

50524  
10



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Efecto de intermediarios metabólicos  
de capsaicina sobre la producción  
de capsainoides por células en  
suspensión de Capsicum chinense**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIOLÓGICO**

**PRESENTA:  
GASPAR ALFREDO BARRERA ISLAS**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. GRACIANO CALVA CALVA  
ASESOR DE TESIS: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS**

**MÉXICO, D.F.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**2003**

**A**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

**ESTIMADOS MAESTROS:**

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

**BARRERA ISLAS GASPAR ALFREDO**

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Efecto de intermediarios metabólicos de capsicina sobre la producción de capsaicinoides por células en suspensión de Capsicum chinense**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	DR. JOSE IGNACIO REGLA CONTRERAS
VOCAL	DR. GRACIANO CALVA CALVA
SECRETARIO	M. en C. MA. PATRICIA SHIRLEY DEMARE NEGRETE
SUPLENTE	Q.F.B. EVANGELINA MERCADO MARIN
SUPLENTE	DRA. MABEL CLARA FRAGOSO

*[Handwritten signatures on lines]*

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
MÉXICO, D.F. A 13 de febrero de 2003.

*[Handwritten signature]*  
Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ  
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados  
c.c.p. Interesado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

B

*Dedicatoria*

*A mi Padres por representar a los seres que siempre me han dado todo su amor y apoyo además de guiar mi camino en la vida. Con todo mi amor, respeto y admiración, Gracias.*

*A dos de mis grandes compañeras y amigas: Thalia Torres a quien admiro y respeto; a María de Jesús quien representa para mí uno de los seres más queridos que he conocido.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*Agradecimientos*

*Al Dr. Graciano Calva Calva por su apoyo y sus consejos hacia mi trabajo de tesis así como también por brindarme su amistad.*

*A mis sinodales por sus comentarios y consejos:*

*M. en C. Ma. Patricia Shirley Demare Negrete*

*Dra. Mabel Clara Fragoso*

*Q.F.B. Evangelina Mercado Marin*

*Dr. José Ignacio Regla Contreras*

*A mis compañeros y amigos del laboratorio 19: I.B.Q. Sandra Silva Cervantes; M. en C. Víctor Manuel Martínez Juárez y el M. en C. José Luis Sánchez.*

*A la FES Zaragoza y al CINVESTAV.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*El presente trabajo se realizó en el laboratorio 19 de Ingeniería metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería bajo la dirección del Dr. Graciano Calva Calva y la asesoría del Dr. José Ignacio Regla Contreras por parte de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

**INDICE**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>V</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>I. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>A. CAPSICUM</b>	<b>3</b>
1. Antecedentes	3
2. Composición	3
<b>B. QUIMICA DE LA PUNGENCIA</b>	<b>4</b>
1. Aspectos Generales	4
<b>C. METABOLISMO DEL RESIDUO AROMATICO DE LOS CAPSAICINOIDES</b>	<b>6</b>
1. Definición	6
2. Ruta del Shikimato/Arogenato	7
3. Ruta de la fenilalanina/hidroxycinamato	11
<b>D. BIOSINTESIS DE CAPSAICINOIDES</b>	<b>15</b>
1. Estudios Preliminares	15
2. Sitio de biosíntesis de capsaicinoides	20
3. Perfil de acumulación	21
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>24</b>
<b>III. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>25</b>
<b>IV. HIPOTESIS</b>	<b>25</b>
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>26</b>
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>31</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



---

<b>A. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PERFIL DE CRECIMIENTO DE CELULAS DE <i>Capsicum chinense</i></b>	<b>31</b>
<b>B. EFECTO DEL ALCOHOL VAINILLILICO SOBRE EL PERFIL DE CRECIMIENTO DE CELULAS DE <i>Capsicum chinense</i> EN MEDIO MS Y CH50</b>	<b>33</b>
<b>C. EFECTO DEL ACIDO PROTOCATEQUICO SOBRE EL PERFIL DE CRECIMIENTO DE CELULAS DE <i>Capsicum chinense</i> EN MEDIO MS Y CH50</b>	<b>35</b>
D. PERFIL DE COMPUESTOS FENOLICOS Y ACUMULACION DE CAPSAICINOIDES EN CELULAS DE <i>Capsicum chinense</i> EN MEDIO MS Y CH50	37
1. Cultivos crecidos en medio MS	38
a) Medio de cultivo	38
b) Biomasa de cultivos en MS	41
2. Cultivos crecidos en medio CH50	41
a) Medio de cultivo	41
b) Biomasa de cultivos en CH50	43
<b>E. EFECTO DEL ALCOHOL VAINILLILICO SOBRE EL PERFIL DE COMPUESTOS FENOLICOS EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE <i>Capsicum chinense</i> (CHILE HABANERO)</b>	<b>44</b>
1. Cultivos crecidos en medio MS	44
a) Análisis del medio de cultivo	44
b) Biomasa	47
2. Cultivos crecidos en medio CH50	48
a) Análisis del medio de Cultivo	48
b) Biomasa	50
<b>F. EFECTO DEL ACIDO PROTOCATEQUICO SOBRE EL PERFIL DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS Y CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE <i>Capsicum chinense</i> (CHILE HABANERO)</b>	<b>52</b>
1. Cultivos crecidos en medio MS y CH50 alimentados con acido protocatéquico	53
a) Medio de cultivo	53
b) Biomasa	54
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>59</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>60</b>



---

**ABREVIATURAS**

CH50	Medio MS modificado con el 50% de nitrógeno total
GC	Cromatografía de gases
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución
MS	Medio Murashige y Skoog
mM	milimolar
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido reducido
NaOH	Hidróxido de sodio
PF	Peso fresco
TR	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
$\mu$ M	micromolar
C	Capsaicina
DC	Dihidrocapsaicina
DV	Decilvainillilamida
HC	Homocapsaicina
HDC	Homodihidrocapsaicina
NDC	Nordihidrocapsaicina
NV	nonenolvainillilamida
OV	Octanol vainillilamida

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

En el presente trabajo se investigó el efecto del alcohol vainillílico y del ácido protocatéuico sobre la biosíntesis de capsaicina y compuestos fenólicos relacionados en cultivos *in vitro* de células de *Capsicum chinense* (Chile habanero). También se llevaron a cabo experimentos para la evaluación de variación del medio de cultivo (medio MS y CH50) en las células alimentadas con el precursor. En estos últimos estudios se observó que el cambio del medio de cultivo sólo afectó el perfil de crecimiento de las células cuando se adicionaba ácido protocatéuico en medio CH50 y que la cantidad de biomasa producida fue aproximadamente 50% más elevada que la de las células control. El análisis de compuestos fenólicos y capsaicinoides que se llevó a cabo espectralmente usando un HPLC con detector de barrido en la región UV tanto en el medio de cultivo como en biomasa, reveló que en medio MS las células transformaron el alcohol vainillílico a derivados del ácido vainillínico y vainillina observándose un máximo de transformación a los 15 días, después de los cuales, la cantidad de estos compuestos de transformación disminuyó. Por otro lado, en medio CH50 no se observó la formación de estos compuestos sino que sólo se detectó un compuesto, que por sus propiedades espectrales pudo ser un intermediario hacia la formación de vainillina a partir del alcohol vainillílico y que además permaneció estable durante toda la cinética de crecimiento. En cuanto al análisis de biotransformación del ácido protocatéuico, se observó un patrón constante en el análisis de ambos medios de cultivo y de biomasa. En el medio de cultivo se detectaron escasos picos que exhibieron espectros relacionados a los fenilpropanoides. En biomasa sólo se detectó un pico que exhibió un espectro muy relacionado al del compuesto adicionado, lo que sugiere que es un posible derivado del ácido protocatéuico. La concentración de este pico se ve incrementada en la biomasa crecida en medio CH50, en el cual se produjo un 50% más de biomasa que en las células control. Estos resultados sugieren que este compuesto probablemente está involucrado en alguna estructura como la pared celular. En cuanto a los capsaicinoides, el análisis del medio de cultivo tanto de las células control como las alimentadas con los precursores no mostró ningún compuesto relacionado a

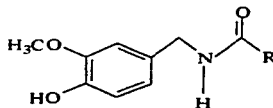
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

capsaicina o a sus homólogos en ninguno de los tiempos de muestreo durante la cinética de crecimiento. Así, estos resultados sugieren que la adición del alcohol vainillílico favoreció el flujo metabólico hacia la formación de otros intermediarios de capsaicinoides como la vainillina, ácido vainillínico, probables conjugados o dímeros de estos intermediarios. Sin embargo no favoreció la formación de capsaicinoides. El ácido protocatéquico fue asimilado por las células, pero aparentemente no fue biotransformado a compuestos relacionados a fenilpropanoides ni capsaicinoides.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCION

La capsaicina (Figura 1) es el componente principal de los capsaicinoides, grupo de compuestos que le confiere la pungencia al fruto del chile (*Capsicum spp.*) (Bennet y Kirby, 1968; Iwai et al., 1977). La biosíntesis de capsaicinoides involucra dos rutas metabólicas: una contribuye a la formación del ácido graso y la otra a la formación del componente aromático (Leete y Loudon, 1968). La parte de la ruta que provee el residuo aromático es compartida con la ruta general de los fenilpropanoides, que es común en todas las plantas. Esta ruta incluye la formación de un rango amplio de compuestos fenólicos, como cinamatos, benzoatos, flavonoides, cumarinas, taninos, fenólicos de pared celular y sustancias relacionadas con la lignina. Todos estos compuestos compiten con los capsaicinoides por precursores bioquímicos y enzimas comunes a la ruta de los fenilpropanoides (Sukrasno y Yeoman, 1992).

TIPICACION  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 1.** Estructura de la Capsaicina, (E)-N-[(4-hidroxi-3-metoxifenil)-metil]-8-metil-6-nonenamida (Merck Index, 1996).

Las últimas etapas de la ruta de biosíntesis del residuo aromático de los capsaicinoides, especialmente a partir de la transformación del ácido ferúlico a vainillilamina, son sólo encontradas en frutos (Iwai et al., 1977), y en cultivos *in vitro* de *Capsicum spp.* que sintetizan capsaicinoides (Calva et al., 1995). La formación de vainillilamina a partir de ácido ferúlico no ha sido completamente demostrada ya que no se han podido detectar las enzimas ni los intermediarios metabólicos involucrados, quizá debido a que el recambio de estos intermediarios podría ser muy rápido, manteniéndose en concentraciones indetectables. Un hecho muy importante es que la vainillilamina libre tampoco ha sido encontrada en ninguna variedad de *Capsicum*, lo que sugiere que puede haber una vía metabólica alterna a la reportada para la biosíntesis de capsaicinoides.

Experimentos de adición de precursores de capsaicina a cultivos de células en suspensión, explantes de placenta e inyección a frutos de *Capsicum* (Calva et al., 1995, 1997) sugieren que la biosíntesis de capsaicinoides compite con la acumulación de sustancias como proteínas, lignina y otras derivadas de los fenilpropanoides. Es así como la fracción fenólica de la pared celular puede actuar como un mecanismo de competencia por los precursores fenilpropanoides de la capsaicina. Si esto es verdad, la adición de este tipo de precursores o intermediarios metabólicos relacionados, a cultivos de células en suspensión de *Capsicum* podría incrementar la producción de capsaicinoides o la acumulación de sus derivados metabólicos respectivos.

Con base en lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de algunos de esos precursores metabólicos hipotéticos de capsaicina, tales como el alcohol vainillílico y el ácido protocatéquico, así como el medio de cultivo utilizado. Con base a los resultados se exploró también la posibilidad de la existencia de una vía teórica alterna para la biosíntesis de capsaicinoides además de la formación y acumulación de fenilpropanoides y capsaicinoides.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

## L ANTECEDENTES

### A. CAPSICUM

#### 1. Antecedentes

El nombre *Capsicum* se deriva del término "Kapso" que quiere decir "picar o picante" en referencia a la pungencia. También puede ser derivado del latín "Capsa", refiriéndose a la forma de la vaina del fruto (Heiser y Smith, 1953). Entre diversas especies, *Capsicum* (chile) aparenta tener el uso más antiguo y hay evidencia de que estos frutos fueron ingeridos por los primeros pobladores de México alrededor del año 7000 a. C. De acuerdo con Heiser hay evidencias de que entre el año 5200 y 3400 a. C., los indígenas sembraban estas plantas, que podrían ser las especies cultivadas más antiguas en América. A finales del siglo XVI y a principios del XVII, el cultivo de *Capsicum* se propagó de América a las regiones de Europa Central y el Mediterráneo.

Los chiles son utilizados como alimentos y condimentos. En la mayoría de países, el sabor dulce o no pungente de algunas variedades es utilizado para la preparación de ensaladas. Al mismo tiempo, *Capsicum* ha tenido una importancia considerable en la medicina tradicional: se utilizan como analgésicos contra el reumatismo o neuritis y para la inflamación de la garganta. (Heiser y Smith, 1953).

A causa de su rápida distribución en varias áreas del mundo desde los siglos XV y XVI, las formas cultivadas han sido bien estudiadas pero su clasificación no es muy clara, debido a la gran cantidad de especies encontradas. No obstante, sólo se han descrito cinco especies cultivadas en América: *C. pendulum*, *C. pubescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. annuum* (Ochoa y Malagón, 2001).

#### 2. Composición

Los carbohidratos, proteínas, grasas y fibra son los componentes mayores de los frutos. La ceniza soluble en agua forma la mayor parte de la ceniza total, indicando que *Capsicum* es una fuente importante de minerales. La fructosa, glucosa y galactosa son los azúcares reductores principales que contiene el chile, siendo la fructosa y glucosa de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



mayor contenido representando un 70% de los azúcares totales. Su valor nutricional recae particularmente en su alto contenido de vitamina C —el fruto maduro contiene de 150 a 180 mg/100 g de peso fresco—. El ácido cítrico es el ácido con mayor frecuencia, los otros son el succínico, fumárico, málico y quinico. Los chiles también son fuente de vitamina A y B. El contenido de vitamina E depende del estado de madurez y de factores genéticos (Govindarajan, 1985).

## B. QUIMICA DE LA PUNGENCIA

### 1. Aspectos Generales

Los frutos de *Capsicum* han sido valorados por miles de años por darle un sabor especial a la carne y cereales insípidos y por sus efectos terapéuticos. Estos efectos han sido relacionados con los componentes que estimulan la pungencia. Thresh en 1846 reportó la cristalización de estos compuestos y los nombró capsaicina (Govindarajan, 1986).

Los tipos más picosos de chiles son utilizados por la industria farmacéutica en la preparación de bálsamos estimulantes y para contrarrestar la irritación en aplicación externa y en formulaciones orales para disipar la flatulencia y estimular el apetito. El principio activo, considerado primero como una sola sustancia, "capsaicina", en realidad es una mezcla de dos homólogos no saturados y tres saturados con estructura básica N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)alquil amida (Figura 2). Con técnicas espectrales se comprobó la existencia de dos homólogos menores y tres análogos en la naturaleza. Esta mezcla es ahora llamada capsaicinoides, en donde la capsaicina y la dihidrocapsaicina son los componentes predominantes con un 80 a 90%. El contenido y composición de capsaicinoides varía entre las especies de *Capsicum* (Tabla 1).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

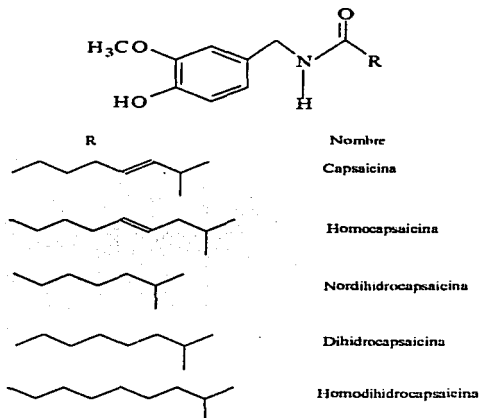


Figura 2. Estructura de los capsaicinoides y sus análogos (Govindarajan, 1986).

