) con un baño de agua caliente a 50°C durante 4 h aplicando agitación magnética (**Anexo 1**). La EAU se realizó empleando un procesador ultrasónico (SONICS, GEX130PB, EE. UU.) a 80% de amplitud y 10°C empleando un baño de hielo durante 15 min (**Anexo 2**) (según las condiciones establecidas por Covarrubias-Cárdenas *et al.*, 2018). Los extractos fueron centrifugados (Fisher Scientific, Centrific 225, EE. UU.) a 6,500 rpm durante 15 min y el sobrenadante fue resguardado a – 40 °C para su posterior análisis.

1.2.4.2. Ajuste de modelo de distribución gaussiana del contenido de fenoles totales (CFT) con diferentes parámetros de polaridad de los solventes

Se evaluó la correlación de tres parámetros de polaridad (constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar) de los solventes puros y las mezclas binarias con el CFT obtenido en hojas de *Capsicum chinense*. Previamente se calculó el valor para cada parámetro de polaridad de las mezclas binarias con la fórmula desarrollada por Moore (1958):

$$P' = \sum_i P_i \phi_i \quad \text{(Ecuación 1.1)}$$

Donde:

P': Es la constante dieléctrica, índice de polaridad o parámetro de solubilidad polar de la mezcla de solventes.

P_i: Es la constante dieléctrica, índice de polaridad o parámetro de solubilidad polar del solvente puro.

ϕ_i : Es la proporción de cada solvente

Para la correlación entre el CFT y los parámetros de polaridad evaluados se empleó un modelo de distribución gaussiana usando la siguiente formula:

$$f = a e^{\left[-0.5 \left(\frac{x-x_0}{b}\right)^2\right]} \quad \text{(Ecuación 1.2)}$$

Donde:

a: Representa el pico máximo teórico o el mayor CFT de la campana gaussiana con respecto a " X_0 ".

b: Representa el coeficiente de distribución o la desviación estándar relaciona con el ancho de la campana gaussiana

X: Es el valor de la constante dieléctrica, índice de polaridad o parámetro de solubilidad polar del solvente puro o la mezcla binaria.

X_0 : Es el valor de la constante dieléctrica, índice de polaridad o parámetro de solubilidad polar con el que se obtiene "a" o el máximo valor de teórico de CFT estimado en la campana gaussiana.

1.2.5. Diseño de experimentos para la extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs)

1.2.5.1. Pre-extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)

Para la extracción de NEPs previamente se realizó la extracción de EPs mediante EC según las condiciones descritas anteriormente, (apartado **1.2.4.1**) empleando metanol al 80% como solvente de extracción. Al finalizar, los extractos fueron centrifugados (Fisher Scientific, Centrifug 225, EE. UU.) a 6,500 rpm durante 15 min y el sobrenadante fue descartado. Para el lavado del material vegetal sedimentado este fue resuspendido en metanol al 80% y agitado vigorosamente, posteriormente fue centrifugado bajo las mismas condiciones antes descritas, y el sobrenadante fue descartado nuevamente. Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces para cada muestra.

1.2.5.2. Extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) mediante extracción ácida (EA) y alcalina (EB).

Se realizó la extracción de NEPs en hoja, tallo y raíz mediante un diseño experimental en el cual se evaluó la extracción ácida (EA) y extracción alcalina (EB) empleando un solvente acuoso (SA) y solvente orgánico (SO). Para la extracción ácida las muestras fueron colocadas en un baño de agua caliente a 90°C durante 1 h aplicando agitación magnética; se evaluaron como solventes HCl (2N) y HCl (2N) /Metanol. Mientras que, para la extracción alcalina las muestras fueron colocadas en un baño de agua caliente a 60°C durante 1 h aplicando agitación magnética; se evaluaron como solventes NaOH 2N y NaOH 2N/Metanol al 80% (**Tabla 1.2**).

Al finalizar los extractos fueron centrifugados (Fisher Scientific, Centrifug 225, EE. UU.) a 6,500 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido mediante extracción ácida y alcalina fue neutralizado con NaOH (2N) / Metanol al 80% y HCl (2N) /Metanol respectivamente.

Posteriormente los extractos fueron concentrados en un rotavapor (BUCHI, R – 215, Suiza) a 50°C y 250 mbar. Al finalizar estos fueron almacenadas a – 40°C para su posterior análisis. Las metodologías de extracción fueron propuestas según las condiciones documentadas por Domínguez-Rodríguez *et al.* (2017). La variable de respuesta estudiada en todos los diseños experimentales fue el CFT expresado en mg EAG/g BS.

Tabla 1. 2. Diseño experimental para la extracción de compuestos fenólicos de la fracción no solubles en hoja, tallo y raíz de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá mediante extracción ácida (EA) y alcalina (EB).

Tejido Vegetal	Factores		Tratamiento
	A: Tipo de extracción	B: Solvente	Código
	Niveles	Niveles	
Hoja/Tallo/Raíz	EA	SA: HCl (2N) SO: HCl (2N) /Metanol	AA AM
	EB	SA: NaOH SO: NaOH (2N) /Metanol al 80%	BA BM

1.2.6. Determinación del contenido de fenoles totales

La determinación de compuestos fenólicos fue realizada mediante el método espectrofotométrico de la reacción de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) de acuerdo con las modificaciones empleadas por Covarrubias-Cárdenas *et al.* (2018). Se realizó una curva estándar de 25 a 600 ppm EAG. Se tomaron 20 µL de cada muestra y estándar preparado (25, 50, 100, 200, 400, 600 ppm), y fueron colocados en viales ámbar de 8 mL, a estos se les adicionó 250 µL de reactivo Folin-Ciocalteu (1N), tras 8 min de reacción se le adiciono 1,250 µL de una solución de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 8% y 480 µL de agua destilada. Al finalizar los 30 min de la reacción se determinó la absorbancia de las muestras y los estándares a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, BIOMATE 3S, EE.

UU.). La determinación de CFT se realizó por triplicado para cada muestra y los valores fueron expresados en mg EAG/g BS.

1.2.7. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Los diseños factoriales para la evaluación de EPs en hoja, tallo, y raíz fueron analizados mediante un ANOVA multifactorial ($p < 0.05$). Para evaluar la contribución de los factores se realizó un análisis de componentes de varianza (ACV) ($p < 0.05$). El diseño experimental para la evaluación de EPs en fruto fue analizado mediante un ANOVA simple ($p < 0.05$). El diseño experimental para la evaluación de NEPs fue analizado mediante ANOVA simple ($p < 0.05$). Se empleó el método de Tukey para realizar las comparaciones entre las medias de los tratamientos evaluados ($p < 0.05$) en todos los experimentos. Los análisis fueron realizados empleando un Software Statgraphics Centurion Version XVI (Manugistic Inc., Rockville MD, EE. UU.).

Para el modelo de distribución gaussiana, se generaron los valores de las constantes de la ecuación (a, b, y X_0), el valor de correlación de Pearson del modelo (R) y la evaluación de la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro – Wilk ($p > 0.05$). El análisis se realizó utilizando un Software Sigma Plot (Systat Software Inc, EE. UU.).

1.3.RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.3.1. Parámetros de polaridad de los solventes evaluados en la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)

En la **Tabla 1.3** se muestra el valor de polaridad de los solventes evaluados de acuerdo con su constante dieléctrica (CD), índice de polaridad (P') y parámetro de solubilidad polar (PSP). Respecto a los valores numéricos el orden de polaridad de los solventes puros y las mezclas binarias empezando con el menos polar hacia el más polar, de acuerdo a la constante dieléctrica (CD) fue Hx <AcOEt <Ace <MeOH <Ace 80% <MeOH 80% <MeOH 50% <Ace 20% <MeOH 20% <AcOH 1% < A; de acuerdo al índice de polaridad (P') fue Hx <AcOEt <Ace o MeOH <Ace 80% o MeOH 80% <MeOH 50% <Ace 20% o MeOH 20% <AcOH 1% < A; y de acuerdo al parámetro de solubilidad polar (PSP) fue Hx <AcOEt <Ace <Ace 80% <MeOH <MeOH 80% <MeOH 50% <Ace 20% <MeOH 20% <AcOH 1% < A. El orden es similar para los tres parámetros, pero presenta diferencias en algunos casos debido a que sus valores toman como base diferentes criterios para la determinación de su interacción con diversos solutos. La constante dieléctrica representa la habilidad del solvente para disociar un soluto en iones a través de interacciones interatómicas e intermoleculares (Jouyban *et al.*, 2004), mientras, que el índice de polaridad determina la habilidad de un solvente para interactuar como diferentes solutos polares de prueba a través de técnicas cromatográficas (Snyder, 1978), por lo que, para Ace y MeOH se obtiene el mismo valor de polaridad (5.10) debido a que muestran la misma selectividad para esta prueba reportada por Snyder (1978), en consecuencia el valor de índice de polaridad calculado para Ace al 80% y MeOH al 80% también es el mismo (6.12). Por su parte, el parámetro de solubilidad polar representa principalmente las interacciones de momento dipolo de los solventes (Hansen, 2007).

Tabla 1. 3. Parámetros de polaridad: Constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar de los solventes evaluados en la extracción de compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá.

Solvente	Constante dieléctrica (CD)	Índice de polaridad (P'')	Parámetro de solubilidad polar (PSP)
Hx: Hexano	1.8900	0.1000	0.0000
AcOEt: Acetato de etilo	6.0200	4.4000	5.3000
Ace: Acetona	20.7000	5.1000	10.4000
MeOH: Metanol	32.7000	5.1000	12.3000
*Ace 80%: Acetona al 80%	32.8000	6.1200	11.5200
*MeOH 80%: Metanol al 80%	42.4000	6.1200	13.0400
*MeOH 50%: Metanol al 50%	56.4000	7.6500	14.1500
*Ace 20%: Acetona al 20%	68.2200	8.1800	14.8800
*MeOH 20%: Metanol al 20%	70.6200	9.1800	15.2600
*AcOH 1%: Ácido acético 1%	79.3610	10.1580	15.9200
A: Agua	80.1000	10.2000	16.0000

*Valores calculados empleando la ecuación propuesta por Moore (1958)

1.3.2. Efecto del solvente y el método de extracción sobre el contenido de compuestos fenólicos solubles (EPs) en hoja, tallo, raíz y fruto de *Capsicum chinense*

Este es el primer estudio que evalúa el efecto de solvente y el método de extracción sobre el contenido de EPs en hojas de *C. chinense*, aunque existen reportes previos del contenido de EPs en hojas frescas de *C. annum* (Kim *et al.*, 2014). La media de EPs en hojas fue de 12.25 mg EAG/g BS, mientras que el rango en el contenido de EPs empleando ambas técnicas (EC y EAU) y utilizando solventes de diferentes polaridades se encontró en un rango de 1.70 a 24.40 mg EAG/g BS.

Los solventes de menor polaridad fueron Hx, AcOEt y Ace, de acuerdo con los valores de su constante dieléctrica (1.89, 6.02 y 20.70 respectivamente), índice de polaridad (0.10, 4.40 y

5.10 respectivamente) y parámetro de solubilidad polar (0.00, 5.30, y 10.40 respectivamente), y presentaron los valores más bajos de EPs. El menor contenido de EPs se obtuvo utilizando Hx, los valores fueron de 2.92 ± 0.20 y 1.72 ± 0.19 mg EAG/g BS empleando EC y EAU respectivamente, utilizando AcOEt fue de 4.40 ± 0.46 y de 3.26 ± 0.55 mg EAG/g BS empleando EC y EAU respectivamente, mientras que usando Ace se obtuvo un mayor contenido de EPs utilizando EC (6.30 ± 0.61 mg EAG/ g BS) que EAU (3.68 ± 0.73 mg EAG/g BS) (**Figura 1.1**).

Al utilizar MeOH se obtuvo un contenido de EPs de 14.85 ± 1.69 mg EAG/g BS empleando EC, y 16.44 ± 0.55 mg EAG/g BS empleando EAU, mientras que usando MeOH 80% se obtuvo un contenido de 21.21 ± 1.70 mg EAG/g BS mediante EAU, y de 18.14 ± 2.79 mg EAG/g BS mediante EC. El incremento de los EPs usando MeOH al 80% con respecto al usar MeOH se debe probablemente a la polaridad del solvente, para MeOH al 80% estos valores son superiores a los de MeOH de acuerdo con los parámetros de polaridad (**Tabla 1.3**). Este efecto en el incremento de EPs también se observa al usar Ace al 80%, con él cual se obtuvo 15.31 ± 2.11 mg EAG/g BS mediante EC, y 15.82 ± 0.70 mg EAG/g BS mediante EAU. Al respecto, para Ace al 80% los valores para los parámetros de polaridad son superiores a los de Ace (**Figura 1.1**).

El mayor contenido de EPs se obtuvo utilizando MeOH al 50%, el cual fue de 22.77 ± 1.34 y 24.39 ± 2.41 mg EAG/g BS utilizando EC y EAU respectivamente. Este solvente presentó una constante dieléctrica de 56.40, índice de polaridad de 7.65, y parámetro de solubilidad polar de 14.15. A partir de este punto el incremento en los valores de polaridad del solvente resulta en un decremento de EPs (**Figura 1.1**).

Para MeOH al 20% los valores de constante dieléctrica (70.62), índice de polaridad (9.18) y parámetro de solubilidad polar (15.26) son mayores a los del MeOH al 50%, y como se indicó anteriormente se observa un decremento de EPs. El contenido de EPs utilizando EC (18.38 ± 1.42 mg EAG/g BS) y EAU (16.55 ± 1.89 mg EAG g BS).

Para AcOH al 1% los valores de constante dieléctrica (79.36), índice de polaridad (10.16) y parámetro de solubilidad polar (15.92) para este solvente también son superiores a los de MeOH al 50% y MeOH al 20% y se observó un decremento de EPs. El contenido de EPs fue mayor empleando EC (14.19 ± 1.11 mg EAG/g BS) que EAU (8.91 ± 3.01 mg EAG/g BS). Este incremento de EPs puede atribuirse a un mayor tiempo y temperatura de extracción con respecto a la utilizada en EAU (**Figura 1.1**).

El contenido de EPs utilizando A como solvente fue mayor empleando EC (11.93 ± 0.94 mg EAG/g BS) que EAU (5.75 ± 1.85 mg EAG/g BS). Este solvente presento el mayor valor para la constante dieléctrica (80.10), índice de polaridad (10.20) y parámetro de solubilidad polar (16.00) y el mayor decremento de EPs con respecto a los solventes cuyos parámetros de polaridad son superiores a los de MeOH al 50%, solvente con el que se obtuvo el mayor contenido de EPs (**Figura 1.1**).

En general, se observó que los EPs incrementan con la polaridad del solvente hasta llegar a un punto máximo, el cual fue observado utilizando MeOH al 50%, y posteriormente se observa un decremento de EPs al emplear solventes de mayor polaridad (**Figura 1.1**).

El ANOVA multifactorial indicó que existe diferencia significativas para ambos factores evaluados, el método de extracción (Factor A) y el solvente de extracción (Factor B) sobre el CFT, y además existe interacción entre ambos factores ($p < 0.05$). El análisis de componente

de varianza (ACV) estimo la contribución de los factores evaluados sobre la variable de respuesta (CFT) e indicó que el método de extracción (Factor A) explica un 7.32% de la variación de los datos, mientras que el solvente de extracción (Factor B) explica el 88.44% de la variación de los datos (**Anexo 3**). Los resultados indican que el solvente de extracción tiene un mayor efecto sobre el contenido de EPs en extractos de hoja de *C. chinense*.

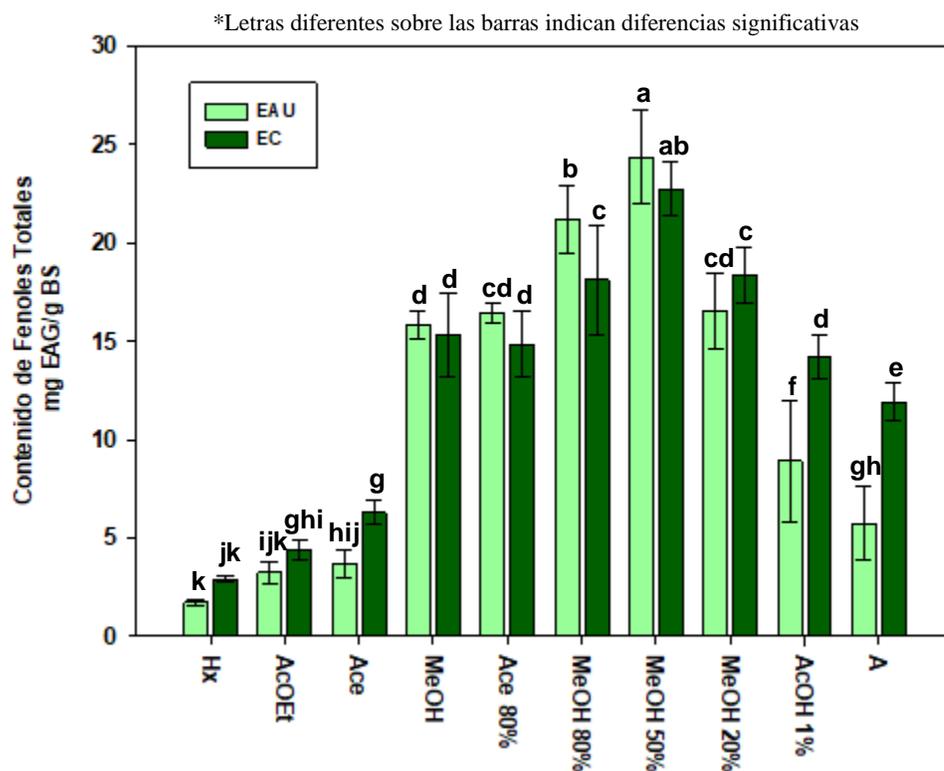


Figura 1. 1. Contenido compuestos fenólicos solubles (EPs) en hoja de *Capsicum chinense* Var. Chinchén Itzá obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción convencional (EC) utilizando diferentes solventes (Hx: hexano, AcOEt: acetato de etilo, Ace: acetona, MeOH: metanol, Ace 80%: acetona al 80%, MeOH 80%: metanol al 80%, MeOH 50%: metanol al 50%, MeOH 20%: metanol al 20%, AcOH 1%: ácido acético al 1%, A: agua).

En tallo fue observada una media de EPs de 3.36 mg EAG/g BS, mientras que el rango de EPs utilizando diferentes solventes se encontró de 1.80 a 6.85 mg EAG/g BS. El mayor contenido de EPs se obtuvo empleando Ace 80%, MeOH y MeOH al 80% independiente del método de extracción.

El contenido de EPs obtenido mediante EAU fue de 6.01 ± 1.70 , 5.08 ± 1.40 y 5.75 ± 1.52 mg EAG/g BS utilizando Ace 80% MeOH y MeOH 80% respectivamente, mientras que con EC fue de 6.84 ± 2.14 , 6.28 ± 2.10 y 6.64 ± 2.45 mg EAG/g BS utilizando Ace 80%, MeOH y MeOH al 80% respectivamente. Estos mostraron valores de constante dieléctrica (32.80, 32.70 y 42.40 respectivamente), índice de polaridad (6.12, 5.10 y 6.12) y parámetro de solubilidad polar (11.52, 12.30 y 13.04 respectivamente) mayores a los de Ace, AcOEt, y Hx (**Tabla 1.3**) con los cuales se obtuvieron los valores más bajos de EPs. Empleando EC utilizando AcOEt y Ace se obtuvo 1.83 ± 0.00 y 1.90 ± 0.25 mg EAG/g BS respectivamente, mientras que con el resto de los tratamientos no se detectó presencia de EPs (**Figura 1.2**).

En raíz el valor medio de EPs fue de 2.21 mg EAG/g BS, mientras que el rango de EPs utilizando los diferentes solventes evaluados fue de 1.55 a 4.54 mg EAG/g BS. El contenido de EPs utilizando Ace 80% fue de 4.44 ± 2.01 y 1.83 ± 1.06 mg EAG/g BS empleando EC y EAU respectivamente, utilizando MeOH 80% se obtuvo 4.07 ± 2.20 y 1.87 ± 0.06 mg EAG/g BS mediante EC y EAU respectivamente, mientras que con MeOH se obtuvo 3.73 ± 2.11 y 1.57 ± 0.12 mg EAG/g BS mediante EC y EAU respectivamente. Al emplear EC utilizando Hx, AcOEt y Ace se obtuvo 1.73 ± 0.06 , 3.48 ± 0.13 y 3.73 ± 2.12 mg EAG/g BS respectivamente, mientras que utilizando EAU no se detectó la presencia de EPs. Un mayor contenido de EPs obtenidos mediante EC se debe probablemente a un mayor tiempo de contacto con el solvente y temperatura de extracción que empleando EAU (**Figura 1.2**).

En tallo, el ANOVA multifactorial indico que ambos factores, el método de extracción (Factor A) y el tipo de solvente (Factor B) mostraron tener un efecto significativo sobre el contenido de EPs, sin embargo, ACV indica que fue el tipo de solvente el cual mostro una mayor contribución a la variación de los datos (80.49%) con respecto al método de extracción (2.22%) (**Anexo 3**).

En raíz, el ANOVA multifactorial indico que el método de extracción (Factor A) tiene un efecto significativo, mientras que el tipo de solvente (Factor B) no presento un efecto significativo sobre el contenido de EPs. El ACV mostro que el método de extracción explicaba en un 64.48% la variabilidad de los datos. En general, los valores de EPs obtenidos a partir de raíz fueron los más bajos en los tejidos estudiados de plántulas de *C. chinense*. Es posible que debido al bajo CFT en este tejido no se apreciara adecuadamente el efecto real del solvente sobre la extracción de EPs, tal como se observó en tallo y hoja, en los cuales el existe una mayor cantidad de EPs y el solvente de extracción tiene una alta contribución (>80% de la variación de los datos) sobre el CFT.

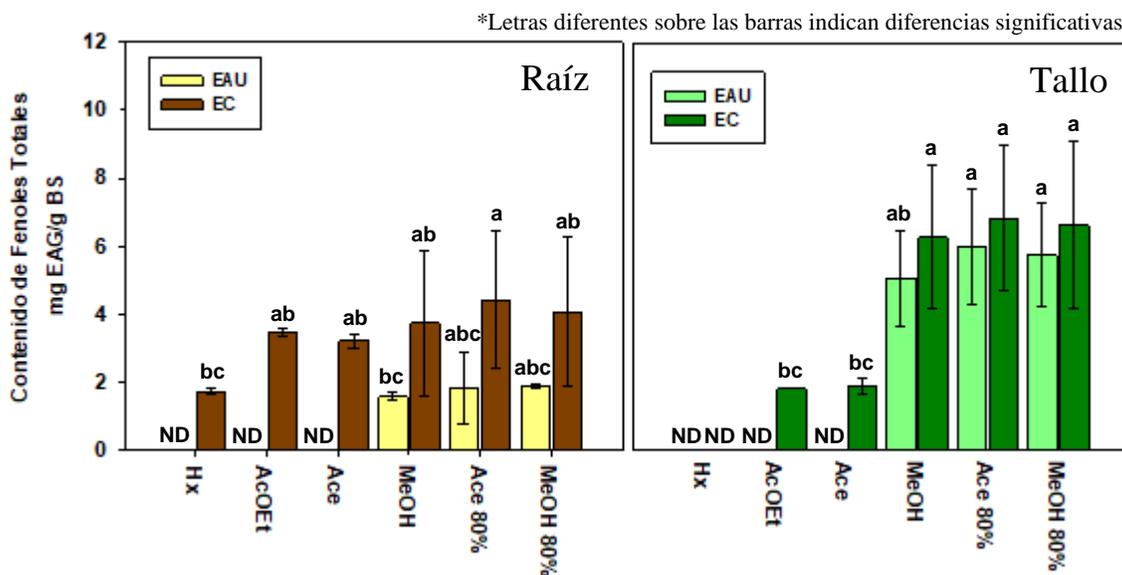


Figura 1. 2. Contenido de compuestos fenólicos solubles (EPs) en raíz y tallo de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá obtenidos mediante extracción convencional (EC) y extracción asistida por ultrasonido (EAU) utilizando diferentes solventes (Hx: hexano, AcOEt: acetato de etilo, Ace: acetona, MeOH: metanol, Ace 80%: acetona al 80%, MeOH 80%: metanol al 80%).

El valor medio de EPs en fruto fue de 21.48 mg EAG/g BS, y se encontró en un rango de 4.50 a 31.75 mg EAG/g BS utilizando solventes con diferentes polaridades. Utilizando Hx, AcOEt y Ace se obtuvieron los valores más bajos de EPs en fruto de *C. chinense*. El menor contenido de EPs fue de 4.51 ± 0.26 mg EAG/g BS utilizando Hx, seguido de AcOEt (6.12 ± 0.58 mg EAG/g BS) y Ace (13.91 ± 0.61 mg EAG/g BS). Resultados similares son observados en la extracción de EPs en raíz, tallo y hoja, donde los valores más bajos de EPs se obtienen con Hx. AcOEt y Ace los cuales tienen los valores más bajos de constante dieléctrica (1.89, 6.02 y 20.70 respectivamente), índice de polaridad (0.10, 4.40 y 5.10 respectivamente) y parámetro de solubilidad polar (0.00, 5.30 y 10.40 respectivamente). Al utilizar MeOH al 80% (29.56 ± 3.16 mg EAG/g BS), MeOH 50% (29.85 ± 1.87 mg EAG/g

BS), MeOH (30.73 ± 1.06 mg EAG/g BS) y Ace 20% (31.74 ± 1.30 mg EAG/g BS) se obtiene los valores más altos de EPs sin que se observen diferencias significativas. Los valores de polaridad de estos solventes se encontraron en un rango de 32.70 a 68.22 para la constante dieléctrica, de 5.10 a 8.18 para el índice de polaridad, y de 12.30 a 14.88 para el parámetro de solubilidad polar, lo que sugiere que estos son adecuados rangos de polaridad de solvente para la extracción de compuestos fenólicos a partir de fruto de *C. chinense* (**Figura 1.3**).

Al utilizar MeOH al 20% se obtuvo 26.54 ± 1.58 mg EAG/g BS, mientras que utilizando AcOH y A se obtuvo 22.18 ± 1.87 y 19.67 ± 0.76 mg EAG/g BS respectivamente. Al utilizar MeOH al 20%, AcOH al 1% y A como solventes, los cuales tienen los valores más altos de constante dieléctrica (70.62, 79.36 y 80.10 respectivamente), índice de polaridad (9.18, 10.16 y 10.20 respectivamente) y parámetro de solubilidad polar (15.26, 15.92 y 16.00 respectivamente) se observa un decremento de los EPs. Este comportamiento también se observó en la extracción de EPs a partir de hoja de *C. chinense* (**Anexo 3**).

Algunos estudios han evaluado el efecto del solvente en la extracción de EPs en fruto de chile habanero. Por ejemplo, Bae *et al.* (2012a) han reportado que a partir de fruto de *C. annuum* se obtiene un mayor CFT empleando AcOEt, mientras que, empleando solventes de mayor polaridad como Ace, MeOH y MeOH al 80% decrece el contenido de EPs, sin embargo, los autores sugieren que probablemente otros compuestos como azúcares con capacidad reductora, carotenoides y capsaicinoides son extraídos por lo cual se sobrestima el CFT mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. Por otro lado, Días *et al.* (2017) reportó que a partir de fruto de *C. baccatum* se obtiene un alto contenido de EPs utilizando MeOH como solvente de extracción, mientras que, utilizando Ace, AcOEt y Hx se observa un menor contenido de EPs en los extractos. En relación con la extracción utilizando A se reporta que en fruto de *C.*

chinense se obtienen un menor CFT con respecto a otros chiles como *C. annuum*, *C. baccatum* y *C. chacoense* (Loizzo *et al.*, 2015). Estos estudios, y los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren una posible correlación entre el contenido de EPs y la polaridad de los solventes que puede ser expresada a través de parámetros como la constante dieléctrica, el índice de polaridad y el parámetro de solubilidad polar para la evaluación de un modelo específico.

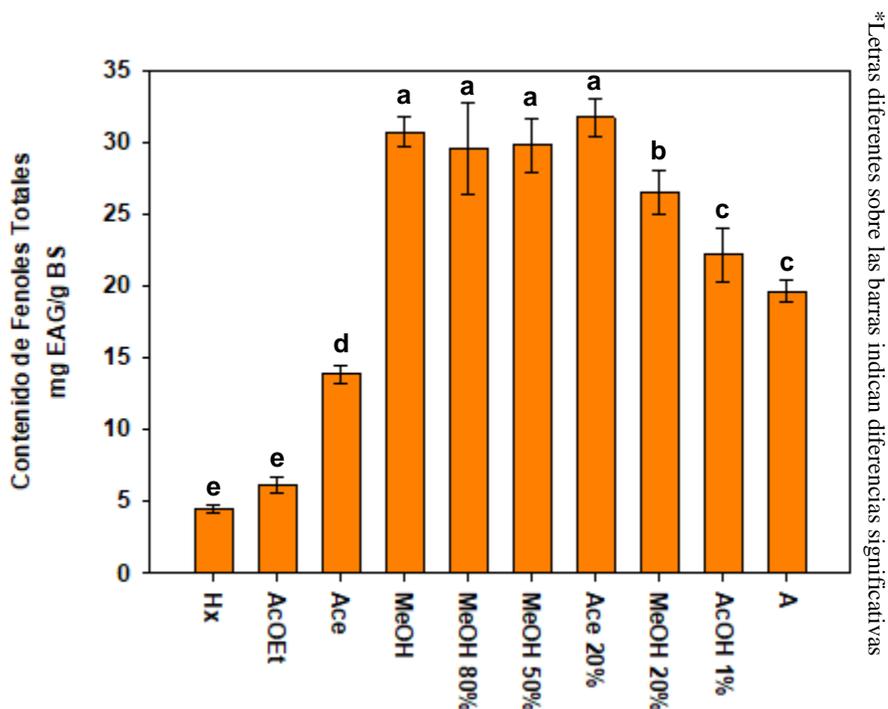


Figura 1. 3. Contenido de compuestos fenólicos solubles (EPs) en frutos de *Capsicum chinense* Var. Chinchen Itzá obtenido mediante extracción convencional (EC) empleando diferentes solventes (Hx: hexano, AcOEt: acetato de etilo, Ace: acetona, MeOH: metanol, MeOH 80%: metanol al 80%, MeOH 50%: metanol al 50%, Ace 20%: acetona al 20%, MeOH 20%: metanol al 20%, AcOH 1%: ácido acético al 1%, A: agua).

1.3.3. Correlación de los parámetros de polaridad del solvente con el contenido compuestos fenólicos solubles (EPs) en hojas empleando un modelo de distribución gaussiana

Los valores de las constantes de la ecuación gaussiana, así como los valores “R” son presentados en la **Tabla 1.4**. Los gráficos de los modelos de distribución gaussiana para los EPs obtenidos por EAU y EC correlacionada con los tres parámetros de polaridad (constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar) son presentados en la **Figura 1.4**).

El mejor ajuste del modelo de distribución gaussiana fue obtenido correlacionando el CFT con la constante dieléctrica de los solventes empleando ambos métodos de extracción (EAU y EC) con una R de 0.96. Para el índice de polaridad el valor R obtenido fue de 0.90 para ambos métodos (EAU y EC), mientras que para el parámetro de solubilidad polar el valor R fue de 0.93 y 0.92 mediante la evaluación de solvente por EAU y EC respectivamente.

El valor de “a” representa el pico máximo teórico de CFT de acuerdo a los modelos generados, para la constante dieléctrica, este valor corresponde a 25.36 y 22.11 mg EAG/g BS empleando EAU y EC respectivamente, para el índice de polaridad de 25.40 y 22.93 mg EAG/g BS empleando EAU, EC respectivamente, mientras que para el parámetro de solubilidad polar de 23.80 y 21.18 mg EAG/g BS empleando EAU y EC respectivamente. Estos picos máximos de CFT son mayores para los modelos obtenidos por EAU que por EC.

El coeficiente de distribución “b” para los modelos fue 18.45 y 24.37 al correlacionar el CFT con la constante dieléctrica, de 1.71 y 2.14 al correlacionar el CFT con el índice de polaridad, y de 1.73 y 2.26 al correlacionar el CFT con el parámetro de solubilidad polar, para EAU y EC respectivamente. Los valores de “b” obtenidos mediante EAU fueron más bajos que los obtenidos por EC. Esto se debe a que los modelos de distribución gaussiana obtenidos por

EAU muestran un mayor valor “a” y en consecuencia el coeficiente de distribución o desviación estándar “b” de la campana decrece.

Por su parte, el valor X_0 correlacionando el CFT obtenido por EAU y EC con la constante dieléctrica fue de 51.64 y 55.18, con el índice de polaridad fue de 7.50 y 7.86, y con el parámetro de solubilidad polar fue de 13.52 y 13.84 respectivamente. Estos valores representan la constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar del solvente con la cual los modelos predicen el mayor CFT teórico obtenido mediante EAU y EC. Estos valores son similares a los parámetros de polaridad presentados para MeOH al 50% el cual fue el solvente de extracción con el que se obtuvo el mayor CFT mediante ambos métodos de extracción (EAU y EC).

Finalmente, la prueba de Shapiro-Wilk indicó que la correlación entre el CFT obtenido mediante EC y los tres parámetros de polaridad (constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar) presentaron una distribución normal, mientras que el CFT obtenido por EAU con estos parámetros, solo presenta correlación una distribución normal al correlacionarse con el índice de polaridad.

Tabla 1. 4. Constante “a” (máximo valor de CFT), “b” (coeficiente de distribución) y X_0 (valor del parámetro de polaridad) de la ecuación de distribución gaussiana, correlación de Pearson al correlacionar el contenido de fenoles totales (CFT) empleando extracción asistida por ultrasonido (EAU) y extracción convencional (EC) con la constante dieléctrica, índice de polaridad y parámetro de solubilidad polar, y prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

Parámetro	Método de extracción	Constantes de la ecuación gaussiana ^b			R	DS ^c	Prueba de Normalidad (Shapiro – Wilk) (valor - P) ^a
		a	b	X_0			
Constante dieléctrica (CD)	UAE	25.3595	18.4526	51.6430	0.96	2.14	0.0055
	CE	22.1068	24.3717	55.1817	0.96	1.72	0.2264
Índice de polaridad (P')	UAE	25.4012	1.7101	7.4990	0.90	3.59	0.5120
	CE	22.9320	2.1482	7.8625	0.90	2.93	0.2559
Parámetro de solubilidad polar (PSP)	UAE	23.7980	1.7353	13.5192	0.93	2.94	0.0295
	CE	21.1804	2.2658	13.8424	0.92	2.59	0.4205

^a Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) con nivel de significación: valor P = 0.05

^b Modelo de distribución de gauss: valor P = 0.0001

^d Desviación estándar del modelo

El mejor modelo de distribución se obtuvo al correlacionar el CFT obtenido por EC con la constante dieléctrica, presentando una “R” o coeficiente de correlación de Pearson de 0.96, además, este modelo paso la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y presento la más baja desviación estándar en relación con los otros modelos. En los otros modelos de distribución gaussiana la correlación presento valores inferiores o estos no pasaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Estos resultados sugieren que la constante dieléctrica puede ser considerado un parámetro de polaridad adecuado para evaluar el efecto de solventes puros y mezclas binarias sobre la extracción de compuestos fenólicos en *C. chinense*, y puede ser empleado como un criterio con alta capacidad predictiva sobre el CFT en hojas de *C. chinense* tomando como referencia el solvente empleado en el procedimiento extracción.