Tabla 1. Composición de frutos de diversas variedades de *Capsicum* (% en peso seco) (Govindarajan, 1986).

Especies	Muestra	OV	NDC	Porcentajes de Capsaicinoides					
				NV	C	DC	DV	HC	HDC
<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i> L.	1	0.63	13.96	0.67	49.66	34.52	0.55	/	/
	2	0.09	8.35	1.8	44.63	36.02	4.17	/	4.94
	3	/	3.45	1.29	64.86	29.47	0.93	/	/
<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	4	/	3.75	1.24	37.35	54.64	1.57	/	1.45
<i>C. frutescens</i> L.	5	/	0.55	0.35	66.97	28.73	0.66	2.32	0.42
<i>C. chinense</i>	6	0.54	6.04	1.06	61.66	24.75	1.44	2.73	1.79
<i>C. pubescens</i>	7	/	3.47	1.23	36.57	45.97	0.68	/	12.08
	8	0.42	8.42	1.78	29.78	46.62	8.61	/	4.38

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En dos de las especies más ampliamente cultivadas, *C. annuum* var. *annuum* y *C. frutescens*, el contenido total de capsaicinoides en peso seco varía desde 0.1 a 1% y 0.4-1.0% respectivamente. La relación de los dos homólogos mayores en la mezcla, capsaicina a dihidrocapsaicina varía de 3:2 aproximadamente. Los capsaicinoides cristalinos funden a 64-65° C, siendo muy poco solubles en agua, pero más solubles en aceites y grasas. La capsaicina y dihidrocapsaicina aportan casi la misma pungencia, mientras que los análogos varían de un 30 hasta un 70% del valor de los componentes principales (Govindarajan y Sathyanarayana, 1991).

La capsaicina (Fig. 1), que produce la pungencia más alta, tiene tres rasgos estructurales característicos: el agrupamiento 4-hidroxi-3-metoxi benzil (vainillil), la longitud y ramificación de la cadena alquílica y el enlace amida. Las revisiones hechas por diversos investigadores (ver por ejemplo Govindarajan y Sathyanarayana, 1991) indican que:

- Cualquier cambio en uno o más de sus rasgos estructurales disminuyen ó desaparecen la pungencia. Compuestos formados por otras bases, tales como guasilamina, etanolamina y pirrolidina, dan débil pungencia.
- Cambios en la sustitución del 4-hidroxi-3-metoxi del grupo aromático, tal como un grupo dimetoxi, dimetileno o un cambio en la posición 2,3, no producen pungencia.
- El carbonilo presente en la capsaicina es esencial para la pungencia.
- La longitud de la cadena alquílica que conserva la actividad pungente, varía generalmente en rango de 7 a 11 carbonos. Compuestos con una cadena más corta o con cadenas más ramificadas producen poca o nula pungencia.

## C. METABOLISMO DEL RESIDUO AROMÁTICO DE LOS CAPSAICINOIDES

### 1. Definición

El metabolismo aromático de las plantas, del cual se deriva la vainillilamina de los capsaicinoides, es un proceso bioquímico que no tiene complemento en los sistemas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

mamíferos (Hrazdina, 1992). El proceso es largo, complejo, e involucra tres procesos metabólicos: de carbohidratos, proteínas y lípidos.

Ese metabolismo consiste de tres rutas: la *ruta del shikimato*, que produce los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano; *la ruta fenilpropanoide* que produce diversas cumarinas, los derivados del ácido cinámico y un componente estructural de la planta, la lignina; y *la ruta flavonoide* que produce los flavonoides (Hrazdina, 1992). Se ha sugerido que las tres vías funcionan como una sola unidad metabólica y que no hay síntesis de fenilpropanoides sin fenilalanina, que es el producto de la ruta del shikimato, y la síntesis de flavonoides no puede tomar lugar sin p-coumaril-CoA que es producido por la ruta de los fenilpropanoides. En *Capsicum*, la síntesis de la vainillilamina de los capsaicinoides también procede de la ruta del shikimato.

## 2. Ruta del Shikimato/Arogenato

Esta ruta provee de tres aminoácidos aromáticos, L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano (Figura 3). Estos aminoácidos son precursores de hormonas del tipo auxina y varios tipos de compuestos como los fenilpropanoides. La secuencia de reacciones que forman fenilalanina y tirosina necesita al menos de 11 enzimas (cuadro 1).

**Cuadro 1. Enzimas principales de la ruta Shikimato/Arogenato**

- E1-1: 2-dehidro-3-deoxifosfoheptonato aldolasa (DAHP sintasa).
- E1-2: 3-dehidroquinato sintasa.
- E1-3: 3-dehidroquinato deshidratasa.
- E1-4: Shikimato 3-deshidrogenasa.
- E1-5: Shikimato-quinasa.
- E1-6: 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (EPSP sintasa).
- E1-7: Corismato sintasa.
- E1-8: Corismato mutasa.
- E1-9: Prefenato aminotransferasa.
- E1-10: Arogenato deshidrogenasa.
- E1-11: Arogenato deshidratasa.

TESIS CON  
FALLA EN EL  
GEN

La ruta empieza con dos reacciones de condensación, formando el esqueleto básico del ciclohexano (Figura 3).

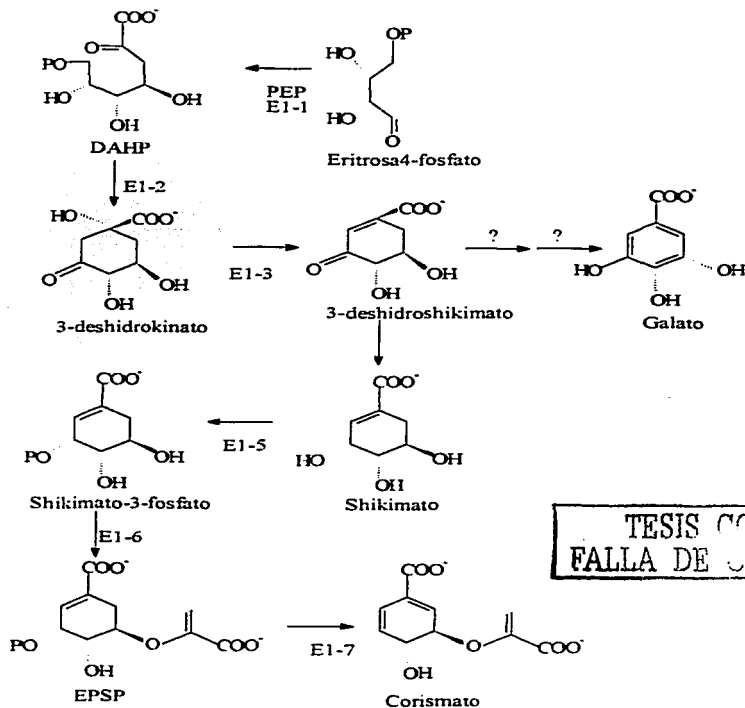


Figura 3. Ruta del Shikimato (Strack, 1997; para las claves E1-1 a E1-7, ver cuadro 1).

La primera reacción (condensación aldol intermolecular), catalizada por la enzima E1-1, es la condensación de eritrosa 4-fosfato con fosfoenolpiruvato. El producto es el azúcar

C<sub>7</sub> de cadena abierta; el 2-deoxiarabinoheptuloso-7-fosfato (DAHP). El segundo paso es la conversión de DAHP hacia 3-deshidroquinato (E1-2). Esta es una secuencia compleja de reacciones que involucran una oxidación, una  $\beta$ -eliminación, una reducción y una condensación aldólica intramolecular para formar la estructura cíclica. Una reducción final dependiente de NADH conduce hacia 3-deshidroquinato el cual es después *cis* deshidratado por la enzima E1-3 a 3-deshidros hikimato. Este último puede tomar dos vías: ser transformado a galato o reducido por una deshidrogenasa dependiente de NADPH (E1-4) a shikimato. Después de una fosforilación (C<sub>5</sub>) (E1-5), el shikimato reacciona con PEP (EPSP sintasa; E1-6) para producir el éter 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP). El siguiente paso en esta ruta es la eliminación del fosfato del EPSP catalizada por la corismato sintasa (E1-7) para formar corismato. A partir de este compuesto, las actividades enzimáticas subsiguientes crean la primera bifurcación del metabolismo aromático de las plantas (Figura 4). La reacción de antranilato sintasa conduce a la síntesis de triptófano, mientras la reacción de la corismato mutasa (E1-8) conduce a la ramificación de la síntesis de fenilalanina y tirosina.

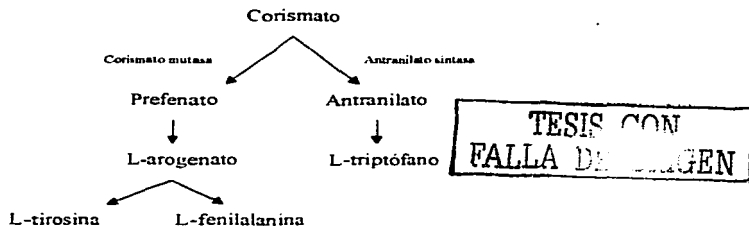


Figura 4. Perfil de la ruta del shikimato/arogenato que forma a los aminoácidos aromáticos en plantas superiores (Strack, 1997).

En *Escherichia coli* y otras bacterias, tanto la tirosina como la fenilalanina son formados directamente del fenilpiruvato e hidroxifenilpiruvato (Figura 5). El fenilpiruvato es

formado del pefrenato por una hidrolasa descarboxilante (pefrenato deshidratasa) y por una reacción de aminotransferasa hacia fenilalanina, mientras el hidroxifenilpiruvato es formado por una oxidoreductasa dependiente de  $\text{NAD}^+$  descarboxilante que conduce, por una reacción de aminotransferasa, hacia tirosina.

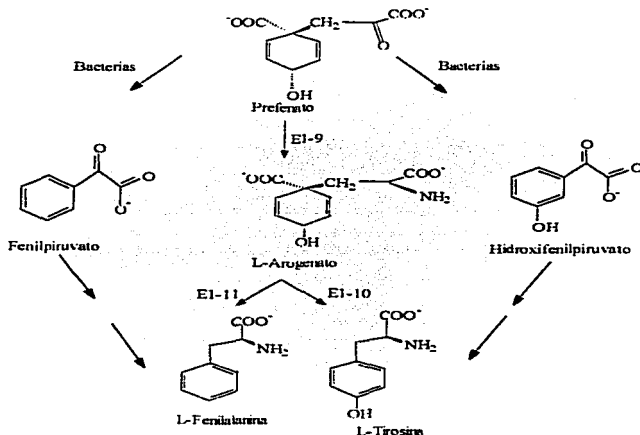


Figura 5. Biosíntesis de fenilalanina y tirosina en *E. coli* y plantas superiores (Strack, 1997).

Aparentemente, los eucariotes y algunos procariotes usan arogenato como precursor intermediario de estos aminoácidos. La ruta del arogenato es la ruta característica hacia fenilalanina y tirosina en plantas superiores. La conversión de pefrenato hacia arogenato es catalizada en presencia de glutamato por la pefrenato aminotransferasa dependiente de 5'-fosfato pindoxal (EI-9). Las dos subsiguientes ramas desde el arogenato son

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

controladas por las enzimas arogenato deshidrogenasa (E1-10) y arogenato deshidratasa (E1-11), que catalizan la formación de tirosina y fenilalanina, respectivamente (Figura 5).

### 3. Ruta de la fenilalanina/hidroxicinamato

Esta ruta es referida como "metabolismo general de los fenilpropanoides" (Figura 6), que conduce la fenilalanina a los hidroxicinamatos y sus formas activadas: los tioésteres de coenzima A (CoA) y los 1-O-acilglucósidos. Los últimos se acumulan en algunas plantas como conjugados típicos del hidroxicinamato. El cuadro 2 lista siete enzimas (E2-1 a E2-7) que catalizan algunas reacciones de esta ruta.

**Cuadro 2.** Enzimas de la ruta de los fenilpropanoides

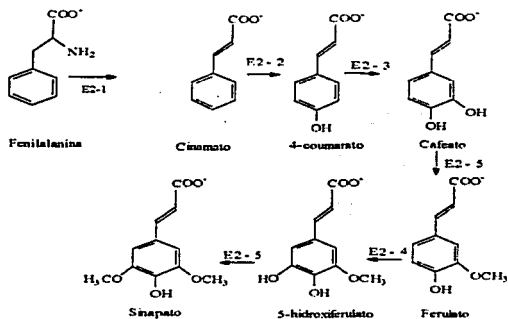
- |   |
|---|
| E2-1: Fenilalanina amonio-liasa (PAL)                               |
| E2-2: Cinamato 4-hidroxilasa.                                       |
| E2-3: 4-cumarato 3-hidroxilasa; (monofenol monooxigenasa; fenolasa) |
| E2-4: Ferulato 5-hidroxilasa.                                       |
| E2-5: Cafeato/5-hidroxiferulato metiltransferasa.                   |
| E2-6: Hidroxicinamatoil-CoA ligasa.                                 |
| E2-7: Hidroxicinamato O-glucosiltransferasa.                        |

Por ejemplo, la metilación e hidroxilación del cinamato catalizada por las enzimas E2-2 a E2-5 conduce a la formación secuencial de los hidroxicinamatos comunes (Figura 6). Estos son el 4-cumarato, cafeato, ferulato y sinapato. El 5-hidroxiferulato es el sustrato para la formación del sinapato. Los hidroxicinamatos en la naturaleza se encuentran en la forma *trans* (E)-isómeros, derivados del E-cinamato. (Strack, 1997).

Las hidroxilasas E2-2 y E2-3 pertenecen a las monooxigenasas, también referidas como oxidasas de función mixta, las cuales introducen un átomo sencillo de oxígeno molecular hacia el sustrato. Un segundo sustrato que se requiere es el NADPH u otro donador de electrones. La fenolasa 4-cumarato hidroxilasa (E2-3) introduce un segundo grupo hidroxilo en la posición *orto* del 4-cumarato. Esto conduce a la pérdida del protón *orto*. La tercera actividad hidroxilasa es la ferulato hidroxilasa (E2-4).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Figura 6.** Biosíntesis de hidroxicinamatos por hidroxilaciones secuenciales y reacciones de metilación (Strack, 1997).

La metilación del cafeato e hidroxiferulato forma ferulato y sinapato respectivamente. La enzima E2-5 utiliza S-adenosil-L-metionina (SAM) como donador de metilo. Durante la transferencia del metilo, SAM es convertida a SAH (S-adenosil-L-homocisteína). SAH puede ser el sustrato para una hidrolasa conduciendo a adenosina y L-homocisteína. Esto favorece la formación de productos metoxilados (Strack, 1997).

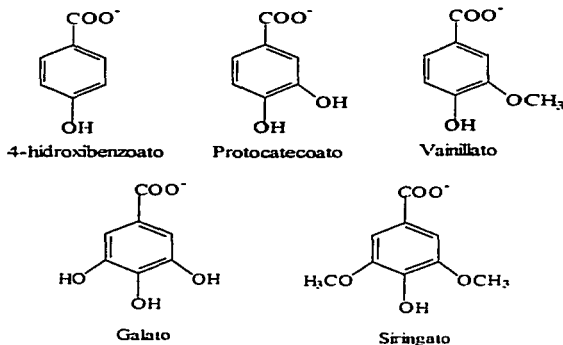
Los hidroxicinamatos son intermediarios en varias rutas que realizan cuatro tipos predominantes de reacciones en la parte de la cadena:

1. Condensación de la cadena lateral con malonil-CoA mediante la adición de unidades acetato con liberación de  $\text{CO}_2$ . Por ejemplo, las reacciones secuenciales con tres moléculas de malonil-CoA conduce a los flavonoides.
2. Degradación ó acortamiento de la cadena lateral por remoción de una unidad acetato que conduce a los hidroxibenzoatos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

3. Reducción dependiente de NADPH que lleva a la formación de los precursores de la lignina, los hidroxicinamoil alcoholes.
4. Conjugación a través de la unión a un grupo amino o hidroxilo con liberación de  $H_2O$  que conduce a los ésteres o amidas. La unión de azúcares al hidroxilo fenólico lleva a los glicósidos.

Al igual que los hidroxicinamatos, varios hidroxibenzoatos ( $C_6-C_1$ ) parecen estar universalmente distribuidos en las plantas. Estos son el 4-hidroxibenzoato, protocateoato, vainillato, galato y siringato (Figura 7). Estos pueden estar presentes en formas solubles conjugadas ó enlazadas a fracciones de pared celular, p.e. la lignina. El derivado trihidroxilico gallato, está frecuentemente presente en estructuras moleculares denominadas galotaninos:



**Figura 7.** Hidroxibenzoatos encontrados en plantas.

Es probable que haya varias rutas que lleven a los hidroxibenzoatos individuales, dependiendo de la planta. Una ruta común es la degradación de los hidroxicinamatos por

la remoción de acetato. Se ha propuesto que la secuencia de reacciones procede a través del CoA-éster (Figura 8), análoga a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos.

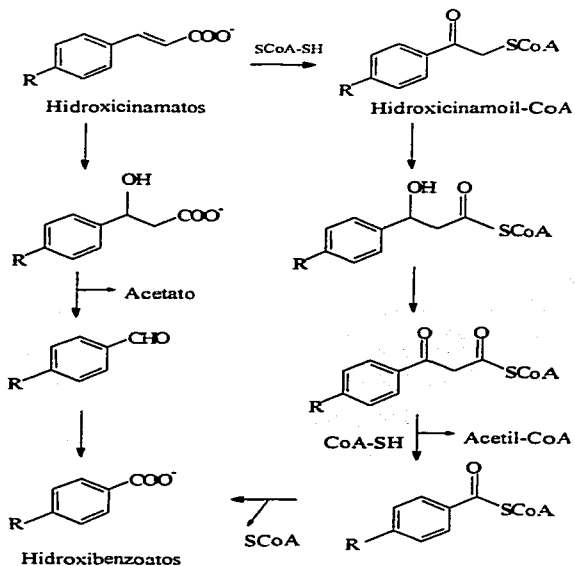


Figura 8. Rutas biosintéticas postuladas para los hidroxibenzoatos (Strack, 1997).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## D. BIOSINTESIS DE CAPSAICINOIDES

### 1. Estudios Preliminares

Bennet y Kirby en 1968 estudiaron la biosíntesis de los compuestos relacionados a las vainillilamidas, dos no saturadas y tres saturadas, por inyección de una solución acuosa de fenilalanina y tirosina marcada en la posición 5 con tritio, algunos ácidos hidroxicinámicos y vainillilamina dentro de vainas maduras de *Capsicum annuum* midiendo la incorporación de la marca en fenoles totales y capsaicinoides. Estos resultados establecieron que la tirosina fue menos incorporada a los capsaicinoides que la fenilalanina en las vainas de *Capsicum annuum* y que tal vez la incorporación de estos aminoácidos a los capsaicinoides pudo ser por la vía de los ácidos cinámicos hidroxilados. Los capsaicinoides marcados en el anillo aromático con tritio en intercambio de la marca con trietilamina acuosa, la cual remueve específicamente el tritio de la posición 5, perdió el 93% para tirosina y el 99% para fenilalanina de la actividad total, revelando a la capsaicina como una ( $5\text{-}^3\text{H}$ ) vainillilamida.

Leete y Louden (1968) también estudiaron la biosíntesis de capsaicina y dihidrocapsaicina en *Capsicum frutescens* utilizando aminoácidos marcados. Encontraron que la tirosina fue muy pobremente incorporada, y que la metionina fue bien incorporada en el grupo metoxi. La valina fue eficientemente incorporada en el carbono 7, 8 y 9 del grupo ácido de la capsaicina. La porción fenólica total se dividió en un 47% de capsaicina y un 53% de dihidrocapsaicina por argentación. Los frutos cultivados 2 y 16 semanas después de la alimentación con [ $3\text{-}^{14}\text{C}$ ]fenilalanina, dieron la misma actividad específica en los capsaicinoides. Esto mostró que la capsaicina y dihidrocapsaicina fueron productos metabólicamente estables en el periodo estudiado.

Rangoonwala (1969), en estudios utilizando secciones de cortes de frutos jóvenes agitados con soluciones nutrientes conteniendo precursores marcados llegó a las mismas conclusiones de Leete y Louden. Adicionalmente, encontraron que el ácido mevalónico fue bien incorporado en la cadena alquílica de los capsaicinoides, y que el nitrógeno era proveniente de fenilalanina. La alimentación de  $\text{L-}[^{14}\text{C}]$  y  $\text{L-}[^{15}\text{N}]$ -fenilalanina a plantas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de *C. annuum* var. *annuum* fue estudiada por Koop et al. (1983). La relación de  $^{14}\text{C}/^{15}\text{N}$  en la mezcla de fenilalanina alimentada (1:21), fue incrementada 1:30 en los capsaicinoides aislados de los frutos. Así, a pesar de la formación de vainillina por la pérdida de nitrógeno vía los ácidos hidroxicinámicos, la fenilalanina también sirvió como donador del nitrógeno en la transaminación de vainillina.

Koop et al., (1980) extendió los descubrimientos de Leete y Louden del uso eficiente de la valina en el grupo acilo de la capsaicina y dihidrocapsaicina al mostrar que la valina era el precursor directo de los ácidos grasos ramificados (Fig. 9), mientras la leucina e isoleucina actuaron como precursores directos de todos los grupos grasos no ramificados de los capsaicinoides. Independientemente, Susuki et al. (1981a), demostró a través de la alimentación de sustratos marcados a cortes frescos de frutos de *Capsicum* y microanálisis de capsaicinoides por GC, que la L-[ $^{14}\text{C}$ ]-valina es incorporada a capsaicina y dihidrocapsaicina, que son las vainillilamidas de los ácidos grasos de cadena par, mientras que la [ $^{14}\text{C}$ ]-leucina es incorporada en los capsaicinoides menores, nordihidrocapsaicina y homocapsaicina, las cuales son las vainillilamidas de los ácidos grasos de cadena impar. En experimentos *in vitro* con esferoplastos preparados de las placentas de frutos de *Capsicum* por incubación con el precursor aminoácido marcado y el análisis del producto por GC, identificaron los intermediarios como el ácido isobutírico y ácido 8-metilononóico a partir de la valina y el ácido isopentanóico y ácido 9-metildecanóico a partir de la leucina. El  $\alpha$ -cetoisovalerato o el  $\alpha$ -cetoisocaproato en la biosíntesis de los grupos acilo de los capsaicinoides fue también demostrada en experimentos *in vitro* utilizando extractos libres de células de la placenta de los frutos de *Capsicum*. Al estudiar la variación en los niveles de L-valina, L-leucina, y fenilalanina con los capsaicinoides individuales y totales formados en placenta durante 45 días después del crecimiento de los frutos, encontraron que la concentración de L-valina y L-leucina en la placenta varió con los capsaicinoides totales alcanzando un máximo cerca de los 25 días después de florecer y que después disminuyeron gradualmente. El contenido de L-leucina fue considerablemente más bajo, 13 a 31% que de L-valina a cualquier estado de crecimiento y reflejaría los niveles bajos de nordihidrocapsaicina y

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

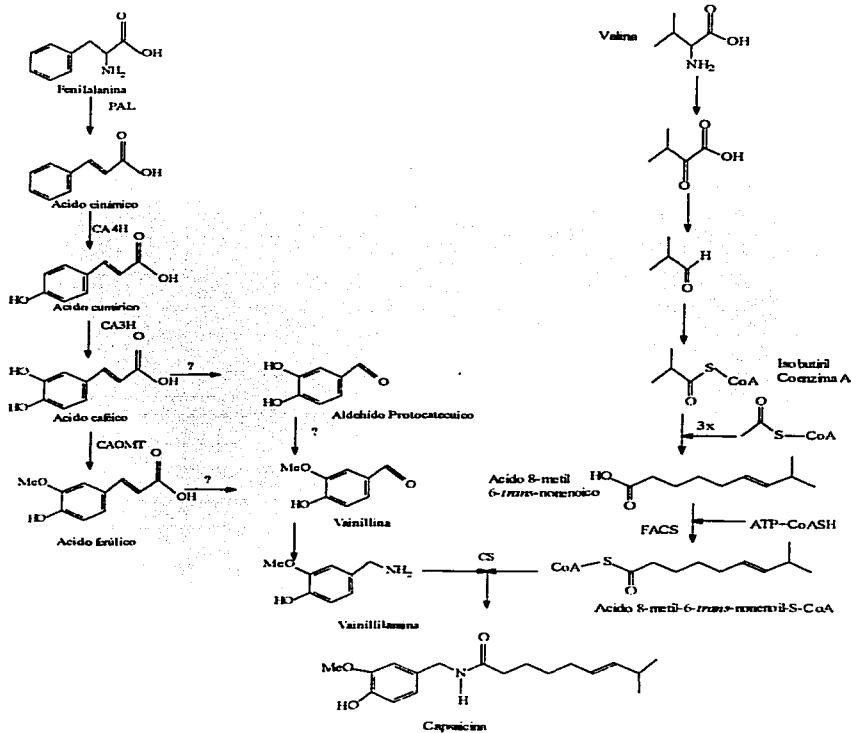


Figura 9. Ruta metabólica propuesta para la síntesis de capsaicinoides. Las enzimas involucradas en la ruta son: PAL, fenilalanina amonio liasa; CA4H, ácido cinámico-4-hidroxilasa; CA3H, ácido cumárico-3-hidroxilasa; CAOMT, ácido caféico-O-metil transferasa; y CS, capsaicinoides sintetasa (Bennet y Kirby, 1968; Iwai et al., 1979).

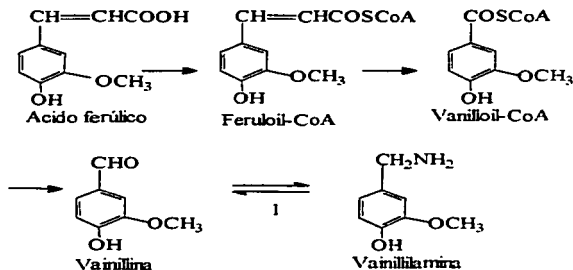
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

homodihidrocapsaicina normalmente biosintetizadas en los frutos de *Capsicum*. Relativamente, la eficiencia de la utilización de L-valina para formar capsaicina y dihidrocapsaicina es mucho más alta durante el periodo de biosíntesis activa de capsaicinoides. Los porcentajes relativos de los mayores componentes también variaron en este estudio, de una síntesis inicial rápida de capsaicina para dar una relación de capsaicina a dihidrocapsaicina de 2.4:1 a los 15 días a una relación de 1.2:1 a los 25 días. Esta variación significativa en la velocidad de la síntesis de los dos capsaicinoides mayoritarios fue diferente de las observaciones anteriores que indicaban constancia. Koop y Jurennitsch (1981) encontraron que tras la administración de capsaicina marcada con  $^{14}\text{C}$  en el mesocarpio de frutos de *Capsicum* inmaduros, no hubo interconversión de capsaicina a dihidrocapsaicina, confirmando las observaciones anteriores sobre la estabilidad de la capsaicina y la constancia en la relación de capsaicina. La conversión de ácido saturado al no saturado, si es que ocurre, debería por lo tanto tomar lugar antes de la condensación con vainillilamina para formar diferentes homólogos de capsaicina (Govindarajan, 1986).

Por otro lado, Johnson et al., (1995) estudiando la capacidad de cultivos de *Capsicum frutescens* para biotransformar el ácido ferúlico y vainillilamina, propusieron que la formación de vainillina a partir de ácido ferúlico podría ser por la vía del feruloil-CoA a través de una reacción similar a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y a partir de vainillilamina por desaminación oxidativa (Figura 10).

La acumulación de vainillina en cultivos tratados con vainillilamina o ácido ferúlico fue alta, mostrando conversión preferencial de estos precursores hacia vainillina. La alta producción de vainillina también implica una alta actividad de desaminasa oxidativa como se propone en la figura 10, sin embargo, la presencia de la reacción reversible (vainillilamina-vainillina) no se encontró en estos cultivos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 10.** Ruta propuesta para la formación de vainillina y vainillilamina a partir de ácido ferúlico. 1. Desaminación oxidativa de vainillilamina para formar vainillina, una reacción reversible realizada en teoría por cultivos de células inmovilizadas de *C. frutescens* (Johnson et al., 1995).

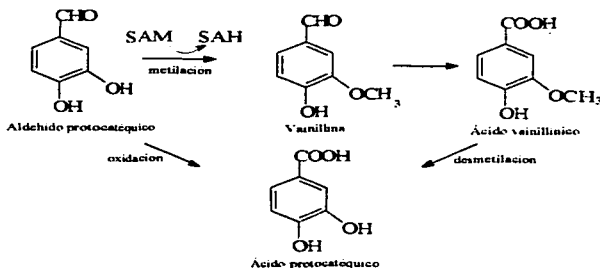
Más tarde, Johnson et al. (1996), encontraron que de todos los precursores alimentados a tejidos de placenta inmovilizada, el ácido cumárico fue el mejor para la formación de capsaicina y dihidrocapsaicina. La conversión máxima hacia estos compuestos en cultivos tratados con los precursores fenilpropanoides fue en el orden siguiente, de mayor a menor: ácido cumárico, ácido cinámico, ácido ferúlico, ácido caféico, vainillilamina, L-valina y fenilalanina. La baja conversión de fenilalanina a los productos finales se pudo deber a que este aminoácido es un precursor distante de la capsaicina, utilizándose para la formación de proteínas y compuestos fenólicos. Por otra parte, se observó que la participación de vainillilamina en la formación de capsaicinoides fue menor que la de los otros precursores. Ya que el residuo aromático de capsaicina es derivado de fenilalanina y el ácido graso es derivado de L-valina, precursores distantes de capsaicina, es comprensible que su adición a los cultivos haya tenido poco efecto en la formación de capsaicina y dihidrocapsaicina.

Ramachandra y Ravishankar (2000) realizaron estudios de biotransformación adicionando aldehído protocatéquico y ácido caféico a cultivos de células inmovilizadas y en suspensión de *Capsicum frutescens*. Detectaron que el cultivo transformó el aldehído

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



protocatéquico a vainillina más que su conversión a capsaicina, mientras que los cultivos tratados con ácido caféico acumularon más capsaicina que vainillina. La máxima acumulación de vainillina y capsaicina se logró a los seis y quince días respectivamente, esto en cultivos de células inmovilizadas alimentadas con aldehído protocatéquico y fue 1.8 y 1.4 veces mayor que en cultivos en suspensión. Los cultivos de células inmovilizadas alimentadas con ácido caféico acumularon un máximo de vainillina y capsaicina a los nueve y doce días, el cual fue 1.65 y 1.33 veces mayor que en cultivos en suspensión. Adicionalmente, alimentaron *S*-adenosil-*L*-metionina -un donador del grupo metilo- a cultivos de células inmovilizadas tratadas con aldehído protocatéquico y detectaron una acumulación de vainillina 2.5 veces mayor que en los cultivos sólo con el aldehído, sugiriendo la influencia de la *S*-adenosil-*L*-metionina en la metilación del aldehído protocatéquico, resultando en una mayor acumulación de vainillina. De los resultados anteriores, ellos sugirieron que puede existir una ruta alternativa para la formación de vainillina en cultivos celulares de *C. frutescens* (Figura 11).