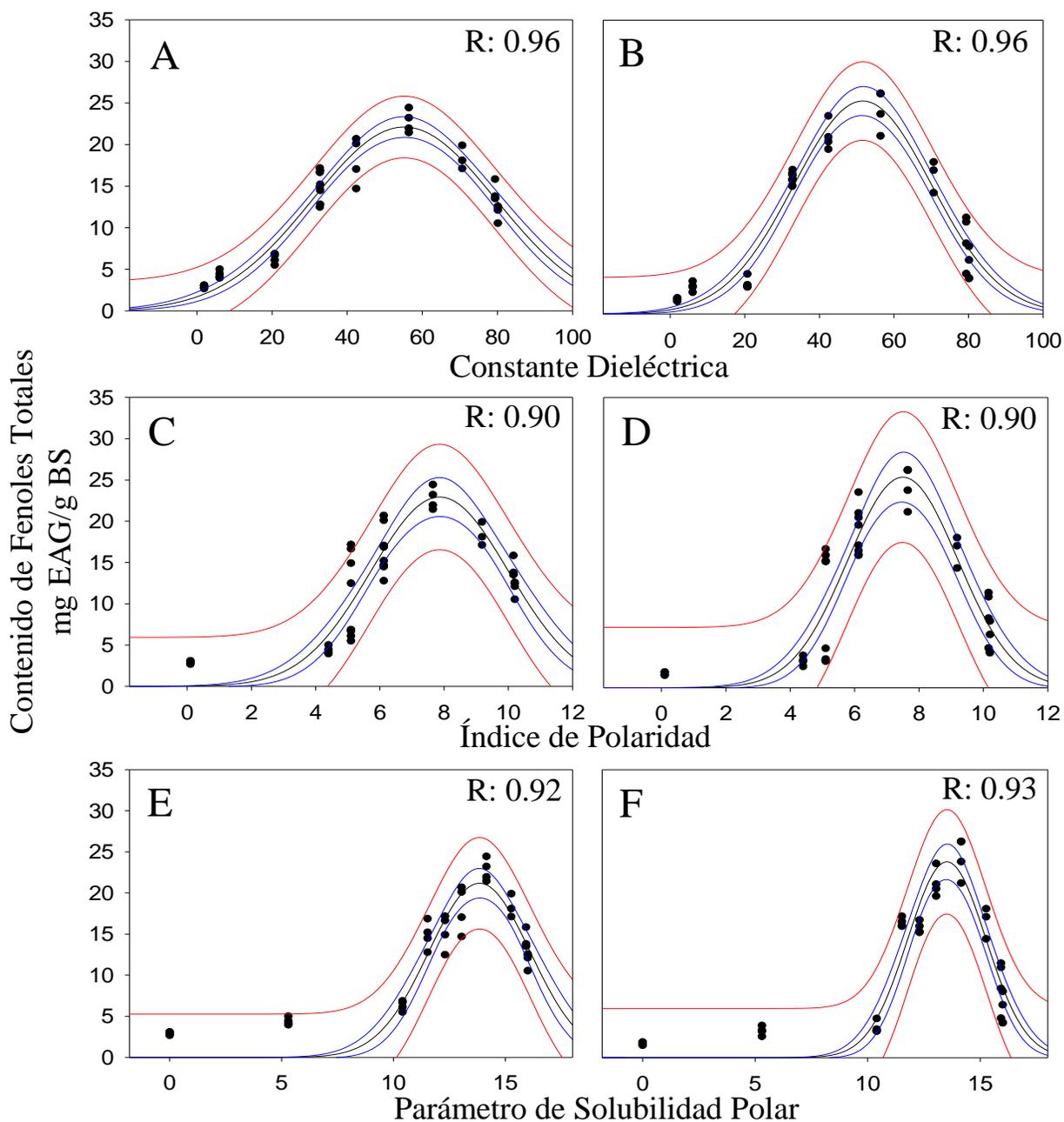


Figura 1. 4. Gráficos de modelo de distribución gaussiana. Las gráficas de distribución gaussiana fueron obtenidas al correlacionar el CFT con la constante dieléctrica (A y B), el índice de polaridad (C y D) y el parámetro de solubilidad polar (E y F) de los solventes empleados en las extracción de compuestos fenólicos de hojas de *C. chinense*. Los datos para los gráficos se obtuvieron empleado dos métodos, extracción asistida por ultrasonido (EAU: modelo A, C y E) y extracción convencional (EC: modelo B, D y F). — Banda de confianza (95%), — Banda de predicción (95%), — Distribución Gaussiana, • Parámetro de polaridad (constante dieléctrica, índice de polaridad o parámetro de solubilidad polar) vs CFT.

1.3.4. Efecto de la extracción ácida (EA) y extracción alcalina (EB) sobre el contenido de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) en hoja, tallo y raíz de *Capsicum chinense*

Los resultados sugieren que una importante cantidad de compuestos fenólicos son liberados de las estructuras de la pared celular presentes en las células vegetales de hoja, tallo y raíz empleando extracción ácida (EA) y alcalina (EB). Se observaron diferencias significativas en el contenido promedio de NEPs obtenidos a partir de los diferentes tejidos estudiados empleando todos los tratamientos (AM, AA, BM, BA) (**Figura 1.5**). El mayor contenido de NEPs fue observado en raíces ($\mu = 16.62$ mg EAG/g BS), seguido de hoja ($\mu = 11.76$ mg EAG/g BS) y tallo ($\mu = 10.55$ mg EAG/g BS). En relación con esto, Owen-Going *et al.* (2008) y Gayoso *et al.* (2004) muestran en sus estudios que es posible encontrar un importante contenido de NEPs en raíces.

En la **Figura 1.5** se muestra el contenido de NEPs en los diferentes tejidos de *C. chinense* empleando los diferentes tratamientos de extracción expuestos en la **Tabla 1.2**.

En extractos de raíz se observó un rango de NEPs de 13.20 a 21.45 mg EAG/g BS empleando los diferentes tratamientos de extracción. Al emplear el tratamiento AM y AA se obtuvo 21.46 ± 1.02 y 15.08 ± 2.15 mg EAG/g BS respectivamente, mientras que empleando BM y BA se obtuvo 13.19 ± 0.23 y 16.77 ± 0.56 mg EAG/g BS respectivamente. El análisis estadístico indicó que el tipo de extracción (EA, EB) y el tipo de solvente (SA, SO) tienen efecto significativo sobre el contenido de NEPs, y que existe interacción entre ambos factores (**Anexo 4**). En raíz el mayor contenido de NEPs se obtuvo empleando el tratamiento AM.

En extractos de tallo se observó un rango de NEPs de 9.60 a 11.80 mg EAG/g BS empleando los diferentes tratamientos de extracción. Al emplear el tratamiento AM y AA se obtuvo 11.83 ± 0.47 y 11.18 ± 0.33 mg EAG/g BS respectivamente, mientras empleando el

tratamiento BM y BA se obtuvo 9.61 ± 0.81 y 9.59 ± 0.20 mg EAG/g BS respectivamente. El análisis estadístico indicó que el tipo de extracción (EA, EB) tiene un efecto significativo sobre el contenido de NEPs, mientras que el tipo de solvente (SA, SO) no presentó un efecto significativo (**Anexo 4**). En tallo un mayor contenido de NEPs es obtenido empleando extracción ácida (EA) que extracción alcalina (EB).

En extractos de hoja se observó un rango de NEPs de 9.70 a 13.10 mg EAG/g BS empleando los diferentes tratamientos de extracción. Al emplear el tratamiento AM y AA se obtuvo 11.25 ± 1.38 y 9.71 ± 0.24 mg EAG/g BS respectivamente, mientras que con BM y BA se obtuvo 12.93 ± 1.32 y 13.14 ± 0.37 mg EAG/g BS respectivamente. El análisis estadístico indicó que el tipo de extracción (EA, EB) tiene un efecto significativo sobre el contenido de NEPs, mientras que el tipo de solvente (SA, SO) no presentó un efecto significativo (**Anexo 4**). En hojas un mayor contenido de NEPs es obtenido empleando extracción alcalina (EB) que extracción ácida (EA).

Algunos autores han reportado que un mayor contenido de NEPs es recuperado mediante extracción alcalina (EB), debido a que produce una apropiada ruptura de los enlaces éster de los ácidos fenólicos unidos a carbohidratos de la pared celular. Por otro lado, mediante extracción ácida (EA) se rompen los enlaces glicosídicos, son solubilizados algunos azúcares, y generalmente no tiene efecto sobre los enlaces éster. La desventaja de la extracción ácida a altas temperaturas es que produce la degradación de los compuestos fenólicos (Acosta-Estrada *et al.*, 2013). Esto sugiere que en hoja y tallo los compuestos fenólicos se encuentran unidos principalmente a través de enlaces éster y enlaces glicosídicos respectivamente, mientras que, en raíz, estos se encuentran unidos principalmente mediante

enlaces glicosídicos a carbohidratos de la pared celular, aunque, en relación con los resultados una importante cantidad de compuestos fenólicos también pueden estar unidos a diferentes estructuras de la pared celular a través de enlaces éster.

Una mayor distribución de compuestos fenólicos no solubles en la raíz puede deberse a que estos cumplen diversas funciones en la rizosfera, entre las cuales están proveer fuerza mecánica, elasticidad, permeabilidad y protección frente al ataque de patógenos presentes en el suelo (Jean-Christophe *et al.*, 2018).

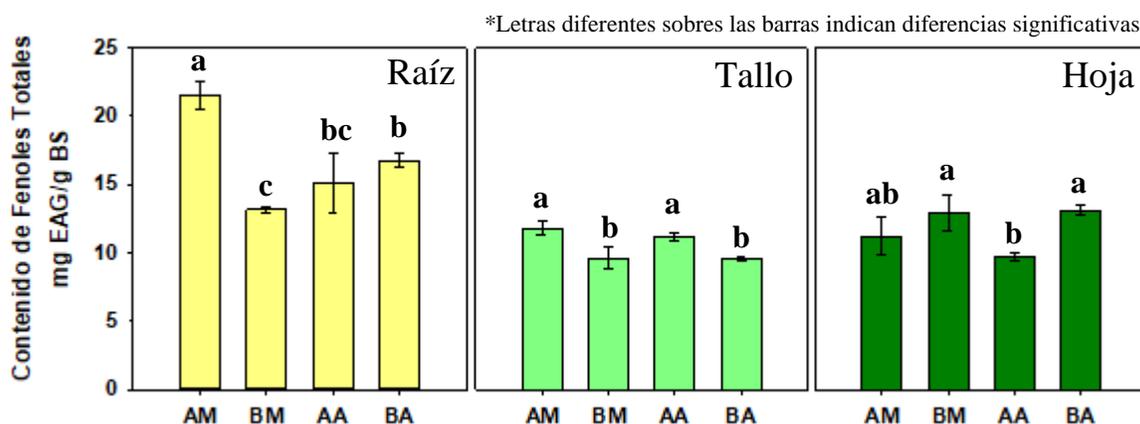


Figura 1. 5. Contenido de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) presentes en raíz, tallo y hoja extraídos mediante hidrólisis ácida (EA) y alcalina (EB), con solvente acuoso (SA) y orgánico (SO). AM: HCl 2N/Metanol, AA: HCl 2 N, BM: NaOH 2N/Metanol al 80%, BA: NaOH 2N.

1.4.CONCLUSIONES

En relación con los EPs los resultados indican que el método (Factor A) y solvente de extracción (Factor B) tienen un efecto significativo sobre el contenido de EPs en tejidos de *C. chinense*, sin embargo, es el tipo de solvente el factor que explica mejor los cambios en el CFT. El máximo contenido de EPs en hojas se obtuvo utilizando MeOH al 50% con ambos métodos (EC y EAU), mientras que en raíz y tallo el empleo de MeOH al 80% o Ace al 80% fue adecuado para la extracción de EPs. Una mayor media de EPs fue obtenido en hojas ($\mu = 12.25$ mg EAG/g BS), seguido de tallo ($\mu = 3.36$ mg EAG/g BS) y raíz y ($\mu = 2.21$ mg EAG/g BS). En fruto se obtuvo el mayor contenido de EPs con MeOH, MeOH al 80%, MeOH al 50% y Ace al 20%, mientras que la media de EPs ($\mu = 21.48$ mg EAG/g BS) fue mayor que en los tejidos de plántulas de *C. chinense*. Por otro lado, la polaridad del solvente presento una importante influencia en la extracción de compuestos fenólicos en hoja de plántulas de *C. chinense*. Se observó una alta correlación ($R = 0.96$) del CFT con la constante dieléctrica (CD) de los solventes evaluados mediante un modelo de distribución gaussiana. Este modelo puede ser empleado en protocolos de extracción de compuestos fenólicos para establecer una mezcla de solventes con una polaridad adecuada para la extracción de un alto CFT. En la extracción de NEPs se observó una mayor media de CFT en raíz ($\mu = 16.62$ mg EAG/g BS), seguido de hoja ($\mu = 11.76$ mg EAG/g BS) y tallo ($\mu = 10.55$ mg EAG/g BS). Los resultados sugieren que los NEPs de plántulas de *C. chinense* se encuentran predominante en raíz unidos principalmente a través de enlaces glicosídicos. En general, los resultados sugieren que un mayor contenido EPs se encuentra distribuidos en hoja, mientras que los NEPs están principalmente presentes en raíz.

CAPITULO 2:

**Análisis e identificación de compuestos fenólicos en
Capsicum chinense mediante UPLC-PDA-ESI-MS**

2.1.INTRODUCCIÓN

Los extractos crudos obtenidos a partir matrices vegetales como el chile habanero (*Capsicum chinense* Var. Chichen Itza) pueden contener un diversa variedad de metabolitos secundarios, por lo cual, se debe recurrir al uso de herramientas de análisis para lograr su separación, detección e identificación. En ese sentido, la cromatografía líquida (CL) es una herramienta útil para realizar la separación de los analitos contenidos en extractos vegetales, mientras que la detección e identificación de los mismo puede ser realizada mediante el uso de detectores acoplados como el detector de arreglo de fotodiodos (PDA por sus siglas en ingles) y espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) (Wood, 2008; Mandal y Chakraborty, 2013; Gu *et al.*, 2018).

Mediante PDA los compuestos fenólicos pueden ser estudiados generalmente de 240 a 560 nm, específicamente los ácidos hidroxicinámicos son detectados a 320 nm, los flavonoides entre 350 a 365 nm, y las antocianinas entre 460 a 560 nm (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2017), sin embargo, la identificación depende de que el tiempo de retención (TR) y la huella espectral en la UV-VIS coincida con del compuesto estándar conocido, esto limita el proceso de identificación a los compuestos previamente reportados de los cuales se cuente con estándares analíticos (Wood, 2008; Mandal y Chakraborty, 2013). Por otro lado, la espectrometría de masas es una técnica efectiva para determinar el peso molecular, la formula molecular y la caracterización estructural de los compuestos fenólicos detectados. La ionización de los compuestos separados produce la formación de iones con cargas positivas y negativas, los iones son detectados electrónicamente y analizados con un algoritmo computarizado, en la adquisición de datos puede analizarse los iones generados en modo ion positivo ($[M - H]^-$) y modo ion negativo ($[M - H]^+$). El ion de mayor abundancia es

considerado el pico base, el ion de mayor masa es considerado un espectro del ion molecular, mientras que los de menor masa son sus fragmentos. Es la fragmentación del ion molecular la que proporciona información útil para la caracterización estructural y composición de una molécula (Wood, 2008; Mandal y Chakraborty, 2013; Gu *et al.*, 2018)

La identificación de compuestos fenólicos es importante debido a que contribuye al estudio de cambios metabólicos en plantas frente a diferentes tipos de alteraciones ambientales. Diversos autores han demostrado la eficiencia de la cromatografía líquida (CL) acoplada a PDA/MS en la identificación de compuestos fenólicos en estudios de metabolómica (Park *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013; Morales-Soto *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2015; Juárez *et al.*, 2016). Respecto a *C. chinense*, la información específica sobre el perfil de compuestos fenólicos es muy limitada, en ese sentido son diversas variedades de *C. annuum* las que han sido predominantemente empleadas como modelo de estudio (Bae *et al.*, 2012b; Chen y Kang, 2013; Loizzo *et al.*, 2013; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014; Bae *et al.*, 2014; Materska *et al.*, 2015; Juárez *et al.*, 2016; Sachadyn *et al.*, 2016, León-Chan *et al.*, 2017). En relación con lo anterior, el principal objetivo fue mediante el empleo de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UPLC) acoplado a PDA/MS A) Determinar el perfil de compuestos fenólicos solubles (EPs) y no solubles (NEPs) de los extractos obtenidos a partir de diferentes tejidos de *C. chinense*. B) Realizar la identificación tentativa de estos compuestos mediante espectrometría de masas (MS). C) Evaluar el efecto del solvente sobre la extracción de los principales EPs presentes en *C. chinense*. D) Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos de extracción ácida y alcalina sobre el perfil de NEPs en los diferentes tejidos de *C. chinense*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Reactivos químicos

El ácido fórmico ($\geq 95.0\%$) y el acetonitrilo ($\geq 99.90\%$) adquirido en SIGMA – Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.); ácido clorhídrico ($\geq 36.5\%$), metanol ($\geq 99.90\%$) e hidróxido de sodio fueron adquiridos en Avantor J. T. Baker (Radnor, PA, EE. UU.). El agua ultrapura fue obtenida de un sistema de filtración Milli – Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).

2.2.2. Extractos de compuestos fenólicos solubles (EPs) y no solubles (NEPs) de *Capsicum chinense* analizados mediante UPLC-PDA-ESI-MS

Para la identificación de los compuestos fenólicos solubles (EPs) se evaluaron mediante UPLC-PDA-ESI-MS los extractos de hojas y fruto obtenidos con MeOH al 50%, y los extractos de raíz y tallo obtenidos con MeOH al 80% mediante EC (de acuerdo al apartado 1.2.4.1), mientras que para evaluar el efecto de la polaridad de solvente sobre la extracción de los principales EPs presentes en *C. chinense* se analizaron mediante UPLC-PDA los extractos de hojas obtenidos con EC empleando diferentes solventes según la **Tabla 1.1** (de acuerdo al apartado 1.2.4.1).

Para la hidrólisis de sustituyentes de los EPs presentes en los extractos de *C. chinense* estos fueron sometidos a hidrólisis ácida. El extracto (2 mL) fue tratado con HCl 2N a 90 °C (1 mL) durante 1 h según la metodología modificada de Bae *et al.*, (2012). Posteriormente los extractos fueron neutralizados empleando una solución de metanol/NaOH al 2N y centrifugados (Centrific 225, Fisher Scientific, EE. UU.) a 6,500 rpm por 15 min. El sobrenadante fue concentrado en un rotavapor (BUCHI, Modelo: R – 215, Suiza) a 50°C y 250 mbar de vacío. Finalmente, los extractos concentrados fueron filtrados con membranas de 0.2 μm (Millex – FG, PTFE 0.2) y almacenados en congelación a -40 °C hasta su análisis.

En cuanto a la identificación de los NEPs se evaluó mediante UPLC-PDA-ESI-MS los extractos de raíz, tallo y hoja obtenidos mediante extracción ácida (EA) empleando HCl 2N y HCl 2N/MeOH, y extracción alcalina (EB) empleando NaOH 2N y NaOH 2N/MeOH al 80% como solventes de extracción (de acuerdo al apartado **1.2.5.2**), estos mismos fueron empleados para evaluar mediante UPLC-PDA el efecto del tipo de extracción (EA, EB), y tipo de solvente (SA, SO) sobre la extracción de los NEPs presentes en los diferentes tejidos según la **Tabla 1.2** (de acuerdo al apartado **1.2.5.2**).

2.2.3. Análisis cromatográfico mediante UPLC-PDA-ESI-MS

Los perfiles cromatográficos se obtuvieron usando un UPLC Waters Acquity H Class (Milford, MA, EE. UU.) con una bomba cuaternaria (UPQSM), un inyector automático (UPPDALTC) y un detector de matriz de fotodiodos PDA λ (UPPDALTC). La separación cromatográfica se realizó con una columna Waters Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μm , 100 x 2,1 mm ID (Milford, MA, EE. UU.) empleando como fase móvil dos solventes, 0.1% de ácido fórmico en agua ultrapura (A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B), con las condiciones reportadas por Covarrubias-Cárdenas *et al.*, (2018). La lectura del PDA λ se realizó en un rango de 190 a 400 nm. La integración de área de los picos cromatográficos ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) para cada compuesto detectado en todos los tratamientos evaluados se realizó tomando la señal analítica a 290 nm.

Para el análisis por espectrometría de masas (MS) fue empleado un instrumento Waters Xevo TQ-S micro. Fueron empleadas las condiciones según lo reportado por Covarrubias-Cárdenas *et al.*, (2018). La energía de colisión empleada fue de 35 eV para la exploración en modo ion negativo y 10 eV en modo ion positivo. Los espectros de masas se registraron en modo de exploración completa en un rango de 50 m / z a 700 m / z. El software MassLynx

V4.1 (Waters, Milford, MA, EE. UU, 2014) y Empower 3 (Waters, Milford, MA, EE. UU. 2010) se usó para adquisición y procesamiento de datos. Para la identificación de compuestos a partir de los patrones de fragmentación fue consultada la literatura citada y, las bases de datos European Mass Bank (<https://massbank.eu/MassBank/index.html>) y ReSpect for phytochemicals (<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/respect/index>).

2.2.4. Análisis estadístico

Para la evaluación del efecto de la polaridad del solvente sobre contenido de los principales EPs presentes en hoja se empleó un ANOVA simple ($p < 0.05$). Los resultados fueron expresados como % de rendimiento (con respecto al área máxima promedio para cada compuesto en los cromatogramas) en promedio \pm desviación estándar, y graficados con respecto a la constante dieléctrica de cada solvente evaluado según la **Tabla 1.3** (de acuerdo con el apartado **1.3.1**) utilizando un Software Sigma Plot (Systat Software Inc, EE. UU.).

El diseño experimental para la evaluación del efecto de cada tratamiento (**Tabla 1.2**; Tratamiento: AM, AA, BM, BA) sobre la extracción de NEPs se realizó el análisis con un ANOVA multifactorial ($p < 0.05$). Se empleó el método de Tukey para realizar las comparaciones entre las medias de los tratamientos evaluados ($p < 0.05$) en todos los experimentos. Para evaluar la contribución de los factores se realizó un análisis de componentes de varianza (ACV) ($p < 0.05$). Los resultados fueron expresados como área ($\mu V \cdot sec$) en promedio \pm desviación estándar. Los análisis fueron realizados empleando un Software Statgraphics Centurion Version XVI (Manugistic Inc., Rockville MD, EE. UU.).

2.3.RESULTADOS Y DISCUSIONES

2.3.1. Compuestos fenólicos solubles (EPs) identificados en *Capsicum chinense* mediante UPLC-PDA-ESI-MS

En la **Figura 2.1** se muestra el perfil cromatográfico de EPs de extractos de fruto (línea naranja), hoja (verde oscuro), tallo (verde claro), y raíz (café) a 290 nm. Se detectaron un total de 39 picos cromatográficos, correspondientes a ácidos fenólicos (13), flavonoides (22), fenol poliamidas (2) y derivados terpenoides (2). Un mayor número de picos cromatográficos fue detectado en hoja (21), de los cuales, los principales correspondieron a compuestos flavonoides (12) como apigenina, luteolina, chrysoeriol y diosmetina, seguido de algunos ácidos fenólicos (5), derivados de terpenoides (2), e isómeros de una fenol poliamida (2). En fruto (14) se detectó la presencia de flavonoides (5) como los anteriormente mencionados y, ácidos fenólicos (6) como derivados de ácido vanílico y clorogénico, así como la presencia de un derivado terpenoide y los mismos isómeros de la fenol poliamida (2) identificada en extractos de hoja. En tallo (16) los principales compuestos fenólicos correspondieron a derivados de apigenina (7), así como algunos ácidos fenólicos (6), un compuesto terpenoide y las misma fenol poliamida identificada en extractos de fruto y hoja. En raíz se observó el menor número de picos cromatográficos (6), de los cuales, algunos correspondieron a ácidos fenólicos no identificados (4) y la fenol poliamida (2) identificada en todos los tejidos de *C. chinense* Var. Chichen Itza. En la **Tabla 2.2** se muestra el tiempo de retención (TR) los picos máximos (λ_{\max}) en la huella espectral (190 a 400 nm) de los compuestos detectados, el ion molecular en modo ion positivo y negativo ($[M - H]^-$ y $[M + H]^+$), el patrón de fragmentación y la identificación tentativa de algunos de los compuestos identificados en los diferentes tejidos evaluados de *C. chinense*.

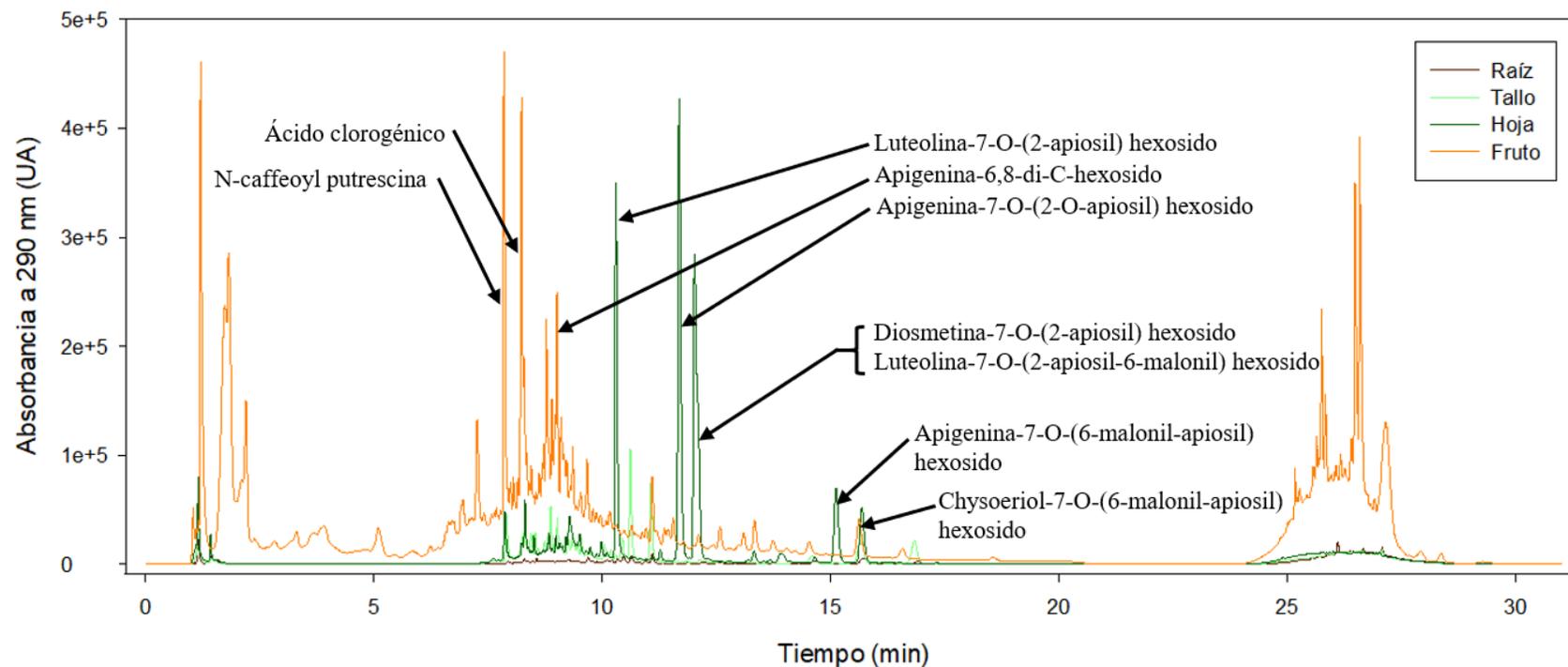


Figura 2. 1. Principales compuestos identificados en extractos de raíz, tallo, hoja y fruto de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itza obtenidos a través de cromatografía líquida de ultra eficiencia (UPLC) acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos (PDA)

El compuesto **1** (TR: 7.20 min; λ_{max} : 195, 265, 295 nm) y **4** (TR: 8.22 min; λ_{max} : 200, 221, 265, 295 nm) fueron identificados en extractos de fruto de chile habanero como derivados de ácido vanílico de acuerdo con su huella espectral (Herrera-Pool *et al.*, 2019). Sus características espectrales y su presencia encontrada únicamente en fruto sugieren que pueden tratarse de intermediarios como la vainillina, el cual en frutos de *Capsicum* sp. está involucrado en la síntesis de vainillinamida, requerido en la síntesis de capsaicinoides (Azá-González *et al.* 2011).

El compuesto **2** y **3** (Isómero I, TR: 7.98 min; Isómero II, TR: 8.14 min; λ_{max} : 194, 213, 293, 312 nm) presente en todos los extractos estudiados fue identificado como N-cafeoyl putrescina. El ion molecular fue de m/z 251 ($[M + H]^+$) y m/z 249 ($[M - H]^-$), y se identificaron los fragmentos m/z 234 ($[M - H - 17$ (perdida de NH_3)] $^+$), m/z 163 ($[M - H - 86$ (putrescina)] $^+$), m/z 89 (putrescina) ($[M + 3H - 164$ (cafeoyl)] $^+$) (**Anexo 5**) (Baumert *et al.*, 2001; Camacho-Cristóbal *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2012). Adicionalmente se identificó el fragmento m/z 72 ($[M - 178]^+$) el cual se sugiere su presencia se debe a la pérdida de un grupo NH_3 del fragmento de putrescina. Este compuesto ha sido reportado en *Nicotiana tabacum* L. (Camacho-Cristóbal *et al.*, 2004) y hojas de *C. annuum* (Kim *et al.*, 2014). Por otro lado, Park *et al.*, (2012) también han identificado este compuesto en frutos de *C. annuum* Var. Chelsea en respuesta a la infección por antracnosis producida por *Colletotrichum gloeosporioides*.

El compuesto **5** (TR: 8.56 min; λ_{max} : 197, 218, 278 nm) presente en todos los extractos fue tentativamente identificado como ácido protocatechuico hexosido con un ion molecular de m/z 315 ($[M - H]^-$) y un fragmento m/z 203 en modo ion negativo. En modo ion positivo se detectaron el fragmento m/z 227 ($[M + H - 90$ ($3 \cdot HCHO$)] $^+$) el cual se sugiere corresponde

a la pérdida de tres grupos aldehídos común en compuestos glicosilados (Abu-Reidah *et al.*, 2013a). Además, este compuesto ha sido reportado por Vallverdú-Queralt *et al.* (2011) en sub – productos de tomate mediante HPLC–ESI-QTOF y por Moco *et al.* (2006) en su forma de aglicona en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*). Se sugiere la acumulación de este compuesto en fruto se debe a que se trata de un derivado del aldehído protocatechuico, un intermediario en la producción de vainillina y ácido vanílico, necesarios para la producción de capsaicinoides.

El compuesto **6** (TR: 8.75 min; λ_{\max} : 212, 299, 325 nm) encontrado en el extracto de hoja y fruto fue identificado como ácido clorogénico con un ion molecular de m/z 353 ($[M - H]^-$) y un fragmento m/z 191 que corresponde al ácido quínico ($[M - H - 162]^-$). Este compuesto ha sido identificado en tomates cherry, en subproductos a base de tomate, y en *Capsicum annuum* Var. Lemeška y Lakošnička (Moco *et al.*, 2006; Gómez-Romero *et al.*, 2010; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2011; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Mudrić *et al.*, 2017). Mikulic-Petkovsek *et al.* (2013) han reportan la acumulación de este compuesto en respuesta a la infección producida por *Colletotrichum coccodes* en frutos de *C. annuum* Var. Bagoly y Var. Soroksari.

El compuesto **7** (TR: 8.89 min; λ_{\max} : 196, 214, 270, 330 nm) y **8** (TR: 9.01 min; λ_{\max} : 196, 220, 250, 295, 330 nm) encontrados en el extracto de fruto fueron identificados como un derivado de apigenina y derivado de ácido hidroxicinámico respectivamente de acuerdo a su huella espectral, mientras que el compuesto **9** (TR: 9.02 min; λ_{\max} : 205, 270, 346 nm) encontrado en extracto de tallo fue identificado como un derivado de apigenina o luteolina de acuerdo a su huella espectral (Morales-Soto *et al.*, 2013).

El compuesto **10** (TR: 9.09 min; λ_{\max} : 209, 284 nm) encontrado en los extractos de tallo y hoja tuvo un ion molecular de m/z 215 ($[M - H]^-$) y m/z 217 ($[M + H]^+$) y fue identificado como ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -3-carbolina-3-carboxílico (Lycoperodine 1) (Abu-Reidah *et al.*, 2013a). Adicionalmente fue detectado el fragmento m/z 200 ($[M - 17(OH)]^+$) que puede tratarse de la pérdida de un grupo OH, y el fragmento m/z 88 ($[M + H - 129]^+$) tentativamente relacionado con la ruptura del anillo piperidina unido a un grupo funcional carboxilo ($C_3H_6NO_2$).

El compuesto **11** (TR: 9.10 min; λ_{\max} : 196, 215, 270, 328 nm) fue encontrado en el extracto de fruto e identificado como un derivado de apigenina de acuerdo a su huella espectral, mientras que el compuesto **12** (TR: 9.16 min; λ_{\max} : 195, 284 nm) fue encontrado en el extracto de tallo e identificado como un derivado ácido hidroxicinámico, aunque también debido a sus características espectrales puede tratarse de un derivado de algún aminoácido (Morales-Soto *et al.* 2013)

El compuesto **13** (TR: 9.25 min; λ_{\max} : 205, 270, 297, 338 nm) presente en el extracto de tallo, hoja y fruto fue identificado como apigenina-6,8-di-C-hexosido (Vicenin II) con un ion molecular de m/z 593 ($[M - H]^-$). También se identificó el fragmento m/z 176 correspondiente a la pérdida de una hexosa. El anterior compuesto ha sido reportado por Mikulic-Petkovsek *et al.* (2013) y Sachadyn-Król *et al.* (2016) en frutos de *C. annuum* y por Vallverdú-Queralt *et al.* (2011) en productos derivados de tomate.

El compuesto **14** (TR: 9.33 min; λ_{\max} : 213, 270, 335 nm) y **15** (TR: 9.37 min; λ_{\max} : 198, 213, 270, 329 nm) fueron encontrados en el extracto de tallo y fruto respectivamente, e identificados como un derivado de apigenina de acuerdo con su huella espectral (Morales-Soto *et al.*, 2013)

El compuesto **16** (TR = 9.55 min; λ_{max} : 195, 213, 312 nm) encontrado en extracto de hoja y fruto presento un ion molecular de m/z 329 ($[M - H]^-$). Este compuesto fue identificado como ácido vanílico-4- β -D-glucósido y ha sido reportado por Vallverdú-Queralt *et al.* (2011) en productos derivados de tomate, por Morales-Soto *et al.* (2013) en frutos de *C. annuum* y ha sido identificado a partir de diversas fuentes vegetales (Abu-Reidah *et al.*, 2012; Abu-Reidah *et al.*, 2013b; Abu-Reidah *et al.*, 2015a). También se identificó el fragmento m/z 265 el cual se sugiere corresponde a la perdida de dos grupos CH_2OH ($[M - 3H - 62 (2 \cdot \text{CH}_2\text{OH})]^-$) y el fragmento m/z 177 el cual se propone corresponde a la perdida de glucosa unida por enlace O – glucosídico ($[M - 2H - 151]^-$).

El compuesto **17** (TR = 9.61 min; λ_{max} : 213, 270, 335 nm), **19** (TR = 9.72 min; λ_{max} : 208, 271, 338 nm), **20** (TR = 9.79 min; λ_{max} : 213, 270, 333 nm) y **22** (TR = 10.02 min; λ_{max} : 214, 271, 332 nm) presentes en extracto de tallo fueron identificados como un derivados de apigenina de acuerdo a su huella espectral (Morales-Soto *et al.*, 2013)

Para el compuesto **18** (TR = 9.62 min; λ_{max} : 212, 311 nm) y **24** (TR = 10.16 min; λ_{max} : 210, 306 nm) encontrado en extracto de hoja se detectó un ion molecular de m/z 337 en modo ion negativo y fue identificado como ácido cumarilquínico. También se detectó el fragmento m/z 191 correspondiente al ácido quínico ($[M - H - 146]^-$ o $[192 (\text{ácido quínico}) - H]^-$), reportado en diversos trabajos (Plazonic *et al.*, 2009; Vallverdú-Queralt *et al.*, 2011; Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2012; Abu-Reidah *et al.*, 2013a; Abu-Reidah *et al.*, 2013b; Pavlović *et al.*, 2016; Mudrić *et al.*, 2017).

El compuesto **21** (TR = 9.88 min; λ_{max} : 272, 320 nm) encontrado en extracto de hoja fue identificado por su ion molecular m/z 597 ($[M - H]^-$) como phloretin-5,6-di-C-hexosido. Este

compuesto que ha sido reportado por Sánchez-Rodríguez *et al.* (2012) en tomates cherry, y por Spínola *et al.* (2015) en limones.