**Figura 11.** Probable ruta biosintética de vainillina a partir de aldehído protocatéquico en cultivos celulares de *C. frutescens* (Ramachandra y Ravishankar, 2000).

## 2. Sitio de biosíntesis de capsaicinoides

Los capsaicinoides se sintetizan y acumulan en la placenta del fruto y no se han detectado en otras partes de la planta (Iwai et al., 1977). En las células, los capsaicinoides se

acumulan en vacuolas especializadas denominadas capsisomas, hasta que son excretados hacia la pared lamelada y las cavidades subcuticulares donde parecen almacenarse en un ambiente oleoso (Iwai et al., 1979). Sin embargo, la acumulación *in vitro* de capsaicinoides tiene lugar casi totalmente en el medio de cultivo de células en suspensión e inmovilizadas. Ohta (1962), de observaciones histoquímicas, concluyó que los receptáculos y órganos que secretan capsaicinoides son localizados en la placenta y en el septo interlobular del fruto y encontró que los capsaicinoides se encuentran en su mayoría en la pared exterior y en la placenta en proporción 2:1. La proporción relativa fue similar en frutos térmicamente procesados (enlatados), pero el contenido de capsaicinoides se incrementó 20 veces en la pared exterior y placenta y algunos cientos de veces en las semillas y pared exterior donde los valores fueron sólo el 1% del total en el fruto fresco.

Iwai et al., (1979) quien hizo extensivos estudios en la biosíntesis de los capsaicinoides, encontró que en todos los estados de crecimiento de los frutos, los capsaicinoides individuales y totales están siempre en concentraciones mayores en la placenta que en el pericarpio (Tabla 2). Concluyó que el sitio mayor de síntesis de capsaicinoides es la placenta. Así, de los estudios mencionados arriba se puede sugerir que los capsaicinoides son sintetizados en su mayoría en subpartículas celulares en la placenta

### 3. Perfil de acumulación

Kosuge e Inagaki (1964), reportaron la formación y la relación de capsaicina:dihidrocapsaicina en dos variedades de chiles jalapeños. Los capsaicinoides comenzaron a formarse entre el día 10 y 20 después de florecer, alcanzando el máximo alrededor de los días 30 y 40 y después disminuyeron. La relación de capsaicina:dihidrocapsaicina permaneció entre 1:0.4 a 1:0.5. Neuman (1966) registró que la incorporación de  $^{14}\text{CO}_2$  toma lugar sólo en frutos jóvenes, aunque la actividad total de los capsaicinoides permaneció constante, indicando que estos fueron metabolitos estables.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 2.** Composición de capsaicinoides en pericarpio y placenta a diferentes estados de crecimiento de frutos de *Capsicum annum* var. *annuum*

Días después de la anthesis	Parte	Total	NDC	Concentración, mg/mg de tejido seco			
				C	DC	HC	HDC
10	Pericarpio	nd	nd	nd	nd	Nd	nd
	Placenta	nd	nd	nd	nd	Nd	nd
20	Pericarpio	3.4	tr.	2,1	1,3	Nd	tr.
	Placenta	30.4	tr.	17,9	12,5	Nd	tr.
30	Pericarpio	28.6	0.2	15,6	12,8	Nd	tr.
	Placenta	164.4	tr.	101,9	62,5	Nd	tr.
40	Pericarpio	40.9	tr.	25,1	15,8	Nd	tr.
	Placenta	250.7	3,8	137,9	109,4	Nd	tr.
50	Pericarpio	4.2	tr.	2,7	1,5	Nd	tr.
	Placenta	52.9	tr.	33,3	19,6	Nd	tr.

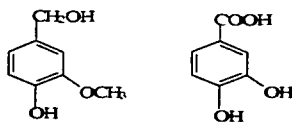
Nota: nd, no detectado; tr, trazas; (Govindarajan., 1986).

Balboa et al. (1968) en sus estudios sobre el contenido de capsaicinoides en frutos de *Capsicum*, notaron que los capsaicinoides no se detectaron sino hasta el día 21-28. y después se incrementaron hasta el día 50. La composición de la mezcla de capsaicinoides en los diferentes estados de madurez mostró que la capsaicina fue el mayor componente, seguido de la dihidrocapsaicina. Otros homólogos, nordihidrocapsaicina y homodihidrocapsaicina, fueron encontrados en trazas a 1.5%. La constancia de la composición a través del crecimiento y madurez mostraron que no hubo interconversión de los componentes (Tabla 2).

Como puede apreciarse por los antecedentes presentados, a pesar de que la biosíntesis de capsaicina ha sido estudiada por diversos grupos de investigación, tales como el de Bennet y Kirby, Iwai y Susuki, Lindsey y Yeoman, Ochoa y Calva, y Ravishankar, la ruta biosintética de esta molécula no se ha elucidado por completo. Por ejemplo, no se han logrado detectar varios de los intermediarios hipotéticos involucrados en los últimos pasos de la vía ni las enzimas participantes en los mismos. Esto es particularmente cierto a partir del ácido ferúlico y hasta los capsaicinoides. En consecuencia, es importante realizar estudios dirigidos a investigar esta parte oscura de la ruta, por ejemplo, mediante la adición de precursores para estudiar su acumulación y efecto en el perfil de capsaicinoides y compuestos fenólicos relacionados. Por ello, en este trabajo se llevaron a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cabo estudios de adición de alcohol vainillílico y ácido protocatéquico (Figura 12), - compuestos relacionados a esa última parte de la ruta- para investigar su posible biotransformación e incorporación a los capsaicinoides en cultivos de células en suspensión de *Capsicum chinense*. Los resultados se discuten en el marco del mecanismo de biosíntesis y biotransformación que pudiera llevarse a cabo en los cultivos de células de *Capsicum* en suspensión sometidas a la adición de estos compuestos.



Alcohol vainillílico    Ácido protocatéquico

**Figura 12.** Precursores adicionados a los cultivos de células en suspensión de *C. chinense* en el presente estudio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IL PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los estudios realizados sobre la biosíntesis de capsaicinoides, no se ha logrado identificar plenamente cual es la vía y el mecanismo de formación del residuo aromático de estos compuestos. Si bien se conoce por estudios de marcaje radioactivo que el nitrógeno y el anillo aromático proceden de la fenilalanina, los estudios de adición de precursores como fenilalanina y tirosina marcados radioactivamente e intermediarios fenólicos no confirman la vía propuesta, tales como la formación de vainillilamina o la vainillina. Otro aspecto que obscurece la hipótesis sobre la ruta biosintética, es que tampoco se han podido detectar las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos intermediarios, y que probablemente hay vías alternativas que pudieran usar los frutos de *Capsicum* para su biosíntesis. Con base en esto, en el presente trabajo se evaluó el efecto de dos intermediarios metabólicos, que están potencialmente relacionados con los precursores de capsaicinoides en esa parte oscura de la ruta, el alcohol vainillílico y el ácido protocatéquico. Los estudios se realizaron mediante experimentos de adición a cultivos de células en suspensión de *Capsicum chinense* (chile habanero). Estos compuestos se seleccionaron debido a la similitud estructural que poseen con los precursores hipotéticos de la ruta, tales como los fenilpropanoides y la vainillina, tratando de favorecer el flujo metabólico hacia la parte final de la ruta y mediante la observación de la variación en el perfil y acumulación de compuestos fenólicos relacionados además de los capsaicinoides.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

### III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de algunos intermediarios metabólicos del residuo aromático de la capsaicina sobre la biosíntesis y acumulación de capsaicinoides y compuestos fenólicos relacionados en cultivos *in vitro* de *Capsicum chinense* (chile habanero).

### IV. HIPOTESIS

La adición de precursores metabólicos de los capsaicinoides a células de *Capsicum chinense* favorecerá el flujo metabólico hacia estos compuestos y/o la acumulación de los productos fenólicos dependientes de los precursores adicionados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## V. MATERIALES Y METODOS

### Substancias

El ácido protocatéquico, alcohol vainillílico y ácido vainillínico fueron grado analítico y obtenidos de ICN chemicals. La vainillina, ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, sacarosa, cinetina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético fueron grado analítico de Sigma Chemical Co. El etanol, metanol y acetato de etilo fueron grado HPLC de Buildrick Jackson. El agua fue doblemente destilada y desionizada usando un sistema de desionización Millipore Simplicity®.

### Material biológico

El establecimiento de los cultivos células de *Capsicum chinense*, callos y suspensión se llevó a cabo bajo condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar estéril en un cuartó de temperatura controlada ( $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Todo el material se sometió a esterilización a  $121^{\circ}\text{C}$ , por 15-18 minutos.

### Medios de cultivo

El medio de cultivo fue el reportado por Murashige y Skoog (1962). La composición se presenta en la tabla 3 (Sigma M5524). La composición del medio CH50 fue la misma que la del medio MS, pero con la mitad de la cantidad de nitrógeno (Sigma M8900).

### Cultivo de células en suspensión

Se indujeron los cultivos de células en suspensión inoculando 3 g de peso fresco de tejidos de callo en 50 mL de medio líquido CH50 contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital a 90-100 r.p.m., a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Estos cultivos se mantuvieron por subcultivo a intervalos de 28-30 días.

Se preparó el inóculo para los experimentos transfiriendo 3 g de peso fresco de los cultivos en suspensión en 50 mL de medio fresco contenidos en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los cultivos se incubaron bajo las mismas condiciones experimentales que los cultivos normales. Después de cuatro semanas, el cultivo se transfirió a un matraz

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio fresco. La biomasa de estos matracas se utilizó como inóculo para los experimentos en estudio.

**Tabla 3.** Composición del medio Murashige y Skoog (MS)

CONTITUYENTES	(g/L)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165
KNO <sub>3</sub>	190
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	44
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	37
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17
KI	.830
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	27.8
Vitaminas	
Inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina.HCl	0.5
Tiamina-HCl	0.5
Glicina	2.0

## Métodos

### Preparación de los medios de cultivo

Se disolvieron 4.3 g del medio mineral (Sigma No. M5524 para el MS) y 2.6 g de medio (Sigma M8900 para el CH50), en agua desionizada según el caso. Después se agregaron 30 g de sacarosa a la solución anterior para el medio MS y 20 g para el medio CH50. A ambos medios se adicionaron 1 mL de Acido 2,4-diclorofexiacético 6.5 mM y 1 mL de cinetina 500 µM por cada litro de medio. Se ajustó el pH a 5.8 con HCl ó NaOH 0.1 N. El medio se dosificó en matracas erlenmeyer (20% del volumen del matraz) y se esterilizaron a 121°C, 15 lb por 15 minutos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### Preparación de medio de cultivo para callos

Se preparó igual que para el medio líquido anterior pero se agregaron 2 g de gelrite. La solución se mantuvo en agitación durante 5 minutos y se calentó a ebullición hasta que el gelrite se disolviera totalmente. El medio se dosificó en frascos de cultivo (25-30 mL por frasco de 125 mL) y se esterilizaron a 121°C, 15 lb por 15 minutos.

### Regulador de crecimiento

La solución concentrada del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se preparó disolviendo 276.2 mg en aproximadamente 15 mL de una solución de etanol absoluto/NaOH 1 N (1:1 v/v). Después se aforó a 100 mL con agua desionizada y se almacenó a -20° C

### Añición de precursores metabólicos a cultivos de células en suspensión

El alcohol vainillílico y el ácido protocatéuico se disolvieron en 20 mL para tener una solución concentrada de 0.02 M. La adición de los precursores al medio se calculó para obtener una concentración de 200 µM de cada compuesto y en dos medios de cultivo como se propone en la tabla 4. El medio conteniendo el compuesto de interés se inoculó con 3 gramos de peso fresco de biomasa en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio MS o CH50 según fue el caso. Esta suspensión, se incubó bajo las mismas condiciones que los cultivos normales. Para cada experimento, se incluyó una serie de matraces control sin ningún compuesto exógeno pero tratado del mismo modo y los tratamientos se ejecutaron por triplicado en forma aleatoria.

**Tabla 4.** Matriz experimental para evaluar el efecto de compuestos exógenos sobre la producción de capsaicinoides y compuestos fenólicos relacionados en cultivos de *Capsicum*.

	Alcohol Vainillílico (200 µM)	Acido Protocatéuico (200 µM)
Medio MS	1	2
Medio CH50	3	4

1-4, tratamientos a las condiciones respectivas. Para obtener la concentración señalada se adicionaron 500 µL de una solución stock a 0.02M del compuesto disuelto en agua.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

---

**Extracción y análisis de capsaicinoides y fenilpropanoides relacionados**

El procedimiento de extracción se basó en una combinación de metodologías reportadas por Calva (1997). Los métodos involucrados aquí, son técnicas de extracción líquido-líquido y líquido-sólido. Esta última se utilizó para extraer los capsaicinoides y fenilpropanoides de la biomasa mientras la primera se utilizó para la extracción a partir del medio de cultivo. En ambos casos, con biomasa y medio, una extracción múltiple (tres veces) se llevó a cabo para lograr una extracción cuantitativa de capsaicinoides y compuestos fenólicos relacionados.

**Extracción de biomasa.** La biomasa se separó del medio de cultivo por filtración a través de papel filtro Whatman No. 121 y después se molió en metanol. Una vez molida, la biomasa se colocó en tubos de 50 mL y el volumen se ajustó a 15 mL con metanol. Estas muestras se colocaron en agitación durante 1 hora a 100 rpm en baño de hielo. La biomasa se filtró y el disolvente se evaporó en su totalidad en un rotavapor a 40°C. El residuo se redisolvió en 1 mL de metanol al 80% para su análisis por HPLC.

**Extracción del medio.** Un volumen conocido de cultivo de células en suspensión (usualmente 25 mL) se filtró a través de un papel filtro Whatman No. 121, y el medio libre de células se extrajo 3 veces con acetato de etilo 1:1. Los extractos orgánicos se combinaron dentro de un matraz y se evaporaron utilizando un rotavapor a 40° C y a vacío. El residuo se redisolvió en 1 mL de metanol al 80% para análisis por HPLC.

**Ensayos**

**Peso fresco.** Para evaluar el peso fresco celular en los cultivos, el contenido completo de un matraz Erlenmeyer o un volumen conocido de cultivo se filtró al vacío a través de un papel filtro Whatman No. 125. La biomasa se lavó 3 veces y se drenó por 3 minutos bajo vacío.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Equipo**

HPLC. El sistema de HPLC comprendió una bomba binaria (Thermo Separation Products), un automuestreador (Thermo Separation AS1000) con un loop fijo de 20  $\mu$ l y un detector de barrido UV/Visible. Las señales del detector fueron capturadas y procesadas por el software PC1000 (Thermo Separation Products) cargado en una computadora PC IBM modelo IBM-300PL. La separación de compuestos en las muestras se realizó con columnas (200 x 4.5 mm i.d.) empacadas con ODS2 5  $\mu$ , Capital ó una Prodigy ODS2, y una precolumna Guard-Pack C18.