El compuesto **23** (TR = 10.05 min; λ_{\max} = 199, 266, 337 nm) y **30** (TR = 12.76 min; λ_{\max} : 199, 266, 336 nm) encontrados en el extracto de hoja fueron identificados como apigenina-7-O-(2-O-apiosil) hexosido (Isómero I y II) con un ion molecular m/z 563 en modo ion negativo y m/z 565 en modo ion positivo (Mudrić *et al.*, 2017). También fue encontrado el fragmento m/z 433 en modo ion positivo el cual se propone corresponde a la pérdida de una pentosa ($[M + 2H - 133]^+$) y el fragmento m/z 271 correspondiente a la molécula de apigenina ($M + H - 294]^+$) tras la pérdida de ambos azúcares. En el extracto hidrolizado (Tabla 2.3) fueron encontrados los iones moleculares m/z 431 ($[M - H]^-$) y m/z 433 ($[M + H]^+$) con un λ_{\max} : 206, 266, 337 nm. Este fue identificado como apigenina-7-O-hexosido tras la pérdida de una pentosa a consecuencia de la hidrólisis ácida (Vallverdú-Queralt *et al.*, 2011; Abu-Reidah *et al.*, 2013a; Pavlović *et al.*, 2016). También fueron encontrados los fragmentos m/z 268 ($[M - H - 163]^-$) y m/z 271 ($[M + 2H - 163]^+$) que se sugiere corresponden a la molécula de apigenina tras la pérdida de ambos azúcares (apiosil y hexosil) tras la ionización (**Anexo 5**).

El compuesto **25** (TR = 13.149 min) encontrado en extracto de hoja fue tentativamente identificado como vebonol (terpenoide) con ion molecular 451 ($[M - H]^-$) y 453 ($M + H]^+$) m/z. Fueron identificados los fragmentos m/z 435 y m/z 213 en modo ion positivo, sin embargo, no fue detectado el fragmento m/z 201 reportado para este compuestos por Abu-Reidah *et al.* (2015a).

El compuesto **26** (TR = 14.665 min; λ_{\max} : 205, 254, 348 nm) encontrado en extracto de hoja presento un ion molecular de m/z 579 ($[M - H]^-$) y m/z 581 ($[M + H]^+$) m/z. Este fue

identificado como luteolina-7-O-(2-O-apiosil) hexosido (Mudrić *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013; Marín *et al.*, 2004). También se identificó la presencia del fragmento m/z 287 en modo ion positivo, el cual corresponde a la molécula de luteolina ($[M + 2H - 295]^+$). En el extracto hidrolizado (Tabla 2.3) se encontró este mismo compuesto con un ion molecular de m/z 447 ($[M - H]^-$) y m/z 449 ($[M + H]^+$) con un λ_{\max} : 207, 253, 347 nm. Fue identificado como luteolina-7-O-hexosido (Abu-Reidah *et al.*, 2013a; Abu-Reidah *et al.*, 2013b; Pavlović *et al.*, 2016; Mudrić *et al.*, 2017) tras la pérdida de una pentosa (apiosil) debido al proceso de hidrólisis ácida. También se identificó el fragmento m/z 285 ($[M - 163]^-$), 284 m/z ($[M - H - 163]^-$), y el fragmento m/z 287 ($[M + H - 163]^+$) que corresponden a la luteolina tras la pérdida de una hexosil durante la ionización (**Anexo 5**).

Generalmente la acumulación de flavonoides glicosilados es observado en hojas sanas, por su actividad reductora (Agati *et al.*, 2012) Se ha reportado la presencia de flavonoides como la apigenina-7-O-glicosido (A-7-G) y la luteolina-7-O-glicosido (L-7-G) en hojas de plantas de *C. annuum*, y se ha demostrado que estos compuestos están involucrados en un mecanismo de defensa frente al estrés producido por la radiación UV-B y las bajas temperaturas (León-Chan *et al.*, 2017). Por otro lado, se debe mencionar que la glicosilación de los diversos flavonoides es importante para su acumulación en diversos tejidos, este proceso es realizado por las UDP-glicosiltransferasas (UGT), y se trata de paso importante en la compartamentación de los flavonoides en la vacuolas de las células vegetales, y contribuye en la homeóstasis en las plantas, y los mecanismos de resistencia frente al estrés biótico y abiótico (Le Roy *et al.*, 2016)

El compuesto **27** (TR = 11.15 min; λ_{\max} : 209, 252, 268, 346 nm) encontrado en extracto de fruto fue identificado como un derivado de luteolina o chrysoeriol de acuerdo a su huellas

espectral, mientras que el compuesto **28** (TR = 11.27 min; λ_{\max} : 195, 218, 292, 309 nm) y **29** (TR = 11.89 min; λ_{\max} : 194, 217, 290, 318 nm) presentes en extracto de raíz y tallo fueron identificados como derivados de ácido hidroxicinámico (Morales-Soto *et al.*, 2013).

Para el compuesto **31** (TR = 12.80 min; λ_{\max} : 209, 268, 346 nm) se identificó un ion molecular de m/z 621 ($[M - H]^-$). Este compuesto no pudo ser identificado, sin embargo, su huella espectral en la UV sugiere que se trata de un derivado de luteolina o chrysoeriol (Morales-Soto *et al.*, 2013).

Para el compuesto **32** (TR = 13.25 min; λ_{\max} : 206, 251, 266, 347 nm) encontrado en extracto de hoja se detectó un ion molecular de m/z 593 ($[M - H]^-$) y m/z 595 ($[M + H]^+$), el cual fue identificado como diosmetina-7-O-(2-O-apiosil) hexosido (Abu-Reidah *et al.*, 2012). En el extracto hidrolizado (Tabla 2.3) fue identificado el ion molecular m/z 461 ($[M - H]^-$) y m/z 463 ($[M + H]^+$) con un λ_{\max} : 205, 251, 265, 347 nm. Fue tentativamente identificado como diosmetina-7-O-hexosido (Morales-Soto *et al.*, 2013) para el cual se sugiere que la hidrólisis ácida dio lugar a la liberación de la pentosa del enlace 2 – O – glucosídico. También se identificó el fragmento m/z 446 correspondiente a la pérdida de un grupo metilo ($[M - H - 15 (CH_3)]^-$), el fragmento m/z 297 el cual se sugiere se debe a la pérdida de la hexosil del enlace 7 – O – glucosídico ($[M - 2H - 163]^-$), el fragmento m/z 283 que se propone representa la pérdida de un hexosa ($[M - 179]^-$) y el fragmento m/z 255 que representa la ruptura del anillo “C” del esqueleto flavonoide de la diosmetina y la pérdida de un grupo OH ($[M + H - 192]^-$). En modo ion positivo se detectó en fragmento m/z 301 ($[M + 2H - 163]^+$) que corresponde a la diosmetina en forma de aglicona (**Anexo 5**).

El compuesto **33** (TR = 13.50 min; λ_{\max} : 206, 253, 348 nm) encontrado en extracto de hoja con un ion molecular de m/z 665 ($[M - H]^-$) y m/z 667 ($[M + H]^+$), el cual fue identificado

como luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido (Marín *et al.*, 2001; Abu-Reidah *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013; Mudrić *et al.*, 2017). Para este compuesto fue detectado el fragmento m/z 621 en modo ion negativo que corresponde a la pérdida de un grupo ion carboxilo ($[M - H - 44 (COO^-)]^-$). En el extracto hidrolizado (Tabla 2.3) fue encontrado el ion molecular de m/z 285 ($[M - H]^-$) y m/z 287 ($[M + H]^+$), el cual fue identificado como luteolina tras la pérdida de sus sustituyentes por hidrolisis ácida (**Anexo 5**).

Para el compuesto **34** (TR = 15.81 min; λ_{max} : 198, 266, 336 nm) encontrado en extracto de hoja con un ion molecular es 635 m/z en modo ion negativo fue identificado como chrysoeriol-7-O-(2-apiosil-6-acetil) hexosido (Marín *et al.*, 2004; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013). El compuesto **38** (TR = 18.66 min; λ_{max} : 210, 251, 266, 347) también encontrado en extracto de hoja con un ion molecular de m/z 679 ($[M - H]^-$) y 681 m/z ($[M + H]^+$) fue identificado como chrysoeriol-7-O-(6 malonil-apiosil) hexosido (Long-Ze *et al.*, 2007). También fue detectado el fragmento m/z 635 para el compuesto **38** el cual corresponde a la pérdida de un ion carboxilo ($[M - H - 44 (COO^-)]^-$) tras la ionización. En el extracto hidrolizado (Tabla 2.3) fue detectado el ion molecular de m/z 299 ($[M - H]^-$) y m/z 301 ($[M + H]^+$), el cual fue identificado como chrysoeriol en forma de aglicona. Para este mismo fueron detectados el fragmento m/z 284 que corresponde a la pérdida de un grupo metilo ($[M - H - 15 (CH_3)]^-$), el fragmento m/z 151 del que se sugiere representa la ruptura del anillo “C” del esqueleto flavonoide ($[M - 149]^-$) y el fragmento m/z 107 del cual se sugiere que también es producto de la ruptura del anillo “C” del chrysoeriol ($[M - H - 192]^-$) (**Anexo 5**).

Los compuestos **35** y **36** (Isómero I, TR = 16.97 min; Isómero II, TR = 17.84; λ_{max} : 208, 266, 336) encontrados en extracto de hoja con un iones molecular de m/z 649 ($[M - H]^-$) y m/z

651 ($[M + H]^+$) fueron identificados como apigenina-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido (Long-Ze *et al.*, 2007). Para este compuesto fue identificado el fragmento m/z 605 que corresponde a la pérdida de un grupo carboxilo ($[M - H - COO]^-$). En el extracto hidrolizado (Tabla 2.3) fueron identificados el ion molecular de m/z 269 ($[M - H]^-$) y m/z 271 ($[M + H]^+$) que corresponden a la apigenina tras perder todos sus sustituyentes mediante hidrolisis ácida. También se encontraron los fragmentos m/z 246 en modo ion positivo que posiblemente corresponde a la pérdida de un grupo C_2H_2 ($[M + 2H - 26(C_2H_2)]^+$) y el fragmento m/z 117 en modo ion negativo que sugiere la ruptura del anillo “C” del esqueleto flavonoide ($[M - H - 152]^-$) (**Anexo 5**).

El compuesto **37** (TR = 17.87 min; λ_{max} : 198, 266, 336 nm) y **39** (TR = 19.55 min; λ_{max} : 198, 266, 336 nm) presentes en extracto de raíz y tallo fueron identificados como derivados de ácido hidroxicinámico de acuerdo con su huella espectral (Morales-Soto *et al.*, 2013).

Tabla 2. 1. Compuestos fenólicos solubles (EPs) identificados en extractos de raíz, tallo, hoja y fruto de *Capsicum chinense* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC) con arreglo de fotodiodos (PDA) y espectrometría de masas (MS)

Número	TR (min)	λ_{max} (nm)	Masa exacta experimental		Formula Molecular	Fragmentos (m/z)		Identificación Tentativa	Clasificación	Tejido ^a
			[M - H] ⁻	[M + H] ⁺		Ion negativo	Ion positivo			
1	7.20	196, 265, 295	-	-	-	-	-	Derivado de ácido vanílico	Ácido fenólico	F
2	7.98	194, 213, 293, 317	249.0850	251.1308	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	249 (100)	251 (95) 234 (21) 163 (100) 72 (80)	N-caffeoyl putrescina (Isómero I)	Fenol poliamida	T, H, F
3	8.14	194, 213, 293, 317	249.0850	251.1308	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	249 (100)	251 (92) 234 (21) 163 (100) 72 (61)	N-caffeoyl putrescina (Isómero II)	Fenol poliamida	R, T, H, F
4	8.22	200, 221, 265, 295	-	-	-	-	-	Derivado de ácido vanílico	Ácido fenólico	F
5	8.56	197, 218, 278	315.0823	227.1421	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315 (100) 203 (54)	227 (18) 188 (100) 146 (91) 118 (28) 100 (17)	Ácido protocatechuico hexosido	Ácido fenólico	R, T, H, F
6	8.75	212, 299, 325	353.0936	-	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353 (100) 215 (13) 293 (19) 191 (82)	-	Ácido clorogénico	Ácido fenólico	H, F
7	8.89	196, 214, 270, 330	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	F
8	9.01	196, 220, 250, 295, 330	-	-	-	-	-	Derivado de ácido hidroxicinámico	Ácido fenólico	F
9	9.02	205, 270, 346	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	T,
10	9.09	209, 284	215.0827	217.1303	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	215 (100)	217 (47) 200 (95) 88 (100)	Lycoperdine 1	Terpenoide	T, H, F
11	9.10	196, 215, 270, 328	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	F
12	9.16	195, 284	-	-	-	-	-	Derivado de ácido hidroxicinámico o aminoácido	Ácido fenólico	T
13	9.25	205, 270, 297, 338	593.1991	595.2100	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593 (72) 431 (9) 302 (9) 177 (100)	595 (7) 471 (100) 144 (57) 100 (31)	Apigenina-6, 8-di-C-hexosido (Vicenin II)	Flavonoide	T, H, F
14	9.33	213, 270, 335	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	T
15	9.37	198, 217, 270, 329	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	F

Continuación de **Tabla 2.1**

16	9.55	195, 213, 312	329.0902	-	$C_{14}H_{18}O_9$	329 (55) 265 (62) 177 (100)	-	Ácido vanílico-4-β-D-glucósido	Ácido fenólico	H, F
17	9.61	213, 270, 335	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	T
18	9.62	212, 311	337.1141	-	$C_{16}H_{18}O_8$	337 (82) 191 (100)	-	Ácido cumarilquínico (Isómero I)	Ácido fenólico	H
19	9.72	208, 271, 338	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	T
20	9.79	213, 270, 333	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	T
21	9.88	272, 320	597.2781	-	$C_{27}H_{34}O_{15}$	387 (100) 597 (9)	-	Phloretin-5, 6-di-C-hexosido	Flavonoide	H
22	10.02	214, 271, 332	-	-	-	-	-	Derivado de apigenina	Flavonoide	T
23	10.05	199, 266, 337	563.1839	-	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563 (100) 439 (69)	-	Apigenina-7-O-(2-O-apiosil) hexosido (Isómero I)	Flavonoide	H
24	10.16	210, 306	337.1141	-	$C_{16}H_{18}O_8$	337 (100) 191 (89)	-	Ácido cumarilquínico (Isómero II)	Ácido fenólico	H
25	10.36	195	451.3783	-	$C_{30}H_{44}O_3$	451 (30)	453 (100) 435 (6) 213 (5)	Vebonol	Terpenoide	H
26	10.51	205, 254, 348	579.1603	581.1707	$C_{26}H_{28}O_{15}$	579 (100)	581 (100) 287 (18)	Luteolina-7-O-(2-O-apiosil) hexosido	Flavonoide	H
27	11.15	209, 252, 268, 346	-	-	-	-	-	Derivado de luteolina o chrysoeriol	Flavonoide	F
28	11.27	195, 218, 292, 309	-	-	-	-	-	Derivado de ácido hidroxicinámico	Ácido fenólico	R, T
29	11.89	194, 217, 290, 318	-	-	-	-	-	Derivado de ácido hidroxicinámico	Ácido fenólico	R, T
30	12.76	199, 266, 336	563.1839	565.1846	$C_{26}H_{28}O_{14}$	563 (100)	565 (100) 433 (9) 271 (29)	Apigenina-7-O-(2-O-apiosil) hexosido (Isómero II)	Flavonoide	H
31	12.80	209, 268, 346	621.2084	-	$C_{28}H_{29}O_{16}$	621 (19) 385 (100)	-	Derivado de luteolina o chrysoeriol	Flavonoide	H
32	13.25	206, 251, 266, 347	593.1651	595.2073	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593 (100)	595 (100) 387 (25) 301 (14)	Diosmetina-7-O-(2-O-apiosyl) hexosido	Flavonoide	H
33	13.50	206, 253, 348	665.1592	667.1755	$C_{26}H_{34}O_{20}$	621 (100) 665 (57)	667 (100)	Luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido	Flavonoide	H
34	15.81	198, 266, 344	635.1789	-	$C_{29}H_{32}O_{16}$	605 (100) 635 (63)	-	Chrysoeriol-7-O-(2-apiosil-6-acetil) hexosido	Flavonoide	H
35	16.97	208, 266, 336	649.1833	-	$C_{29}H_{30}O_{17}$	649 (13) 605 (100)	-	Apigenina-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido (Isómero I)	Flavonoide	H

Continuación de **Tabla 2.1**

36	17.84	208, 266, 336	649.1833	651.1900	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₇	649 (9) 635 (32) 605 (100)	651 (100)	Apigenina-7-O-(6-malonyl-apiosil) hexosido (Isómero II)	Flavonoide	H
37	17.87	214, 290, 308	-	-	-	-	-	Derivado de ácido hidroxicinámico	Ácido fenólico	R, T
38	18.66	210, 251, 266, 347	679.1975	681.1900	C ₂₃ H ₄₀ O ₂₀	679 (12) 635 (100)	681 (100)	Chysoeriol-7-O-(6 malonil-apiosil) hexosido	Flavonoide	H
39	19.55	214, 285, 317	-	-	-	-	-	Derivado de ácido hidroxicinámico	Ácido fenólico	R, T

^a F: Fruto; H: Hoja; T: Tallo; R: Raíz (las letras indican la presencia en el tejido correspondiente)

Tabla 2. 2. Compuestos fenólicos solubles (EPs) hidrolizados identificados en extractos de hoja de *Capsicum chinense* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (UPLC) con arreglo de fotiodios (PDA) y espectrometría de masas (MS)

Número	TR (min)	λ_{max} (nm)	Masa exacta experimental		Formula Molecular	Fragmentos (m/z)		Identificación Tentativa	Clasificación	Tejido ^a
			[M - H] ⁻	[M + H] ⁺		Ion negativo	Ion positivo			
1	6.53	194, 227, 284	-	-	-	-	109 (100) 81 (38) 127 (16) 174 (2) 194 (2)		Ácido fenólico	R, T, H
2	9.48	195, 218, 281	-	-	-	-	109 (100) 81 (35) 141 (8) 249 (2)		Ácido fenólico	R, T, H
3	15.15	207, 253, 347	447.1658	449.1168	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447 (100) 285 (90) 284 (80)	449 (100) 287 (61)	Luteolina-7-O-hexosido	Flavonoide	H
4	20.27	206, 266, 336	431.1199	433.1222	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431 (88) 268 (100)	433 (100) 271 (79)	Apigenina-7-O-hexosido	Flavonoide	H
5	24.88	205, 251, 265, 347	461.1377	463.1222	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461 (100) 297 (6) 283 (32) 255 (22)	463 (100) 453 (30) 301 (44)	Diosmetina-7-O-hexosida	Flavonoide	H
6	26.51	210, 252, 267, 347	285.061	287.0468	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285 (68) 133 (100)	287 (100)	Luteolina	Flavonoide	H
7	27.359	214, 267, 336	269.0797	271.0555	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269 (27) 117 (100)	271 (100) 246 (34)	Apigenina	Flavonoide	H, F
8	27.529	210, 247, 267, 346	299.0699	301.0551	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299 (100) 284 (49) 227 (46) 151 (30) 107 (35)	301 (100)	Chysoeriol	Flavonoide	H

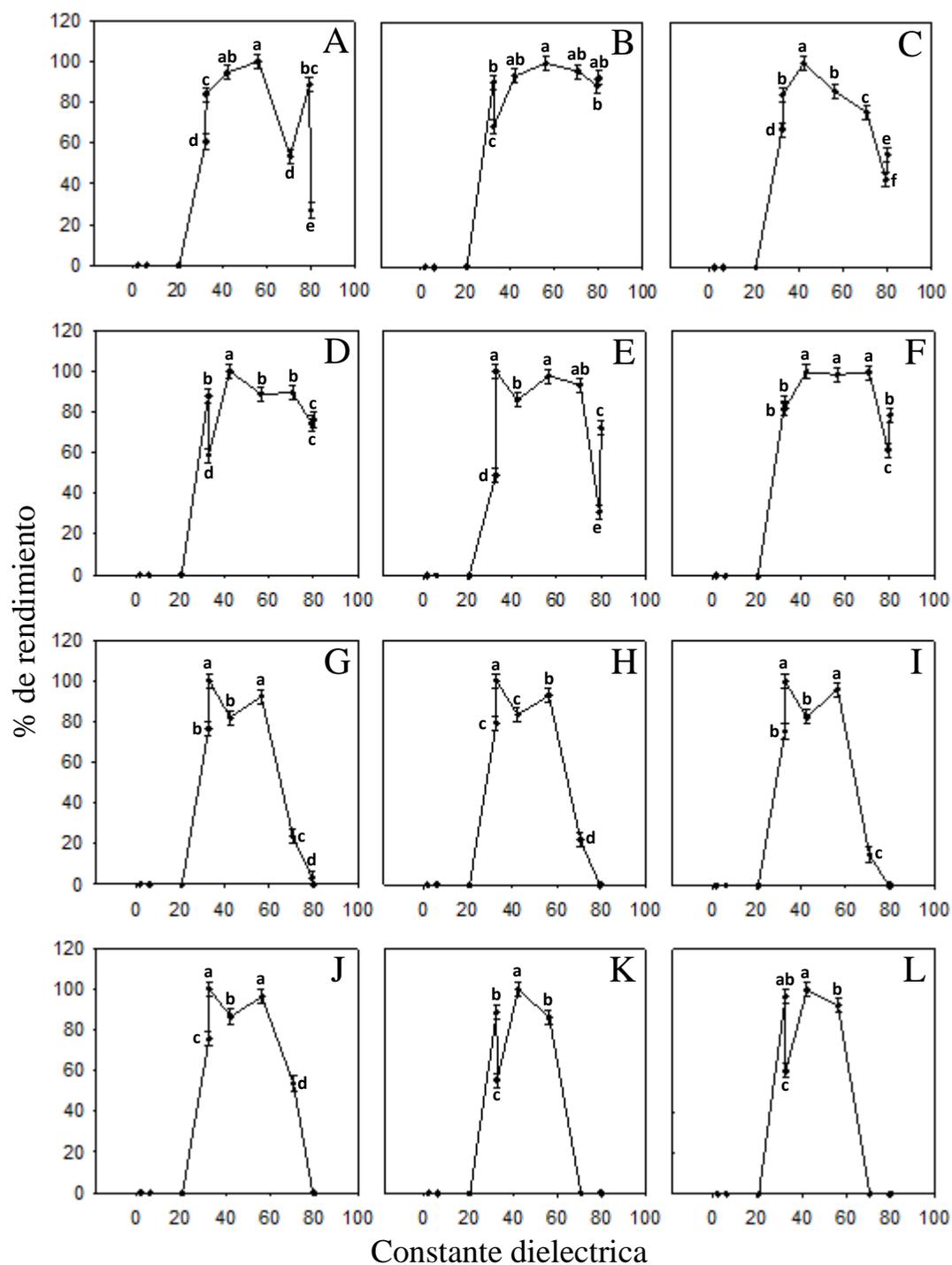
^a F: Fruto; H: Hoja; T: Tallo; R: Raíz (las letras indican la presencia en el tejido correspondiente)

2.3.2. Análisis del efecto de la polaridad del solvente sobre la extracción de los principales compuestos fenólicos solubles (EPs) en hojas identificadas en *Capsicum chinense*

El rendimiento de extracción de los principales compuestos fenólicos identificados tentativamente (N-cafeoyl putrescina (**A**), ácido clorogénico (**B**), ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -3-carbolina-3-carboxílico (lycoperodine 1; **C**), apigenina-6,8-di-C-hexosido (Vicenin II; **D**), ácido vanílico-4- β -O-glicósido (**E**), phloretin-5,6-di-C-hexosido (**F**), luteolina-7-O-(2-apiosil) hexosido (**G**), apigenina-7-O-(2-apiosil) hexosido (**H**), diosmetina-7-O-(2-apiosil) hexosido (**I**), luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido (**J**), apigenina-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido (**K**), chrysoeriol-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido (**L**) empleando solventes de extracción con diferentes valores de polaridad (de acuerdo a su constante dieléctrica (CD)) fueron graficados en **Figura 2.3**.

Los compuestos flavonoides (**G, H, I, J, K, L**) en general presentaron un bajo rendimiento de extracción empleando agua como solvente (CD: 80.10), y presentaron un mayor rendimiento a través del empleo de MeOH al 50% (**K, L**) y Ace al 80% (**G, H, I, J**) como solventes de extracción cuya constante dieléctrica corresponde a 56.40 y 32.80, mientras para N-cafeoyl putrescina (**A**) y ácido clorogénico (**B**) se observó un comportamiento similar al modelo de distribución gaussiana del apartado **1.3.3** propuesto para la extracción de compuestos fenólicos, en el cual el rendimiento de este compuesto se incrementa con el aumento de la constante dieléctrica del solvente hasta llegar a un punto máximo, correspondiente al empleo de MeOH al 50% y MeOH al 80% (CD: 42.40) respectivamente, seguido de un decremento de rendimiento de extracción. Estos resultados sugieren que en general los compuestos fenólicos presentan una mayor interacción con solventes de polaridad intermedia como MeOH al 50%, y también destaca la importancia de la selección del

solvente de extracción en el estudio de cambios metabólicos mediante técnicas analíticas como UPLC-PDA-ESI-MS. En el caso de N-cafeoyl putrescina el empleo de MeOH al 50% demuestra ser la mejor opción, en comparación con emplear MeOH o agua lo que equivale a un decremento del rendimiento de este compuesto de hasta un 40% y 70% respectivamente. En el caso de los flavonoides como luteolina-7-O-(2-apiosil) hexosido (**G**), apigenina-7-O-(2-apiosil) hexosido (**H**), diosmetina-7-O-(2-apiosil) hexosido (**I**), el empleo de MeOH al 20% significa un decremento del rendimiento de extracción de hasta un 80%, en comparación con emplear Ace al 80%. Para los flavonoides con un grupo malonil (**J**, **K**, **L**) en su estructura el empleo de MeOH al 20% equivale a un decremento del rendimiento de entre 10 a 40%, en comparación con emplear MeOH al 50%. En general se tienen los mayores rendimientos empleando solventes con una constante dielectrica entre 32.80 y 56.40, y de acuerdo con lo presentado en el apartado **1.3.3** y los resultados de la **Figura 1.3** la opción más adecuada es la extracción de compuestos fenólicos empleando MeOH al 50% como solvente de extracción (análisis estadístico presentado en **Anexo 6**).



*Letras diferentes sobre los puntos indican diferencias significativas

Figura 2. 2. Porcentaje de rendimiento de los principales compuestos identificados en *Capsicum chinense* Var. Chichen Itza (A: N-caffeoyl putrescina, B: Ácido clorogénico, C: Lycoperodine 1, D: Apigenina-6,8-di-C-hexosido, E: Ácido vanílico-4-β-O-glucósido, F: Phloretin-5,6-di-C-hexosido, G: Luteolina-7-O-(2-apiosil) hexosido, H: Apigenina-7-O-(2-apiosil) hexosido, I: Diosmetina-7-O-(2-apiosil) hexosido, J: Luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido, K: Apigenina-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido, L: Chrysoeriol-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido) vs constante dielectrica (CD) de los solventes de extracción.

2.3.3. Compuestos fenólicos no solubles (NEPs) identificados en *Capsicum chinense* mediante UPLC-PDA-ESI-MS

Los NEPs detectados e identificados, en extractos de raíz, tallo y hoja de *Capsicum chinense* se muestran en la **Tabla 2.4** y **Tabla 2.5**. Se observaron un total de 42 posibles NEPs en los cromatogramas de extractos de raíz, tallo y hoja empleando los diferentes tratamientos de extracción codificados como AA (**Figura 2.3**), AM (**Figura 2.4**), BA (**Figura 2.5**) y BM (**Figura 2.6**). El número de compuestos observados fue de 22 en raíz, 18 en tallo y 13 en hoja empleando el tratamiento AA, de 20 en raíz, 16 en tallo y 7 en hoja empleando el tratamiento AM, de 15 en raíz, 10 en tallo y 10 en hoja empleando el tratamiento BA, y de 14 en raíz, 11 en tallo y 13 en hoja empleando el tratamiento BM. A partir del análisis se determinó que en los extractos de raíz fueron observados 28 diferentes picos cromatográficos, de los cuales 23 fueron observados en los extractos obtenidos mediante extracción ácida (EA) y 17 en los extractos obtenidos mediante extracción alcalina (EB), en extractos de tallo se observaron 32 diferentes picos cromatográficos, de los cuales 28 se observaron en los extractos obtenidos mediante extracción ácida (EA) y 12 en los obtenidos por extracción alcalina (EB), mientras que en extractos de hoja se observaron 21 diferentes picos cromatográficos, de los cuales 15 se podían observar en los extractos obtenidos por extracción ácida (EA) y 13 en los extractos obtenidos mediante extracción alcalina (EB). En condiciones de extracción ácidas o alcalinas es posible liberar estos compuestos cuando están unidos a la pared celular por medio de enlaces covalentes de tipo éster o enlace glicosídicos respectivamente (Acosta-Estrada *et al.*, 2013), por lo cual, es posible sugerir el tipo de enlace involucrado en la unión de estos compuestos a las estructuras de la pared celular, de acuerdo con lo anterior, un mayor número de estos compuestos presentan enlaces de tipo glicosídicos en todos los tejidos de *C. chinense*.

El análisis estadístico de la **Tabla 2.5** (análisis estadístico en **Anexo 7**) muestra la distribución de todos los compuestos detectados (42) en los cromatogramas de los diferentes tejidos de *C. chinense* empleando los diferentes tratamientos de extracción. De acuerdo con esta información, un mayor número de estos compuestos (20) se encontraron distribuidos principalmente en la raíz y estadísticamente presentaron un mayor contenido en comparación al encontrado en otros tejidos, en tallo y en hoja, 16 y 9 de estos compuestos mostraron un mayor contenido estadísticamente significativo respectivamente. Los compuestos detectados e identificados se describen a continuación:

El compuesto **1** (TR = 1.43 min; λ_{\max} = ND) y **3** (TR = 1.88 min; λ_{\max} = ND) fueron detectados (290 nm) principalmente en extractos de hoja. Empleando BA y BM como solvente de extracción respectivamente se logró una mayor liberación de estos compuestos, lo que sugiere que se trata de compuestos no identificados unidos a alguna estructura de la pared celular mediante enlaces éster.

Los compuestos **7** (TR = 4.66 min; λ_{\max} = 283 nm), **11** (TR = 8.69 min; λ_{\max} = 280 nm), **12** (TR = 8.81 min; λ_{\max} = 278 nm), **17** (TR = 9.34 min; λ_{\max} = 277 nm), **18** (TR = 9.79 min; λ_{\max} = 279 nm), **22** (TR = 10.85 min; λ_{\max} = 215, 280 nm), **24** (TR = 12.06 min; λ_{\max} = 212, 309 nm), **25** (TR = 12.10 min; λ_{\max} = 212, 279, 312 nm), **27** (TR = 12.38 min; λ_{\max} = 212, 286 nm), **30** (TR = 12.97 min; λ_{\max} = 215, 296, 322 nm), **33** (TR = 13.91 min; λ_{\max} = 214, 278 nm), **35** (TR = 14.45 min; λ_{\max} = 213, 281 nm), **37** (TR = 15.33 min; λ_{\max} = 213, 276 nm), **39** (TR = 20.21 min; λ_{\max} = 212, 284, 320 nm) y **42** (TR = 24.21 min; λ_{\max} = 212, 260 nm) fueron detectados principalmente en extractos de raíz, mientras que los compuestos **3** (TR = 1.88 min; λ_{\max} = ND), **9** (TR = 8.33 min; λ_{\max} = 283 nm), **13** (TR = 8.97 min; λ_{\max} = 271 nm), **14** (TR = 8.99 min; λ_{\max} = 259 nm), **15** (TR = 9.20 min; λ_{\max} = 216, 279 nm), **20**

(TR = 9.96 min; λ_{\max} = 289 nm), **24** (TR = 12.06 min; λ_{\max} = 212, 309 nm), **27** (TR = 12.38 min; λ_{\max} = 212, 286 nm), **28** (TR = 12.69 min; λ_{\max} = 212, 312 nm), y **32** (TR = 13.13 min; λ_{\max} = 213, 280, 317 nm) fueron detectados en extractos de tallo (T), y los compuestos **2** (TR = 1.62 min; λ_{\max} = 217, 272 nm), **4** (TR = 2.27 min; λ_{\max} = 252, 270 nm), **5** (TR = 2.43 min; λ_{\max} = 217, 278 nm), **6** (TR = 4.34 min; λ_{\max} = 255, 275 nm), **8** (TR = 7.74 min; λ_{\max} = 253, 278 nm), **40** (TR = 23.12 min; λ_{\max} = 223, 278 nm) y **42** (TR = 24.21 min; λ_{\max} = 212, 260 nm) fueron identificados principalmente en extractos de hojas.

Algunos de estos compuestos presentaron una huella espectral similar a la de diversos ácidos fenólicos como el ácido cinámico, ácido cumárico (**2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 27, 33, 35, 37, 40, 42**), ácido cafeico, clorogénico y ferúlico (**10, 24, 25, 28, 30, 32, 39**). La mayor diversidad de estos compuestos fue liberada principalmente mediante extracción ácida (**4, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 22, 25, 27, 28, 31, 32, 33, 35, 39, 42**), lo cual sugiere que se tratan de diversos ácidos fenólicos unidos a las estructuras de la pared celular a través de enlaces glicosídicos. Por otro lado, algunos de estos ácidos fenólicos son liberados mediante extracción alcalina (**2, 5, 6, 7, 8, 13, 24, 30, 37, 40**), lo que sugiere su unión a las estructuras de la pared celular es a través de enlaces éster.

Algunos autores reportan que estos ácidos fenólicos se tratan predominantemente de derivados de ácido cumárico (λ_{\max} = 195, 215, 277 nm), ácido cafeico (λ_{\max} = 216, 326 nm) y ácido ferúlico (λ_{\max} = 216, 218, 322 nm) en especies como *Zea mays* (Santiago *et al.*, 2018; Cocuron *et al.*, 2019), *Lonicera japonica* y *Lonicera macranthoides* (Yu *et al.*, 2019), y *Oryza sativa* L. (Gupta y De, 2017), y también se han encontrado estos compuestos asociados a las estructuras de la pared celular en especies de Solanáceas como *Lycopersicon esculentum* Mill. (Mandal y Mitra, 2008, Mandal *et al.*, 2009), *Nicotiana tabacum* L. (Schnablová *et al.*,

2006) y *C. annuum* (Novo *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que estos compuestos son capaces de asociarse a diversos polisacáridos y proteínas de la pared celular primaria para formar diferentes complejos. Algunos de estos derivados como el ácido diferúlico, son capaces de unirse a la hemicelulosa (arabinosilanos) de la pared celular mediante esterificación con la arabinosa, y entrecruzarse con la lignina para formar estos complejos, cuya función es aumentar la fuerza mecánica, la formación de barreras como mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos, y la modulación de la permeabilidad en los tejidos vegetales (Iiyama *et al.*, 1994; Barros-Rios *et al.*, 2015). De acuerdo con Agati *et al.* (2012), en general, los ácidos hidroxicinámicos contribuyen a la formación de la pared celular a través de la esterificación con carbohidratos complejos, estos son sintetizados en el retículo endoplasmático, y posteriormente transportados en pequeñas vesículas para migrar hacia la pared celular después de fusionarse a la membrana plasmática.

Los compuestos **19** (TR = 9.79 min; λ_{max} = 212, 271, 335 nm), **26** (TR = 12.16 min; λ_{max} = 212, 270, 346 nm), **36** (TR = 14.77 min; λ_{max} = 212, 266, 336 nm) y **38** (TR = 15.43 min; λ_{max} = 212, 270, 348 nm) fueron identificados como derivados de apigenina de acuerdo con su huella espectral. Los resultados indican que estos flavonoides se localizan en el tallo (T) y son liberados mediante extracción ácida (AM), lo cual sugiere que se encuentran unidos a las estructuras de la pared celular a través de enlaces glicosídicos. La acumulación de estos flavonoides en la pared celular puede tratarse de un mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos en el sistema vascular de *C. chinense*, en este mecanismo se sugiere que los flavonoides son liberados y dirigidos al sitio de infección induciendo la reacción de hipersensibilidad (HR según sus siglas en inglés) y la muerte celular programada (PCD según sus siglas en inglés), estos se incorporan a las paredes celulares de las células necróticas y

adyacentes, a través de un proceso de oxidación que conduce al aumento del ácido indolacético (IAA según sus siglas en inglés), a su vez estos cambios en el equilibrio metabólico inducen la síntesis de etileno produciendo la muerte celular, la suberización y cierre del sistema vascular para prevenir la colonización del tejido por acción de un patógeno (Besseau *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2011; Petrusa *et al.*, 2013; Mierziak *et al.*, 2014). Estos compuestos flavonoides, pueden localizarse en la pared celular secundaria de las traqueidas y los elementos vasculares del xilema, y pueden contribuir en la resistencia o susceptibilidad de diversas especies de plantas frente al ataque de un patógeno. Se ha reportado que los flavonoides pueden unirse a diversos polisacáridos como celulosa, pectina y callosa de la pared secundaria y la laminilla media en el sistema vascular. Algunos autores proponen que la función de estos compuestos es la modificación de la estructura de la pared celular secundaria que permite desarrollar resistencia frente a un patógeno dificultando degradación de estas barreras físicas y, por otro lado, la obstrucción del sistema vascular que contribuye de manera negativa a la colonización de los tejidos vegetales, principalmente frente al ataque de patógenos vasculares (Dai *et al.*, 1996; Wallace y Fry, 1996; Beckman, 2000; Miedes *et al.*, 2014)

El compuesto **16** (TR = 9.33 min; λ_{\max} = 212, 318 nm) presente en raíz fue detectado con un ion molecular m/z 249 en modo ion positivo ($[M + H]^+$). Para este compuesto se detectaron los fragmentos m/z 227 ($[M + H - 22]^+$) y el fragmento m/z 209 ($[M + H - 40]^+$). Este compuesto es liberado empleando AM como solvente de extracción, lo que sugiere que se encuentra asociado a las estructuras de la pared celular a través de un enlace glicosídico.

El compuesto **21** (TR = 10.38 min; λ_{\max} = 215, 293, 323 nm) presenta un ion molecular de m/z 265 en modo ion positivo ($[M + H]^+$) y fue identificado como N-feruloyl putrescina. Se

identificaron los fragmentos m/z 249 ($[M + H - 16 (NH)]^+$) del cual se sugiere corresponde a la pérdida de un grupo amino de la cadena de putrescina, m/z 177 ($[M - H - 86$ (putrescina)]⁺), m/z 145 ($[M - 2H - 86$ (putrescina) - OMe (31)]⁺), y m/z 117 ($[M - 147]^+$). Este compuesto ha sido reportado en especies como *N. tabacum* (Torras-Claveria *et al.*, 2012), *S. tuberosum* (Serra *et al.*, 2015), y *O. sativa* (Dong *et al.*, 2015). La extracción de este compuesto se logra a través de hidrolisis alcalina, lo que sugiere que se encuentra unido a las estructuras de la pared celular mediante enlaces éster.

El compuesto **23** (TR = 11.20 min; λ_{max} = 217, 284 nm) fue identificado como un ácido hidroxicinámico con un ion molecular de m/z 257 en modo ion positivo ($[M + H]^+$). Para este compuesto fueron identificados los fragmentos m/z 100 ($[M + H - 157]^+$), y m/z 143 ($[M + H - 114]^+$). Los resultados muestran una mayor liberación de este compuesto mediante extracción ácida, lo que sugiere que se encuentra unido a las estructuras de la pared celular a través de enlaces glicosídicos.

El compuesto **29** (TR = 12.86 min; λ_{max} = 213, 281 nm) fue identificado como un derivado de ácido hidroxicinámico con un ion molecular de m/z 263 en modo ion positivo ($[M + H]^+$). Para este compuesto también fueron identificados los fragmentos m/z 147 ($[M + H - 116]^+$), m/z 224 ($[M + H - 39]^+$), m/z 124 ($[M + H - 139]^+$), m/z 233 ($[M + H - 30]^+$), y m/z 179 ($[M + H - 84]^+$). Los resultados muestran una mayor liberación mediante extracción ácida, lo que sugiere que se encuentra unido a las estructuras de la pared celular a través de enlaces glicosídicos.

El compuesto **34** (TR = 14.25 min; λ_{max} = 213, 315 nm) fue identificado tentativamente como una fenol poliamida derivado de ácido ferúlico de acuerdo con su huella espectral y el patrón fragmentación, con un ion molecular de m/z 277 en modo ion positivo ($[M + H]^+$). Para este

compuesto se detectaron los fragmentos m/z 177 ($[M + H - 100]^+$), m/z 145 ($[M + H - 132]^+$), m/z 117 ($[M + H - 160]^+$) característicos en derivados de ácido ferúlico. También se observaron los fragmentos m/z 249 ($[M + H - 28]^+$), m/z 227 ($[M + H - 50]^+$), m/z 265 ($[M + H - 12]^+$). Un mayor contenido de este compuesto es obtenido mediante extracción alcalina, por lo cual se sugiere que presenta su unión a la pared celular mediante enlaces éster.

El compuesto **41** (TR = 23.36 min; λ_{\max} = 212, 286, 320 nm) fue identificado como N-feruloyl tiramina, con un ion molecular de m/z 314 en modo ion positivo ($[M + H]^+$). Se identificaron los fragmentos m/z 277 ($[M + H - 37]^+$), m/z 177 ($[M + H - 137$ (tiramina)] $^+$), m/z 145 ($[M + 2H - 31$ (H_3CO) $- 137$ (tiramina)] $^+$), m/z 117 ($[M + 2H - 31$ (H_3CO) $- 137$ (tiramina) $- 28$ (CO)] $^+$), m/z 209 ($[M + H - 105]^+$), 227 ($[M + H - 87]^+$), 277 ($[M + H - 37]^+$) (**Anexo 5**). Este compuesto ha sido encontrado en *C. annuum* (Yoshihara *et al.*, 1981; Novo *et al.*, 2017) y *L. esculentum* (Campos *et al.*, 2014). La extracción de este compuesto se logra a través de hidrolisis alcalina, lo que sugiere que se encuentra unido a las estructuras de la pared celular mediante enlaces éster. De acuerdo con Bassard *et al.* (2010) una cantidad importante de poliamidas como feruloyl putrescina y feruloyl tiramina pueden encontrarse asociadas a la pared celular en raíces, se ha reportado que esta última se encuentra unida a la pared celular mediante enlaces éter.

Tabla 2. 3. Compuestos fenólicos identificados en extractos de raíz, tallo y hoja de *Capsicum chinense* var. Chichen Itzá mediante UPLC-PDA. Se muestra el λ_{\max} de la huella espectral (210 a 400 nm) para cada compuesto, los tratamientos con los que son extraíbles (AM, BM, AA, BA) y su distribución en los tejidos en plántulas de chile habanero

Número	TR (min)	λ_{\max} (nm)	Identificación Tentativa	Clasificación	Tratamiento ^a	Tejido ^a
1	1.43	ND	Desconocido	Ácido fenólico	AM, BM, AA, BA	R, T, H
2	1.62	217, 272	Derivado de ácido Hidroxicinámico	Ácido fenólico	AM, BM, AA, BA	R, T, H
3	1.88	ND	Desconocido	Ácido fenólico	BM	T, H
4	2.27	252, 270	Derivado de ácido Hidroxicinámico	Ácido fenólico	AM, BM, AA, BA	R, T, H
5	2.43	217, 278	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, BM, AA	R, T, H
6	4.34	255, 275	Desconocido	Ácido fenólico	BM, AA, BA	R, T, H
7	4.66	283	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, AA, BA	R
8	7.74	253, 278	Desconocido	Ácido fenólico	BM, BA	R, H
9	8.33	283	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, AA	R, T, H
10	8.66	212, 292, 317	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	Ácido fenólico	AM	T, H
11	8.69	280	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AA	R
12	8.81	278	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, AA, BA	R, T, H
13	8.97	271	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	BM	T, H
14	8.99	259	Desconocido	Ácido fenólico	AM	T
15	9.20	216, 279	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM	T
17	9.34	277	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AA	R
18	9.79	279	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, AA	R, T
19	9.79	212, 271, 335	Derivado de apigenina	Flavonoide	AM	T
20	9.96	286	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AA	T
22	10.85	215, 280	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, AA	R, T, H
24	12.06	212, 309	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	Ácido fenólico	BM, BA	R, T, H
25	12.10	212, 279, 312	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	Ácido fenólico	AM, AA	R, T, H
26	12.16	212, 270, 346	Derivado de apigenina	Flavonoide	AM	T
27	12.38	212, 286	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AA	R, T, H
28	12.69	212, 312	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	Ácido fenólico	AM	T
30	12.97	215, 296, 322	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	Ácido fenólico	AM, BM, AA, BA	R, T, H
31	12.98	ND	Desconocido	Ácido fenólico	AM	T
32	13.13	213, 280, 317	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	Ácido fenólico	AM	T
33	13.91	214, 278	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, AA	R

Continuación de **Tabla 2.3**

35	14.45	213, 281	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, AA	R
36	14.77	212, 266, 336	Derivado de apigenina	Flavonoide	AM	T
37	15.33	213, 276	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, BM, AA, BA	R
38	15.43	212, 270, 348	Derivado de apigenina	Flavonoide	AM	T
39	20.21	212, 284, 320	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	Ácido fenólico	AM, AA	R, T
40	23.12	223, 278	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, BM, AA, BA	R, T, H
42	24.21	212, 260	Desconocido	Ácido fenólico	AM, AA	R, T, H

^a Tratamiento: **AM:** HCl 2N/Metanol, **BM:** NaOH 2N/Metanol al 80%, **AA:** HCl 2N, **BA:** NaOH 2N

^b Tejido: **R:** Raíz, **T:** Tallo, **H:** Hoja

Tabla 2. 4. Compuestos fenólicos identificados en extractos de raíz, tallo y hoja de *Capsicum chinense* var. Chichen Itzá mediante UPLC-PDA-ESI-MS. Se muestra el λ_{max} de la huella espectral (210 a 400 nm), los fragmentos obtenidos mediante espectrometría de masas para cada compuesto, los tratamientos con los que son extraíbles (AM, BM, AA, BA) y su distribución en los tejidos en plántulas de chile habanero

Número	TR (min)	λ_{max} (nm)	Masa exacta experimental	Formula Molecular	Fragmentos (m/z)	Identificación Tentativa	Clasificación	Tratamiento ^a	Tejido ^b
16	9.33	212, 318	249.1480	-	100 (100) 227 (70) 249 (62) 209 (48)	-	Fenol poliamida	BM	R
21	10.38	215, 293, 323	264.1408	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	177 (100) 145 (59) 117 (35) 249 (5) 265 (2)	N-feruloyl putrescina	Fenol poliamida	BM, BA	R, T
23	11.20	217, 284	257.0465	-	257 (100) 100 (10) 143 (5)	Derivado de ácido cumárico	Ácido fenólico	AM, BM, AA	R, T, H
29	12.86	213, 281	-	-	147 (100) 224 (58) 124 (34) 233 (24) 263 (10) 179 (10)	Derivado de ácido hidroxicinámico	Ácido fenólico	AM, AA	R, T
34	14.25	213, 315	-	-	177 (100) 145 (59) 117 (50) 249 (20) 227 (19) 265 (5) 277 (5)	Derivado de ácido ferúlico	Fenol poliamida	BM, BA	R, H
41	23.36	212, 286, 320	314.1342	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	177 (100) 145 (59) 117 (48) 209 (19) 227 (19) 277 (18) 309 (10) 314 (5)	N-feruloyl tiramida	Fenol poliamida	AM, BM, AA, BA	R, T, H

^aTratamiento: **AM:** HCl 2N/Metanol, **BM:** NaOH 2N/Metanol al 80%, **AA:** HCl 2N, **BA:** NaOH 2N

^bTejido: **R:** Raíz, **T:** Tallo, **H:** Hoja

Tabla 2. 5. Área integrada de los compuestos fenólicos no solubles (NEPs) detectados e identificados en los cromatogramas de extractos de raíz, tallo y hoja de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá obtenidos mediante UPLC-PDA. Se muestra el área integrada ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) de los cromatogramas obtenidos con una señal analítica de 290 nm (comparación de medias mediante método de Tukey). EA: extracción ácida, EB: extracción alcalina; SA: solvente acuoso, SO: solventes orgánico; AA: HCl 2N, AM: HCl 2N/MeOH, BA: NaOH 2N, BM: NaOH 2N/MeOH al 80% (condiciones de extracción establecidas en el apartado 1.2.5.2).

Compuesto	Raíz				Tallo				Hoja			
	EA		EB		EA		EB		EA		EB	
	SA	SO	SA	SO	SA	SO	SA	SO	SA	SO	SA	SO
	AA	AM	BA	BM	AA	AM	BA	BM	AA	AM	BA	BM
1	53 ^e	222 ^{abc}	210 ^{abcd}	60 ^{de}	138 ^{bcde}	ND	241 ^{ab}	82 ^{cde}	96 ^{bcde}	90 ^{bcde}	313 ^a	68 ^{cde}
2	67 ^g	374 ^{de}	131 ^{fg}	402 ^{de}	262 ^{ef}	577 ^{bc}	167 ^{fg}	406 ^{cde}	473 ^{cd}	745 ^{ab}	167 ^{fg}	848 ^a
3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	273 ^a	ND	ND	ND	265 ^a
4	490 ^b	178 ^d	120 ^{def}	55 ^f	216 ^{cd}	44 ^f	61 ^{ef}	51 ^f	159 ^{de}	646 ^a	295 ^c	117 ^{def}
5	95 ^b	61 ^b	99 ^b	43 ^b	51 ^b	25 ^b	36 ^b	107 ^b	ND	141 ^{ab}	255 ^a	152 ^{ab}
6	ND	ND	92 ^{bc}	105 ^b	6 ^{ef}	ND	33 ^{def}	50 ^{cde}	5 ^{ef}	ND	199 ^a	77 ^{bcd}
7	33 ^b	25 ^b	125 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	ND	ND	94 ^b	23 ^c	ND	ND	ND	ND	ND	ND	173 ^a	78 ^b
9	260 ^b	114 ^c	ND	ND	432 ^a	72 ^{cd}	ND	ND	44 ^d	217 ^b	ND	ND
10	ND	ND	ND	ND	ND	187 ^a	ND	ND	ND	160 ^b	ND	ND
11	284 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	628 ^a	615 ^a	72 ^c	ND	433 ^b	117 ^c	ND	ND	166 ^c	ND	ND	ND
13	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	155 ^a	ND	ND	ND	59 ^b
14	ND	ND	ND	ND	ND	114 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	ND	ND	97 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	113 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	297 ^a	ND	96 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	139 ^a	ND	ND	76 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	ND	ND	ND	ND	ND	99 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	ND	ND	ND	ND	41 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	ND	ND	ND	51 ^a	ND	ND	37 ^b	ND	ND	ND	ND	ND
22	121 ^b	240 ^a	ND	ND	85 ^{ab}	ND	ND	ND	65 ^b	ND	ND	ND
23	439 ^a	534 ^a	97 ^{bc}	182 ^b	47 ^c	ND	18 ^c	45 ^c	31 ^c	ND	13 ^c	51 ^c
24	ND	ND	197 ^b	464 ^a	ND	ND	236 ^b	377 ^a	ND	ND	57 ^c	155 ^{bc}
25	100 ^b	154 ^a	ND	ND	47 ^c	ND	ND	ND	27 ^c	ND	ND	ND
26	ND	ND	ND	ND	ND	52 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	41 ^a	ND	ND	ND	42 ^a	ND	ND	ND	14 ^b	ND	ND	ND
28	ND	ND	ND	ND	ND	40 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	20 ^b	93 ^a	ND	ND	16 ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	23 ^e	63 ^{de}	189 ^{bc}	773 ^a	ND	ND	126 ^{cd}	209 ^b	ND	ND	4 ^e	142 ^{bcd}
31	ND	ND	ND	ND	ND	17 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
32	ND	ND	ND	ND	ND	11 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33	10 ^b	106 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34	ND	ND	49 ^b	213 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32 ^c
35	13 ^b	33 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	ND	ND	ND	ND	ND	81 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
37	3 ^c	20 ^b	19 ^b	61 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
38	ND	ND	ND	ND	ND	83 ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND
39	17 ^b	37 ^a	ND	ND	32	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
40	411 ^f	1,682 ^c	ND	ND	362 ^f	759 ^e	1,063 ^d	2236 ^b	1,251 ^d	559 ^{ef}	1,265 ^d	4,720 ^a
41	36 ^d	295 ^b	288 ^b	429 ^a	74 ^c	ND	ND	ND	161 ^c	ND	ND	ND
42	ND	256 ^a	ND	ND	16 ^b	ND	ND	ND	271 ^a	ND	ND	ND

*Letras diferentes indican diferencias significativas por cada compuestos evaluad

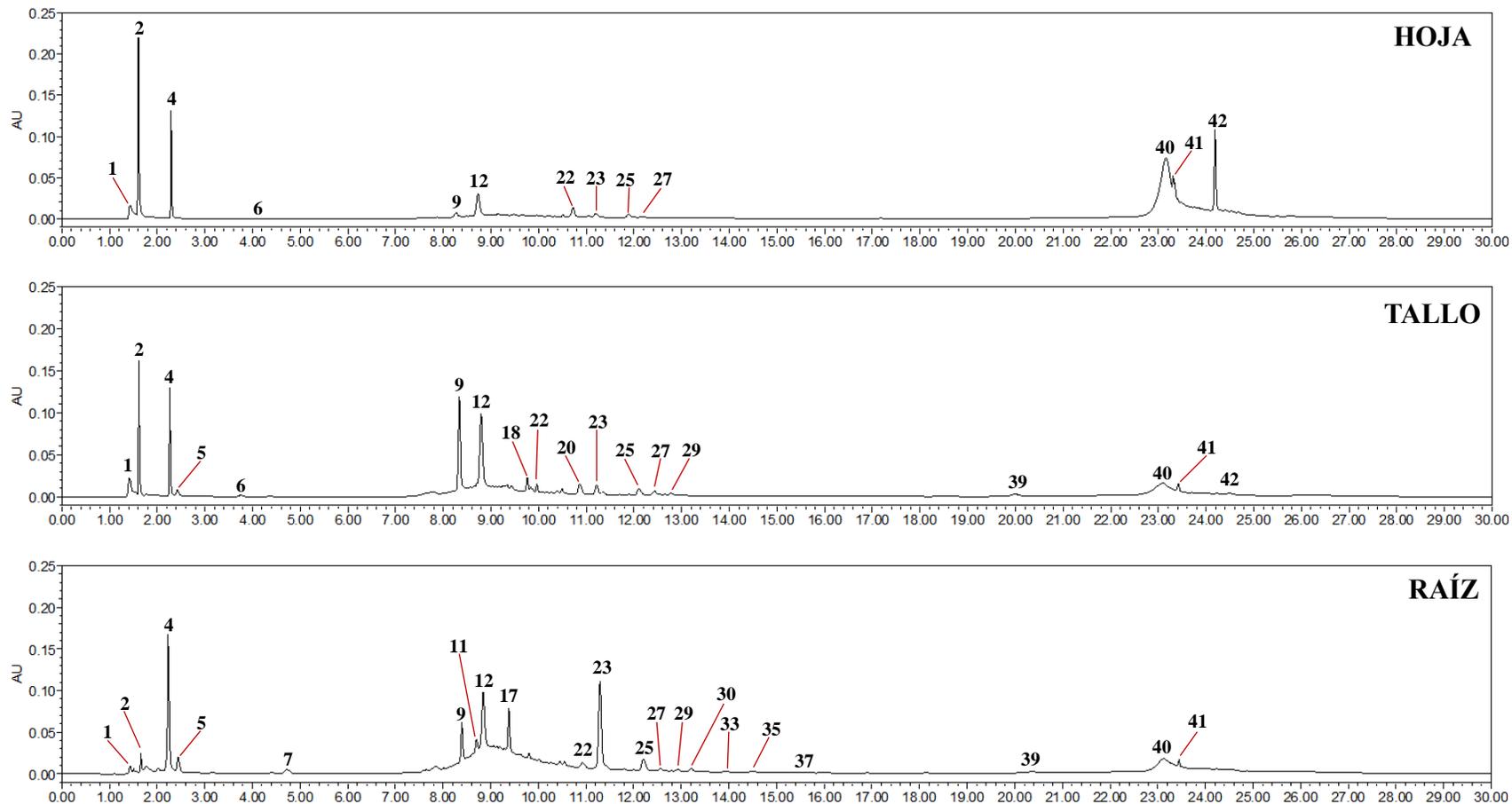


Figura 2. 3. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (20 compuestos), tallo (16 compuestos) y hoja (7 compuestos) de *Capsicum chinense* obtenidos mediante extracción acida (EA) con solvente orgánico (SO). Código de tratamiento: AM. Señal analítica tomada a 290 nm.

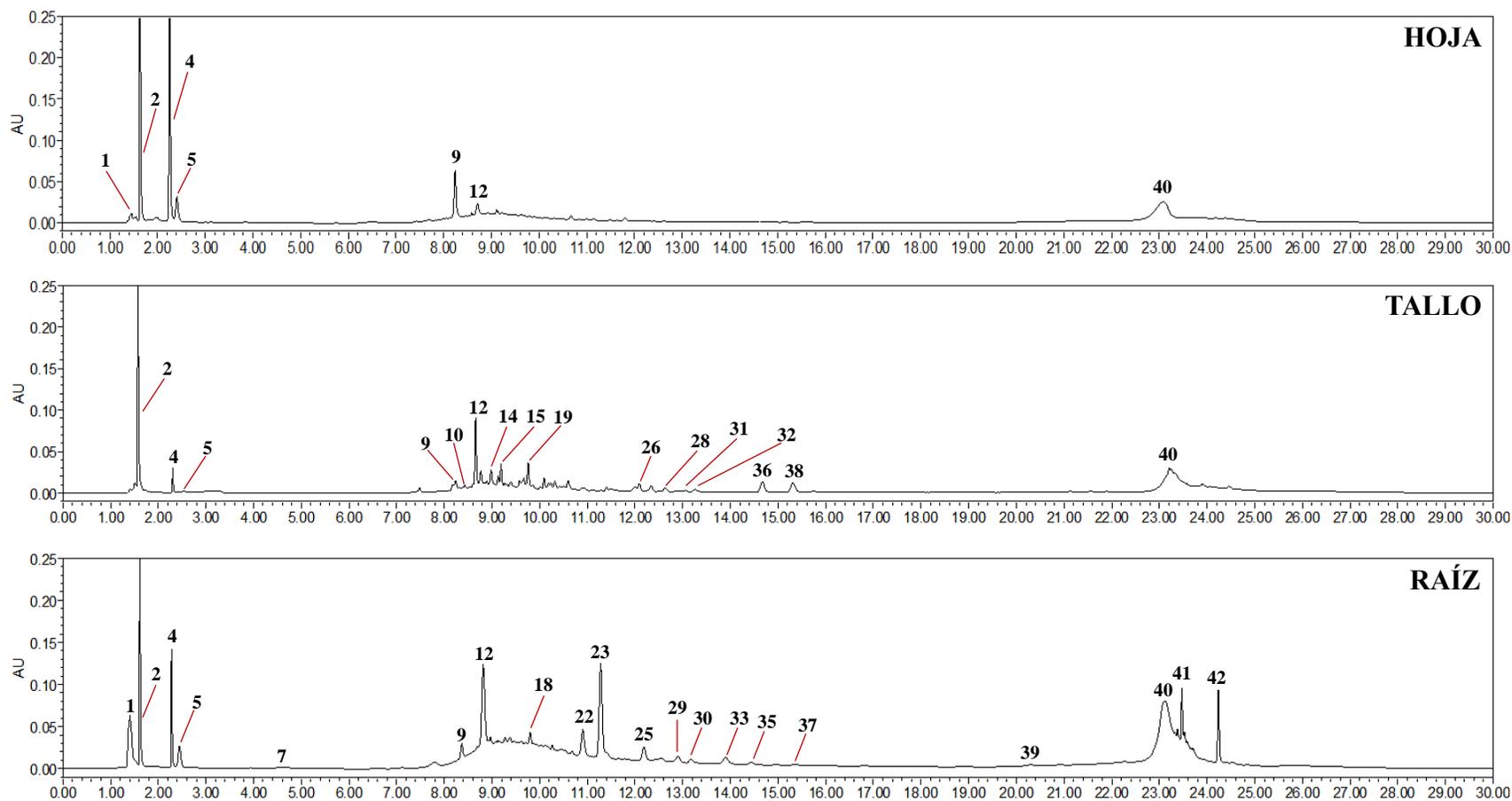


Figura 2. 4. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (20 compuestos), tallo (16 compuestos) y hoja (7 compuestos) de *Capsicum chinense* obtenidos mediante extracción acida (EA) con solvente orgánico (SO). Código de tratamiento: AM. Señal analítica tomada a 290 nm.

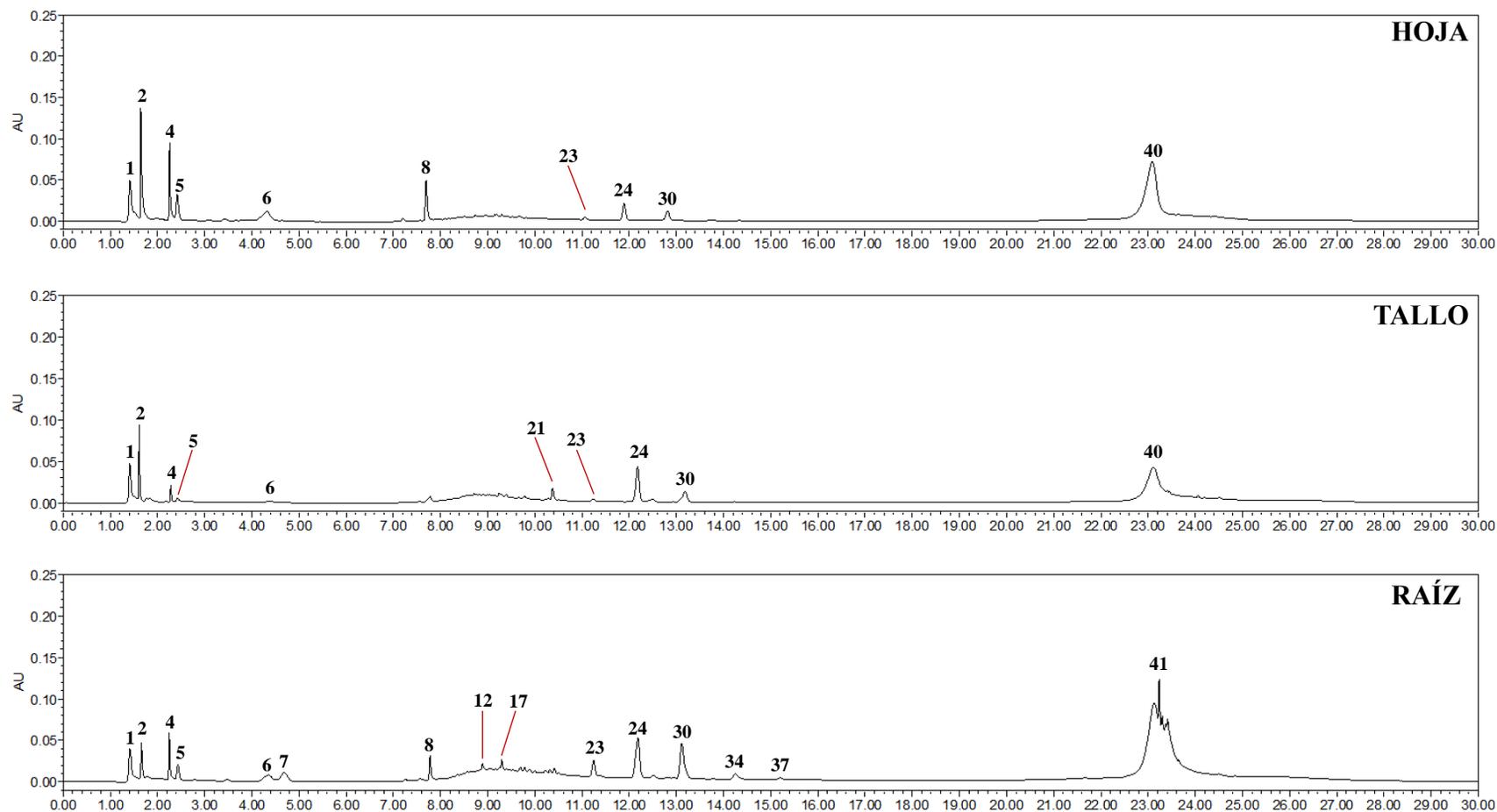


Figura 2. 5. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (15 compuestos), tallo (10 compuestos) y hoja (10 compuestos) de *Capsicum chinense* obtenidos mediante extracción alcalina (EB) con solvente acuoso (SA). Código de tratamiento: BA. Señal analítica tomada a 290 nm.

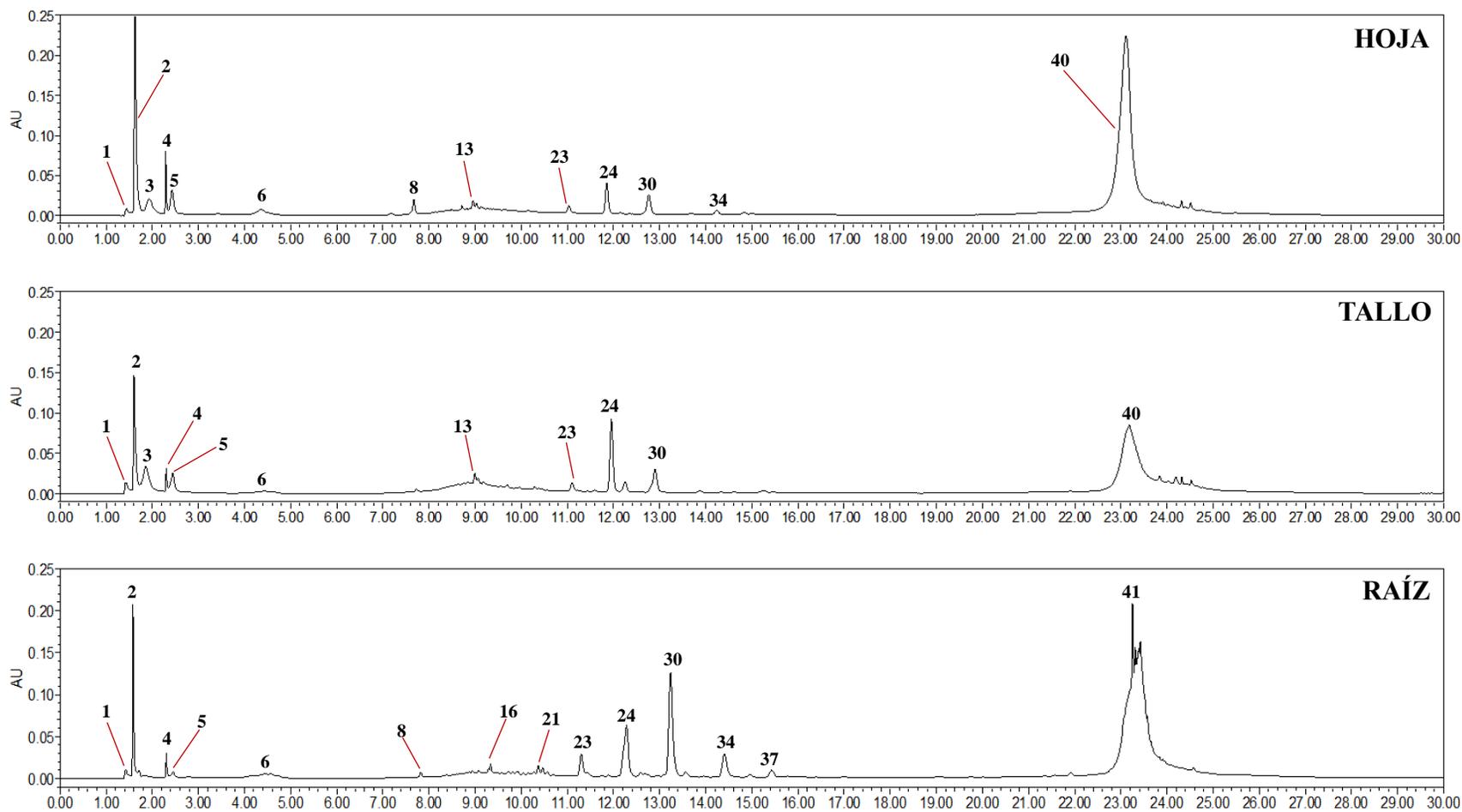


Figura 2. 6. Perfil cromatográfico obtenidos mediante UPLC-PDA a partir de extractos de raíz (14 compuestos), tallo (11 compuestos) y hoja (13 compuestos) de *Capsicum chinense* obtenidos mediante extracción alcalina (EB) con solvente orgánico (SO). Código de tratamiento: BM. Señal analítica tomada a 290 nm.

2.4.CONCLUSIONES

Mediante UPLC-PDA-ESI-MS se logró la detección de 39 compuestos distribuidos en los diferentes tejidos (raíz, tallo, hoja y fruto) de *C. chinense*. De acuerdo con su contenido, estos compuestos se encuentran distribuidos de manera importante en hojas y frutos. Los principales EPs identificados fueron N-caffeoyl putrescina, ácido clorogénico, derivados glicosilados de luteolina, apigenina, diosmetina y chrysoeriol. Se observó la influencia de la constante dieléctrica de los solventes sobre la eficiencia de extracción de los principales EPs identificados, siendo la opción más adecuada para su extracción el uso de MeOH al 50%.

En los extractos de NEPs de los diferentes tejidos de plántulas (raíz, tallo, y hoja), y empleando los diferentes tratamientos de extracción (AA, AM, BA, BM) se detectaron 42 compuestos. Se determinó que 20 de estos compuestos se encuentran principalmente en raíz, 16 en tallo, y 9 en hojas. Las huellas espectrales de los NEP indican que se tratan generalmente de derivados de ácidos hidroxicinámicos unidos a enlaces glicosídicos y/o éster y en algunos casos flavonoides como derivados de apigenina unidos a enlaces glicosídicos a las estructuras de la pared celular. En raíces, se observó la presencia de derivados de ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido clorogénico, además, se identificaron dos compuestos fenol poliamidas, N-feruloyl putrescina y N-feruloyl tiramina.

CAPITULO 3:

**Análisis del cambio en el contenido y perfil de
compuestos fenólicos en *Capsicum chinense* frente a la
interacción con *Pythium ultimum***

3.1.INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense*) el cual es de gran importancia en la región de la península de Yucatán (Gutiérrez-Gómez *et al.*, 2018), al igual que otros cultivos comerciales es susceptible a ser afectado por condiciones de estrés biótico y abiótico en interacción con el medio ambiente. Durante su crecimiento y desarrollo las plantas son susceptibles al ataque de diversos patógenos presentes en la rizosfera que son capaces de afectar la productividad y la calidad de cultivos comerciales como el chile habanero (Verna y Shukla, 2015; Madani *et al.*, 2019).

Diversos trabajos publicados describen la interacción entre oomicetos con variedades de *Capsicum annum*, debido a su impacto económico en el manejo agrícola de cultivos de chile (Yücel, 1995; Kim *et al.*, 1997; Harris, 1999; Chatterton *et al.*, 2004; Ueeda *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Chellemi, 2006; Gilardi *et al.*, 2013; Serrano-Pérez *et al.*, 2017). *Pythium ultimum* es considerado uno de los oomicetos más importantes en la patología de plantas por su capacidad para producir infección en más de 300 especies. Es un habitante común en el campo y se encuentra distribuido en diferentes partes del mundo. Además *P. ultimum* es capaz de crecer saprotróficamente en el suelo, y sus micelios y oosporas pueden infectar semillas y raíces, lo que produce el marchitamiento, bajos niveles de rendimiento, y una alta mortalidad en cultivos (Kamoun *et al.*, 2015).

En relación, al efecto de la interacción de *C. chinense* con el oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*, las plantas son capaces de producir diversos metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, que se encuentran involucrados en diversas funciones biológicas con gran significancia en los procesos de adaptación y participación en el mecanismo de defensa

frente a la ataque de patógenos (Badri y Vivanco, 2009; Agati *et al.*, 2012; Verna y Shukla, 2015; León-Chan *et al.*, 2017; Jean-Christophe *et al.*, 2019).

Algunos trabajos han descrito la significancia de los cambios observados en el contenido de EPs y NEPs en plántulas de *C. annuum* durante la infección producida por *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum* (Gayoso *et al.*, 2004; Woo-Jin *et al.*, 2004; Hu-Zhe *et al.*, 2005; Owen-Going *et al.*, 2008; Novo *et al.*, 2017), sin embargo, estos estudios no son exhaustivos, por lo que no describen los principales cambios en el perfil de compuestos fenólicos. Por otro lado, en *C. annuum* solo se ha estudiado la acumulación de compuestos fenólicos durante la infección producida por patógenos como *C. gloeosporioides* y *C. coccodes* en frutos (Park *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013; Jayawardana *et al.*, 2016). Al respecto, se han caracterizado los cambios en el perfil de compuestos fenólicos cuando el sitio localizado de la infección se desarrolla en los frutos, pero no existe información respecto a la respuesta sistemática en frutos cuando la infección es producida en otros tejidos.

La realización de estos trabajos ha permitido caracterizar los cambios en la acumulación de compuestos fenólicos y su significancia en el mecanismo de defensa empleando por el género *Capsicum* frente a la interacción con diversos patógenos, sin embargo, no existe un enfoque específico hacia la respuesta de *C. chinense*. Por otro lado, no existen estudios que evalúen la acumulación de compuestos fenólicos en frutos como parte de una respuesta sistemática cuando la infección es producida en las raíz. Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo es proponer un modelo del mecanismo de defensa relacionado con la función de los EPs y NEPs inducidos de forma local y sistemática en *C. chinense* frente a la infección

producida por *P. ultimum* en raíz, a través de la determinación del cambio en el contenido de EPs y NEPs, y su perfil mediante UPLC-PDA-ESI-MS.

3.2.MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Reactivos químicos

Los reactivos químicos empleados fueron ácido fórmico ($\geq 95.0\%$), acetonitrilo ($\geq 99.90\%$), etanol ($\geq 96.0\%$), Folin – Ciocalteu (2N), ácido gálico monohidratado ($\geq 98.0\%$), agar de papa y dextrosa (PDA) y, medio Murashige y Skoog (MS) fueron adquiridos de SIGMA – Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU); carbonato de sodio (Na_2CO_3), metanol ($\geq 99.90\%$) e hidróxido de sodio (NaOH) adquiridos en Avantor J. T. Baker; e hipoclorito de sodio comercial. El agua ultrapura fue obtenida de un sistema de filtración Milli – Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).

3.2.2. Material vegetal y oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*

Las plántulas de *Capsicum chinense* Var. Chichen Itzá con 45 días postgerminación fueron adquiridas de un productor local en la comunidad de Muna, Yucatán, México (Septiembre, 2018).

Los frutos de chile habanero (*C. chinense* Var. Chichen Itzá) obtenidos de plantas infectadas y no infectadas con zoosporas de *P. ultimum* fueron adquiridos en un invernadero experimental de CIATEJ, A. C., Unidad sureste (Noviembre, 2018). Para su análisis, el pretratamiento de los frutos de chile habanero se realizó de acuerdo con lo establecido en el apartado **1.2.3**.

El oomiceto fitopatógeno *P. ultimum* (P233.08) fue adquirido a partir de la colección Silva Tarouca Research Institute for Landscape and Ornamental Gardening (Department of Biological Risks, Republica Checa, Brno).

3.2.3. Preparación de plántulas de *C. chinense*

Las plántulas de *C. chinense* fueron lavadas con agua destilada para eliminar el sustrato de las raíces, después fueron lavadas con EtOH al 20% durante 5 min, posteriormente con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 5 min, y para finalizar el exceso de este último fue retirado con agua destilada. Las plántulas desinfectadas fueron colocadas en una bandeja de 96 celdas (8 x 12) sobre un recipiente de plástico (área de 40 x 22 cm y 15 cm de profundidad) sanitizado con EtOH al 70% en el que fueron colocados 2.5 L de medio Murashige y Skoog (2.15 g/L) al cual se le adicionó 200 mg/L de ampicilina, y adaptó un sistema de aireación a través de una bomba de aire (Hagen, Elite 799, España). El acondicionamiento de las plántulas se realizó en un cuarto con luz natural regulado a 22°C durante un periodo de 120 h.

3.2.4. Preparación de medio e inóculo de *P. ultimum*

Para la preparación del PDA se suspendieron 39 g/L de agua destilada (B. Medina, Yucatán, México), mediante agitación magnética, posteriormente, el medio se calentó a 60°C para homogenizar la mezcla, en seguida, el medio de cultivo luego fue esterilizado en autoclave vertical automático (Ecoshel, CVQ-B35L, México) a 121°C (15 lb/pulg²) durante 15 min. Posteriormente, un volumen de entre 10 a 20 mL de medio fue vertido en placas para agar (10 cm de diámetro), el procedimiento fue realizado dentro de una campana de flujo laminar horizontal (LABCONCO, EE. UU.). Tras la gelificación del medio las placas se resguardaron en una incubadora (Ecoshel, Mod. 9082, México) durante 48 h a 36°C. Después, las placas de agar se resguardaron en refrigeración a 4°C. Finalmente, las placas con agar fueron inoculadas con micelio de *P. ultimum*, y posteriormente fueron incubadas por 120 h a 22°C.

3.2.5. Preparación del sistema para la interacción de plántulas de *C. chinense* con *P. ultimum*

Para la evaluación del efecto de la interacción de *Pythium ultimum* sobre el contenido y perfil de compuestos fenólicos en plántulas de *C. chinense* se asignaron dos tratamientos. El primero de plántulas (no infectadas) y el otro de plántulas inoculadas (infectadas) con *P. ultimum* sobre medio PDA. Para esto se esterilizaron vasos de precipitado de 1 L, medio de cultivo MS (2.15 g/L), y agua destilada (B. Medina, Yucatán, México) en un esterilizador vertical automático (Ecoshel, CVQ-B35L, México) a 121°C (15 lb/pulg²) durante 15 min. El material fue colocado en una campana de flujo laminar horizontal (LABCONCO, EE. UU.), donde cuidadosamente se introdujeron placas de PDA (10 cm de diámetro por 0.5 cm de grosor) sin inocular o inoculado con *P. ultimum* (120 h de cultivo). Después se vertieron 150 mL de medio MS. Por último, se colocaron los tratamientos (plántulas inoculadas y sin inocular) dentro de una campana de flujo laminar en contacto con luz natural a 25°C por un periodo de 72 h (**Figura 3.1**). Al finalizar, el material vegetal fue retirado de los cilindros y preparado para sus análisis de acuerdo con el apartado **1.2.3** descrito en el primer capítulo.

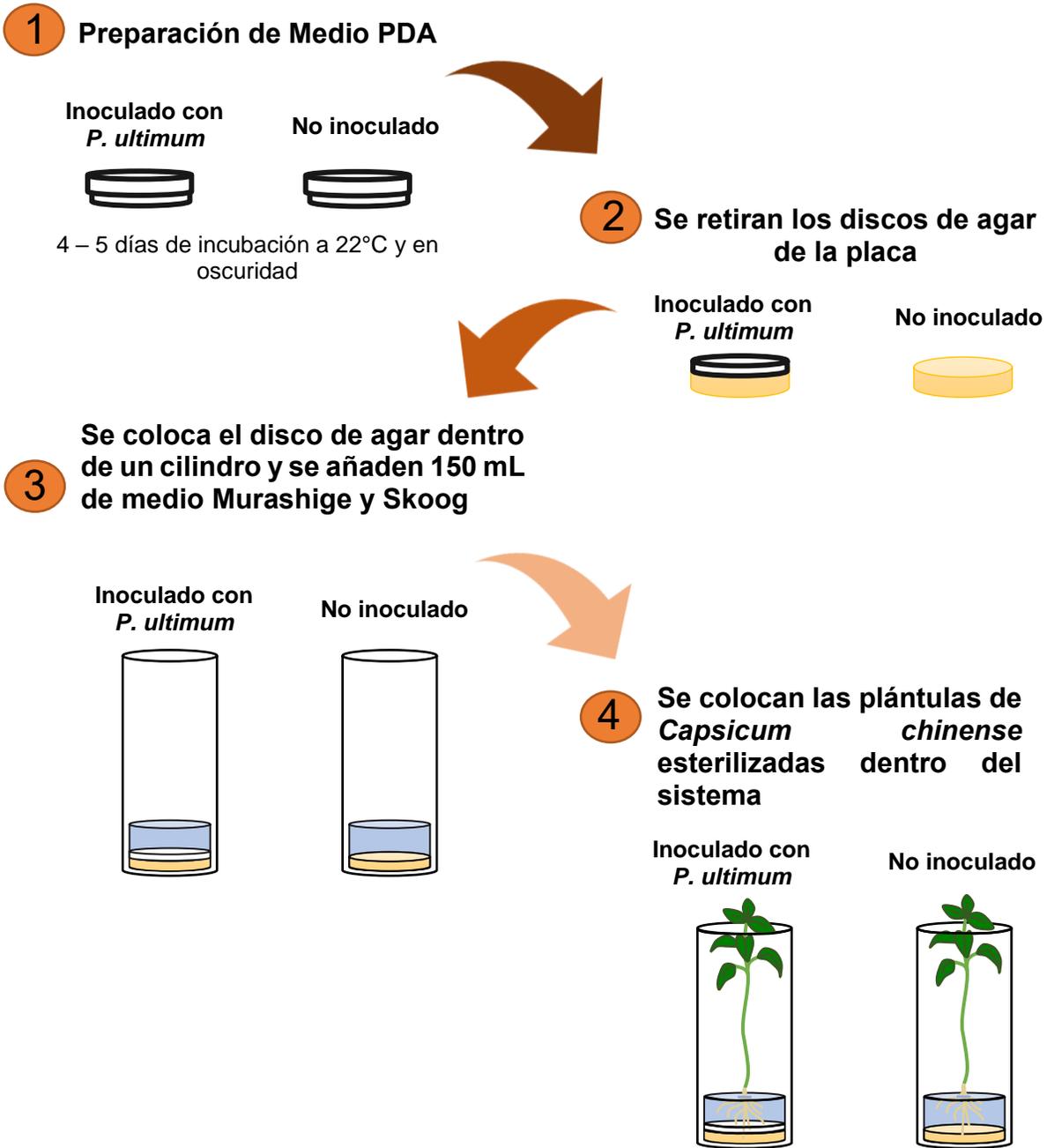


Figura 3. 1. Preparación del sistema de infección de raíces de *Capsicum chinense* con *P. ultimum*

3.2.6. Extracción de EPs y NEPs

Los EPs presentes en polvos liofilizados de raíz, tallo, hoja y fruto fueron extraídos empleando MeOH al 50% como solvente de extracción, de acuerdo con la metodología de EC descrita en el apartado **1.2.5**, mientras que la extracción de los NEPs fue empleado el tratamiento de extracción alcalina (BM: NaOH 2N/MeOH al 80%) de acuerdo con el apartado **1.2.7** descrito en el primer capítulo.

3.2.7. Determinación de CFT y análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS

Se determinó el CFT y se realizó el análisis cromatográfico de los extractos de EPs y NEPs de raíz, tallo, hoja y fruto de acuerdo con las técnicas y parámetros establecidos en el apartado **1.2.8** del primer capítulo y el apartado **2.2.3** del segundo capítulo respectivamente.

3.2.8. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar. El diseño experimental para la evaluación del CFT (expresado en mg EAG/g BS) y el contenido de los diferentes compuestos fenólicos detectados e identificados mediante UPLC-PDA-ESI-MS (expresado en área [μ V*sec] obtenida con una señal analítica de 290 nm) en los extractos de EPs y NEPs de raíz, tallo, hoja y frutos fueron analizados mediante un ANOVA simple ($p < 0.05$) para comparar el tratamiento de plantas infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. Se utilizó el método de Tukey para realizar las comparaciones entre las medias de los tratamientos evaluados ($p < 0.05$) en todos los experimentos. Los análisis fueron realizados empleando el Software Statgraphics Centurion Version XVI (Manugistic Inc., Rockville MD, EE. UU.).

3.3.RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.3.1. Contenido de EPs y NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*.

En la **Figura 3.2** se muestra el contenido de EPs en raíz, tallo y hoja de plántulas infectadas y no infectadas de *C. chinense*. En raíz fue de 3.89 ± 0.15 y 4.84 ± 2.04 mg EAG/g BS, en tallo de 8.62 ± 1.50 y 10.40 ± 1.45 mg EAG/g BS, y en hoja fue 30.87 ± 0.29 y 33.28 ± 0.89 mg EAG/g BS en plántulas infectadas y no infectadas respectivamente. El ANOVA mostró que no existen diferencias significativas de EPs entre el tratamiento infectado y no infectado (**Anexo 8**). En concordancia con los resultados presentados, Gayoso *et al.* (2004) reportaron que no se observaron cambios en el contenido de EPs en plántulas de *C. annuum* a los tres días de establecerse la infección con *P. capsici*, estos cambios son observados principalmente en hojas, con el incremento de EPs a partir del día 5 y 7 después de iniciada la interacción del oomiceto con la raíz. Por su parte, Jousset *et al.* (2011) reportaron la inducción de compuestos fenólicos en plántulas de cebada (*H. vulgare*) como parte del mecanismo de defensa frente a la infección producida por *P. ultimum*, sin embargo, la acumulación de compuestos sucede en las zonas de raíces sanas (sitios sistemáticos), y no en el sitio local de la infección.

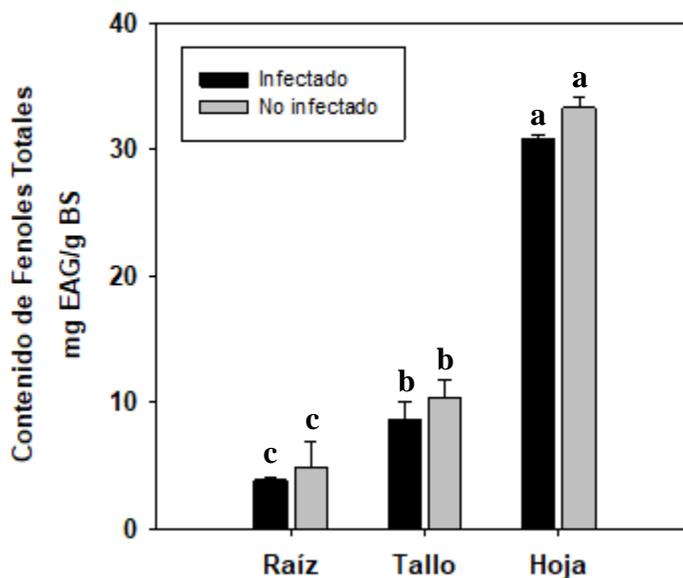


Figura 3. 2. Contenido EPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.

En la **Figura 3.3** se muestra el contenido de NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas infectadas y no infectadas de *C. chinense*. En raíz fue de 15.70 ± 1.74 y 8.04 ± 1.25 mg EAG/g BS, en tallo de 11.89 ± 1.05 y 10.57 ± 2.03 mg EAG/g BS, y en hoja fue de 11.10 ± 1.39 y 12.87 ± 1.34 mg EAG/g BS en plántulas infectadas y no infectadas respectivamente. El ANOVA indicó que existe una mayor cantidad de NEPs en raíz de plántulas infectadas (**Anexo 8**). El ANOVA también mostró que no existen diferencias significativas de NEPs en tallo y hoja de plántulas infectadas y no infectadas.

En la **Tabla 3.1** se observa la sumatoria de EPs y NEPs en raíz, tallo y hoja de *C. chinense* de plántulas infectadas y no infectadas con *P. ultimum*; la cual muestra un incremento total

de compuestos fenólicos significativo en raíz de plántulas infectadas (19.59 ± 1.73 mg EAG/g BS) con respecto al de plántulas no infectadas (12.87 ± 0.84 mg EAG/g BS).

El contenido de compuestos fenilpropanoides incrementa en diferentes órganos de la planta en respuesta a la interacción con patógenos, esto confiere tolerancia a la infección (Agati *et al.*, 2012). El incremento de NEPs en raíz de plántulas infectadas está relacionado con la síntesis de barreras como protección frente al ataque de patógenos (Jean-Christophe *et al.*, 2018). Algunos de estos mecanismos de síntesis de barrera son la lignificación y la suberización. La lignificación en raíz de plantas de *C. annuum* frente al ataque de *P. capsici* ha sido propuesto como un mecanismo de defensa (Hu-Zhe *et al.*, 2005). Por otro lado, el proceso de acumulación de compuestos fenólicos puede desarrollarse a través de la suberización; los compuestos fenólicos involucrados en la suberización en general no son precursores de la lignina y se tratan principalmente de ácidos hidroxicinámicos que se unen covalentemente a la pared celular primaria. (Razem y Bernardis, 2002; Mandal *et al.*, 2009). En *Solanum tuberosum*, se ha demostrado que frente a la infección producida por *P. infestans* la planta produce especies reactivas de oxígeno (ROS) como H_2O_2 para eliminar al patógeno, y se produce la formación de una barrera polimérica unida a la pared celular, que reduce la permeabilidad evitando la deshidratación y la colonización del tejido vegetal, como consecuencia de la oxidación de los compuestos fenólicos en el sitio de la infección. Además, Caamal-Chan *et al.* (2011) reportaron la inducción sistemática de nitrato reductasas durante la infección producida por *P. capsici* en raíces de plántulas de *C. chinense* lo que sugiere la acción de otras ROS como NO en el mecanismo de defensa. Woo-Jin *et al.* (2004) reportaron que en raíz de plántulas de *C. annuum* se observa un incremento en la actividad de la polifenol oxidasa (PPO), la cual realiza la oxidación de compuestos fenólicos durante la infección

producida por *P. capsici*, pero no se observa un incremento en la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima involucrada en la síntesis de compuestos fenólicos. Por su parte, Hu-Zhe *et al.* (2005) reportaron que en raíz de plántulas de *C. annuum* infectadas con *P. capsici* se observa el incremento de actividad de peroxidasas (POD), y un decremento en la actividad de la PAL. Mientras que Owen-Going *et al.* (2008) encontraron en su investigación que en plántulas de *C. annuum* en un sistema hidropónico se observó el incremento de NEPs en raíces tras la infección producida por *P. aphanidermatum*. En relación con esto, se sugiere que la actividad de POD y la PPO está involucrada en la acumulación de compuestos fenólicos en las estructuras de la pared celular como uno de los principales mecanismos de defensa tempranos en *C. annuum*. A su vez, se sugiere que en *C. chinense* la acumulación de NEPs puede involucrar alguno de estos mecanismos, mediante la incorporación de los EPs a la pared celular, es decir, tras su oxidación por la acción de POD utilizando como co-sustrato ROS como parte de la respuesta local a la infección.

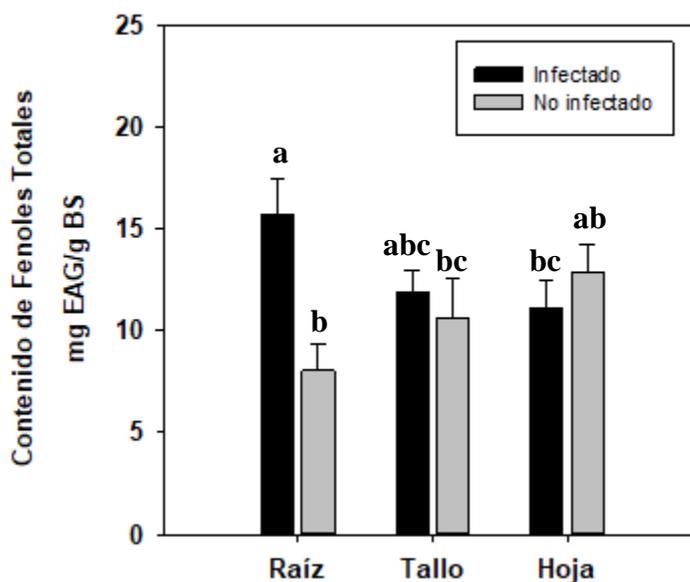


Figura 3. 3. Contenido de NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.

Tabla 3 1. Contenido de EPs y NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*.

Tejido/Tratamiento	Infectado*	No Infectado*
Raíz	19.59 ± 1.73 ^a	12.87 ± 0.84 ^b
Tallo	20.51 ± 2.53 ^a	20.97 ± 3.31 ^a
Hoja	41.96 ± 1.67 ^a	46.14 ± 1.63 ^a

* Letras diferentes indican diferencias significativas (los valores representan la sumatoria de EPs y NEPs en cada tratamiento expresado en mg EAG/g BS).

En raíz de plántulas infectadas con *P. ultimum* se observó una distribución de compuestos fenólicos, en la cual, el 19.87% correspondió a EPs y, el 80.13% a NEPs, mientras que en raíces de plántulas no infectadas se observó un 37.58% de EPs y 62.42% de NEPs. En tallo de plántulas infectadas se presentó un 42.03% de EPs y 57.97% de NEPs, mientras que en

tallo de plántulas no infectadas la distribución fue de 49.61% de EPs y 50.39% de NEPs, es decir, se observa un incremento porcentual de NEPs en tallo durante la interacción con *P. ultimum*. En hoja de plántulas infectadas se presentó un 73.56% de EPs y 26.44% de NEPs, mientras, que, en hojas de plántulas no infectadas, se observó un 72.11% de EPs y 27.89% de NEPs, es decir, se observó una distribución similar de EPs y NEPs entre hoja de plántula infectada y no infectada (Figura 3.4).

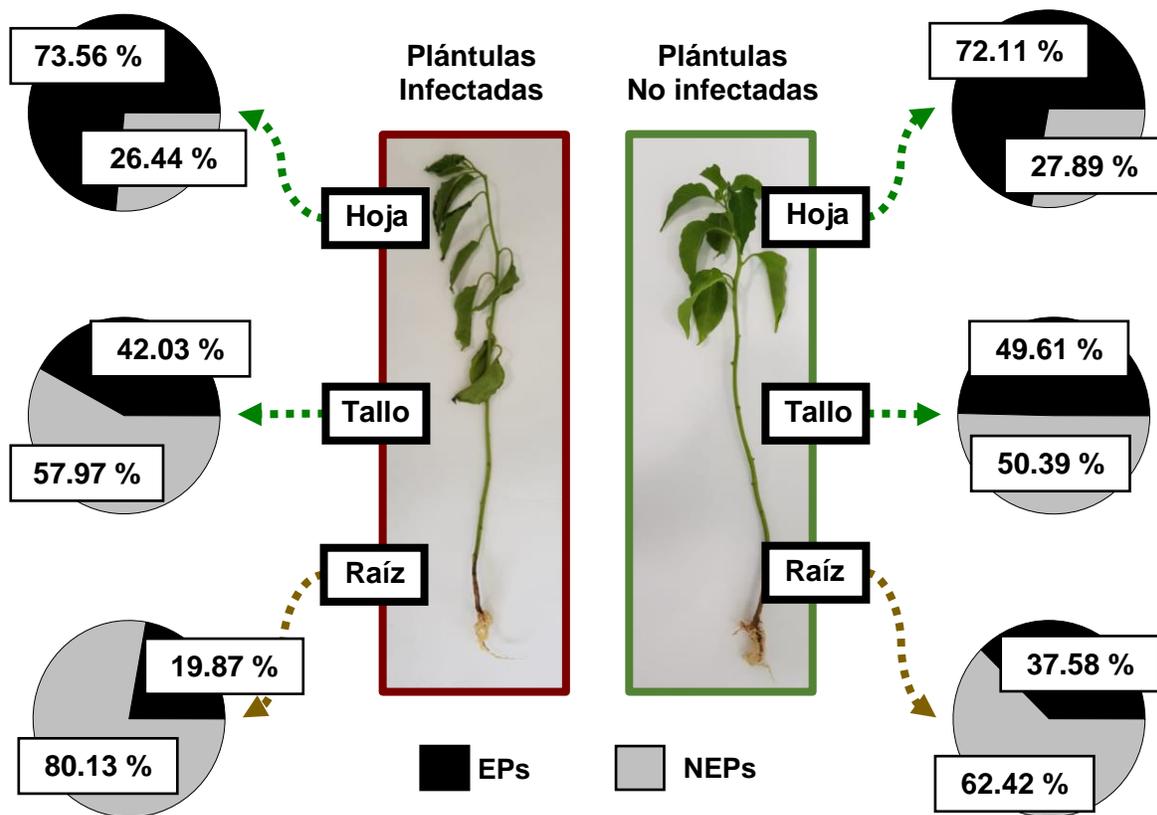


Figura 3. 4. Porcentaje de distribución EPs y NEPs en raíz, tallo y hoja de plántula de *C. chinense* infectada y no infectada con *P. ultimum*.

3.3.2. Contenido de EPs y NEPs en fruto de plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*

En la **Tabla 3.2** se observa la sumatoria de EPs y NEPs en frutos de plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. En frutos de plantas infectadas se observó un contenido de 31.56 ± 1.53 mg EAG/g BS, mientras, que en frutos de plantas no infectadas fue de 33.34 ± 1.12 mg EAG/g BS. No se observaron diferencias significativas (**Anexo 8**).

Tabla 3 2. Contenido de EPs y NEPs presentes en fruto de plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*.

Frutos en plantas de <i>Capsicum chinense</i>	Contenido de Fenoles Totales (mg EAG/g BS)*
Infectadas	31.56 ± 1.53^a
No infectadas	33.34 ± 1.12^a

* Letras diferentes indican diferencias significativas (los valores representan la sumatoria de EPs y NEPs)

En la **Figura 3.5** se observa el contenido EPs y NEPs, y su distribución porcentual en frutos de plantas infectadas y no infectadas. El contenido de EPs fue significativamente mayor en frutos de plantas infectadas (26.10 ± 1.26 mg EAG/g BS) que en frutos de plantas no infectadas (21.61 ± 1.12 mg EAG/g BS). Los NEPs fueron significativamente menores en frutos de plantas infectadas (5.46 ± 0.28 mg EAG/g BS), que, en frutos de plantas no infectadas (11.74 ± 0.21 mg EAG/g BS) (**Anexo 8**). Los resultados mostraron un cambio en la distribución de EPs y NEPs. En frutos de plantas infectadas, el 82.70% correspondió a EPs y 17.30% a NEPs, mientras que, en frutos de plantas no infectadas, el 64.80% fueron EPs y el 35.20% NEPs, es decir, se observa un incremento de EPs y un decremento de NEPs en frutos de plantas infectadas.

Lo anterior sugiere la acumulación de EPs como un mecanismo de defensa; algunos autores han reportado que en frutos de *C. annuum* uno de los principales mecanismos de defensa

frente a la infección producida por patógenos es la acumulación de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides en los tejidos infectados y colonizados por el patógeno, de este modo se produce la formación de una barrera en el sitio local de la infección que impide su progresión (Bassard *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2012; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2013)

Con relación al contenido de NEPs, se observó un menor contenido de estos en frutos de plantas infectadas. Al respecto, Jayawardana *et al.* (2016) reportan la acumulación de compuestos fenólicos en las paredes celular del sitio local de la infección producida por *C. gloeosporioides* en frutos de *C. annuum*. Por su parte, Mikulic-Petkovsek *et al.* (2013) y Park *et al.*, (2012) no evaluaron el contenido de NEPs durante la infección de frutos de *C. annuum*, sin embargo, sugieren que la acumulación de EPs tienen como propósito la formación de una barrera física a través de su posterior incorporación a la pared celular de los sitios adyacentes a la infección. En relación con el presente trabajo, el sitio local de la infección en las plantas de *C. chinense* se encuentra en las raíces; se observó que en raíces de plántulas de *C. chinense* infectadas con *P. ultimum* se desarrolla la acumulación de NEPs como mecanismo de defensa. Gayoso *et al.* (2004) indicaron que existe una fuerte correlación entre la producción ROS, el mecanismo de oxidación de compuestos fenólicos involucrados en las suberización y la lignificación para la formación de barreras en el sitio local de la infección, la respuesta hipersensible (HR), y la respuesta de resistencia sistemática adquirida (SAR). Se sugiere que posiblemente se produce un detrimento o inhibición en la acumulación de NEPs en frutos de plantas infectadas para favorecer una mayor acumulación de EPs involucrados en el mecanismo de defensa, la cual puede tratarse de una parte de SAR en frutos, o bien los NEPs son transportados al sitio local de la infección (Referencia).

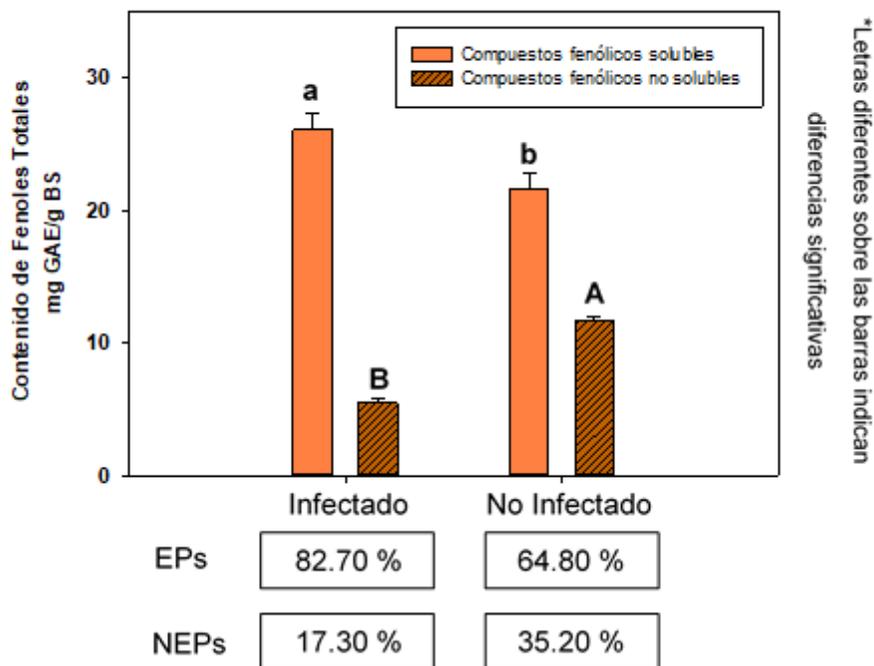


Figura 3. 5. Distribución porcentual y contenido de EPs y NEPs en fruto de plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas.

3.3.3. Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de EPs y NEPs en diferentes tejidos de *Capsicum chinense* tras la infección producida por *P. ultimum*

En la **Tabla 3.3** se observa el área total ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) integrada de los cromatogramas de extractos de EPs obtenidos a partir de raíz, tallo, y hoja en plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. En raíz el área correspondió a $48,615 \pm 5,322$ y $60,408 \pm 6,000 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$ respectivamente, estos resultados no mostraron diferencias significativas; en tallo el área fue de $99,665 \pm 7,806$ y $86,942 \pm 8,651 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$ respectivamente, no se observaron diferencias significativas; mientras que, en hoja el área fue de $170,878 \pm 8,543$ y $176,274 \pm 8,857 \mu\text{V}\cdot\text{sec}$ respectivamente, sin que se observen diferencias significativas (**Anexo 8**). Los resultados mostraron una distribución de EPs en los diferentes tejidos de *C. chinense* similar a la presentada en la **Figura 3.2**.

Tabla 3.3. Análisis mediante UPLC-PDA de EPs en raíz, tallo y hojas de plántulas de *Capsicum chinense* infectadas y no infectadas con *Pythium ultimum*.

Tejido/Tratamiento	Infectados	No Infectados
Raíz	48,615 ± 5,322 ^a	60,408 ± 6,000 ^a
Tallo	99,665 ± 7,806 ^a	86,942 ± 8,651 ^a
Hoja	170,878 ± 8,543 ^a	176,274 ± 8,857 ^a

* Letras diferentes indican diferencias significativas (comparación por fila)

En la **Tabla 3.4** se muestran numerados (de acuerdo con la identificación propuesta en la **Tabla 2.2**) los EPs, el área integrada ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$) de cada compuesto en raíz, tallo y hojas en plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*, los resultados del análisis estadístico, así como el valor de incremento o decremento porcentual de cada compuesto en plántulas infectadas con respecto al contenido observado en plántulas no infectadas.

En hoja, los compuestos identificados (número de identificación de acuerdo con la **Tabla 3.4**) como N-caffeoyl putrescina (**3**) y luteolina-7-O-(2-apiosil) hexósido (**26**) presentaron en los cromatogramas un área integrada significativamente menor en plántulas infectadas en comparación con plántulas no infectadas, lo que representó una reducción del 66.48 y 25.19% respectivamente durante la infección producida por *P. ultimum*. El decremento en el contenido de estos compuestos fenólicos en hoja de plántulas infectadas sugiere que posiblemente fueron transportados al sitio local de la infección como mecanismo de defensa; de acuerdo con Jørgensen *et al.* (2015), algunos compuestos involucrados en el mecanismo de defensa en *Arabidopsis thaliana*, como los glucosinolatos pueden ser transportados a otros tejidos a partir del sitio donde fueron sintetizados y acumulados; y sugieren que diversos metabolitos secundarios pueden ser transportados desde la hoja hacia la raíz vía floema, o desde la raíz hacia la hoja vía xilema; los autores también mencionan que este fenómeno es transferible a otras especies, y otros metabolitos secundarios especializados. Algunos de estos mecanismos de transporte han sido propuestos para flavonoides (Grotewold, 2004;

Zhao, 2015). En cuanto a la acción en el mecanismo de defensa para estos compuestos, se ha reportado que la N-caffeoyl putrescina en frutos de *C. annuum* está involucrada con la formación de una barrera física en el sitio local de la infección producida por *C. gloeosporioides* (Park *et al.*, 2012), por su parte, Du *et al.*, (2010) reportaron que la luteolina es capaz de inhibir la germinación de esporas de *C. sublineolum*.

Los compuestos identificados como ácido protocatechuico hexósido (**5**), lycoperodine 1 (**6**), ácido vanílico-4- β -D-glicósido (**16**), y chrysoeriol-7-O-(2-apiosil-6-acetil) hexosido (**34**) presentaron en los cromatogramas un área integrada significativamente mayor en plántulas infectadas, que en plántulas no infectadas, lo que representó un incremento de estos compuestos del 40.31, 20.97, 18.49% y 28.18% respectivamente durante la infección producida por *P. ultimum*. En cuanto a la acumulación de compuestos fenólicos como chrysoeriol-7-O-(2-apiosil-6-acetil) hexósido, las plantas en condiciones de estrés acumulan compuestos flavonoides glucosilados debido a que estos son efectivos secuestrantes de ROS; esta acumulación de compuestos es mayor en especies sensibles al estrés que en especies tolerantes, debido a que, en especies sensibles, la primera línea de defensa frente a la producción de ROS es poco eficaz y, por lo tanto, la planta se encuentra expuesta a un mayor estrés oxidativo (Agati *et al.*, 2012). El área integrada del resto de los compuestos (**Tabla 3.4; Número: 6, 13, 21, 30, 32, 33, 36, 38**) detectados e identificados en hojas de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum* no presentaron diferencias significativas.

En tallo, los compuestos identificados como apigenina-6,8-di-C-hexósido (**13**) y un derivado de apigenina (**17**) presentaron en los cromatogramas un área integrada significativamente menor en plántulas infectadas, que, en plántulas no infectadas, esto representó una reducción

de estos compuestos de 14.83 y 12.50% respectivamente. Al respecto, los flavonoides han sido reportados como co-sustrato para peroxidasas para reducir el contenido de H₂O₂ (Agati *et al.*, 2012). Se sugiere que, tras su oxidación, estos derivados de apigenina se acumulan en la pared celular como un mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos en el sistema vascular de *C. chinense*. Los flavonoides son liberados y dirigidos al sitio de infección induciendo la HR y la muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés), esto previene la colonización de tejidos adyacentes al sitio local de la infección (Besseau *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2011; Petrusa *et al.*, 2013; Mierziak *et al.*, 2014). Estos flavonoides pueden localizarse en la pared celular secundaria de las traqueidas y los elementos vasculares del xilema; también pueden unirse a diversos polisacáridos como celulosa, pectina y callosa de la pared secundaria y la laminilla media en el sistema vascular; diversos autores proponen que su función es la modificación de la estructura de la pared celular secundaria, lo que dificulta la degradación de esta barreras físicas y, por otro lado, la obstrucción del sistema vascular que previene la colonización de otros tejidos adyacentes (Dai *et al.*, 1996; Wallace y Fry, 1996; Beckman, 2000; Miedes *et al.*, 2014). Por otro lado, algunos derivados de ácidos hidroxycinámicos, como los compuestos **28** (λ_{max} : 195, 218, 292, 309 nm), **37** (λ_{max} : 214, 290, 308 nm) y **39** (λ_{max} : 214, 285, 317 nm) presentaron en los cromatogramas un área significativamente mayor en plántulas infectadas, que, en plántulas no infectadas, lo cual representó un incremento de estos compuestos del 45.94, 158.92 y 74.50% respectivamente, durante la infección producida por *P. ultimum*. Algunos autores reportaron que estos ácidos fenólicos son predominantemente derivados de ácido cumárico (λ_{max} = 195, 215, 277 nm), ácido cafeico (λ_{max} = 216, 326 nm) y ácido ferúlico (λ_{max} = 216, 218, 322 nm) en especies como *Zea mays* (Santiago *et al.*, 2018; Cocuron *et al.*, 2019), *Lonicera japonica* y *Lonicera macranthoides* (Yu *et al.*, 2019), y *Oryza sativa* L. (Gupta y De, 2017), y también se han

encontrado estos compuestos asociados a las estructuras de la pared celular en especies de Solanaceae como *Lycopersicon esculentum* Mill. (Mandal y Mitra, 2008, Mandal *et al.*, 2009), *N. tabacum* L. (Schnablová *et al.*, 2006) y *C. annuum* (Novo *et al.*, 2017). Además, se ha reportado que estos compuestos son capaces de asociarse a diversos polisacáridos y proteínas de la pared celular primaria para formar diferentes complejos. Algunos de estos derivados como el ácido diferúlico, son capaces de unirse a la hemicelulosa (arabinosilanos) de la pared celular mediante esterificación con la arabinosa, y entrecruzarse con la lignina para formar estos complejos, cuya función es aumentar la fuerza mecánica, la formación de barreras como mecanismo de defensa frente al ataque de patógenos, y la modulación de la permeabilidad en los tejidos vegetales (Iiyama *et al.*, 1994; Barros-Rios *et al.*, 2015).