**Análisis de capsaicinoides y compuestos fenólicos por HPLC**

Se utilizó una columna ODS2 Prodigy ó Capital y un gradiente de 1 mM TFA y Acetonitrilo. El flujo se mantuvo a 1 mL/min y el gradiente fue:

Tiempo (min.)	0	5	10	25	35	55	60	65	70	80
A: 1 mM TFA (%)	90	90	80	80	40	40	10	10	90	90
B: Acetonitrilo (%)	10	10	20	20	60	60	90	90	10	10

Para el análisis espectral, el espectro de absorción de los picos se registró entre los 200-365 nm a una velocidad de 10 espectros por segundo. La integración para los cálculos cuantitativos se realizó a 280, 260 y/o 230 nm, según las características espectrales de cada compuesto de interés.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

### A. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PERFIL DE CRECIMIENTO DE CELULAS DE *Capsicum chinense*

El objetivo de este experimento fue conocer el cambio en el perfil de crecimiento de los cultivos de células en suspensión de *Capsicum chinense* variando la cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo. Cabe señalar que estos cultivos sirvieron a la vez como cultivos control para los experimentos posteriores de adición de compuestos exógenos.

Para este experimento, se realizó una cinética de crecimiento durante 27 días tomando muestras cada tres días y cada punto se hizo por triplicado. En la figura 13-A se observa el perfil de crecimiento típico observado en el medio MS. La fase de adaptación fue aproximadamente tres días, después se encuentra una fase exponencial desde los tres hasta los 12 días, donde aparece una curva diaúxica y luego la etapa estacionaria a los 20-27 días. El comportamiento del penúltimo punto pudo ser debido a que las células en esa etapa ya no eran 100% viables o hubo lisis celular.

Con respecto al perfil de crecimiento de las células crecidas en medio CH50 (Figura 13-B), las condiciones experimentales fueron similares al experimento anterior. Se observó que la fase de adaptación fue mayor que en MS, de aproximadamente 7 días y la etapa exponencial de los 7 a los 18 días. A diferencia del cultivo en medio MS, en el CH50 no se observó el comportamiento diaúxico. La fase estacionaria se observó de los 18 a los 27 días. Comparando el comportamiento de los dos cultivos, se observó que hay diferencia en la fase de adaptación, siendo más larga en los cultivos que fueron suplementados con la mitad del nitrógeno. Esto sugiere que posiblemente las células requirieron mayor consumo de este nutriente para iniciar sus procesos metabólicos en el menor tiempo posible. La fase exponencial de las células crecidas en medio CH50 fue más corta que la del medio MS, quizás porque al contener menos cantidad de nitrógeno y carbono, estos elementos son agotados en menor tiempo por las células que en el medio con una mayor

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cantidad de estos nutrientes. No obstante, la cantidad de biomasa producida fue similar en ambos medios, aunque los puntos máximos de crecimiento se presentaron con una diferencia de tres días. Nuñez (1997) utilizando cultivos en suspensiones de *Capsicum annum* L. tipo serrano, también reportó un perfil de crecimiento similar a los mostrados en este trabajo. En estudios hechos por Ramachandra y Ravishankar (2000) sobre biotransformación de precursores en cultivo de células en suspensión de *Capsicum frutescens*, también observaron que el perfil de la cinética mostraba un comportamiento similar al encontrado en *Capsicum chinense*, al menos hasta los 15 días, indicando que tal vez las diferentes especies de *Capsicum* se comporten de manera similar en cuanto a su cinética de crecimiento.

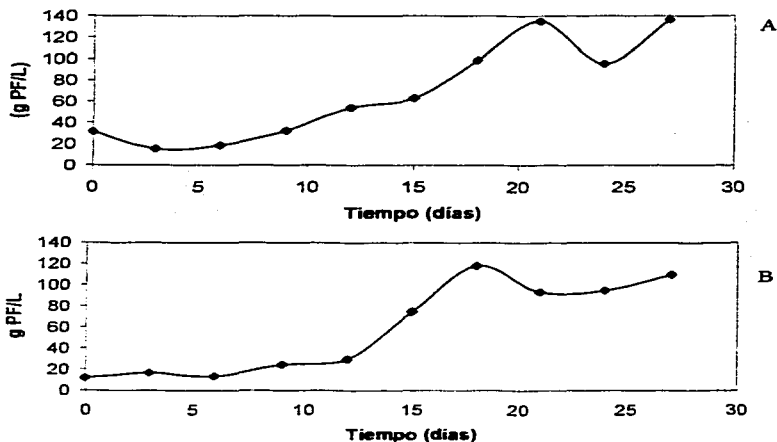


Figura 13. Perfil de crecimiento de cultivo de células en suspensión de *Capsicum chinense* en medio MS (A) y CH50 (B).

---

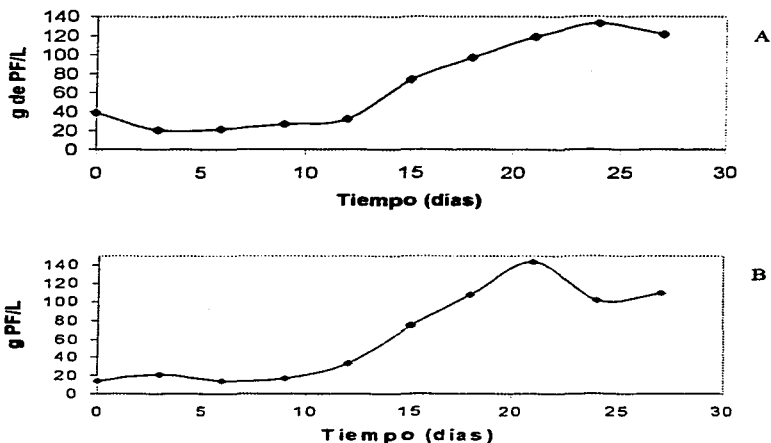
## B. EFECTO DEL ALCOHOL VAINILLILICO SOBRE EL PERFIL DE CRECIMIENTO DE CELULAS DE *Capsicum chinense* EN MEDIO MS Y CH50

Este experimento tuvo como objetivo evaluar el efecto del alcohol vainillilico (200  $\mu$ M) en el perfil de crecimiento de las células de *Capsicum chinense* tanto en medio MS como en CH50.

La cinética de crecimiento se realizó durante 27 días, tomando muestras cada tres días y por triplicado. En la figura 14-A para el medio MS, de manera similar a los cultivos control, se observó una fase de adaptación de aproximadamente 8 días, después de la cual le siguió la etapa exponencial hasta los 21 días. Posteriormente se observó, la declinación a los 25-27 días. Con respecto a los cultivos control (Fig. 13-A), las células alimentadas con alcohol vainillilico tuvieron una fase de adaptación ligeramente más larga, posiblemente debido a su toxicidad y tiempo de adaptación del cultivo para asimilar el compuesto adicionado y poder transformarlo ó incorporarlo a sus estructuras. En cuanto a la fase exponencial en ambos cultivos, alimentados y control, no se observaron diferencias en el tiempo de duración de esta fase ni en la producción de biomasa. De esta manera, la adición del alcohol vainillilico no afectó significativamente el crecimiento de las células en este medio.

Con respecto a los cultivos crecidos en medio CH 50 (Figura 14-B), se observó una fase de adaptación hasta los 7 días, seguida de la fase exponencial hasta los 18 días y la fase de declinación se presentó hasta los 27 días. Comparando este comportamiento con los cultivos control (Fig. 13-B), las células alimentadas mostraron un periodo de adaptación más corto, sin embargo, al igual que en el medio MS, la duración de la fase exponencial fue menor para las células control.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 14.** Cinética de crecimiento de células de *Capsicum chinense* alimentadas con alcohol vainillílico 200 mM en medio MS (A) y CH 50 (B).

Al comparar los dos experimentos en diferentes medios de cultivo, se observó que no hay diferencias significativas de duración en cuanto a las fases de la curva de crecimiento ya que las etapas de adaptación y exponencial fueron sólo ligeramente diferentes en las células crecidas en medio MS que en las de CH50. Aunque se haya presentado esta ligera diferencia, la cantidad de nitrógeno y carbono no afectó significativamente la cantidad de biomasa producida en presencia de alcohol vainillílico. Esto sugiere que en presencia de alcohol vainillílico, las células pueden activar la maquinaria necesaria para optimizar los niveles de nutrientes suplementados y regular su crecimiento. Estos resultados concuerdan con Nuñez (1997), en los estudios que realizó sobre efecto de adición de diversos precursores aromáticos a suspensiones celulares de chile serrano (*Capsicum annum* L.), en donde encontró que ninguno de los compuestos adicionados (fenilalanina,

el ácido cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, vainillina, vainillilamina, y ácido cinámico) afectaron de manera significativa el perfil de crecimiento celular, excepto cuando los últimos tres se adicionaban en una concentración de 1000  $\mu\text{M}$ . Los resultados también concuerdan con lo encontrado por Ramachandra y Ravishankar (2000) al alimentar cultivos en suspensión de *Capsicum frutescens* con ácido caféico a una concentración 1.25 mM. En el presente estudio, la adición de alcohol vainillílico no afectó el crecimiento de las células de *Capsicum chinense* en ambos medios probados, debido probablemente a que no fueron niveles tóxicos y que posee una estructura muy similar a la de los fenoles comúnmente encontrados en estas plantas, como la vainillina, que es un precursor de la ruta biosintética propuesta para la formación de capsaicinoides.

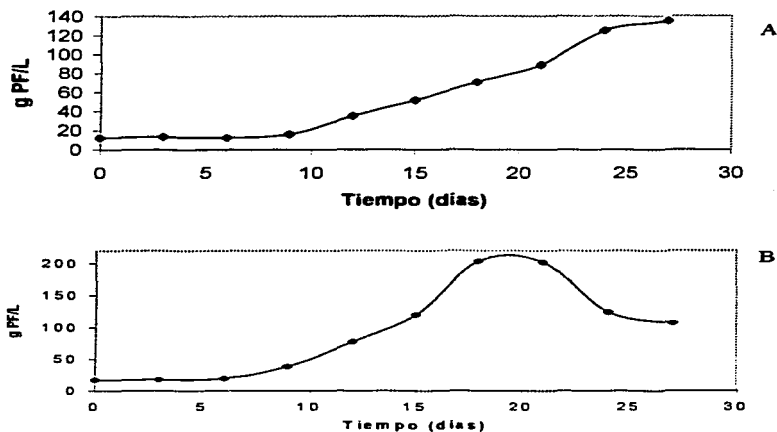
### C. EFECTO DEL ACIDO PROTOCATEQUICO SOBRE EL PERFIL DE CRECIMIENTO DE CELULAS DE *Capsicum chinense* EN MEDIO MS Y CH50

Este experimento tuvo como objetivo evaluar el efecto del ácido protocatequico (200  $\mu\text{M}$ ) sobre el perfil de crecimiento de las células de *Capsicum chinense* tanto en medio MS como en CH50.

En medio MS, la cinética de crecimiento se realizó durante 27 días, tomando muestras cada tres días y por triplicado. En la figura 15-A se observó una fase de adaptación de nueve días y una etapa exponencial que llegó hasta los 12-21 días. Por último, se observó una fase estacionaria desde los 24 a los 27 días. Al comparar este comportamiento con los cultivos control (Fig. 13-A), se observó que en la fase de adaptación hay una diferencia de tres días, siendo más larga en las células alimentadas con ácido protocatequico, pero la duración de la fase exponencial fue similar. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de biomasa producida en ambos cultivos. Probablemente la fase de adaptación fue más larga en las células alimentadas para asimilar el compuesto y poder utilizarlo en otros procesos propios de la célula.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





**Figura 15.** Cinética de crecimiento de células de *Capsicum chinense* alimentadas con ácido protocatéquico 200  $\mu$ M en medio MS (A) y CH50 (B). Nótase que la escala de la gráfica B, para cultivos crecidos en CH50, es mayor que para la A y las figuras. 13 y 14.

Con respecto a los cultivos crecidos en medio CH50 (Fig. 15-B), se observó que la fase de adaptación fue de 6 días y la fase exponencial fue entre los 6 y 18 días. La etapa estacionaria observada comprendió sólo dos puntos, de los 18 hasta los 21 días, y por último se observó la fase de declinación a partir de los 21 días. En comparación con los cultivos control (Fig. 13-B), las células alimentadas con ácido protocatéquico presentaron una fase de adaptación más corta y una etapa exponencial más larga. Los cultivos control llegaron a una etapa de declinación como la que se observó con las células alimentadas con el ácido protocatéquico.

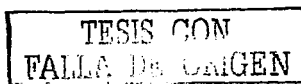
Como puede observarse, el comportamiento en la curva de crecimiento fue similar al comparar los cultivos alimentados en ambos medios (Fig. 15). No obstante, Las células

crecidas en medio CH50 presentaron una adaptación más rápida y una fase exponencial más corta que las crecidas en MS. La cantidad de biomasa fue 50% mayor en CH50 que la producida en MS. Este comportamiento probablemente se debió a que el ácido protocatéquico pudo actuar mejor como precursor en reacciones involucradas en la biosíntesis de pared celular en condiciones limitantes de nitrógeno y que esto orientara el flujo metabólico hacia la producción de estos compuestos unidos a pared celular, como se ha observado en estudios realizados con fenilalanina y ácido sinápico hechos por Hall y Yeoman (1991). Así, la variación en la cantidad de nitrógeno en las células alimentadas afectó negativamente la cantidad de biomasa producida, es decir, en el rango probado, a mayor concentración de nitrógeno, menor crecimiento.

Ramachandra y Ravishankar (2000), en sus estudios de biotransformación del aldehído protocatéquico como probable precursor de capsaicinoides, encontraron que en cultivos de células en suspensión de *Capsicum frutescens*, éste afectó negativamente el crecimiento de las células. En contraste con sus resultados, en este trabajo donde se adicionó el ácido protocatéquico, se encontró que en condiciones limitantes de nitrógeno en el medio CH50, hubo una producción de biomasa 50% mayor que la de los cultivos control. Esto indica que el ácido protocatéquico no fue tóxico para las células a la concentración usada, en contraste con el aldehído protocatéquico probado por los autores citados.

#### **D. PERFIL DE COMPUESTOS FENOLICOS Y ACUMULACION DE CAPSAICINOIDES EN CELULAS DE *Capsicum chinense* EN MEDIO MS Y CH50**

Para facilitar la presentación de los resultados y su análisis, en la figura 16 se muestran los cromatogramas de diversos fenilpropanoides estándar, los cuales están involucrados en la ruta biosintética de capsaicinoides. Los tiempos de retención (TR) característicos a los cuales son detectados se muestran en la tabla 5.



**Tabla 5.** Tiempos de retención característicos para algunos compuestos de la ruta de capsaicinoides

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Alcohol vainillílico (VOH)	6.79
Vainillilamina (VM)	1.91
Vainillina (V)	16.22
Ácido cumárico (COU)	17.99
Ácido ferúlico (FER)	18.57
Ácido caféico	12.32
Capsaicina (C)	40.07
Ácido protocatéuico (PROT)	7.36
Ácido vainillínico (AV)	13.26

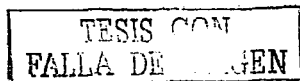
-Los TR fueron tomados de los cromatogramas mostrados en la figura 16

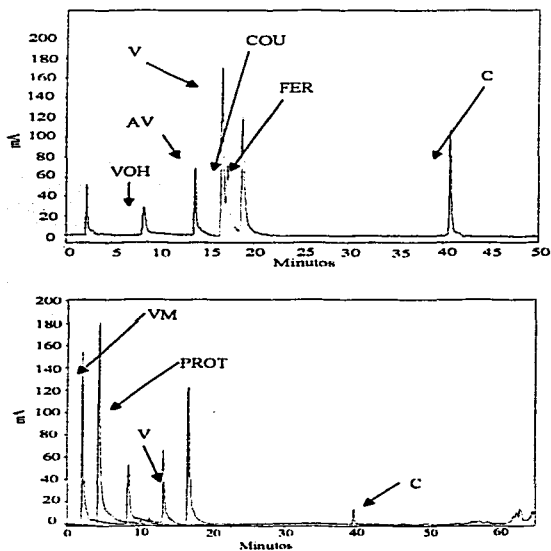
La columna ODS2 utilizada en combinación con el gradiente de solventes, tiene la característica de que los compuestos más polares eluyen más rápido, por lo que sus tiempos de retención son más bajos, detectándose al inicio de la corrida, mientras que las moléculas menos polares eluyen a tiempos más lejanos y los tiempos de retención son mayores. Una vez establecido lo anterior, se presentaron primero los resultados sobre el perfil de fenilpropanoides y acumulación de capsaicinoides en los cultivos control de células en suspensión de *Capsicum chinense*. Se analizó tanto el medio de cultivo como la biomasa de los cultivos crecidos en medio MS y CH50.

## 1. Cultivos crecidos en medio MS

### a) Medio de cultivo

En la figura 17 se observan los cromatogramas a 230 nm de los extractos orgánicos del medio de cultivo de células sin alimentar después de 3-15 días de incubación. Se detectaron algunos picos que presentaron espectros de absorción relacionados a los fenilpropanoides (Fig. 18). Debe notarse que estos compuestos no se produjeron de manera constante a través del tiempo (Fig. 17) y que al comparar sus espectros y el TR (tiempo de retención) con los de los compuestos estándar (Fig. 16 y 18), el pico 1 correspondió a un derivado del alcohol vainillílico, el pico 2 a la vainillina, y el pico 3 posiblemente sea de un derivado del ácido vainillínico, ya que la parte inicial del espectro se deforma pero la parte restante que le confiere la parte aromática la conserva. En estos

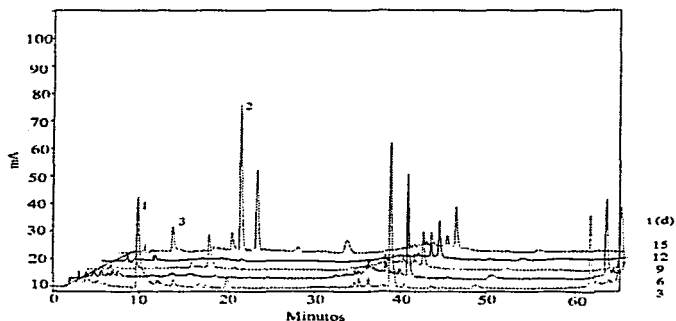




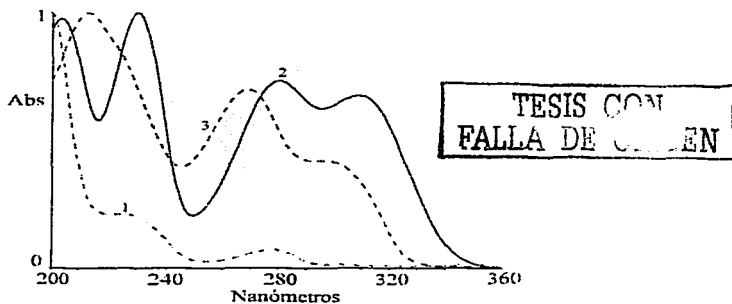
**Figura 16.** HPLC-cromatogramas a 280 nm de dos mezclas (A y B) de compuestos fenólicos estándar relacionados a la ruta biosintética de los capsaicinoides.

cultivos no se observaron picos con espectros relacionados a capsaicinoides a ninguno de los tiempos analizados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 17:** HPLC-Cromatogramas (230 nm) del extracto orgánico del medio de cultivo de las células control en medio MS a los 3, 6, 9, 12 y 15 días de incubación.



**Figura 18.** Espectros de absorción de algunos compuestos detectados a los 18 días en los extractos orgánicos del medio de cultivos de las células control en medio MS. Los números corresponden con los picos de la figura 17.

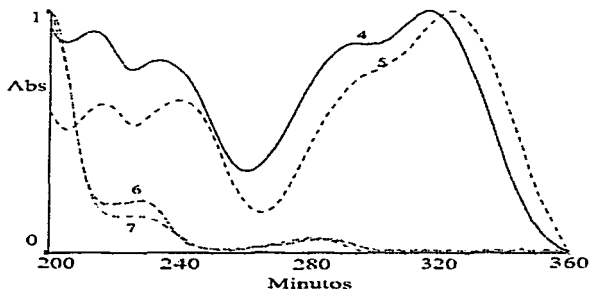
**b) Biomasa de cultivos en MS**

La figura 19 muestra los espectros de absorción de compuestos detectados en la biomasa de los cultivos crecidos en MS. Los espectros 4 y 5 tienen similitud con el espectro del ácido ferúlico y se observaron a lo largo de toda la cinética. El espectro 6 corresponde al ácido 2,4-diclorofenoxiacético, que es un regulador del crecimiento adicionado al medio pero que posee un espectro similar al de la capsaicina (7). Al igual que en el medio de cultivo, en biomasa no se detectaron compuestos relacionados a los capsaicinoides.

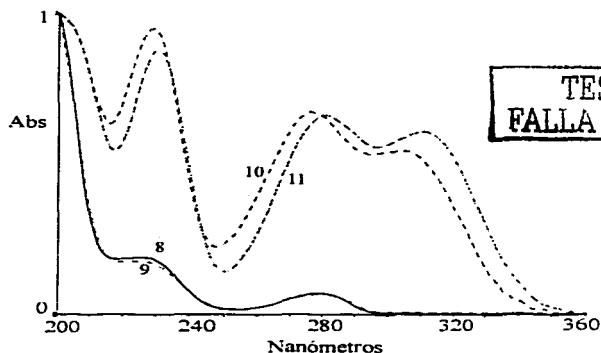
**2. Cultivos crecidos en medio CH50****a) Medio de cultivo**

En la figura 20 se muestran los espectros de absorción de algunos de los compuestos detectados en los extractos orgánicos del medio de cultivo. Sólo se detectaron dos compuestos relacionados a los fenilpropanoides. El primero es el espectro 8, que tiene una similitud muy grande con el alcohol vainillílico (9) pero con un tiempo de retención de tres minutos más alto, por lo que puede ser algún derivado del alcohol, pero menos polar que este. Otro compuesto formado es el que exhibe el espectro 10 (TR= 11.7 min) que es muy parecido al de la vainillina (11, TR= 16 min.), pero que mostró una diferencia de aproximadamente cinco minutos abajo del tiempo de retención, por lo que muy probablemente se trate de algún derivado más polar que la vainillina. La presencia de estos dos compuestos no fue constante a lo largo de la cinética, ni tampoco se detectaron capsaicinoides en los tiempos de muestreo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



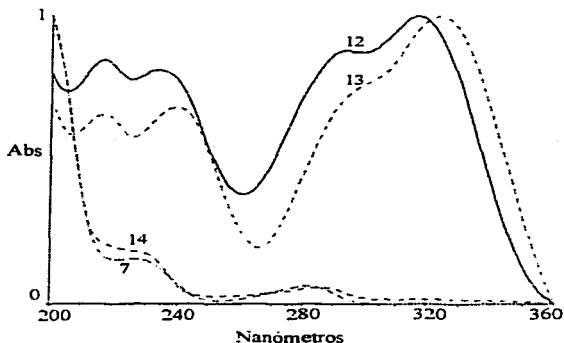
**Figura 19.** Espectros de absorción de compuestos detectados en los extractos orgánicos de biomasa de cultivos sin alimentar en medio MS. 4: compuesto detectado a un TR= 4.01 min.; 5: compuesto a un TR= 19.07 min.; 6: compuesto detectado a los 9 días con un TR= 38.5 min.; 7: capsaicina estándar con un TR= 40.07 min.



**Figura 20.** Espectros de absorción de diversos compuestos observados en los extractos del medio de cultivo de células crecidas en medio CH50. 8, compuesto detectado a los 12 días (TR= 10.19 min.); 9, alcohol vainillílico estándar (TR= 7.44 min.); 10, compuesto detectado a los 15 días (TR= 11.74 min.) 11, vainillina estándar (TR= 16.22 min.).

### b) Biomasa de cultivos en CH50

En la figura 21 se observan los espectros de absorción de dos de los compuestos detectados en los extractos de biomasa de cultivos crecidos en medio CH50 y su comparación con compuestos estándar. El espectro 12 (TR= 4.12 min.), que se logró detectar a todo lo largo de la cinética de crecimiento, posee mucha similitud con el espectro del ácido ferúlico (13, TR= 18.5 min.), sin embargo la diferencia en el tiempo de retención y el desplazamiento del espectro hacia la izquierda indican que es un derivado mucho más polar del ácido ferúlico debido a las características del gradiente. El compuesto 14, aunque con espectro similar al de los capsaicinoides, no fue posible relacionarlo ya que se trató del ácido 2,4-diclorofenoxiacético, el regulador del crecimiento adicionado al medio de cultivo.



**Figura 21.** Espectros de absorción de algunos detectados en los extractos de biomasa de cultivos sin alimentar y crecidos en medio CH50. 12, compuesto detectado a los tres días a un TR= 4.125 min.; 13, ácido ferúlico estándar (TR= 18.57 min.); 14, compuesto detectado a los 18 días (TR= 38.75 min.); 7: capsaicina estándar (TR= 40.07 min.).

Calva y Rios (1999), en estudios de acumulación de metabolitos secundarios en callos de *Capsicum annum*, detectaron dos picos de producción de capsaicinoides, uno al inicio de



la cinética durante la fase lag, y el segundo alrededor de los 45 días durante la etapa de desaceleración o estacionaria. Ramachandra y Ravishankar (2000) detectaron la producción de capsaicina en cultivos de células en suspensión a los 15 días de incubación cerca de la fase estacionaria. Yeoman (1990) mostró que diferentes líneas celulares obtenidas de una sola planta se podían comportar de manera distinta y concluyó que las diferencias en la producción de algún compuesto dependían del patrón de su actividad enzimática. En el presente estudio, en ambos medios de cultivo (CH50 y MS) no se detectaron compuestos relacionados a los capsaicinoides. Esto pudo ser debido a diferentes razones; una de ellas es que la biosíntesis de estos compuestos se llevó a cabo en los días en que no se tomaron muestras para el análisis. Otro motivo pudo ser que estos cultivos no sintetizan estos metabolitos, ya que se ha observado que puede haber variaciones en las líneas celulares y que algunas de ellas no formen los compuestos de interés, manteniendo atenuada esa parte del metabolismo, característica de éste género de plantas.

## **E. EFECTO DEL ALCOHOL VAINILLILICO SOBRE EL PERFIL DE COMPUESTOS FENOLICOS EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Capsicum chinense* (CHILE HABANERO)**

Con base en las cinéticas de crecimiento realizadas, en este experimento se estudió el efecto del alcohol vainillílico sobre el perfil de compuestos fenólicos y su acumulación de capsaicinoides por cultivos de células en suspensión de *Capsicum chinense* crecidos en medio MS y CH50. Se analizó el medio de cultivo y la biomasa.

### **1. Cultivos crecidos en medio MS**

#### **a) Análisis del medio de cultivo**

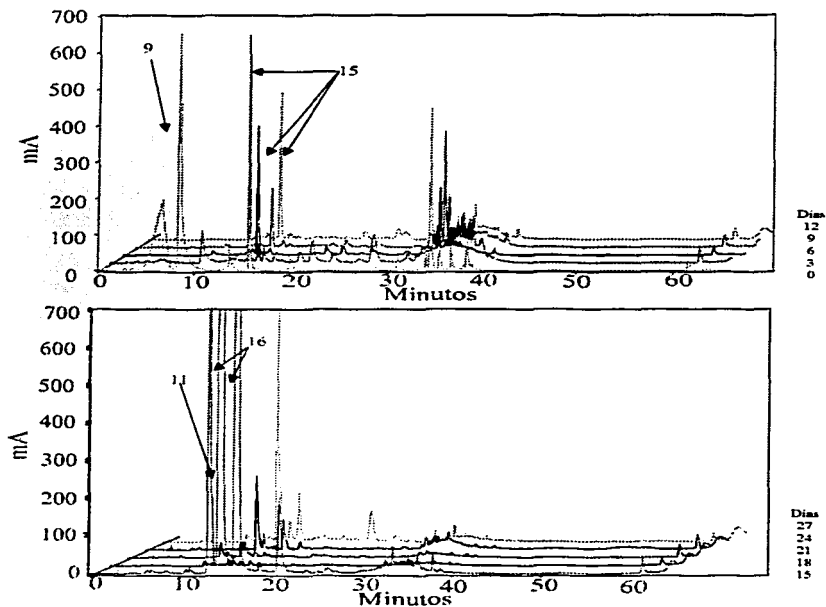
En la figura 22, se muestran los cromatogramas de los extractos orgánicos del medio de cultivo después de 0-27 días de incubación en presencia de alcohol vainillílico (pico 9). Se observa que el alcohol vainillílico fue removido totalmente del medio a los 6 días de incubación. Por otro lado, a los 3 días se detectó un compuesto (pico 15) que se mantuvo presente hasta los 12 días. Este compuesto mostró un espectro semejante al del espectro

del alcohol vainillílico pero con un corrimiento a la derecha (Fig. 23). A los 15 días, se detectó la presencia de vainillina en concentraciones muy altas (pico 11) y algunos derivados del ácido vainillínico también en concentraciones muy altas (pico 16). Esos compuestos fueron disminuyendo gradualmente hasta los 27 días. Los espectros de absorción de estos compuestos que se muestran en la figura 23 sugieren claramente que el espectro 16 corresponde a un derivado del ácido vainillínico, debido a su correlación (99%) que posee con este compuesto. De manera similar, el espectro 11 corresponde a vainillina. En el anexo 1 y 2 (pags. 60 y 61) se comparan los espectros de absorción del alcohol vainillílico, vainillina y ácido vainillínico con respecto a los espectros de los compuestos detectados en el medio de cultivo.

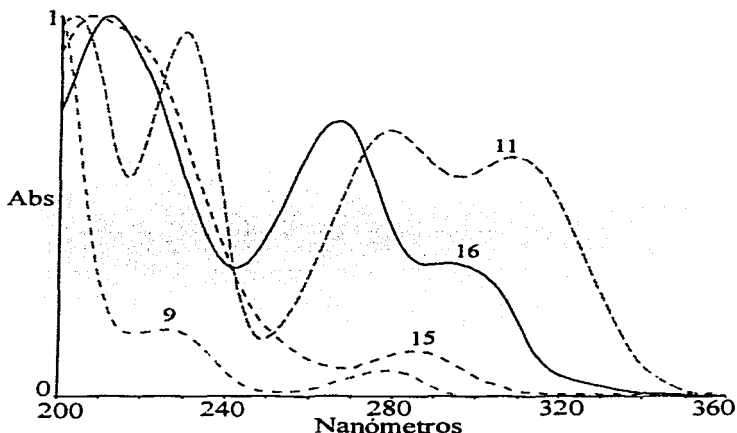
Estos resultados sugieren que el alcohol fue asimilado por las células desde tiempos iniciales y/o adsorbido a su estructura celular, por ejemplo en la pared celular. Aparentemente, el alcohol vainillílico fue primero transformado a un compuesto conjugado menos polar (pico 15) que podría ser menos tóxico para la célula o más fácil de metabolizar como se ha observado en mamíferos. Posteriormente, la célula pudo haber oxidado enzimáticamente este compuesto a vainillina y algún derivado del ácido vainillínico que a su vez pudieron ser excretados al medio de cultivo donde fueron detectados.