En raíz, el compuesto identificado como ácido protocatechuico hexósido (**5**), presentó en los cromatogramas un área significativamente menor en plántulas infectadas que, en plántulas no infectadas, lo que equivale a una disminución de este compuesto del 46.73 %, por otro lado, un derivado de ácido hidroxicinámico (**28**) con una huella espectral de λ_{\max} : 195, 218, 292, 309 nm (similar a compuestos como ácido ferúlico, ácido cafeico y ácido clorogénico) presentó en los cromatogramas un área significativamente mayor en plántulas infectadas que en plántulas no infectadas, lo que equivale a un incremento de este compuesto del 72.80% durante la infección producida por *P. ultimum*. Al respecto, Mikulic-Petkovsek *et al.* (2013) reportaron la acumulación de ácido clorogénico alrededor del sitio local de la infección producida por *C. coccodes* en frutos de *C. annuum* Var. Soroksari. Por su parte, Jousset *et al.* (2011) reportaron en cebada (*H. vulgare*) la acumulación de ácidos hidroxicinámicos como ácido cumárico y ácido vanílico en raíz de plántulas frente a la infección producida por *P. ultimum*. Debido a lo anterior, se sugiere que la acumulación de ácidos hidroxicinámicos

se debe a la activación de la PAL en los sitios circundantes a la infección en las raíces de *C. chinense*.

Tabla 3.4. Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de EPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*

Número	TR (min)	Identificación Tentativa	Infectado	No infectado	Valor-P*	% de reducción o incremento
Hoja						
3	8.13	N-caffeoyl putrescina	1,093 ± 60 ^b	3,261 ± 187 ^a	0.0000**	- 66.48
5	8.55	Ácido protocatechuico hexosido	4,364 ± 220 ^a	3,110 ± 195 ^b	0.0018**	+ 40.31
6	8.63	Ácido clorogénico	1,009 ± 59 ^a	862 ± 72 ^a	0.0516	+ 17.08
10	9.08	Lycoperodine 1	2,140 ± 129 ^a	1,749 ± 79 ^b	0.0132*	+ 20.97
13	9.24	Apigenina-6,8-di-C-hexosido	1,414 ± 57 ^a	1,322 ± 67 ^a	0.1437	+ 6.93
16	9.54	Ácido vanílico-4-β-D-glucósido	5,093 ± 225 ^a	4,298 ± 185 ^b	0.0092**	+ 18.49
21	9.86	Phloretin-5,6-di-C-hexosido	1,804 ± 137 ^a	1,956 ± 153 ^a	0.2681	- 7.77
26	10.91	Luteolina-7-O-(2-apiosil) hexosido	16,426 ± 888 ^b	21,958 ± 1,163 ^a	0.0028**	- 25.19
30	12.73	Apigenina-7-O-(2-apiosil) hexosido	31,449 ± 1,307 ^a	32,735 ± 2,416 ^a	0.4629	- 3.93
32	13.21	Diosmetina-7-O-(2-apiosil) hexosido	21,805 ± 1,056 ^a	23,679 ± 1,514 ^a	0.1535	- 7.91
33	13.46	Luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido	6,610 ± 624 ^a	7,770 ± 528 ^a	0.0698	- 14.93
34	15.77	Chrysoeriol-7-O-(2-apiosil-6-acetil) hexosido	1,150 ± 51 ^a	897 ± 60 ^b	0.0051**	+ 28.18
36	17.76	Apigenina-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido	7,184 ± 526 ^a	7,918 ± 349 ^a	0.1140	- 9.28
38	18.60	Chrysoeriol-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido	5,937 ± 357 ^a	6,460 ± 374 ^a	0.1547	- 8.10
Tallo						
3	8.20	N-caffeoyl putrescina	3,251 ± 210 ^a	3,291 ± 189 ^a	0.8156	- 1.23
5	8.57	Ácido protocatechuico hexosido	2,358 ± 157 ^a	2,100 ± 85 ^a	0.0662	+ 12.28
9	9.01	Derivado de apigenina	1,258 ± 79 ^a	1,174 ± 57 ^a	0.2129	+ 7.13
10	9.09	Lycoperodine 1	915 ± 59 ^a	837 ± 45 ^a	0.1388	+ 9.38
12	9.15	Derivado de ácido hidroxicinámico	2,707 ± 142 ^a	2,608 ± 126 ^a	0.4154	+ 3.80
13	9.24	Apigenina-6,8-di-C-hexosido	628 ± 32 ^b	737 ± 27 ^a	0.0105*	- 14.83
14	9.32	Derivado de apigenina	2,072 ± 123 ^a	2,148 ± 144 ^a	0.5285	- 3.52
17	9.59	Derivado de apigenina	1,637 ± 64 ^b	1,871 ± 97 ^a	0.0253*	- 12.50
19	9.71	Derivado de apigenina	716 ± 31 ^a	779 ± 33 ^a	0.0718	- 8.12
20	9.77	Derivado de apigenina	921 ± 78 ^a	942 ± 45 ^a	0.7019	- 2.26
21	9.86	Phloretin-5,6-di-C-hexosido	1,160 ± 106 ^a	1,125 ± 101 ^a	0.6963	+ 3.15
22	10.00	Derivado de apigenina	1,345 ± 66 ^a	1,439 ± 93 ^a	0.2266	- 6.54
28	11.23	Derivado de ácido hidroxicinámico	6,171 ± 342 ^a	4,229 ± 184 ^b	0.0010**	+ 45.94
29	11.83	Derivado de ácido hidroxicinámico	4,646 ± 266 ^a	4,435 ± 346 ^a	0.4499	+ 4.75
37	17.66	Derivado de ácido hidroxicinámico	3,817 ± 306 ^a	1,478 ± 96 ^b	0.0002**	+ 158.22

Continuación de **Tabla 3.4**

39	19.29	Derivado de ácido hidroxicinámico	3,169 ± 171 ^a	1,816 ± 82 ^b	0.0002**	+ 74.50
Raíz						
3	8.19	N-caffeoyl putrescina	150 ± 9 ^a	166 ± 14 ^a	0.1497	- 10.12
5	8.53	Ácido protocatechuico hexosido	134 ± 8 ^b	251 ± 11 ^a	0.0001**	- 46.73
28	11.21	Derivado de ácido hidroxicinámico	428 ± 21 ^a	248 ± 16 ^b	0.0003**	+ 72.80
29	11.80	Derivado de ácido hidroxicinámico	664 ± 35 ^a	714 ± 46 ^a	0.2874	- 6.89
37	17.66	Derivado de ácido hidroxicinámico	877 ± 64 ^a	902 ± 40 ^a	0.6050	- 2.71
39	19.27	Derivado de ácido hidroxicinámico	548 ± 33 ^a	505 ± 29 ^a	0.1615	+ 8.64

**indica diferencia significativa con un valor $P < 0.01$

*indica diferencia significativa con un valor $P < 0.05$

En la **Tabla 3.5** se observa el área total de los cromatogramas de EPs de frutos de plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. En extractos de frutos de plantas infectadas el área total integrada fue $725,839 \pm 46,810 \mu V \cdot sec$, la cual fue significativamente mayor que en plántulas no infectadas con un valor de $469,820 \pm 44,854 \mu V \cdot sec$ (**Anexo 8**).

Los resultados presentados son similares a los presentados en la **Figura 3.5**.

Tabla 3 5. Análisis mediante UPLC-PDA de EPs en fruto de plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*.

Tratamiento	Área ($\mu V \cdot sec$)
Infectados	$725,839 \pm 46,810^a$
No infectados	$469,820 \pm 44,854^b$

* Letras diferentes indican diferencias significativas

Los EPs identificados (número de identificación de acuerdo con la **Tabla 3.4**) en frutos de *C. chinense* en plantas infectadas y no infectadas con *P. ultimum* se presentan numerados en la **Tabla 3.6**. La numeración se presenta de acuerdo a la identificación propuesta en la Tabla 2.2. Se identificó la presencia de un derivado de ácido vanílico (**1**), N-caffeoyl putrescina (**3**), ácido protocatechuico hexósido (**5**), derivados de apigenina (**7**, **11**), derivado de ácido clorogénico o ferúlico (**8**) y un derivado de luteolina o chrysoeriol, los cuales presentaron en los cromatogramas un área significativamente mayor en frutos de plantas infectadas que no

infectadas, lo que representó un incremento significativo de estos compuestos durante la infección producida por *P. ultimum* en las raíces. También se observó que un derivado de apigenina (**11**), presentó en los cromatogramas un área integrada significativa menor en plántulas infectadas que plántulas no infectadas, lo que equivale a una disminución del 34.43% durante la infección. Al respecto, algunos compuestos fenólicos pueden sufrir un decremento en términos de reducir a ROS (Agati *et al.*, 2012).

Con relación a los resultados, Park *et al.* (2012) han reportado que la N-caffeoyl putrescina no se encuentra presente en fruto no infectados de *C. annuum*, sino que hace su aparición durante la infección producida por *C. gloeosporioides*, y alcanza su mayor contenido a los tres días de comenzar el proceso infeccioso, por lo cual, los autores consideran que cumple con los requisitos para ser considerada como una fitoalexina. De acuerdo con Ahuja *et al.* (2011) una fitoalexina es un compuesto de bajo pesos molecular, con actividad antimicrobiana, y sintetizado de *novo* después del inducirse el estrés por parte de un patógeno, sin embargo, en frutos de *C. chinense* de plantas no infectadas este compuesto ya se encuentra presente, y su acumulación, es decir, el incremento del 70.63% con respecto al contenido en plantas no infectadas aumenta durante la infección con *P. ultimum*, por lo que, aparentemente N-caffeoyl putrescina no es un compuesto de síntesis *de novo* en *C. chinense* frente al estrés producido por *P. ultimum*.

En relación con la acumulación de algunos flavonoides como derivados de apigenina (**7**, **15**) y derivado de luteolina o chrysoeriol (**27**), se ha observado que son capaces de impedir la germinación de esporas. Du *et al.* (2010) han reportado en sorgo la acumulación de flavonoides, principalmente apigenina y luteolina, los cuales son capaces de inhibir la germinación de esporas de *C. sublineolum*, por otro lado, Mikulic-Petkovsek *et al.* (2013),

reportaron la distribución y acumulación de diversos flavonoides como derivados de luteolina, apigenina, quercetina y chrysoeriol en frutos de *C. annuum* Var. Bagoly y Soroksari, y sus resultados mostraron que existe una mayor acumulación de estos compuestos en los alrededores del sitio de infección, y un menor contenido en el área infectada, por lo que, se sugieren que la principal función de estos compuestos es la formación de una barrera mecánica que impida que el patógeno continúe colonizando los tejidos vegetales.

En plántulas de *H. vulgare* se ha demostrado que la infección producida por *P. ultimum* estimula la acumulación de ácido ferúlico, ácido p-cumárico y ácido vanílico en sitios cercanos a la infección como parte de una respuesta sistemática (Jousset *et al.*, 2011), lo que puede explicar la acumulación de derivados de ácido vanílico (**1**) y derivados de ácido ferúlico en fruto de plantas *C. chinense* infectadas en la raíz.

Los resultados sugieren que tras un proceso de señalización durante la interacción de la raíz de *C. chinense* con el patógeno *P. ultimum* se llevó a cabo la inducción sistemática en frutos para la acumulación de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos que cumplen diversas funciones en el mecanismo de defensa. Se sugiere que la señalización puede estar mediada por ROS, debido a que es la reacción del mecanismo de defensa más temprana en ser activada, esto incluye la formación de H₂O₂ y NO, las cuales son moléculas altamente reactivas, y pueden producir daño en los lípidos, proteínas, pigmentos y ácidos nucleicos, lo que resulta en la PCD, y también existen evidencias de que ROS como el H₂O₂ son moléculas de señalización, e inducen la expresión de genes relacionados con el mecanismo de defensa, como el involucrado en la codificación de la PAL (Lamb y Dixon, 1997; Desikan *et al.*, 1998; Arreola-Cortés *et al.*, 2007), lo que explicaría una mayor acumulación de EPs en frutos de plantas infectadas. En general, los resultados sugieren la acumulación de EPs en frutos como

parte del mecanismo de SAR, tras la infección local producida por *P. ultimum* en la raíces de plantas de *C. chinense* donde la acumulación de NEPs es parte de la HR.

Tabla 3.6. Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de EPs en fruto de plantas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*

Número	TR (min)	Identificación Tentativa	Infectado	No infectado	Valor-P*	% reducción o incremento
1	7.23	Derivado de ácido vanílico	11,542 ± 985 ^a	7,937 ± 244 ^b	0.0035*	+ 45.43
3	7.84	N-cafeoyl putrescina	23,757 ± 832 ^a	13,923 ± 630 ^b	0.0001*	+ 70.63
4	8.23	Derivado de ácido vanílico	19,413 ± 933 ^a	17,677 ± 1,508 ^a	0.1653	+ 9.82
5	8.78	Ácido protocatechuico hexosido	14,639 ± 683 ^a	8,189 ± 370 ^b	0.0001*	+ 78.77
7	8.90	Derivado de apigenina	7,531 ± 454 ^a	4,848 ± 149 ^b	0.0006*	+ 55.34
8	9.01	Derivado ácido clorogénico o ferúlico	11,676 ± 561 ^a	8,901 ± 679 ^a	0.0055*	+ 31.16
11	9.12	Derivado de apigenina	6,569 ± 333 ^b	10,019 ± 320 ^a	0.0002*	- 34.43
15	9.36	Derivado de apigenina	6,239 ± 405 ^a	3,387 ± 195 ^b	0.0004*	+ 84.21
27	11.12	Derivado de luteolina o chrysoeriol	5,303 ± 453 ^a	3,037 ± 111 ^b	0.0011*	+ 74.59

**indica diferencia significativa con un valor P<0.01

*indica diferencia significativa con un valor P<0.05

En la **Tabla 3.7** se observa el área total de los cromatogramas de extractos de NEPs de raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. En raíz se obtuvo un área de 48,321 ± 4,895 y 48,915 ± 1,697 μV*sec, en tallo fue de 33,352 ± 3,313 y 29,303 ± 2,052 μV*sec, y en hoja fue de 58,243 ± 4,760 y 57,717 ± 3,297 μV*sec en plántulas infectadas y no infectadas respectivamente. De manera general, no se observaron diferencias significativas entre las áreas integradas para el tratamiento infectado y no infectado en los tejidos estudiados (**Anexo 8**).

Tabla 3 7. Análisis mediante UPLC-PDA de NEPs en raíz, tallo y hojas de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*.

Tejido/Tratamiento	Infectados	No Infectados
Raíz	48,321 ± 4,895 ^a	48,915 ± 1,607 ^a
Tallo	33,352 ± 3,313 ^a	29,303 ± 2,052 ^a
Hoja	58,243 ± 4,760 ^a	57,717 ± 3,297 ^a

* Letras diferentes indican diferencias significativas

En la **Tabla 3.8** se presentan los NEPs de extractos de raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*. La numeración se presenta de acuerdo con la identificación propuesta de NEPs mostrada en la **Tabla 2.3** del segundo capítulo. En hoja y tallo se observó la presencia tentativa de derivados de ácidos hidroxicinámicos como ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido clorogénico (**Tabla 3.8**; Número: **23**, **24** y **30**) en ambos tratamientos. No se observaron diferencias significativas en la presencia de estos compuestos entre plántulas infectadas y no infectadas.

En raíz se observó la presencia de derivados de ácido cumárico, ácido ferúlico y ácido clorogénico (**Tabla 3.8**; Número: **23**, **24**, **30** y **34**). El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas en la presencia de estos compuestos entre plántulas infectadas y no infectadas. También se detectó la presencia de N-feruloyl tiramida, la cual se encontró presente en raíz de plántulas no infectadas, pero ausente en raíz de plántulas infectadas. La ausencia de este compuesto en raíz durante la infección sugiere la posible oxidación N-feruloyl tiramida como mecanismo de defensa que permite el fortalecimiento de la pared celular vegetal durante el proceso de infección, y también su acción como compuesto inhibitorio del crecimiento de *P. ultimum* (Novo *et al.*, 2017). En tabaco (*N. tabacum*) las poliamidas tienen una función importante en el entrecruzamiento en la pared celular, pero no están implicadas las fenol amidas en este proceso. Además, se ha sugerido que las fenol amidas son sustratos preferenciales de algunas amino oxidasas y peroxidasas,

y que se encuentran involucradas en la generación de ROS en el apoplasto, y en los procesos de polimerización en la pared celular dependientes de H₂O₂ (Bassard *et al.*, 2010).

Tabla 3 8. Análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS del perfil de NEPs en raíz, tallo y hoja de plántulas de *C. chinense* infectadas y no infectadas con *P. ultimum*.

Número	TR (min)	Identificación Tentativa	Infectado	No infectado	Valor-P*	% de reducción o incremento
Hoja						
24	10.50	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	889 ± 83 ^a	941 ± 67 ^a	0.5276	- 5.52
30	11.13	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	506 ± 42 ^a	556 ± 47 ^a	0.2342	- 9.12
Tallo						
23	9.78	Derivado de ácido cumárico	273 ± 16 ^a	240 ± 13 ^a	0.0506	+ 13.76
24	10.48	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	2,379 ± 147 ^a	2,331 ± 232 ^a	0.0662	+ 2.10
30	11.10	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	806 ± 51 ^a	795 ± 36 ^a	0.7734	+ 1.38
Raíz						
23	9.77	Derivado de ácido cumárico	891 ± 81 ^a	1,090 ± 94 ^b	0.0498*	- 18.26
24	10.43	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	1,146 ± 109 ^b	1,292 ± 112 ^a	0.1809	- 11.32
30	11.07	Derivado de ácido ferúlico o clorogénico	1,293 ± 107 ^a	1,504 ± 103 ^a	0.0697	- 14.03
34	11.75	Derivado de ácido ferúlico	979 ± 65 ^a	956 ± 72 ^a	0.7075	+ 2.38
41	25.07	N-feruloyl tiramida	ND	1,641 ± 137 ^a	0.0000**	(-)

**indica diferencia significativa con un valor P<0.01

*indica diferencia significativa con un valor P<0.05

3.3.4. Mecanismo de defensa propuestos para *C. chinense* frente a la interacción con el oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*

En función a la información obtenida acerca del cambio de compuestos fenólicos en *C. chinense* en interacción con *P. ultimum* se realizan las siguientes sugerencias:

En la **Figura 3.6** se muestra el mecanismo de defensa propuesto en plántulas de *C. chinense* frente a la interacción con *P. ultimum*. Se propone la posible acumulación de ROS, que en conjunto con los EPs como co-sustrato son oxidados por POD. Esto permitiría su incorporación y polimerización en estructuras de la pared celular en la raíz infectada como parte de la respuesta local. La acumulación de NEPs puede tratarse de un componente de la respuesta hipersensible HR que se caracteriza por la PCD con el propósito de evitar la colonización de otros tejidos, y la pérdida de agua durante la infección.

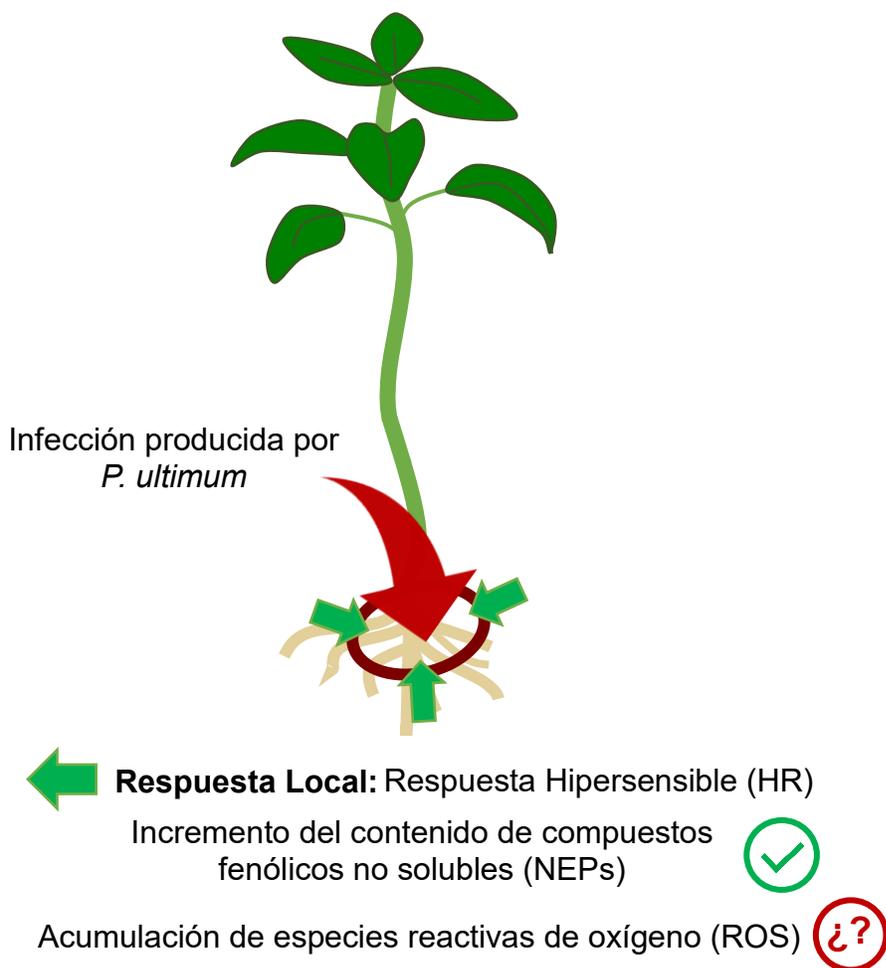


Figura 3. 6. Mecanismo de defensa en raíces de plántulas de *C. chinense* frente a la interacción con el oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*. La acumulación de NEPs en estructuras de la pared celular forma parte de HR en el sitio local de la infección. También se propone la posible acumulación de ROS que en conjunto con los EPs son sustrato de POD.

En la **Figura 3.7** se muestra el posible mecanismo de defensa inducido en fruto de plantas infectadas en la raíz con *P. ultimum*. Se propone la posible señalización desde la raíz mediada por ROS que induce el mecanismo de SAR en fruto, esto a través de la activación de los genes responsables de la codificación de la PAL que permitiría la síntesis y acumulación de diversos EPs, entre los cuales se encuentra principalmente la N-cafeoyl putrescina, derivados de apigenina, luteolina, y diversos ácidos hidroxicinámicos. De acuerdo, a los

resultados presentados en este trabajo, el principal compuesto acumulado en fruto durante la interacción en la raíz de plantas de *C. chinense* con *P. ultimum* fue N-cafeoyl putrescina, cuya acción propuesta en el mecanismo defensa es el reforzamiento de la pared celular para evitar la progresión de la infección en fruto.

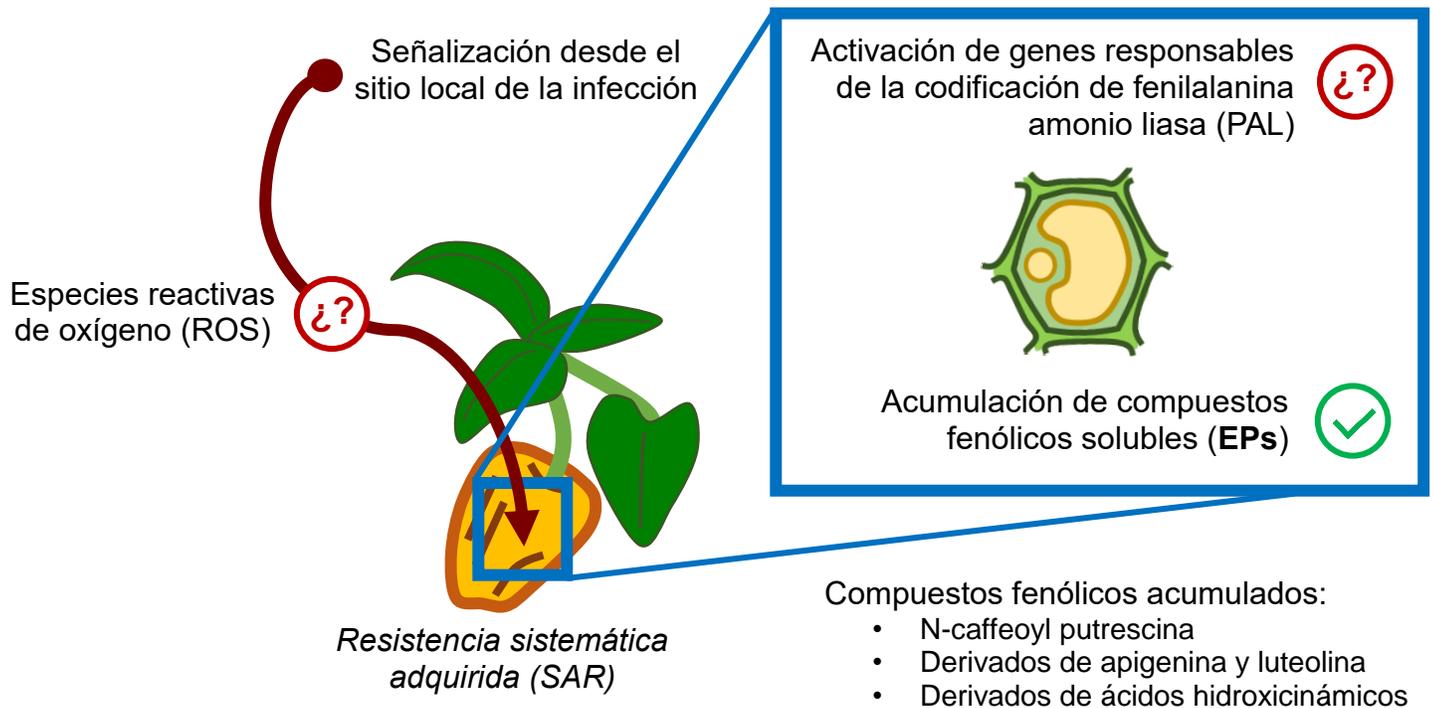


Figura 3. 7. El mecanismo de SAR es inducido en fruto de plantas de *C. chinense* frente a la interacción en raíz con el oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*. Se propone la señalización mediada por ROS desde el sitio local de la infección, lo que produce la activación de genes responsables de la codificación de la PAL y permite la acumulación de EPs como N-cafeoyl putrescina, derivados de apigenina, luteolina y ácidos hidroxicinámicos.

En la **Figura 3.8** se muestra un esquema que propone la posible acción de N-cafeoyl putrescina en el mecanismo de defensa frente al ataque de *P. ultimum*. El presente trabajo demostró la acumulación de este compuesto en frutos como parte del mecanismo de SAR.

Se sugiere que un posible mecanismo de defensa durante el ataque de *P. ultimum* en frutos implica la producción de un alto contenido de ROS en el sitio de infección, y la posterior liberación de N-cafeoyl putrescina desde las vacuolas celulares para ser empleado como co-sustrato de peroxidasas distribuidas en la pared celular primaria.

Esto permitiría la catálisis de ROS como H_2O_2 , y la oxidación de N-cafeoyl putrescina, la cual puede ser dividida en dos subunidades, la putrescina y el cafeoyl (ácido cafeico), los cuales son sustratos para la formación de un dominio polialifático y poliaromático respectivamente durante la suberización. De acuerdo con Graça (2015) se han propuesto algunos modelos para la estructuración de estos dominios entre las células vegetales en la lamilla media.

La formación de estos dominios estructurales sucede en la lamilla media y compuesta, ubicada entre las paredes celulares de dos células vegetales adyacentes, tal como se presenta en la **Figura 3.9**. La suberización permite mejorar la cohesión entre las células vegetales, reducir la permeabilidad en los tejidos vegetales, y evita la progresión de la infección producida por patógenos como *P. ultimum* a través de la formación de barreras físicas en la pared celular (Bernards *et al.*, 1999; Graça, 2015)

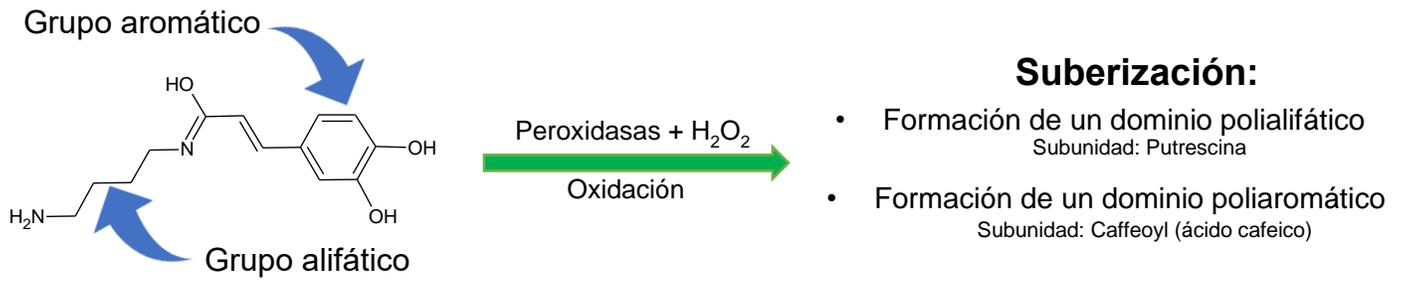


Figura 3. 8. Mecanismo de acción propuesto para N-caffeoyl putrescina frente a la infección de *P. ultimum*. En el sitio de infección producida por *P. ultimum* el compuesto N-caffeoyl putrescina es catalizado en dos subunidades (putrescina y ácido cafeico) por peroxidasas encontradas en la pared celular primaria, estas subunidades son utilizadas como sustrato para la formación de un dominio polialifático y poliaromático durante la suberización.

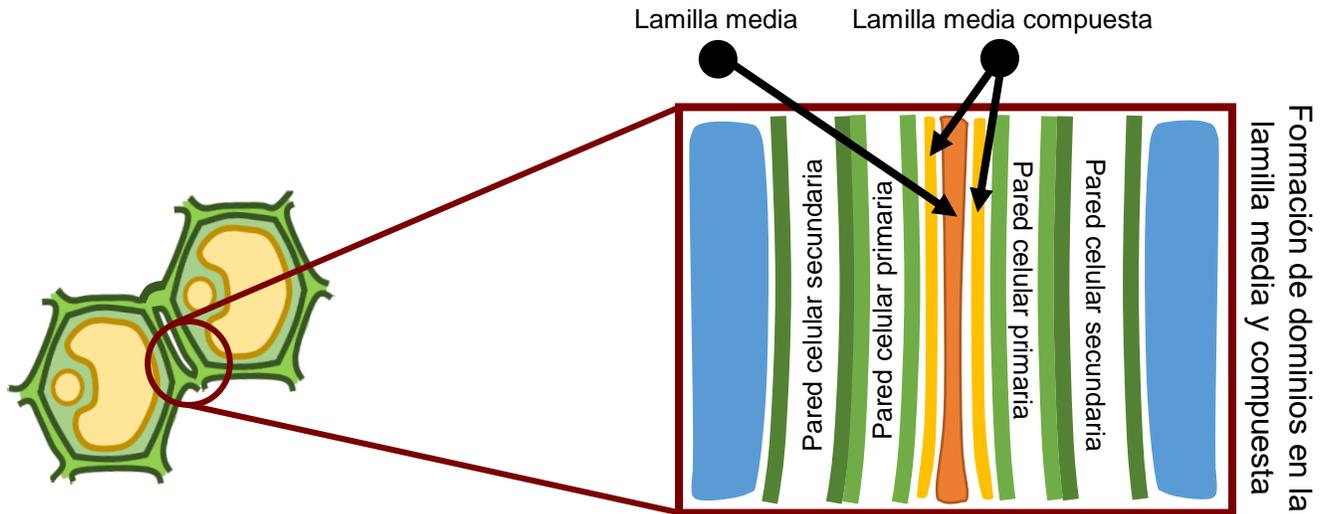


Figura 3. 9. Sitio de formación del dominio polialifático y poliaromático durante la suberización. La formación de ambos dominios se produce en la lamilla media y compuesta ubicada entre las paredes celulares de dos células adyacentes.

3.4.CONCLUSIONES

En plántulas de *C. chinense* no se observaron cambios en el contenido EPs en los diferentes tejidos estudiados, sin embargo, se observó de acuerdo al CFT una mayor acumulación de NEPs en raíces infectadas (15.70 ± 1.74 mg EAG/g BS) que no infectadas (8.04 ± 1.25 mg EAG/g BS), lo que sugiere su acumulación en las estructuras de la pared celular como parte de la HR, y permite reducir la permeabilidad de la pared celular, evitar la pérdida de agua y la progresión de la infección. El contenido de EPs fue mayor en frutos de plantas infectadas (26.10 ± 1.26 mg EAG/g BS) que en frutos de plantas no infectadas (21.61 ± 1.12 mg EAG/g BS). Mientras, que el contenido de NEPs fue menor en frutos de plantas infectadas (5.46 ± 0.28 mg EAG/g BS), que, en frutos de plantas no infectadas (11.74 ± 0.21 mg EAG/g BS). Lo anterior sugiere la inducción en la acumulación de compuestos fenólicos solubles EPs como parte del mecanismo de SAR en frutos.

Se observó la acumulación significativa de N-cafeoyl putrescina, derivados de apigenina, luteolina, y ácidos hidroxicinámicos en frutos de *C. chinense* en respuesta a la infección producida en raíces por *P. ultimum*. Se sugiere que la inducción en la acumulación que N-cafeoyl putrescina puede ser el principal mecanismo de defensa en frutos. El mecanismo de acción propuesto para este compuesto es la suberización, en la cual se lleva a cabo la formación de dos dominios, uno polialifático y otro poliaromático (formados a partir de la subunidad putrescina y cafeoyl respectivamente) en la lamilla media y compuesta, ubicada entre las paredes celulares de las células vegetales adyacentes. Se sugiere que este mecanismo permite reducir la permeabilidad en los tejidos celulares, mejorar la cohesión entre la células vegetales, y evitan la progresión de la infección en frutos en caso de ser atacados por patógenos como *P. ultimum*.

CONCLUSIONES GENERALES

La evaluación en la extracción de compuestos fenólicos permitió caracterizar el contenido de EPs y NEPs, así como conocer su distribución en diferentes tejidos de *C. chinense*. Aún más importante, se determinó el efecto del solvente de extracción sobre el CFT, lo anterior para proporcionar información útil para establecer la selección del solvente adecuado a emplear en protocolos de extracción de compuestos fenólicos en *C. chinense*. Por otra parte, el empleo de UPLC-PDA-ESI-MS demostró ser una herramienta útil en la caracterización e identificación de EPs y NEPs en extractos crudos de diferentes tejidos de *C. chinense*.

En conjunto, el protocolo de extracción y UPLC-PDA-ESI-MS conformaron herramientas útiles para el estudio de cambio en el contenido y perfil de compuestos fenólicos frente a alteraciones en el medio ambiente.

El desarrollo del protocolo de extracción, y el empleo de UPLC-PDA-ESI-MS permitieron conocer los principales cambios de EPs y NEPs durante la infección local en raíces de plántulas y plantas de *C. chinense*. La respuesta en el sitio de infección se caracterizó por la acumulación de NEPs mientras que la respuesta sistémica por la acumulación de EPs. Por primera vez, se reporta la acumulación de EPs como N-cafeoyol putrescina en frutos como parte de la respuesta sistémica cuando la infección es originada en las raíces de plantas de *C. chinense*.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

El análisis mediante UPLC-PDA-ESI-MS es una herramienta que puede ser empleada para evaluar el cambio de compuestos fenólicos frente a diversos factores de estrés biótico y abiótico en el medio ambiente, e incluso puede ser utilizada como una herramienta de diagnóstico y monitoreo en cultivos comerciales como *C. chinense*, sin embargo, primero se recomienda realizar una serie de estudios exhaustivos que permitan correlacionar el cambio específico en el perfil de compuestos fenólicos frente a otro tipo de alteraciones medioambientales.

El análisis de EPs y NEPs permite realizar sugerencias acerca de la significancia de los compuestos fenólicos en el mecanismo de defensa de *C. chinense*, por lo que, es requerido correlacionar esta información con la actividad de diferentes enzimas como POD, PAL y PPO, así como el contenido ROS durante la infección producida por *P. ultimum* para poder realizar una discusión más concluyente. Además, es recomendable evaluar el efecto de los diferentes compuestos fenólicos acumulados en *C. chinense* durante la infección para corroborar si estos tienen algún efecto inhibitorio sobre el crecimiento y desarrollo de *P. ultimum*.

TRABAJOS DERIVADOS DE LA TESIS

PUBLICACIONES EN REVISTAS

- Herrera-Pool, E., Patrón-Vázquez, J., Ramos-Díaz, A., Ayora-Talavera, T., Pacheco, N. 2019. Extraction and identification of phenolic compounds in roots and leaves of *Capsicum chinense* by UPLC-PDA/MS. Journal of Bioengineering and Biomedicine Research. 3 (2), 17-27.
- Herrera-Pool, E., Ramos-Díaz, A. L., Ayora-Talavera, T., Cuevas-Bernardino, J.C., Medina-Torres, N. C., Alonzo-Solís, E. A., Pacheco, N. “Solvents polarity effect on the extraction of phenolic compounds from habanero pepper leaves (*Capsicum chinense*) and its identification by UPLC-PDA-ESI-MS/MS. Sometido en Journal of Agricultural and Food Chemistry (Febrero, 2019; En revision)
- Herrera-Pool, E., Ramos-Díaz, A. L., Ayora-Talavera, T. D., Cuevas-Bernardino, J. C., Lizardi-Jiménez, M. A., Pacheco, N. “cambios en el contenido y perfil de compuestos fenólicos en *C. chinense* en respuesta a la infección en raíces producida por el oomiceto fitopatógeno *P. ultimum*” (En preparación)

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- Presentación de cartel: Herrera-Pool, I. E., Ríos-Velázquez, T., Patrón-Vázquez, J. A., Ramos-Díaz, A. L., Pacheco, N. “Evaluation of polyphenols and capsaicinoids content during the infection by a pathogenic complex (*Colletotrichum* sp. – *Pythium* sp.) in fresh fruits of habanero pepper (*Capsicum chinense*)” XVII National Congress on Plant Biochemistry and Molecular Biology. X Joint Mexico – U. S. Symposium. Puerto Vallarta, Jalisco, México del 13 al 17 de noviembre de 2017.
- Presentación de cartel: Herrera-Pool, I. E., Patrón-Vázquez, J. A. Ramos-Díaz, A. L., Ayora-Talavera, T. D., Pacheco, N. “Analysis of polyphenolic compounds in roots and leaves of *Capsicum chinense* by UPLC-PDA/MS” X International Congress on Biochemical Engineering and the XVI Biomedicine and Molecular Biotechnology Scientific Meetings. Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos, A. C. (CMIBQ, A. C.). Mérida, Yucatán, México del 21 al 23 de mayo de 2018.
- Trabajo en extenso y presentación de cartel: Herrera-Pool, I. E., Ramos-Díaz, A. L., Ayora-Talavera, T. D., Cuevas-Bernardino, J. C., Lizardi-Jiménez, M. A., Pacheco, N. “Efecto de la polaridad de solvente sobre el contenido de compuestos fenólicos y la variación de color en extractos de fruto y hoja de Chile habanero (*Capsicum chinense* var. Chichen Itza)”. XL Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A. C. (AMIDIQ, A. C.). Huatulco, Oaxaca, México del 7 al 10 de mayo de 2019.

ESTANCIA INTERNACIONAL

- Estancia Internacional en departamento de nutrición y ciencias de los alimentos de Texas A&M University, College Station, Texas, EE. UU. a cargo de la Dra. Susanne Talcott. Evaluación de actividad biológica y análisis mediante espectrometría de masas de extractos crudos de compuestos fenólicos . Del 20 de febrero al 21 de marzo de 2019.

REFERENCIAS

- 1) “Chile habanero de la península de Yucatán (*Capsicum chinense* Jacq.) especificaciones y métodos de prueba”. NORMA Oficial Mexicana NOM-189-SCFI-2017. Diario Oficial de la Federación, 25 de mayo de 2017.
- 2) Abu – Reidah, I. M.; Ali-Shtayeh, M. S.; Jamous, R. M.; Arráez – Roman, D.; Segura-Carretero, A. 2015. Comprehensive metabolite profiling of *Arum palaestinum* (Araceae) leaves by using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Food Research International*. 70, 74-86.
- 3) Abu – Reidah, I. M.; Arráez-Román, D.; Quirantes-Piné, R.; Fernández-Arroyo, S.; Segura-Carretero, A.; Fernández – Gutiérrez, A. 2012. HPLC – ESI – Q – TOF – MS for a comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in cucumber whole fruit extract. *Food Research International*. 46, 108 – 117.
- 4) Abu-Reidah, I. M.; Arraez-Roman, D.; Segura-Carretero, A.; Fernandez-Gutierrez, A. 2013b. Extensive characterization of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC – DAD – ESI – QTOF – MS. *Food Chemistry*. 2013, 141, 2269-2277.
- 5) Abu-Reidah, I. M.; Contreras, M. M.; Arráez-Román, D.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. 2013a. Reversed – phase ultra – high – performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization – quadrupole – time – of – flight mass spectrometry as a powerful tool for metabolic profiling of vegetables: *Lactuca sativa* as an example of its application. *Journal of Chromatography A*. 1312, 212 – 227.
- 6) Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. 2013. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*. 152, 46-55.
- 7) Agati, G., Azzaello, E., Pollastri, S., Tattini, M. 2012. Flavonoids as antioxidant in plants: Location and functional significance. *Plant Science*. 196, 67-76.
- 8) Ahuja, I., Kissen, R., Bones, A. M. 2011. Phytoalexins against pathogens. *Trens in Plant Science*. 17 (2), 73-90.
- 9) Alonso-Carrillo, N., Aguilar-Santamaría, M. A., Vernon-Carter, E. J., Jiménez-Alvarado, R., Cruz-Sosa, F., Róman-Guerrero, A. 2017. Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ulltrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Industrial Crops & Product*. 103, 213-221.
- 10) Álvarez, A.; Fayos-Fernández, J., Monzó-Cabrera, J., Cocero, M. J., Mato, R. B. 2017. Measurement and correlation of the dielectric properties of a grape pomace extraction media. Effect of temperature and composition. *Journal of Food Engineering*. 197, 98-106.
- 11) Arreola-Cortés, A., Castro-Mercado, E., Lozoya-Gloria, E., García-Pineda, E. 2007. Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induce by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 70, 69-76.
- 12) Badri, D. V., Vivanco, J. M. 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*. 32 (6), 666-681.

- 13) Bae, H., Jayaprakasha, G. K., Crosby, K., Yoo, K. S., Leskovar, D. I., Jifon, J., Patil, B. 2014. Ascorbic acid, capsaicinoids and flavonoid aglycone concentrations as a function of fruit maturity stage in greenhouse grown peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33 (2), 195-202.
- 14) Bae, H., Jayaprakasha, G. K., Jifon, J., Patil, B. S. 2012a. Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. *Food Chemistry*. 134, 1912-1918.
- 15) Bae, H.; Jayaprakasha, G. K.; Jifon, J.; Patil, B. S. 2012b. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry*. 133, 751-758.
- 16) Baetz, U., Martinoia, E. 2014. Root exudate: the hidden part of plant defense. *Trend in Plant Science*. 19 (2), 90-98.
- 17) Barros-Rios, J., Santiago, R., Jung, H. J. G., Malvar, R. A. 2015. Covalent Cross-Linking of Cell Wall Polysaccharides through Esterified Diferulates as a Maize Resistance Mechanism against Corn Borers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63 (8), 2206-2214.
- 18) Bassard, J. E., Ullmann, P., Bernier, F., Werck-Reichhart, D. 2010. Phenolamides: Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry*. 71, 1808-1824.
- 19) Baumert, A.; Mock, H. P.; Schmidt, J.; Herbers, K.; Sonnewald, U.; Strack, D. 2001. Patterns of phenylpropanoids in non – inoculated and potato virus Y – Inoculated leaves of transgenic tobacco plants expressing yeast – derived invertase. *Phytochemistry*. 56 (6), 535-541.
- 20) Beckman, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57, 101-110.
- 21) Bernards, M. A., Fleming, W. D., Llewellyn, D. B., Priefer, R., Yang, X., Sabatino, A., Plourde, G. L. 1999. Biochemical Characterization of the Suberization-Associated Anionic Peroxidase of Potato. *Plant Physiology*. 121, 135-145.
- 22) Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapiere, C., Pollet, B., Legrand, M. 2007. Flavonoid Accumulation in Arabidopsis Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *The Plant Cell*. 19, 148-162.
- 23) Bosland, P. W., Baral, J. B. 2007. “Bhut Jolokia” The World’s Hottest Known Chile Pepper is a Putative Naturally Occurring Interspecific Hybrid. *HorScience*. 42 (2), 222-224.
- 24) 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 (5), 574-579.
- 25) Caamal-Chan, M. G., Souza-Perera, R., Zúñiga-Aguilar, J. J. 2011. Systemic induction of a *Capsicum chinense* nitrate reductase by infection with *Phytophthora capsici* and defence phytohormones. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49, 1238-1243.
- 26) Camacho-Cristobal, J. J; Lunar, L.; Lafont, F.; Baumert, A; González-Fontes, A. Boron deficiency causes accumulation of chlorogenic acid and caffeoyl polyamine conjugates in tobacco leaves. *Journal of Plant Physiology*. 161 (7), 879-881.

- 27) Campos, L., Lisón, P., López-Gresa, M. P., Rodrigo, I., Zacarés, L., Conejero, V., Bellés, J. M. 2014. Transgenic Tomato Plants Overexpressing Tyramine N-hydroxycinnamic Acid Amide Levels and Enhanced Resistance to *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 27 (10), 1159-1169.
- 28) Cao, S., Chen, H., Xiang, S. Hong, J., Weng, L., Zhu, H., Liu, Q. 2015. Anti-Cancer Effects Mechanisms of Capsaicin in Chili Peppers. *American Journal of Plant Sciences*. 6, 3075-3081.
- 29) Chatterton, S., Sutton, J. C., Boland, G. J. 2004. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. *Biological Control*. 30 (2), 360-373.
- 30) Chellemi, D. O. 2006. Effect of urban plant debris and soil management practices on plant parasitic nematodes, *Phytophthora* blight and *Pythium* root rot of bell pepper. *Crop Protection*. 25 (10), 1109-1116.
- 31) Chen, L., Kang, Y-H. 2013. Anti-inflammatory and antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum* L.) stalk extracts: Comparison of pericarp and placenta extracts. *Journal of Functional Foods*. 5 (4), 1724-1731.
- 32) Cocuron, J. C., Casas, M. I., Yang, F., Grotewold, E., Alonso, A. P. 2019. Beyond the wall: High-throughput quantification of plant soluble and cell-wall bound phenolics by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1589, 93-104.
- 33) Covarrubias-Cárdenas, A. G., Martínez-Castillo, J. I., Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., García-Cruz, N. U., Pacheco, N. 2018. Antioxidant Capacity and UPLC-PDA-ESI-MS Phenolic Profile of *Stevia rebaudiana* Dry Powder Extracts Obtained by Ultrasound Assisted Extraction. *Agronomy Journal*. 8 (9), 170.
- 34) Dai, G. H., Nicole, M., Andary, C., Martínez, C., Bresson, E., Boher, B., Daniel, J. F., Geiger, J. P. 1996. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 49, 285-306.
- 35) De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., Álvarez-Parrilla, E. 2019. Phenolic Compounds. In: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elhadi M. Yahia, editors. 1ra ed. Elsevier Inc, 253-271. ISBN 978-0-12-813278-4.
- 36) Desikan, E., Reynolds, A., Hancock, J. T., Neill, S. J. 1998. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochemical Journal*. 330, 115-120.
- 37) Días, A. L. B., Sergio, C. S. A., Santos, P., Barbero, G. F., Rezende, C. A., Martínez, J. 2017. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moca (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 198, 34-44.
- 38) Díaz, J., Bernal, A., Pomar, F., Merino, F. 2001. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science*. 161, 179-188.

- 39) Domínguez-Rodríguez, G., Marina, M. L., Plaza, M. 2017. Strategies for the extraction and analysis of non-extractable polyphenols from plants. *Journal of Chromatography A*. 1514, 1-15.
- 40) Dong, X., Gao, Y., Chen, W., Wang, W., Gong, L., Liu, X., Luo, J. 2015. Spatiotemporal Distribution of Phenolamides and the Genetics of Natural Variation of Hydroxycinnamoyl Spermidine in Rice. *Molecular Plant*. 8, 111-121.
- 41) Du, Y., Chu, H., Wang, M., Chu, I. K., Lo, C. 2010. Identification of flavone phytoalexins and pathogen-inducible flavone synthase II gene (*SbFNSII*) in sorghum. *Journal of Experimental Botany*. 61 (4), 983-994.
- 42) Gayoso, C., Pomar, F., Merino, F., Bernal, M. A. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae*. 102, 1-13.
- 43) Gilardi, G., Baudino, M., Moizio, M., Pugliese, M., Garibaldi, A., Gullino, M. L. 2013. Integrated management of *Phytophthora capsici* on bell pepper by combining grafting and compost treatment. *Crop Protection*. 53, 13-19.
- 44) Gómez-Romero, M.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*. 71 (16), 1848–1864
- 45) González-Estrada, T., Casanova-Chávez, C., Gutiérrez-Pacheco, L., Torres-Tapia, L., Contreras-Martín, F., Peraza-Sánchez, S. 2011. “Chiles cultivados en Yucatán” Duran, R., Méndez, M. (Eds.). *Biodiversidad y Desarrollo humano en Yucatán*. México: CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA, p.p. 342-344.
- 46) Graça, J. 2015. Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*. 3, 1-11.
- 47) Grotewold, E. 2004. The challenges of moving chemicals within and out of cell insights into the transport of plant natural products. *Planta*. 219, 906-909.
- 48) Gu, F., Wu, G., Fang, Y., Zhu, H. 2018. Nontargeted Metabolomics for Phenolic and Polyhydroxy Compounds Profile of Pepper (*Piper nigrum* L.) Products Based on LC-MS/MS Analysis. *Molecules*. 23 (8), 1985.
- 49) Guan-Lin, C., Zhang, X., Song-Gen, C., Men-Di, H., Yong-Qing, G. 2017. Antioxidant activities and contents of free, esterified and insoluble-bound phenolics in 14 subtropical fruits leaves collected from south of China. *Journal of Functional Foods*. 30, 290-302.
- 50) Gupta, P., De, B. 2017. Differential responses of cell wall bound phenolic compounds in sensitive and tolerant varieties of rice in response to salinity. *Plant Signaling & Behavior*. 12 (10), 1559-2324.
- 51) Gutiérrez-Gómez, C., Carrillo-Ávila, E., Landeros-Sánchez, C., Coh-Méndez, D., Monsalvo-Espinosa, A., Arreola-Enríquez, J., Pimentel-López, J. 2018. Soil moisture tension as an alternative for improving sustainable use of irrigation water for habanero chilies (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agricultural Water Management*. 204, 28-37.
- 52) Hansen, C. M. 2007. *Hansen solubility Parameters: A User's Handbook*. Charles M. Hansen. CRC., Press, Boca Raton, FL, 38. ISBN 978-0-84-937248-3

- 53) Harris, A. R. 1999. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* on *Capsicum* by *Trichoderma koningii* in potting medium. *Microbiological Research*. 154 (2), 131-135.
- 54) Hoyong, K., Vinueza, N. R., Kelley, S. S., Park, S. 2018. Correlation between solubility parameter and recovery of phenolic compounds from fast pyrolysis bio-oil by diesel extraction. *Carbon Resources Conversion*. 1, (3), 238-244.
- 55) Hu-zhe, Z., Chun-Ian, C., Yu-Ting, Z., Dan, W., Yu, J., Kil-Yong, K. 2005. Active changes of lignification-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Xhejiang University Science*. 6 (8), 778-786.
- 56) Iiyama, K., Lam, T. B. T., Stone, B. A. 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiology*. 104, 315-320.
- 57) Jayawardana, H. A. R. K., Weerahewa, H. L. D., Saparamadu, M. D. J. S. 2016. The mechanisms underlying the anthracnose disease reduction by rice hull as a silicon source in capsicum (*Capsicum annuum* L.) grown in simplified hydroponics. *Food Science*. 6, 147-150.
- 58) Jean-Christophe, C., Casas, M. I., Yang, F., Grotewold, E., Alonso, A. P. 2019. Beyond the wall: High-throughput quantification of plant soluble and cell-wall bound phenolics by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1589, 93-104.
- 59) Jiang, Z. Q., Guo, Y. H., Li, S. M., Qi, H. Y., Guo, J. H. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of treatment of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper. *Biological Control*. 36 (2), 216-223.
- 60) Jørgensen, M. E., Nour-Eldin, H. H., Halkier, B. A. 2015. Transport of defense compounds from sources to sink: lessons learned from glucosinolates. *Trends in Plant Science*. 20 (8), 508-514.
- 61) Jousset, A., Rochat, L., Lanoue, A., Bonkowski, M., Keel, C., Scheu, S. 2011. Plants Respond to Pathogen Infection by Enhancing the Antifungal Gene Expression of Root-Associated Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24 (3), 352-359.
- 62) Jouyban, A., Soltanpour, S., Chan, H. K. 2004. A simple relationship between dielectric constant of mixed solvent with solvent composition and temperature. *International Journal of Pharmaceutics*. 269 (2), 353-360.
- 63) Juárez, I., Ludwig, I. A., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., Rio, D. D., Cid, C., De Peña, M-P. 2016. Catabolism of raw and cooked Green pepper (*Capsicum annuum*) (poly)phenolic compounds after simulated gastrointestinal digestion and fecal fermentation. *Journal of Functional Foods*. 27, 201-213.
- 64) Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J. D. G., Judelson, H. S., Ali, G. S., Dalio, R. J. D., Roy, S. G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., Cahill, D., Ruocco, M., Figueiredo, A., Chen, X. R., Hulvey, J., Stam, R., Lamour, K., Gijzen, M., Tyler, B. M., Grünwald, N. J., Mukhtar, M. S., Tomé, D. F. A., Tör, M., Akerveken, G. V. D., McDowell, J., Daayf, F., Fry, W. E., Lindqvist – Kreuze, H., Meijer, H. J. G., Petre, B., Ristaino, J., Yoshida, K., Birch, P. R. J., Govers, F. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 16 (4), 413-434.

- 65) Kim, K. D., Nemeč, S., Musson, G. 1997. Effects of composts and soil amendments soil microflora and *Phytophthora* root and crown rot of bell pepper. *Crop Protection*. 16 (2), 165-172.
- 66) Kim, W. R., Kim, E. O, Kang, K., Oidovsambuu, S., Jung, S, H., Kim, B. S., Nho, C. W., Um, B. H. 2014. Antioxidant Activity of Phenolics in Leaves of Three Red Pepper (*Capsicum annuum*) Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 850-859
- 67) Kuhn, B. M., Geisler, M., Bigler, L., Ringli, C. 2011. Flavonols Accumulate Asymmetrically and Affect Auxin Transport in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 156, 585-595.
- 68) Kushalappa, A. C., Yogendra, K. N., Karre, S. 2016. Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 35 (1), 38-55.
- 69) Lamb, C., Dixon, R. A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48, 251-275.
- 70) Le Roy, J., Huss, B., Creach, A., Hawkins, S., Neutelings, G. 2016. Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants. *Frontiers in Plant Science*. 7, 735.
- 71) León-Chan, R. G., López-Meyer, M., Osuna-Enciso, T., Sañudo-Barajas, J. A., Basilio-Heredia, J., León-Félix, J. 2017. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany*. 139, 143-151.
- 72) Loizzo, M. R., Pugliese, A., Bonese, M., Menichini, F., Tundis, R. 2015. Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. *Food Science and Technology*. 64, 623-631.
- 73) Long-Ze, L.; James, H.; Shengmin, L. 2007. Detection and Quantification of Glycosylated Flavonoid Malonates in Celery, Chinese Celery, and Celery Seed by LC – DAD – ESI/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (4), 1321 – 1326.
- 74) Madani, B., Mirshekari, A., Imahori, Y. 2019. Physiological Responses to Stress. In: *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elhadi M. Yahia, editors. 1ra ed. Elsevier Inc, 405-423. ISBN 978-0-12-813278-4.
- 75) Mandal, S., Mitra, A., Malick, N. 2009. Time course study on accumulation of cell wall-bound phenolics and activities of defense enzymes in tomato roots in relation to Fusarium wilt. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25 (5), 795-802.
- 76) Mandal, S., Mitra, Adinpunya. 2008. Accumulation of cell wall-bound phenolic metabolites and their upliftment in hairy root cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Biotechnology Letters*. 30, 1253-1258.
- 77) Marín, A.; Ferreres, F.; Tomás – Barberán, F. A.; Gil, M. I. 2004. Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3861 – 3869.
- 78) Materska, M., Konopacka, M., Rogoliński, J., Śłosarek, K. 2015. Antioxidant activity and protective effects against oxidative damage of human cells induced by X-radiation

- of phenolic glycosides isolated from pepper fruits *Capsicum annuum* L. Food Chemistry. 168, 546-553.
- 79) Materska, M., Perucka, I. 2005. Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53, 1750-1756
 - 80) Medina-Torres, N.; Ayora-Talavera, T.; Espinosa-Andrews, H.; Sánchez-Contreras, A.; Pacheco, N. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. Agronomy Journal. 2017, 7 (3), 47.
 - 81) Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A. 2014. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. Frontiers in Plant Science. 5, 358.
 - 82) Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. Molecules. 19 (10), 16240-16265.
 - 83) Mikulic-Petkovsek, M.; Schmitzer, V.; Jakopic, J.; Cunja, V.; Veberic, R.; Munda, A.; Stampar, F. 2013. Phenolic compounds as defence response of pepper fruits to *Colletotrichum coccodes*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 84, 138-145.
 - 84) Moco, S.; Bino, R. J.; Vorst, O.; Verhoeven, H. A.; De Groot, J.; Van Beek, T. A.; Vervoort, J.; De Vos, C. H. R. 2006. A liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolome Database for Tomato. Plant Physiology. 141 (4), 1205-1218
 - 85) Moore, W. 1958. Use of an approximate dielectric constant in solubility studies. Journal of Pharmaceutical Sciences. 51, 391-392.
 - 86) Morales-Soto, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; García-Salas, P.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. 2013. High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annuum* L.) samples. Food Research International. 51, 977-984.
 - 87) Mudrić, S.; Gašić, U. M.; Dramićanin, A. M.; Ćirić, I.; Milojković-Opsenica, D. M.; Popović-Đorđević, J. B.; Momirović, N. M.; Tešić, Ž. L. 2017. The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika. Food Chemistry. 217, 705-715.
 - 88) Naczk, M., Shahidi, F. 2006, Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetable: Extraction and Analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 41 (5), 1523-1542.
 - 89) Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F. A., Naushin, F. 2019. Role and Regulation of Plant Phenolics in Abiotic Stress Tolerance: An Overview. In: Plant Signaling Molecules. Khan, M. I. R., Reddy, P. S., Ferrante, A., Khan, N. A., editors. 1ra ed. Elsevier Inc, 157-168. ISBN 978-0-12-816451-8.
 - 90) Novo, M., Silvar, C., Merino, F., Martínez-Cortés, T., Lu, F., Ralph, J., Pomar, F. 2017. Deciphering the role of the phenylpropanoid metabolism in the tolerance of *Capsicum annuum* L. to *Verticillium dahlia* Kleb. Plant Science. 258, 12-20.
 - 91) Oweng-Going, T. N., Beninger, C. W., Sutton, J. C., Hall, J. C. 2008. Accumulation of phenolic compounds in plants and nutrient solution of hydroponically grown peppers inoculated with *Pythium aphanidermatum*. Canadian Journal of Plant Pathology. 30 (2), 214-225.

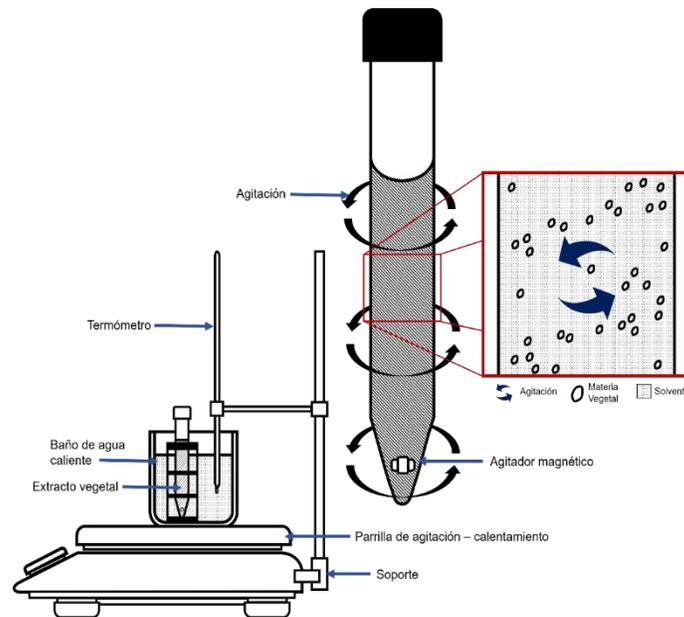
- 92) Park, S.; Jeong, W. Y.; Lee, J. H.; Kim, Y. H.; Jeong, S. W.; Kim, G. S.; Bae, D. W.; Lim, C. S.; Jin, J. S.; Lee, S. J.; Shin, S. C. 2012. Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 130, 981-985.
- 93) Pérez-Jiménez, J., Torres J. L. 2011. Analysis of Nonextractable Phenolic Compounds in Foods: The Current State of the Art. *Journal of Agricultural al Food Chemistry.* 59 (24), 12713 – 12724.
- 94) Petruša, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Pauti, S., Vianello, A. 2013. Plant Flavonoids-Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Science.* 14 (7), 14950-14973.
- 95) Plazonić, A.; Bucar, F.; Maleš, Željan; Mornar, A.; Nigović, B.; Kujundžić, N. 2009. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*Caucalis platycarpos* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules.* 14, 2466-2490.
- 96) Razem, F. A., Bernards, M. A. 2002. Hydrogen Peroxide Is Required for Poly(phenolic) Domain Formation during Wound-Induced Suberization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50 (5), 1009-1015.
- 97) Rybińsk-Fryca, A., Sosnowska, A., Puzyn, T. 2018. Prediction of dielectric constant of ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids.* 260, 57-64.
- 98) Sachadyn-Król, M.; Materska, M.; Chilczuk, B.; Karás, M.; Jakubczyk, A.; Perucka, I.; Jackowska, I. 2016. Ozone-induced changes in the content of bioactive compounds and enzyme activity during storage of pepper fruits. *Food Chemistry.* 211, 59-67.
- 99) Sánchez-Rodríguez, E.; Ruiz, J. M.; Ferreres, F.; Moreno, D. A. Phenolic profiles of cherry tomatoes as influenced by hydric stress and rootstock technique. *Food Chemistry.* 2012, 134 (2), 775-782.
- 100) Santiago, R., López-Malvar, A., Souto, C., Barros-Rios, J. 2018. Methods for Determining Cell Wall-Bound Phenolics in Maize Stem Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 66 (5), 1279-1284.
- 101) Schnablová, R., Synková, H., Vičanková, A., Burketová, L., Eder, J., Cvikrová, M. 2006. Transgenic *ipt* tobacco overproducing cytokinins overaccumulates phenolic compounds during in vitro growth. *Plant Physiology and Biochemistry.* 44, 526-534.
- 102) Serra, O., Chatterjee, S., Figueras, M., Molinas, M., Stark, R. E. 2015. Deconstructing a Plant Macromolecular Assembly: Chemical Architecture, Molecular Flexibility, And Mechanical Performance of Natural and Engineered Potato Suberins. *Biomacromolecules.* 15, 799-811.
- 103) Serrano-Pérez, P., Roskopf, E., Santiago, A. D., Rodríguez-Molina, M. C. 2017. Anaerobic soil disinfestation reduces survival and infectivity of *Phytophthora nicotianae* chlamydospores in pepper. *Scientia Horticulturae.* 215, 38-48.
- 104) Shirsath, S. R., Sonawane, S. H., Gogate, P. R. 2012. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations – A review of current status. *Chemical Engineering and Processing.* 53, 10-23.

- 105) Singleton, V. L.; Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic – Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.
- 106) Snyder, L. R. 1978. Classification of the solvent properties of common liquids. *Journal of Chromatographic Science*. 16 (6), 223-234.
- 107) Soto, M. L., Falqué, E., Domínguez, H. 2015. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. *Cosmetics*. 2 (3), 259-276.
- 108) Spínola, V.; Pinto, J.; Castilho, P. C. 2015. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC – DAD – ESI - MSn and screening for their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 173, 14-30.
- 109) Tang, Y., Zhang, B., Li, X., Chen, P. X., Zhang, H., Liu, R., Tsao, R. 2016. Bound phenolics of Quinoa Seeds Released by Acid, Alkaline, and Enzymatic Treatments and Their Antioxidant and α -Glucosidase and Pancreatic Lipase Inhibitory Effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (8), 1712-1719.
- 110) Thines, M., Kamoun, S. (2010). Oomycete-plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (4), 427-433.
- 111) Topuz, A., Ozdemir, F. 2007. Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 20 (7), 596-602.
- 112) Torras-Claveria, L., Jáuregui, O., Codina, C., Tiburcio, A. F., Bastida, J., Viladomat, F. 2012. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. *Plant Science*. 182, 71-78.
- 113) Ueeda, M., Kubota, M., Nishi, K. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67 (3-5), 149-154.
- 114) Vallverdú-Queralt, A.; Jáuregui, O.; Di Lecce, G.; Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R. M. 2011. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF). *Food Chemistry*. 129, 877-883,
- 115) Van West, P., Appiah, A. A., Gow, N. A. R. 2003. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62, 99-113.
- 116) Verma, N.; Shukla, S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 2015, 2 (4), 105 – 113.
- 117) Wallace, G., Fry, S. 1994. Phenolic Components of the Plant Cell Wall. *International Review of Cytology*. 151, 229-267.
- 118) Wang, X., Chen, K., Yao, J., Li, H. 2016. Recent progress in studies on polarity of ionic liquids. *Science China Chemistry*. 59 (5), 517-525.
- 119) WIPO, World Intellectual Property Organization URL: (<https://www.wipo.int/wipolex/es/details.jsp?id=9314>) (30 NOV 2018)

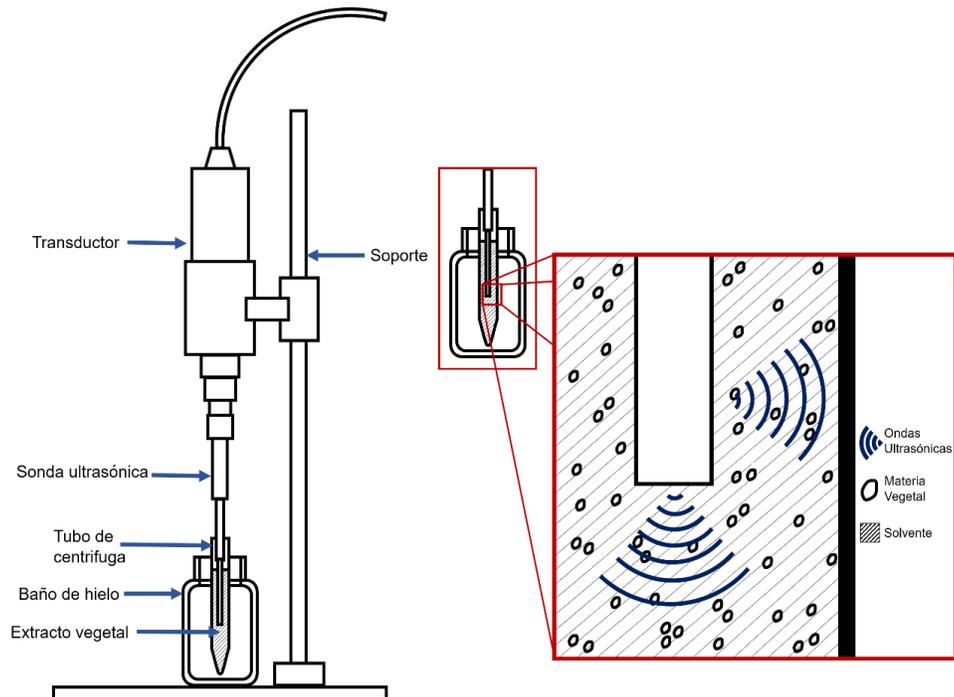
- 120) Woo-Jin, J., Yu-Lan, J., Young-Cheol, K., Kil-Yong, K., Ro-Dong, P., Tae-Hwan, K. 2004. Inoculation of *Paenibacillus illinoisensis* alleviates root mortality, activates of lignification-related enzymes, and induction of the isozymes in pepper plants infected by *Phytophthora capsici*. *Biological Control*. 30, 645-652.
- 121) Yoshihara, T., Yamaguchi, K., Takamatsu, S., Sakamura, S. 1981. A New Lignan Amide, Grossamide, from Bell Pepper (*Capsicum annuum* var. *grossum*). *Agricultural and Biological Chemistry*. 45 (11), 2593-2598.
- 122) Yu, M., Yang, L., Xue, Q., Yin, P., Sun, L., Liu, Y. 2019. Comparison of Free, Esterified, and Insoluble -Bound Phenolics and Their Bioactivities in Three Organs of *Lonicera japonica* and *L. macranthoides*. *Molecules*. 24, 970.
- 123) Yücel, S. 1995. A study in soil solarization and combined with fumigant application to control *Phytophthora* Crown blight (*Phytophthora capsici* Leonian) on peppers in the East Mediterranean region of Turkey. *Crop Protection*. 14 (8), 653-655.
- 124) Zerillo, M. M., Adhikari, B. N., Hamilton, J. P., Buell, C. R., Lévesque, C. A., Tisserat, N. 2013. Carbohydrate – Active enzymes in *Pythium* and their role in plant cell wall storage polysaccharide degradation. *PLoS ONE*, 8 (9), 1-14.
- 125) Zhao, J. 2015. Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in Plant Science*. 20 (9), 576-585.

ANEXOS

1. Esquematzación del sistema de extracción convencional



2. Esquematzación del sistema de extracción asistida por ultrasonido



3. Análisis estadísticos de la extracción de compuestos fenólicos solubles (EPs)

ANOVA multifactorial (EPs-Hoja) (Figura 1.1)

Análisis de Varianza - Suma de Cuadrados Tipo III					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente de extracción	3686.61	9	409.623	170.21	0.0000
B: Método de extracción	25.4005	1	25.4005	10.55	0.0019
INTERACCIONES					
AB	161.167	9	17.9075	7.44	0.0000
RESIDUOS	139.578	58	2.40651		
TOTAL (CORREGIDO)	4012.17	77			

Análisis de Componentes de Varianza (EPs-Hoja)

Análisis de Varianza para CFT (Hoja)					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Comp. Var.</i>	<i>Por ciento</i>
TOTAL (CORREGIDO)	4012.17	77			
Solvente de extracción	3686.61	9	409.623	50.1656	88.44
Método de extracción	185.988	10	18.5988	4.15186	7.32
ERROR	139.578	58	2.40651	2.40651	4.24

ANOVA multifactorial (EPs-Tallo) (Figura 1.2)

Análisis de Varianza para CFT - Suma de Cuadrados Tipo III					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente (Tallo)	367.247	5	73.4494	39.59	0.0000
B: Método (Tallo)	14.7187	1	14.7187	7.93	0.0078
INTERACCIONES					
AB	5.0214	5	1.00428	0.54	0.7436
RESIDUOS	66.7821	36	1.85506		
TOTAL (CORREGIDO)	453.769	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de Componentes de Varianza (EPs-Tallo)

Análisis de Varianza para CFT (Tallo)					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Comp. Var.</i>	<i>Por ciento</i>
TOTAL (CORREGIDO)	453.769	47			
Solvente de extracción	367.247	5	73.4494	8.76992	79.84
Método de extracción	19.7401	6	3.29001	0.358739	3.27
ERROR	66.7821	36	1.85506	1.85506	16.89

ANOVA multifactorial (EPs-Raíz) (Figura 1.2)

Análisis de Varianza - Suma de Cuadrados Tipo III					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Solvente de extracción	27.5484	5	5.50967	4.43	0.0030
B: Método de extracción	68.9604	1	68.9604	55.45	0.0000
INTERACCIONES					
AB	3.52533	5	0.705067	0.57	0.7246
RESIDUOS	44.769	36	1.24358		
TOTAL (CORREGIDO)	155.655	47			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de Componentes de Varianza (EPs-Raíz)

Análisis de Varianza para CFT (Raíz)					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Comp. Var.</i>	<i>Por ciento</i>
TOTAL (CORREGIDO)	155.655	47			
Solvente de extracción	36.3834	5	7.27668	0.0	0.00
Método de extracción	74.5029	6	12.4171	2.85688	69.67
ERROR	44.769	36	1.24358	1.24358	30.33

ANOVA simple (EPs-Fruto) (Figura 1.3)

Tabla ANOVA para CFT (Fruto)					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5620.41	9	624.49	263.74	0.0000
Intra grupos	118.392	50	2.36784		
Total (Corr.)	5738.8	59			

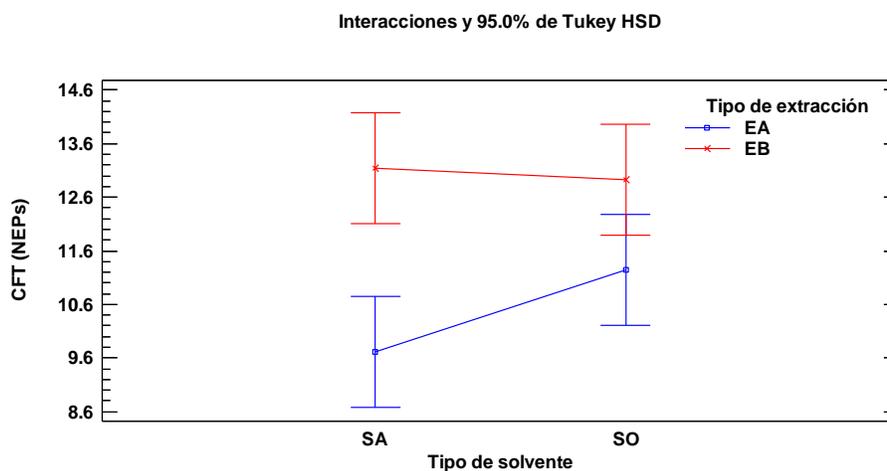
4. Análisis estadísticos de la extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs)

ANOVA multifactorial (NEPs-Hoja) (Figura 1.5)

Análisis de Varianza - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de solvente	1.74901	1	1.74901	1.81	0.2029
B:Tipo de extracción	26.1888	1	26.1888	27.17	0.0002
INTERACCIONES					
AB	3.03631	1	3.03631	3.15	0.1013
RESIDUOS	11.5671	12	0.963927		
TOTAL (CORREGIDO)	42.5412	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Gráfico de interacciones (NEPs-Hoja)

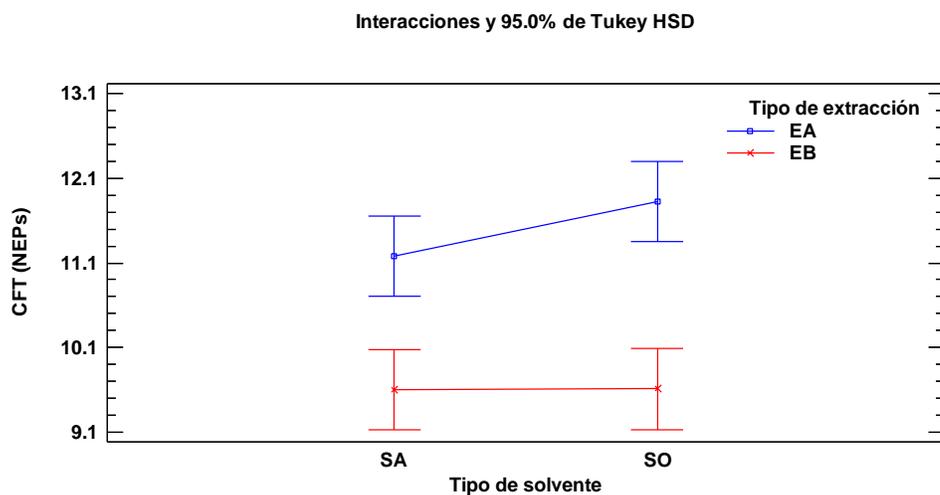


ANOVA multifactorial (NEPs-Tallo) (Figura 1.5)

Análisis de Varianza - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de solvente	0.4356	1	0.4356	2.13	0.1704
B:Tipo de extracción	14.5161	1	14.5161	70.88	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.403225	1	0.403225	1.97	0.1859
RESIDUOS	2.45765	12	0.204804		
TOTAL (CORREGIDO)	17.8126	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Gráfico de interacciones (NEPs-Tallo)

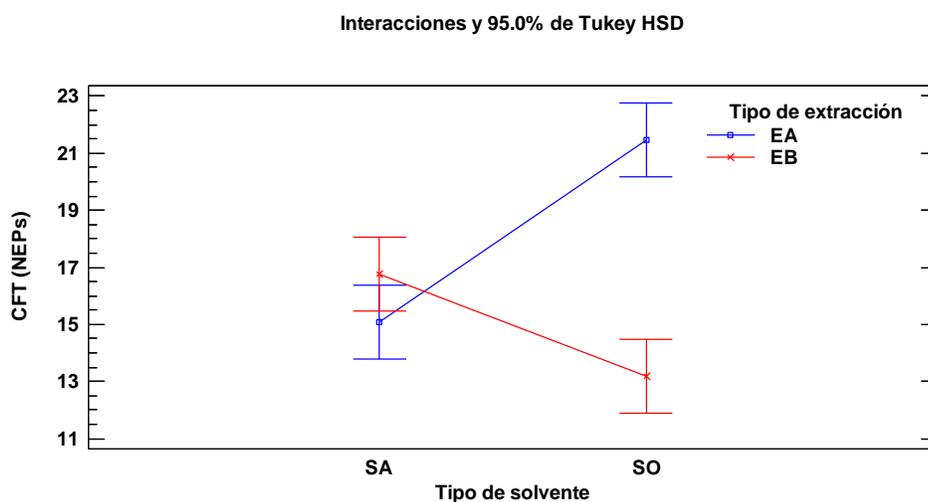


ANOVA multifactorial (NEPs-Raíz) (Figura 1.5)

Análisis de Varianza - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo de solvente	7.82601	1	7.82601	5.21	0.0414
B:Tipo de extracción	43.3293	1	43.3293	28.87	0.0002
INTERACCIONES					
AB	99.4508	1	99.4508	66.25	0.0000
RESIDUOS	18.0127	12	1.50106		
TOTAL (CORREGIDO)	168.619	15			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Gráfico de interacciones (NEPs-Raíz)



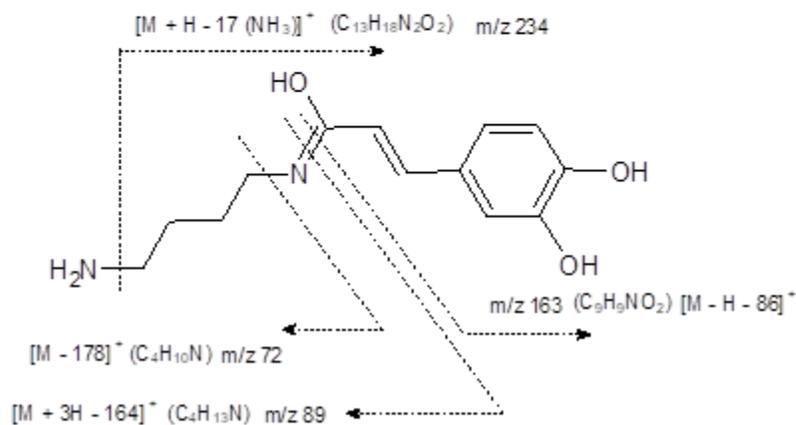
5. Estructura y mecanismo de fragmentación propuesto para compuestos fenólicos identificados en *Capsicum chinense*

N - caffeyol putrescina

Masa monoisotópica: 250.1317 Da

Fórmula Molecular: $C_{13}H_{18}N_2O_3$

λ_{max} : 194, 213, 293, 312

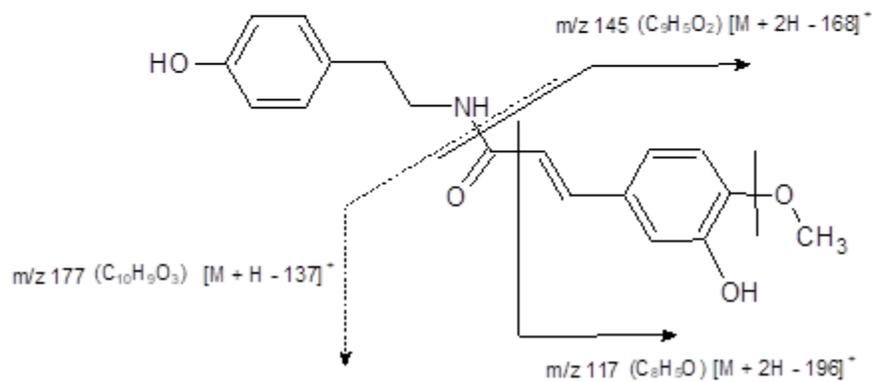


N - ferulyl tiramida

Masa monoisotópica: 314.1342 Da

Fórmula Molecular: $C_{18}H_{19}NO_4$

λ_{max} : 194, 212, 286, 320



Luteolin - 7 - O - glucoside

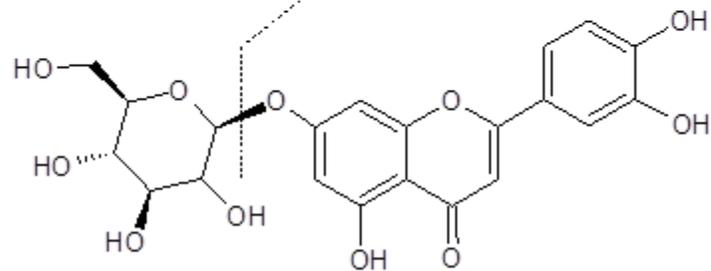
Monoisotopic Mass: 448.1005 Da

Molecular Formula: C₂₁H₂₀O₁₁

[M + 2H - 163]⁺ (C₁₅H₁₁O₆) 287 m/z

[M - H - 163]⁻ (C₁₅H₈O₆) 284 m/z

[M - 163]⁻ (C₁₅H₉O₆) 285 m/z

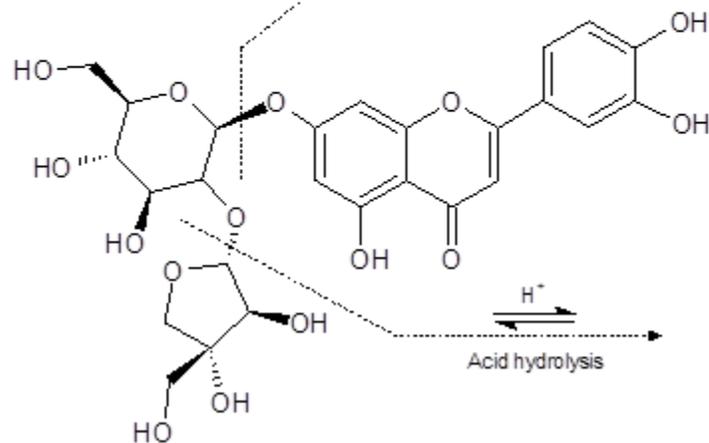


Luteolin - 7 - O - (2 - O apiosyl) hexoside

Monoisotopic Mass: 580.1428 Da

Molecular Formula: C₂₆H₂₈O₁₅

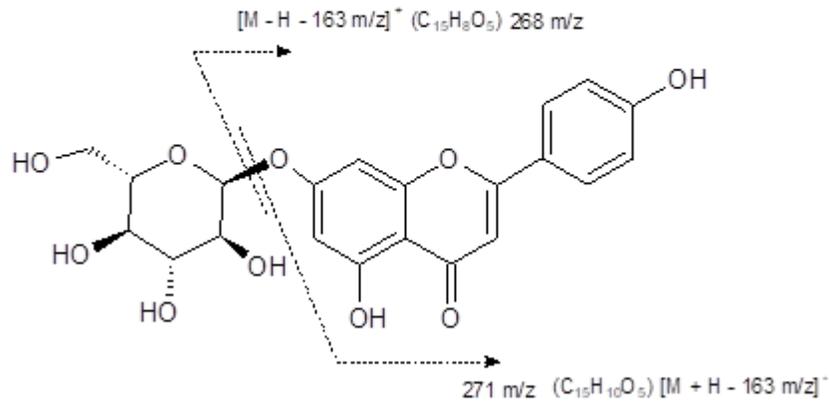
[M + 2H - 295]⁺ (C₁₅H₁₁O₆) 287 m/z



Apigenin - 7 - O - hexoside

Monoisotopic Mass: 432.1056 Da

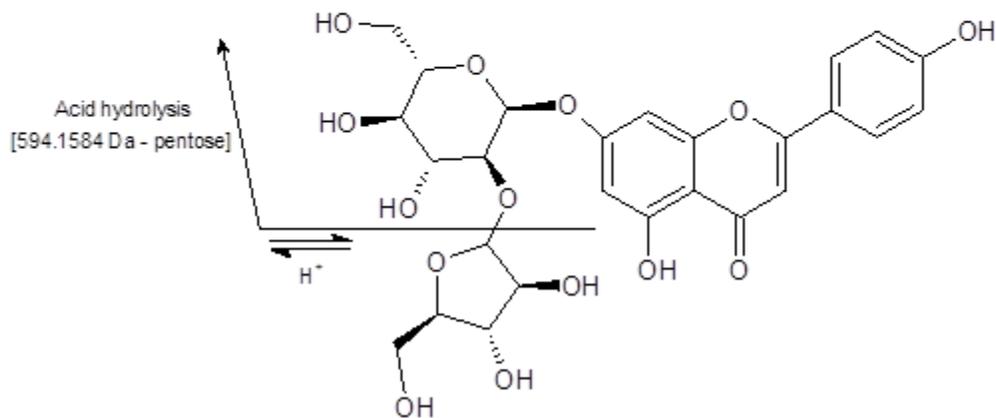
Molecular Formula: C₂₁H₂₀O₁₀



Apigenin - 7 - O - (2 - apiosyl) hexoside

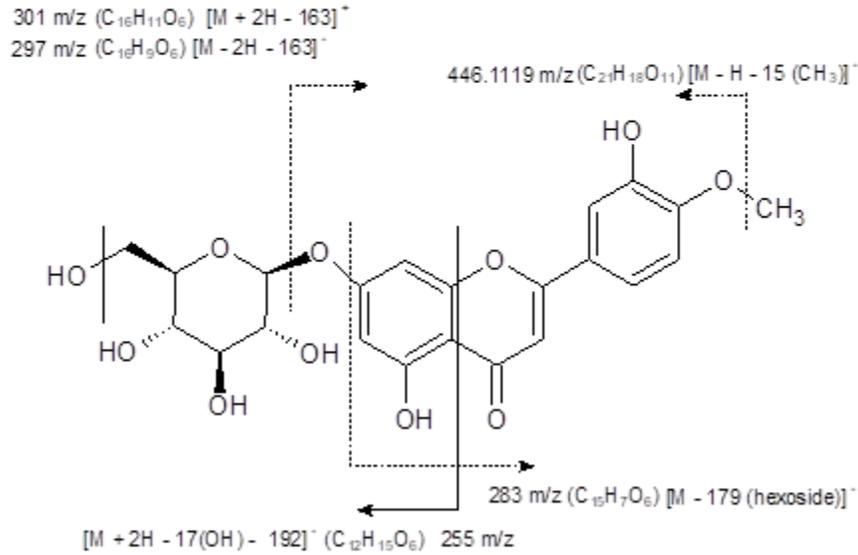
Monoisotopic Mass: 564.1479 Da

Molecular Formula: C₂₆H₂₈O₁₄



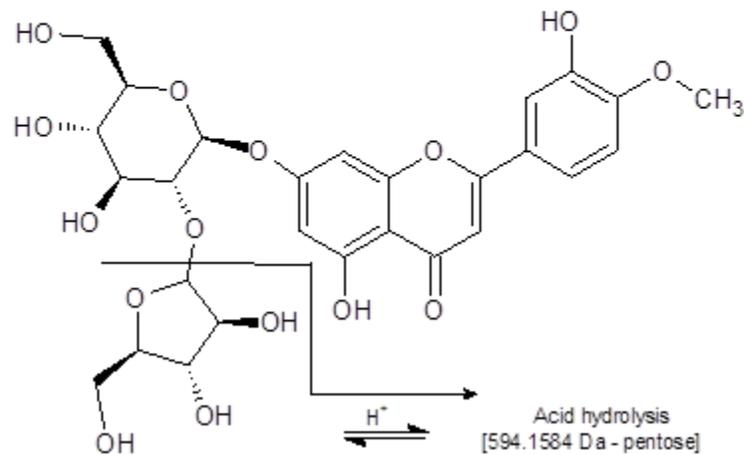
Diosmetin - 7 - O - hexoside

Monoisotopic Mass: 462.1162 Da
Molecular Formula: $C_{22}H_{22}O_{11}$



Diosmetin - 7 - O (2 - O - apiosyl) hexoside

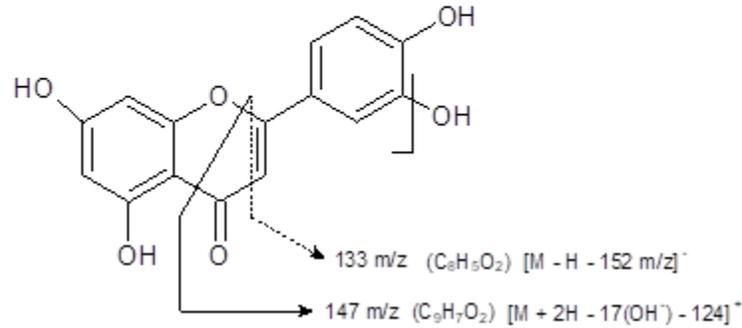
Monoisotopic Mass: 594.1584 Da
Molecular Formula: $C_{27}H_{30}O_{15}$



Luteolin

Monoisotopic Mass: 286.0477 Da

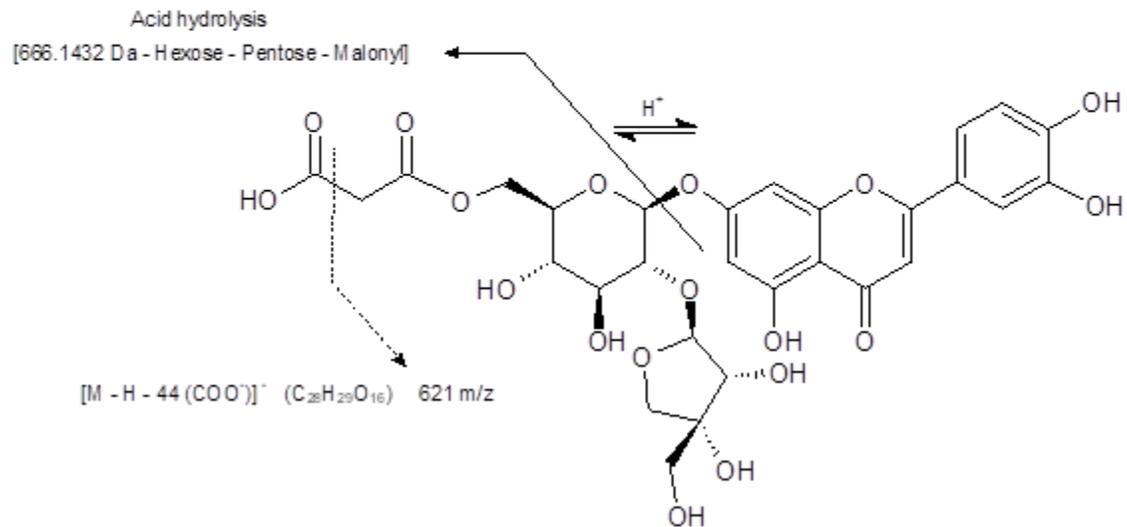
Molecular Formula: $C_{15}H_{10}O_6$



Luteolin - 7 - O - (2 - O - apiosyl - 6 - O - malonyl) - glucoside

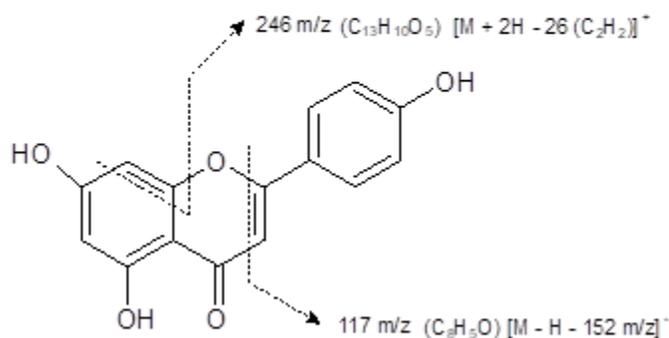
Monoisotopic Mass: 666.1432 Da

Molecular Formula: $C_{29}H_{30}O_{18}$



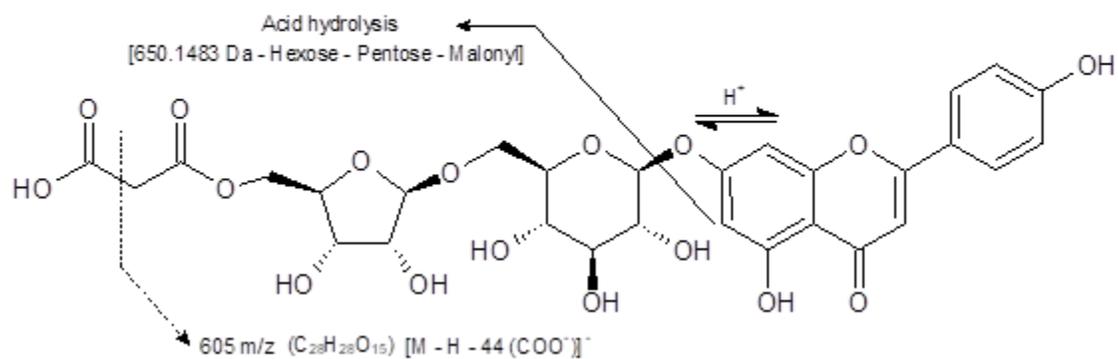
Apigenin

Monoisotopic Mass: 270.0528 Da
Molecular Formula: $C_{15}H_{10}O_5$



Apigenin - 7 - O - (6''malonyl - apiosyl - glucoside)

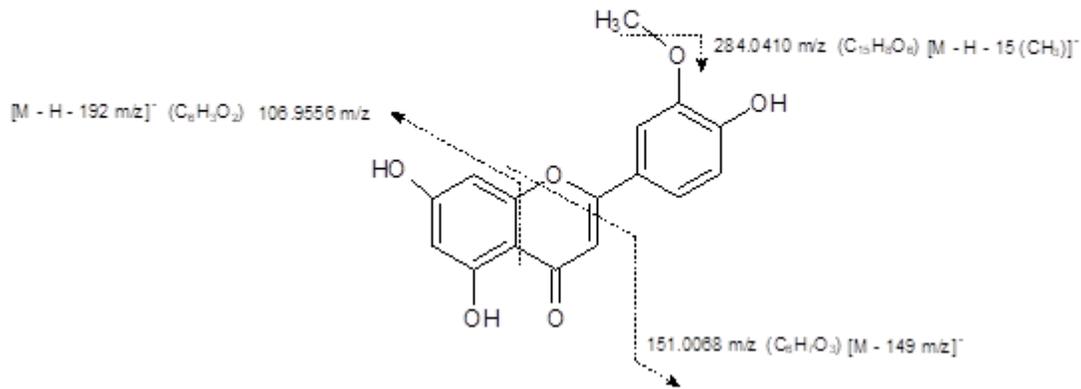
Monoisotopic Mass: 650.1483 Da
Molecular Formula: $C_{29}H_{30}O_{17}$



Chysoeriol

Monoisotopic Mass: 300.0633 Da

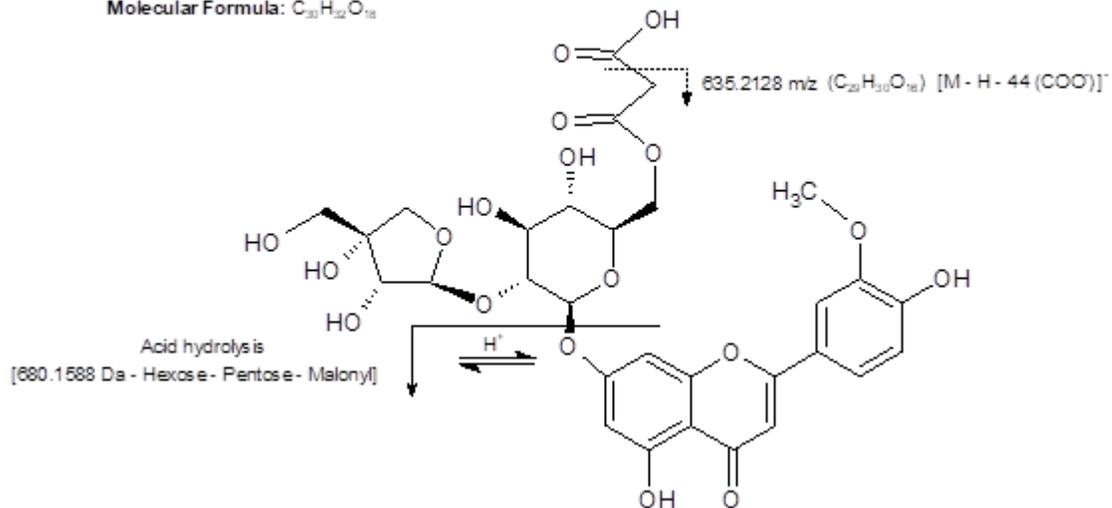
Molecular Formula: $C_{20}H_{12}O_8$



Chysoeriol - 7 - O - (6''malonyl - apiosyl - glucoside)

Monoisotopic Mass: 680.1588 Da

Molecular Formula: $C_{30}H_{32}O_{18}$



6. Análisis estadístico del efecto el solvente de extracción sobre el contenido de los principales fenólicos solubles (EPs) en *Capsicum chinense*

A: N-caffeyol putrescina

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	45786.2	9	5087.35	600.12	0.0000
Intra grupos	169.546	20	8.47728		
Total (Corr.)	45955.7	29			

B: Acido clorogénico

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	52966.9	9	5885.22	694.23	0.0000
Intra grupos	169.546	20	8.47728		
Total (Corr.)	53136.5	29			

C: Lycoperodine 1

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	40832.2	9	4536.91	535.18	0.0000
Intra grupos	169.546	20	8.47728		
Total (Corr.)	41001.8	29			

D: Apigenina-6,8-di-C-hexosido

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	45769.9	9	5085.55	599.90	0.0000
Intra grupos	169.546	20	8.47728		
Total (Corr.)	45939.5	29			

E: Ácido vanílico-4-β-O-glucósido

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	48639.3	9	5404.36	637.51	0.0000
Intra grupos	169.546	20	8.47728		
Total (Corr.)	48808.8	29			

F: Phloretin-5,6-di-C-hexosido

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	50811.6	9	5645.74	665.98	0.0000
Intra grupos	169.546	20	8.47728		
Total (Corr.)	50981.2	29			

G: Luteolina-7-O-(2-apiosil) hexosido

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	52167.7	9	5796.41	797.72	0.0000
Intra grupos	145.325	20	7.26624		
Total (Corr.)	52313.0	29			

H: Apigenina-7-O-(2-apiosil) hexosido

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	54342.8	9	6038.09	997.17	0.0000
Intra grupos	121.104	20	6.0552		
Total (Corr.)	54463.9	29			

I: Diosmetina-7-O-(2-apiosil) hexosido

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	55062.9	9	6118.1	1010.39	0.0000
Intra grupos	121.104	20	6.0552		
Total (Corr.)	55184.0	29			

J: Luteolina-7-O-(2-apiosil-6-malonil) hexosido

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	55047.6	9	6116.39	1010.11	0.0000
Intra grupos	121.104	20	6.0552		
Total (Corr.)	55168.7	29			

K: Apigenina-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	52412.6	9	5823.62	1202.19	0.0000
Intra grupos	96.8832	20	4.84416		
Total (Corr.)	52509.5	29			

L: Chrysoeriol-7-O-(6-malonil-apiosil) hexosido

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	57877.8	9	6430.87	1327.55	0.0000
Intra grupos	96.8832	20	4.84416		
Total (Corr.)	57974.7	29			

7. ANOVA simple y ANOVA multifactorial empleado para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos empleados sobre la extracción de compuestos fenólicos no solubles (NEPs) identificados por UPLC- PDA-ESI-MS.

Compuesto*	ANOVA Simple ^a	Tratamiento (AM, AA, BM, BA) ^b	A: Tipo de extracción (EA, EB) ^c	B: Tipo de solvente (SO, SA) ^c	C: Tejido ^c	Interacciones significativas (p<0.05) ^d
1	0.0000	0.0000	0.0014	0.0000	0.4546	AB, BC, ABC
2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
3	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
4	0.0000	0.0060	0.0000	0.0016	0.0000	AB, AC, BC, ABC
5	0.0000	0.0827	0.0011	0.9341	0.0002	AC, ABC
6	0.0000	0.0183	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
8	0.0000	0.0042	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
10	0.0000	0.0028	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
11	0.0000	0.0027	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
12	0.0000	0.0153	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
13	0.0000	0.0029	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
14	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
15	0.0000	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
16	0.0000	0.0102	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
17	0.0000	0.0104	0.0319	0.0319	0.1516	AB
18	0.0000	0.0027	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
19	0.0000	0.0004	0.0000	0.3348	0.0000	AC, BC, ABC
20	0.0000	0.1796	0.0000	0.0303	0.0000	AC, BC
21	0.0096	0.0007	0.0000	0.2204	0.0000	AC, BC, ABC
22	0.0000	0.0031	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
23	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
24	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0015	AB, AC, BC, ABC
25	0.0000	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
26	0.0000	0.0070	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
27	0.0000	0.0029	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
28	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
29	0.0000	0.0028	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
30	0.0000	0.0062	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
31	0.0000	0.0154	0.0000	0.0005	0.0000	AB, AC, BC, ABC
32	0.0000	0.0028	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
33	0.0000	0.0009	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
34	0.0000	0.0032	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
35	0.0000	0.0064	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
36	0.0000	0.0010	0.0000	0.0009	0.0000	AB, AC, BC, ABC
37	0.0000	0.0021	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
38	0.0000	0.8194	0.0088	0.0043	0.0000	AB, AC, BC, ABC
39	0.0000	0.0137	0.0000	0.1757	0.0000	AC, BC, ABC
40	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	AB, AC, BC, ABC
41	0.0000	0.0229	0.0000	0.0766	0.0000	AC, BC, ABC
42	0.0000	0.0000	0.0000	0.0046	0.0000	AB, AC, BC, ABC

^a ANOVA simple: Análisis de contenido de los diferentes por compuestos identificado en los diferentes tejidos de *C. chinense* (raíz, tallo y hoja) empleando diferentes tratamientos de extracción (*Tabla 2.5), y enlistados de acuerdo a la identificación presentada en la Tabla 2.3 y Tabla 2.4.

^b ANOVA simple: Análisis del efecto por tratamiento (AM, AA, BM, AA mostrados en la Tabla 1.2) sobre el contenido de cada compuesto identificado

^c ANOVA multifactorial; Factor A: Efecto del tipo de extracción por compuesto (EA: extracción ácida, EB: extracción alcalina). Factor B: Efecto del tipo de solventes (SO: solvente orgánico, SA: solvente acuoso). Factor C: Efecto del tejido analizado (raíz, tallo, hoja). ^d Interacción entre los factores A, B, y C (se muestran las dobles y triples interacciones)

*Valor p<0.05 indica diferencias significativas en los análisis presentados.

8. ANOVA del efecto de la infección producida por *Pythium ultimum* sobre el contenido de compuestos fenólicos solubles y no solubles en *Capsicum chinense*

ANOVA simple (EPs en plántulas infectadas y no infectadas - Figura 3.2)

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2620.98	5	524.195	333.12	0.0000
Intra grupos	18.8833	12	1.57361		
Total (Corr.)	2639.86	17			

ANOVA simple (NEPs en plántulas infectadas y no infectadas - Figura 3.3)

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	97.4696	5	19.4939	8.64	0.0011
Intra grupos	27.0664	12	2.25553		
Total (Corr.)	124.536	17			

ANOVA simple (Sumatoria de EPs y NEPs en hojas de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.1)

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	26.2159	1	26.2159	9.65	0.0360
Intra grupos	10.8697	4	2.71742		
Total (Corr.)	37.0856	5			

ANOVA simple (Sumatoria de EPs y NEPs en tallo de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.1)

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.309144	1	0.309144	0.04	0.8597
Intra grupos	34.8123	4	8.70307		
Total (Corr.)	35.1214	5			

ANOVA simple (Sumatoria de EPs y NEPs en raíz de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.1)

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	67.7699	1	67.7699	36.85	0.0037
Intra grupos	7.35703	4	1.83926		
Total (Corr.)	75.1269	5			

ANOVA simple (Sumatoria de EPs y NEPs en frutos de plantas infectadas y no infectadas - Tabla 3.2)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.75515	1	4.75515	2.65	0.1789
Intra grupos	7.17798	4	1.79449		
Total (Corr.)	11.9331	5			

ANOVA simple (EPs en frutos de plantas infectadas y no infectadas - Figura 3.4)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	30.3479	1	30.3479	21.34	0.0099
Intra grupos	5.68837	4	1.42209		
Total (Corr.)	36.0362	5			

ANOVA simple (NEPs en frutos de plantas infectadas y no infectadas - Figura 3.4)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	59.1287	1	59.1287	938.86	0.0000
Intra grupos	0.251916	4	0.062979		
Total (Corr.)	59.3806	5			

ANOVA simple (EPs totales detectados por UPLC-PDA en hoja de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.3)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	4.3683E7	1	4.3683E7	0.58	0.4899
Intra grupos	3.02923E8	4	7.57307E7		
Total (Corr.)	3.46606E8	5			

ANOVA simple (EPs totales detectados por UPLC-PDA en tallo de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.3)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.42813E8	1	2.42813E8	3.58	0.1316
Intra grupos	2.71572E8	4	6.78929E7		
Total (Corr.)	5.14385E8	5			

ANOVA simple (EPs totales detectados por UPLC-PDA en raíz de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.3)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.08607E8	1	2.08607E8	6.48	0.0635
Intra grupos	1.28677E8	4	3.21693E7		
Total (Corr.)	3.37285E8	5			

ANOVA simple (EPs totales detectados por UPLC-PDA en frutos de plantas infectadas y no infectadas - Tabla 3.5)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	9.83187E10	1	9.83187E10	46.78	0.0024
Intra grupos	8.40618E9	4	2.10155E9		
Total (Corr.)	1.06725E11	5			

ANOVA simple (NEPs totales detectados por UPLC-PDA en hoja de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.7)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	415117.	1	415117.	0.02	0.8826
Intra grupos	6.70504E7	4	1.67626E7		
Total (Corr.)	6.74655E7	5			

ANOVA simple (NEPs totales detectados por UPLC-PDA en tallo de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.7)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	2.45937E7	1	2.45937E7	3.24	0.1463
Intra grupos	3.0373E7	4	7.59325E6		
Total (Corr.)	5.49667E7	5			

ANOVA simple (NEPs totales detectados por UPLC-PDA en raíz de plántulas infectadas y no infectadas - Tabla 3.7)

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	528447.	1	528447.	0.04	0.8516
Intra grupos	5.30908E7	4	1.32727E7		
Total (Corr.)	5.36192E7	5			