En estos cultivos se cuantificó la cantidad de vainillina detectada a los 15 días de la cinética, donde se observó el pico y áreas máximas de este compuesto. Para ello, se comparó con un estándar y a partir de su concentración y área se calculó la concentración final de vainillina en la muestra, la cual fue 1.48 g/L (9771  $\mu$ M). Esta cantidad de producto no pudo provenir del alcohol vainillílico exógeno dado que fue muy alta (48 veces), si se toma en cuenta que sólo se adicionó una concentración de precursor de 200  $\mu$ M. Una explicación posible para este resultado podría ser que la cantidad de nutrientes, junto con la adición de este precursor, pudo haber activado algún mecanismo bioquímico para la biosíntesis de vainillina en estas cantidades.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 22.** Cromatogramas a 230 nm de la fase orgánica de los extractos del medio de cultivo de células alimentadas con alcohol vainillílico (200  $\mu$ M) después de 12 (A) y 27 (B) días de cultivo en medio MS. 9, alcohol vainillílico; 15, compuesto detectado entre los 3 y 12 días; 11, vainillina; 16, compuesto detectado a los 15 y 18 días. El número de traza indica los días de cultivo.



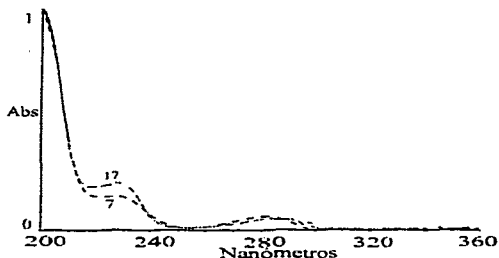
**Figura 23.** Espectros de absorción de diversos compuestos detectados en el medio de cultivo de células alimentadas con alcohol vainillílico (200  $\mu$ M) en medio MS. 9, alcohol vainillílico al tiempo 0 (RT= 6.79 min.); 15, compuesto observado entre los 3 y 14 días (RT= 14.46 min.); 16, compuesto observado a los 15 días (RT= 13.32 min.); 11, vainillina detectada a los 15 días (RT= 16.52 min.).

La formación de capsaicinoides fue muy baja tanto en los cultivos alimentados como en los cultivos control donde también se detectaron compuestos de descomposición de capsaicinoides en ambos cultivos.

#### b) Biomasa

La figura 24 muestra el espectro (17) de uno de los compuestos detectados en los extractos orgánicos de biomasa alimentada con alcohol vainillílico. Tiene espectro similar al de la capsaicina estándar (TR= 40 min.), sin embargo, el tiempo de retención es ligeramente diferente. Este compuesto corresponde al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que eluye a los 38-39 min.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 24.** Espectros de absorción de un compuesto (17) detectado en los extractos orgánicos de las células alimentadas con alcohol vainillílico (200  $\mu$ M) en medio MS. 7, capsaicina estándar (TR= 40.07 min.); 17, compuesto detectado a los nueve días de cultivo (TR= 39.5 min.).

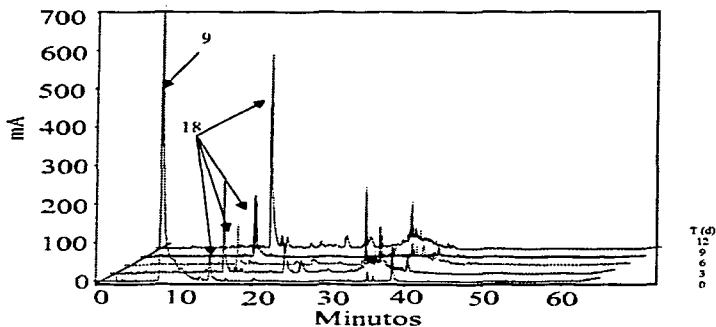
A lo largo de la cinética, se detectaron otros picos con espectros de absorción que no guardaron correlación con los compuestos fenólicos relacionados a capsaicinoides, tanto en la biomasa de cultivos alimentados como en cultivos control.

## 2. Cultivos crecidos en medio CH50

### a) Análisis del medio de Cultivo

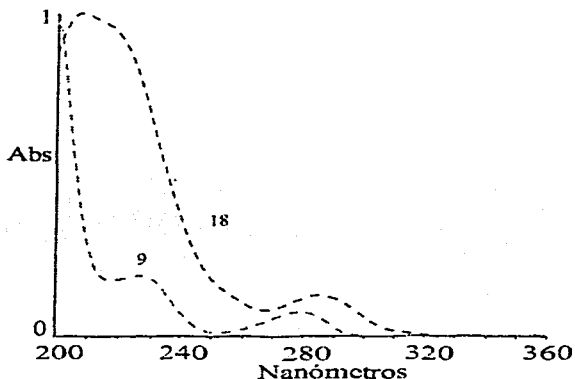
En la figura 25, se muestran los cromatogramas de los extractos orgánicos del medio de cultivo alimentado de células en suspensión con alcohol vainillílico (pico 9). El precursor adicionado (pico 9, TR=8.8 min.) fue removido en su totalidad a los tres días. Posteriormente, desde los tres días de cultivo, se detectó, pero con un corrimiento a la derecha, (fig. 26) un pico (18) con un tiempo de retención de 14.6 minutos y espectro similar al alcohol vainillílico, el cual permaneció en los cultivos desde los seis y hasta los 27 días.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 25.** Cromatogramas a 230 nm de la fase orgánica de los extractos del medio de cultivo de células alimentadas con alcohol vainilílico a 200  $\mu$ M en medio CH50. Los números indican los días de cultivo.

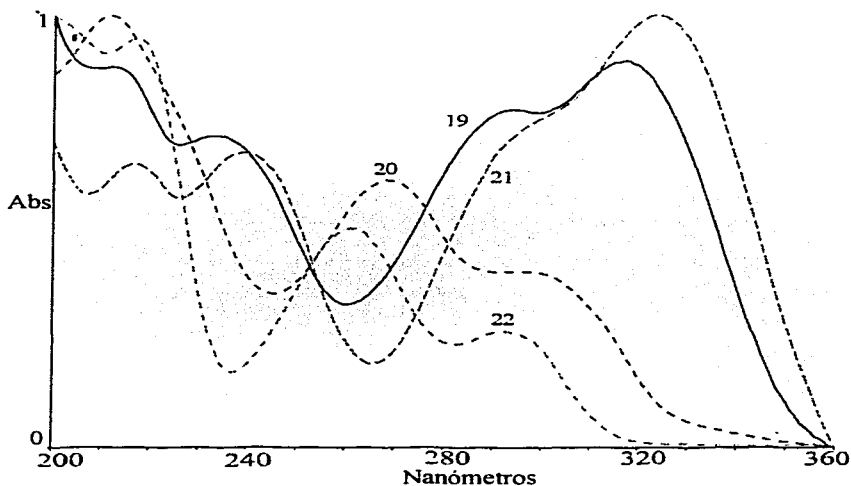
Los niveles de los picos detectados aumentaron gradualmente hasta los 12 días y después no varió hasta el final de la cinética los 27 días. Al igual que lo observado en el medio MS, a lo largo de la cinética no se observaron picos que presentaran espectros de absorción relacionados a los capsaicinoides tanto en cultivos con y sin alimentar. Cabe señalar que en contraste con lo observado en el medio MS, en este medio no se detectaron compuestos como vainillina o derivados del ácido vainillínico en los tiempos de muestreo. Esto puede indicar que en estos cultivos no se encontraban las enzimas necesarias para catalizar las reacciones que hicieran posible la formación de vainillina y de los derivados del ácido vainillínico.



**Figura 26.** Espectros de absorción de un compuesto (18) detectado en los extractos orgánicos del medio de cultivo alimentados con alcohol vainillílico (200  $\mu\text{M}$ ) en medio CH50. 9, alcohol vainillílico al tiempo 0 (TR= 8.79 min.); 18, compuesto formado a los 12 días (TR= 14.6 min.)

#### b) Biomasa

La figura 27 muestra los espectros de absorción de dos de los compuestos (19, TR=4.1 y 20, TR= 14.3) detectados en los extractos orgánicos de las células alimentadas con alcohol vainillílico y después de los 0 y 9 días de cultivo. Estos espectros corresponden a los únicos compuestos relacionados a los fenilpropanoides detectados a lo largo de la cinética a niveles constantes. Como puede apreciarse, presentaron altas correlaciones con el ácido ferúlico (21, TR= 18.6) y ácido vainillínico estándar (22, TR=13.6). Al igual que en el medio de cultivo, no se detectaron picos que presentaran espectros de absorción relacionados a los capsaicinoides en ningún tiempo durante la cinética.



**Figura 27.** Espectros de absorción de compuestos detectados en los extractos orgánicos de las células alimentadas con alcohol vainillílico (200  $\mu$ M) en medio CH50. 19, compuesto detectado al tiempo 0 (TR= 4.12 min.); 20, compuesto detectado a los nueve días (TR= 14.35 min.); 21, ácido ferulico estándar (TR= 18.57 min.); 22, ácido vainillínico estándar con un TR= 13.08 min.)

Como se observó, los cultivos pueden realizar varias reacciones de biotransformación de los compuestos exógenos. Así, las células en suspensión pueden ser manipuladas para la producción de compuestos de interés mediante bioconversiones. Se han hecho diversos estudios de biotransformación de fenilpropanoides en células inmovilizadas como en suspensión de *Capsicum*. La adición de estos precursores algunas veces ha incrementado la producción de capsaicina en varios modelos de estudio. Se ha reportado, por ejemplo, que la adición de ácido ferúlico y vainillilamina incrementan los niveles de vainillina (Johnson et al., 1996). Nuñez (1997), estudiando el efecto de adición de precursores



aromáticos en cultivos celulares de *Capsicum annuum*, encontró que los cultivos tratados con vainillina fueron los que produjeron una mayor cantidad de capsaicinoides con respecto a los demás precursores. Ramachandra y Ravishankar (2000) encontraron que al adicionar ácido caféico a cultivos de células en suspensión de *Capsicum frutescens* se incrementaban los niveles de capsaicina, siendo aún mayor estos niveles en células inmovilizadas. De manera similar, en el presente trabajo, se observó que en los experimentos realizados con células alimentadas con alcohol vainillílico en medio MS, hubo una producción muy alta de vainillina (48 veces la cantidad alimentada de alcohol vainillílico) a los 15 días de incubación, al igual que algún probable derivado del ácido vainillinico. Esto no se reflejó de la misma manera en los experimentos realizados en medio CH50, indicando que el uso de una concentración dos veces mayor de nitrógeno junto con la adición del alcohol vainillílico afectó positivamente en la formación y acumulación de precursores fenólicos, como la vainillina y algunos derivados del ácido vainillinico, pudiendo ser una probable alternativa para la obtención de vainillina natural usando células de *Capsicum chinense*.

#### **F. EFECTO DEL ACIDO PROTOCATEQUICO SOBRE EL PERFIL DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS Y CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Capsicum chinense* (CHILE HABANERO)**

Con base a los resultados anteriores, en este experimento se estudió el efecto de la adición del ácido protocatequico sobre la producción de compuestos fenólicos y contenido de capsaicinoides en cultivos de células en suspensión de *Capsicum chinense* tanto en medio MS como en CH50 y analizando el medio de cultivo y la biomasa. A diferencia de los resultados anteriores, a continuación se hace referencia a ambos medios de cultivo, ya que se observaron resultados similares.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 1. Cultivos crecidos en medio MS y CH50 alimentados con ácido protocatéquico

### a) Medio de cultivo

En la figura 28, se muestran los cromatogramas a 230 nm, de los extractos orgánicos del medio de cultivo alimentado con ácido protocatéquico (200  $\mu$ M). Se observó que el ácido protocatéquico (pico 23, TR=7.4 min.) fue removido totalmente a los 3 días de cultivo. Posteriormente, a las 72 horas no se detectó ningún pico que presentara espectros relacionados con los fenilpropanoides (Fig. 28). No obstante, a los nueve días se observó la aparición de un sólo pico (24, TR=14.7 min.) que posee un espectro parecido al del ácido vainillínico (espectro 22, TR=13.1 min.) (Fig 29). Esta similitud se observó en la parte espectral que es debida a la parte aromática, pero se deforma en la región de los 220 nm. Después de este tiempo, ya no se detectaron compuestos con espectros de interés hasta el final de la cinética, razón por la cual no se presentan los cromatogramas de los días restantes. Al no detectarse el compuesto adicionado en el medio de cultivo a partir de los tres días, se deduce que este fue asimilado, transformado o que fue requerido para otros procesos metabólicos que tuvieran lugar dentro de la célula.

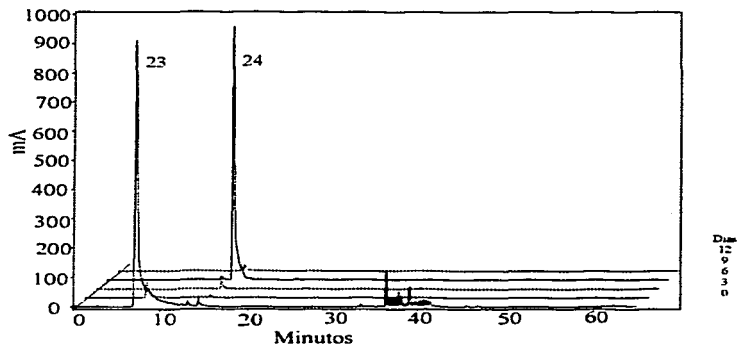
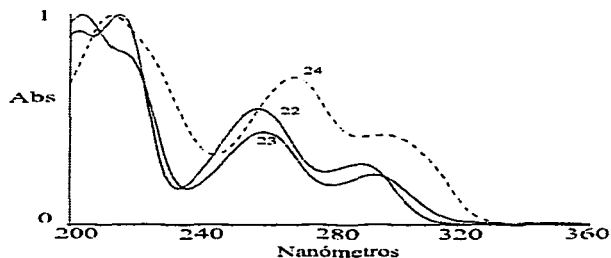


Figura 28. Cromatogramas a 260 nm de los extractos orgánicos del medio de cultivo de células alimentadas con ácido protocatéquico 200  $\mu$ M (23) en medio MS.

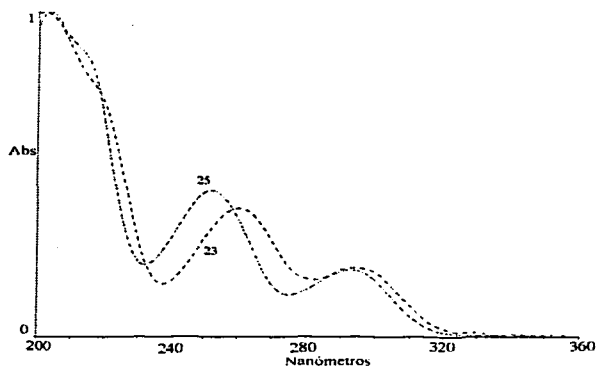
**b) Biomasa**

En la figura 30 se muestra el espectro de absorción de un compuesto (25, TR=3.8 min.) detectado a lo largo de la cinética en la biomasa alimentada con ácido protocatéquico 200  $\mu\text{M}$  y su comparación con un estándar de ácido protocatéquico (23, TR= 6.8 min.). El espectro del compuesto 25, del cual el pico en el cromatograma permaneció constante durante los 27 días, mostró una gran similitud con el compuesto adicionado, sólo que su espectro cambia en la sección inicial aproximadamente a los 210 nm. Cabe señalar que hubo una diferencia notable en la cantidad de biomasa producida en el medio CH50 que fue mayor que en el MS. Posiblemente la disminución en la cantidad de nutrientes y la presencia del compuesto exógeno activaron algún mecanismo que compitió por el precursor adicionado y permitió asimilarlo rápidamente, ya que se ha observado que puede haber una relación inversa entre el metabolismo secundario y la síntesis de compuestos que están involucrados en el metabolismo primario (Hall et al., 1991).



**Figura 29.** Espectro de absorción del ácido protocatéquico (23) (TR= 7.36) y del compuesto detectado a los nueve días en medio MS con un TR= 14.72 min. en comparación del espectro del ácido vainillínico (22, TR=13.17 min.)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



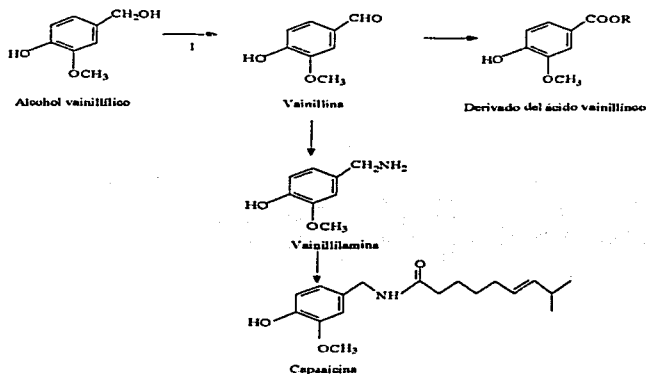
**Figura 30.** 23: espectro de absorción del ácido protocatéutico estándar (TR= 6.81 min.); 25: Espectro de absorción de un compuesto detectado en los extractos orgánicos de las células alimentadas con ácido protocatéutico 200  $\mu$ M en medio MS y CH50 (TR= 3.86 min.)

Ramachandra y Ravishankar (2000) usando aldehído protocatéutico como probable precursor de la ruta biosintética de capsaiconoides, encontraron que en presencia de este precursor, las células de *C. frutescens* acumulaban más vainillina que capsaicina. En contraste, el ácido protocatéutico empleado en este trabajo fue removido totalmente, pero no hubo formación de capsaiconoides ni compuestos fenólicos relacionados a la ruta de interés. Lo anterior sugiere que las células no lograron tener las enzimas requeridas para llevar a cabo esas biotransformaciones.

De los resultados globales del presente estudio, se pudo observar que cuando las células fueron alimentadas con alcohol vainillílico en medio MS, estas tuvieron la capacidad de asimilarlo y transformarlo a vainillina y otros probables derivados del ácido vainillínico en concentraciones muy altas. Con base a estos resultados, se puede concluir que utilizaron las células para transformar el alcohol fue la siguiente:

Resultados y Discusión

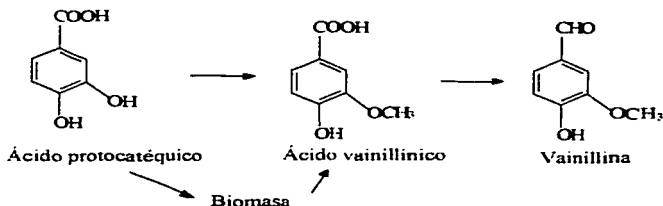
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



La primera reacción (1) que comprende la transformación de alcohol vainillílico a vainillina pudo ser llevada a cabo por una enzima como la alcohol vainillílico oxidasa, que podría ser una enzima constitutiva o inducida. Cabe señalar que la concentración encontrada de vainillina en los cultivos fue casi 48 veces mayor que la del sustrato adicionado, por lo cual, las células deben haber producido vainillina de novo. Es decir, la cantidad de vainillina encontrada no pudo provenir del alcohol vainillílico adicionado ya que este se adicionó en una concentración mucho menor que la vainillina detectada. Así, la adición del alcohol vainillílico pudo haber inhibido la enzima que cataliza en teoría la reacción de vainillina a vainillilamina en *Capsicum* y por ello se observó tal acumulación de vainillina en los cultivos. Otra posibilidad es que la vainillina formada se haya sintetizado a partir de una ruta metabólica alterna, descartando la descomposición de lignina, ya que al formar parte de la pared celular, las células hubieran sufrido daños importantes como lisis, disminuyendo la viabilidad celular, proceso que no se observó en los cultivos. Por otro lado, la vainillina no se detectó en los cultivos de células incubadas en medio CH50, pero se observaron posibles derivados del ácido vainillínico. Esto indica que la transformación de vainillina a ácido vainillínico fue más eficiente en CH50 que en

MS, es decir, que la deficiencia en nitrógeno favorece la formación de ácido vainillínico. La posibilidad de que la vainillina se transformara hacia la vainillilamina y capsaicinoides es baja porque estos compuestos no se detectaron en los cultivos. Esto motiva a seguir estudiando el mecanismo de biosíntesis de capsaicinoides en esa última parte de la ruta, ya que al producirse la vainillina en concentraciones tan altas, se podría otra técnica experimental para tratar de detectar los compuestos finales de la ruta, además de poder estudiar la enzimología involucrada en esta transformación.

En cuanto a las células alimentadas con ácido protocatéquico, el espectro detectado en el medio MS puede representar un conjugado del ácido protocatéquico o del ácido vainillínico dado que el espectro sólo muestra una modificación en la región de los 220 nm. Si esto fuera así, tal vez el ácido protocatéquico se transforme finalmente a un derivado del ácido vainillínico. Por otra parte, en los cultivos crecidos en medio CH50 suplementado con ácido protocatéquico, hubo mayor formación de biomasa y el análisis de esta permitió observar un compuesto con un espectro parecido al del ácido alimentado, lo que indica que pudo ser un derivado de este. Así, los posibles pasos para la biotransformación del ácido protocatéquico serían:



Finalmente, al contrario de lo que se observó en los cultivos alimentados con alcohol vainillílico, el ácido protocatéquico no favoreció el flujo metabólico hacia los

---

fenilpropanoides ni capsaicinoides, ya que no se lograron detectar estos compuestos en los cultivos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VII. CONCLUSIONES

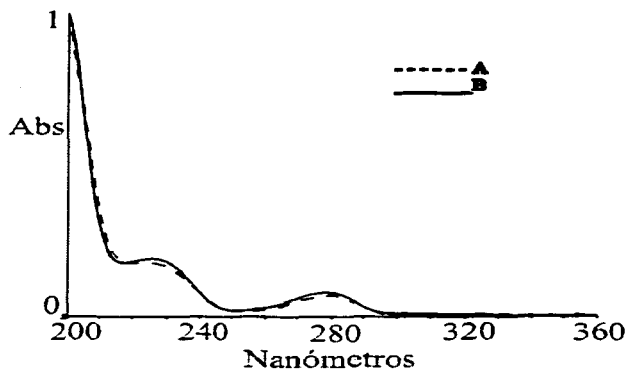
1. La adición del alcohol vainillílico favoreció el flujo metabólico hacia la formación de intermediarios más inmediatos de los capsaicinoides, como la vainillina, ácido vainillínico y probables conjugados o dímeros de estos intermediarios. Sin embargo no favoreció la formación de capsaicinoides
2. El nitrógeno afectó positivamente la biosíntesis de algunos productos fenólicos cuando las células se alimentaron con alcohol vainillílico.
3. El alcohol vainillílico fue oxidado a vainillina, ácido vainillínico y algunos conjugados de estos compuestos.
4. La cantidad de vainillina formada en cultivos alimentados con alcohol vainillílico en medio MS fue de 1.4 g/L a los 15 días de la cinética. Esto indica que la técnica utilizada puede ser una alternativa para la síntesis de vainillina.
5. El ácido protocatéquico fue asimilado por la biomasa, pero aparentemente no fue biotransformado a compuestos relacionados a fenilpropanoides ni capsaicinoides.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

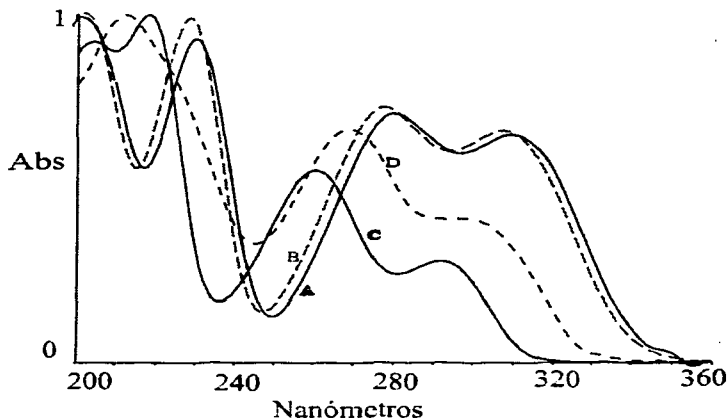


VIII. ANEXOS



**Anexo 1. A:** Espectro de absorción correspondiente al alcohol vainillílico estándar (A) (TR= 9.66 min.), y al alcohol vainillílico (B, TR=7.44 min.) adicionado a las células de chile habanero en medio MS.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Anexo 2.** Espectros de absorción para: A. vainillina estándar (TR= 17.04 min.); B. vainillina detectada a los 15 días en los extractos orgánicos del medio de cultivo alimentado con alcohol vainillílico 200  $\mu$ M en medio MS (TR= 16.44 min.); C. ácido vainillínico estándar (TR= 13.17 min.); D. compuesto detectado a los 15 días en las mismas condiciones que el compuesto B (TR= 14.66 min.).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## IX. REFERENCIAS

Balboa S.L., Karawya, M.S. and Girgis A.N. (1968). The Capsaicin Content of *Capsicum* Fruits at Different Stages of Maturity, *Lloydia*, 31:272.

Bennet D.J. and Kirby G.W. (1968). Constitution and Biosynthesis of Capsaicin, *J. of Chem. Soc.*: 442-446.

Calva C. G., Narbad J., Eagles E. J., Parr M. J., Rodes M. J. C., Walton N. J., Amito M. J. and Robins J. Phenolic Transformation by *Capsicum spp.* In Current Trends in Fruit and Vegetables Phytochemistry. Garcia-Viguera C. M., Castañer M., Gil M. I., Ferreres F., Tomas-Barberan F. A. Eds. España: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas, 1995: 205-209.

Calva C. G. Glycosylation and Synthesis of Capsaicin in Cell Cultures and Fruits of *Capsicum spp.* Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Institute of Food Research-Norwich. Genetic and Microbiology Department, 1997: 256.

Calva C. G. y Rios L. E. Cultivo de Callos y su Acumulación de Metabolitos de Metabolitos Secundarios, en Aspectos aplicados de la Biotecnología. Vazquez R.R., Calva C. G., Ramos R, E. y Salazar M. A. Mexico: Instituto Politécnico Nacional. 1999: 290-296.

Govindarajan V. S. (1985). *Capsicum*- Production, Technology, Chemistry and Quality. Part I: History, Botany, Cultivation and Primary Processing, in *Critical Reviews in Food Science Nutrition* 22 (2): 109-144.

Govindarajan V. S. (1986). *Capsicum*- Production, Technology, Chemistry and Quality. Part III: Chemistry of the Color, Aroma and Pungency Stimuli, in *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 24 (3): 313-348.

Govindarajan V. S. and Sathyanarayana M. N. (1991). *Capsicum*- Production, Technology, Chemistry and Quality. Part V. Impact on Physiology, Pharmacology, Nutrition and Metabolism: Structure, Pungency, Pain and Desensitization Sequences, in *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 29(6): 345-460.

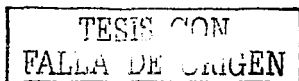
Hall R. and Yeoman M. (1991). The influence of Intracellular Pools of Phenylalanine Derivatives upon Synthesis of Capsaicin by Immobilized Cell Cultures of the Chilli Pepper *Capsicum frutescens.*, *Planta*, 185: 72-80.

Heisser Ch. B., Smith P. (1953) The Cultivated Capsicum Peppers. *Economic Botany*, 7: 214-226.

Hrazdina G. Compartmentation in Aromatic Metabolism. In *Phenolic Metabolism in Plants*. (Stafford H. and Ibrahim R). U.S.A. Plenum Press. 26,1992: 1-4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Iwai K., Lee K. R., Kobashi M. and Susuki T. (1977). Formation of Pungent Principles in Fruits of Sweet Pepper, *Capsicum annum* L. var. *grossum* during Post-harvest under Continuous Light, *Agric. Biol. Chem.*, 41 (10): 1873-1876. *Referencias*
- Iwai K., Susuki T. and Fujiwake H. (1979). Formation and Metabolism of Pungent Principles of *Capsicum* Fruits. IV. Formation and Accumulation of Pungent Principles of *Capsicum annum* var. *annuum* cv. *karayatsubusa* at Different Stages after Flowering. *Agric. Biol. Chem.* 43: 2493.
- Johnson T. S., Ravishankar G.A. and Venkataraman L.V. (1995). Biotransformation of Ferulic Acid and Vanillylamine to Capsaicin and Vanillin in Immobilized Cell Cultures of *Capsicum frutescens*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 44:117-121
- Johnson T. S. and Ravishankar G.A. (1996). Precursor Biotransformation in Immobilized Placental Tissues of *Capsicum frutescens* Mill. Influence of Feeding Intermediate Metabolites of the Capsaicinoid Pathway on Capsaicin and Dihydrocapsaicin Accumulation, *J. Plant Physiol.*, 147: 481-485.
- Koop B., Jurenitsch J. and Kubelka W. (1980). Biosynthesis of Capsaicinoids in *Capsicum annum* L. var. *annuum*, *Planta Medica*, 39 (3): 289.
- Koop B. and Jurenitsch J. (1981). Biosynthesis of Capsaicinoids in *Capsicum annum*. 2. Formation of the Fatty Acid Moiety of the Capsaicinoids from L-Valine, L-Isoleucine, *Planta Medica*, 43(3): 272. *Referencias*
- Koop B., Jurenitsch J., Woginger R. and Hawnold E. (1983). Biosynthesis of Capsaicinoids in *Capsicum annum* L. var. *annuum* IV. On the Incorporation of Nitrogen., *Sci. Pharm.*, 51: 274.
- Kosuge S. and Inagaki Y. (1964). Pungent Principles of Red Peppers. XI. Determination and Contents of the Two Principles, *Chem. Abstr.*, 61: 7620f.
- Leete E. and Loudon M.C.L. (1968). Biosynthesis of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 90 (24): 6837-6841.
- Lindsey K. and Yeoman M. M. (1984). The Synthetic Potential of Immobilized Cell of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum*, *Planta*. 162(6): 195-501.
- Merck Index. Ed. Budavari S. U.S.A., Twelfth Edition, Merck Research Laboratories, 1996, p. 287-288.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*. 15 (3): 473-497.
- Neumann D. (1986). On the Biosynthesis of Capsaicin. *Naturwissenschaften*, 53: 131.



Nuñez Palenius Hector Gordon. Efecto de los Precursores Aromáticos sobre la Acumulación de Capsaicinoides en Suspensiones Celulares de Chile (*Capsicum annum* L.). Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional- Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato, México. 1997: 91.

M. M. (1992). Phenylpropanoid Metabolism During Growth and Development of *Capsicum frutescens* Fruits, *Phytochemistry*;32 (4): 839-844.

Susuki T., Kawada T. and Iwai (1981). K. Formation and Metabolism of the Pungent Principle of *Capsicum* Fruits. Part IX. Biosynthesis of Acyl Moieties of Capsaicin and its Analogs from Valine and Leucine in *Capsicum* Fruits, *Plant Cell Physiol.*, 22(1): 23.

Susuki T., Kawada T. and Iwai K. (1981). Formation and Metabolism of the Pungent Principle of *Capsicum* Fruits. Part X. The Precursors Affecting the Composition of Capsaicin and its Analogs in the Fruits of *Capsicum annum* var. *Referencias karayatsubusa*, *Agric. Biol. Chem.*, 45: 535.

Susuki T. and Iwai K. (1984). Constituents of Red Pepper Species; Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Food Science of the Pungency Principle of *Capsicum* species, in *The Alkaloids*, Brossi E., Ed. Academic Press, Orlando, Fla., 24.

Yeoman M. M., Miedzybrodska M. B., Lindsey K. and McLauchlan W. R. The Synthetic Potential of Cultured Plant Cells. In *Plant Cell Cultures, Results and Perspectives*. Sala F., Parisi B., Cella R. and Cifferri O. Eds. Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 1990: 327-343.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN