



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Irapuato

Unidad de Genómica Avanzada

“Estudio del perfil metabólico de diferentes tejidos del fruto de chile  
mediante el análisis no dirigido”

Tesis que presenta

**Felipe de Jesús Cervantes Hernández**

Para Obtener el Grado de

**Maestría en Ciencias**

En la especialidad de

**Biotecnología de Plantas**

Directores de Tesis:

**Dr. Octavio Martínez de la Vega**

**Dr. José Juan Ordaz Ortiz**

Irapuato, Guanajuato.

Enero de 2018

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biología Computacional y el Laboratorio de Metabolómica y Espectrometría de Masas de la Unidad de Genómica Avanzada del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), bajo la asesoría del Dr. Octavio Martínez de la Vega y el Dr. José Juan Ordaz Ortiz, y con el apoyo financiero de CONACYT (becario 587878).

## DEDICATORIAS

### A LA VIDA:

Por las grandes, medianas y pequeñas sorpresas que siempre me han ocurrido. Gracias por la salud que he mantenido hasta el día de hoy. Gracias por la familia, los amigos, cualidades y las experiencias que he podido adquirir durante mi recorrido.

### A MIS PADRES:

Por ser el pilar más grande para querer superarme todos los días. Gracias por todo el amor y comprensión que me han demostrado con su apoyo, esfuerzo y sacrificios. Todos mis logros y metas los hago pensando en ustedes.

### A MIS HERMANOS:

Armando y Daniel por su apoyo y tolerancia, además de los buenos momentos. Gracias por estar conmigo siempre.

### A MI FAMILIA:

María Dolores Hernández García y Venustiano Hernández Rodríguez, por contribuir a la persona que he llegado a ser. Por todas las enseñanzas y hermosos momentos que están presentes en mi mente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al CONACYT por la beca otorgada (becario 587878) para la culminación de mis estudios de posgrado.

Al Cinvestav-Irapuato-UGA por brindar las instalaciones para la realización de este proyecto y permitirme obtener el título de Maestro en Ciencias en la especialidad de Biotecnología de Plantas.

A mis directores de tesis, primeramente, por aceptarme en sus grupos de trabajo y compartir los conocimientos en sus distintas áreas:

Al Dr. José Juan Ordaz Ortiz por la asesoría y todos los conocimientos que transmitió durante estos dos años de formación dentro del análisis por espectrometría.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega por todo su apoyo e introducción al análisis de datos a gran escala, algo que nunca había hecho. Además, por su paciencia y comprensión durante la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité, Dr. Neftalí Ochoa Alejo y Dra. Angélica Cibrián Jaramillo, por sus sabios consejos y observaciones para la satisfactoria culminación de este proyecto.

Agradezco inmensamente al Biol. Fernando Hernández Godínez, Auxiliar de Investigación, por siempre apoyarme en las complicaciones que se presentaron durante este tiempo de trabajo, además de sus consejos y palabras de aliento.

Un agradecimiento muy especial a María Esperanza Anaya Gil, anterior Auxiliar de Investigación del laboratorio de Metabolómica, ya que ayudó en la formación y organización de lo que actualmente es el laboratorio, además de sus recomendaciones y ayuda durante el análisis de las muestras.

Un agradecimiento especial a la Dra. June Simpson y su grupo de trabajo, por su apoyo en las instalaciones de los invernaderos de la Unidad Irapuato, y por el apoyo e inclusión en diferentes eventos.

Agradezco al Dr. Victor Olalde Portugal por el apoyo y asesoría con el cultivo de las plantas de Chile, así como los consorcios microbianos proporcionados para el crecimiento y cuidado de las plantas.

A mis compañeros y ex compañeros de ambos laboratorios: Arely, Paul Pascual, Rogelio, David, Josué, Ana Laura, Sarahi, Fidel, Judith, Paulina, María Fernanda, Gerardo, Fanny, Luis y Adrián, con quienes, en mayor o menor medida, compartimos tiempo de calidad en el laboratorio.

Un agradecimiento a los Laguneros y ex compañeros de casa: Carolina, Sheila, Sofía y Ruth, por estos casi dos años que convivimos en la misma casa, y por ayudarme a crecer como persona, por las pláticas amenas, las noches de juego y el drama que no puede faltar.

A Vincent y Víctor, personas muy importantes que me han brindado una sincera amistad y sabios consejos, además de brindar los días que la situación lo ameritaba, ¡Salud!

A mis amigos en Cinvestav: Carlos, Ricardo, Thelma, Miguel, Dania, Sara, Ale, Daniel y Bernardo.

A mis amigos de Mazatlán que me hacían una plática amena cuando ocupaba alguien con quien platicar: Diana, Manuel, Carolina, Gabriela, Teresa, Ramón, Elizabeth, Javier, Roberto, Abraham, Omar, Karla, Nayeli, Jorge, Kevin y Alan.

Y el más sincero agradecimiento a Mizraim Olivares Miranda, por estar conmigo en buenos y hacer de los no tan buenos algo pasajero durante este último año de formación. Por darme el cariño, la alegría y la tranquilidad que es lo que más necesitaba en mi vida.

Por último, a las personas que estuvieron conmigo durante estos poco más de dos años que estuve fuera de mi círculo de confort, y que de maneras distintas nunca dejaron de alentarme a conseguir mis metas.

## Índice

Índice de figuras	8
Índice de tablas	10
Resumen	11
Abstract	12
<b>1. Introducción</b>	<b>13</b>
<b>2. Antecedentes</b>	<b>16</b>
2.1. <i>Capsicum annuum</i> .	16
2.1.1. Anatomía y composición del fruto	18
2.2. Las ciencias ómicas.	19
2.2.1. Análisis metabolómicos.	21
2.2.2. Cromatografía de líquidos en matrices complejas.	23
2.2.3. Bases de datos disponibles para la comparación de compuestos en espectrometría de masas.	25
2.3. Análisis de la diversidad metabólica en <i>C. annuum</i> .	26
<b>3. Justificación</b>	<b>29</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>31</b>
<b>5. Objetivo General</b>	<b>32</b>
5.1. Objetivos específicos.	32
<b>6. Metodologías</b>	<b>33</b>
6.1. Diseño experimental.	33
6.2. Establecimiento de variedades y material biológico.	34
6.2.1. Esterilización y germinación de semillas.	34
6.2.2. Riego y fertilización de plantas en invernadero.	34
6.2.3. Recolección de material vegetal.	34
6.2.4. Disección de tejidos del fruto de chile var. "Tabasco".	35
6.3. Extracción en dos fases.	35
6.4. Análisis en LC-MS.	35
6.5. Análisis de datos y diseño experimental.	37
<b>7. Resultados</b>	<b>39</b>
7.1. Material vegetal y colecta de frutos.	39
7.2. Estandarización del método cromatográfico.	39
7.2.1. Robustez del método de extracción.	40
7.2.2. Estandarización del método y análisis para LC-MS.	40
7.3 Análisis de tejido específico del fruto de chile "Tabasco".	45
<b>8. Discusión</b>	<b>63</b>
8.1. Robustez del método de extracción.	63
8.2. Distribución de los tejidos del fruto de chile en base a sus perfiles metabólicos no dirigidos.	65
8.3. La diversidad de compuestos encontrados en las partes del fruto de chile y sus posibles propiedades bioactivas.	67

8.4. Propiedades nutraceuticas del fruto y la presencia de compuestos no reportados.	69
<b>9. Conclusiones</b>	71
<b>10. Perspectivas</b>	73
<b>11. Referencias</b>	74
<b>12. Anexos</b>	86

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Corte transversal del fruto de chile.	19
<b>Figura 2.</b> Esquema de los diferentes niveles de organización molecular.	20
<b>Figura 3.</b> Diagrama de flujo del análisis metabólico.	22
<b>Figura 4.</b> Estructuras de los compuestos en cromatografía líquida de fase reversa.	24
<b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo de las actividades.	33
<b>Figura 6.</b> Espectrómetro de masas Synapt HDMS G1.	36
<b>Figura 7.</b> PCA de dos distintos métodos de extracción no dirigida del fruto de chile.	40
<b>Figura 8.</b> Perfil cromatográfico de muestras del fruto completo de la variedad Tampiqueño 74 (tipo serrano) (T74) a 60 días después de antesis.	42
<b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico de muestras del fruto completo del chile criollo de Morelos (CM334) a 60 días después de antesis.	43
<b>Figura 10.</b> Comparación de dos estadios del desarrollo del fruto de T74.	44
<b>Figura 11.</b> Diferencias cromatográficas de la fase extraída con dietiléter en ESI (+) utilizando una columna CHS C18	46
<b>Figura 12.</b> Análisis de componentes principales de la fase orgánica de los tejidos del fruto de chile “Tabasco”.	49
<b>Figura 13.</b> Análisis de componentes principales de la fase acuosa de los tejidos del fruto de chile “Tabasco”.	50
<b>Figura 14.</b> Características diferenciales entre los diferentes tejidos en la extracción con dietiléter presentados en gráficas de volcán	52
<b>Figura 15.</b> Características diferenciales entre los diferentes tejidos en la extracción con MetOH:H <sub>2</sub> O presentados en gráficas de volcán.	53
<b>Figura 16.</b> Diagramas de Venn de la distribución de compuestos pre-identificados	55
<b>Figura 17.</b> Perfiles de fragmentación.	56

**Figura 18.** Tiempos de retención para compuestos en placenta del fruto de chile en columna C<sub>18</sub>.

57

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Taxonomía del género <i>Capsicum</i> .	16
<b>Tabla 2.</b> Composición de solución Long-Ashton.	34
<b>Tabla 3.</b> Método de separación cromatográfica en columna C <sub>18</sub> (LC-MS).	37
<b>Tabla 4.</b> Información del crecimiento y colecta de las réplicas biológicas incluidas en el experimento.	39
<b>Tabla 5.</b> Metabolitos del metabolismo secundario pre-identificados en muestras de chile T74.	45
<b>Tabla 6.</b> Aductos utilizados en “Progenesis QI for metabolomics”.	47
<b>Tabla 7.</b> Clases de compuestos pre-identificados en las diferentes fases de extracción y análisis.	57
<b>Tabla 8.</b> Compuestos pre-identificados con diferencias significativas entre tejidos.	59

## **Resumen**

El fruto de chile (*Capsicum* spp.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes para México. Sus características únicas son reconocidas a nivel mundial, además de que sus propiedades únicas para el beneficio de la salud, conocidas desde hace siglos de manera empírica, han comenzado a aclararse y atribuirse a compuestos claves. La búsqueda metabólica no dirigida ha empezado a ganar interés en el descubrimiento de compuestos en matrices complejas. Separando los principales tejidos del fruto de chile Tabasco, se realizó la búsqueda global en la plataforma LC-ESI-QToF-MS/MS. Se pre-identificaron alrededor de 300 compuestos putativos de los cuales 77 presentaron abundancia significativa hacia alguno de los tejidos del fruto. Las principales clases de compuestos encontrados pertenecen a grupos con propiedades bioactivas consistentes a los usos empíricos del chile en la medicina tradicional. Este trabajo presenta una exploración hacia la generación de una base de datos que contenga la información metabólica global del fruto de chile.

## **Abstract**

Chili pepper (*Capsicum* spp.) is one of the most important horticultural crops of Mexico. Its unique characteristics are recognized all around the world, and its empirical well-known benefits in human health since centuries are recently attached to key compounds. The non-targeted metabolic analysis has become to gain attractive in phytochemical discovery fields. Dissecting the main tissues of red Tabasco chili pepper, global metabolic profiling was performed in a LC-ESI-QToF-MS/MS equipment. Around 300 putative compounds were pre-identified, where 77 were significant related to a tissue-specific localization. The main compound classes detected were consistent with literature and empirical uses for chili pepper extracts in traditional medicine. In this study, we show an explorative work to the making of a metabolic database of chili pepper fruit.

## 1. Introducción

El fruto de chile (*Capsicum* spp.) es uno de los ingredientes más utilizados e importantes en la cultura culinaria de diferentes países alrededor del mundo, por ejemplo Asia, Latinoamérica, Mediterráneo y África. Se tienen registros del uso de este fruto para platillos tradicionales e incluso rituales ceremoniales desde tiempos ancestrales (Guzman, Bosland, & O'Connell, 2011). México, es uno de los países con mayor historia cultural y producción en chile (Waizel-Bucay & Camacho Morfín, 2011). La producción a nivel mundial de este fruto asciende alrededor de 32,324,345 toneladas en 2014, año en el que México ocupó el segundo lugar en la producción mundial (FAO, 2014).

El interés de este fruto no recae únicamente en las características organolépticas únicas que ofrece al área culinaria, sino también en las propiedades que posee debido a la diversidad de metabolitos secundarios que están presentes en los diferentes tejidos que lo componen. Algunos de ellos ya se reconocen y se utilizan para el beneficio de la salud humana como son el ácido ascórbico, las vitaminas (A, C, E), los capsaicinoides, y los flavonoides, entre otros (Jang, Jung, Lee, Choi, & Lee, 2015).

Durante el proceso de maduración, los frutos sufren cambios morfológicos significativos; específicamente en chile, una elongación pronunciada ocurre durante los primeros 30 días después de la antesis (DAA), y posteriormente comienza a sintetizar y acumular distintos compuestos, principalmente del metabolismo secundario, a los cuales se le atribuyen las características organolépticas únicas de este fruto (Klie et al., 2014). Capsaicinoides, capsinoides, carotenoides (provitamina A), aceites esenciales, antocianinas, tocoferoles, flavonoides y ácido ascórbico (vitamina C), son compuestos secundarios encontrados en los frutos de *Capsicum*, otorgándole sus características sensoriales a lo largo de los diferentes tejidos del fruto (Aranha, Hoffmann, Barbieri, Rombaldi, & Chaves, 2017). Sin embargo, poco se conoce sobre la distribución espaciotemporal de los compuestos en los diferentes tejidos que componen al fruto.

Dentro de los grupos de compuestos más importantes de este fruto son los capsaicinoides, los cuales han sido atribuidos a la síntesis en tejido-específico de la placenta (Cesar Aza-González, Núñez-Paleniús, & Ochoa-Alejo, 2011). Debido al impacto comercial que posee este grupo, ya que son los responsables de la pungencia característica de ciertas variedades, ya se ha estudiado ampliamente la ruta de biosíntesis de los capsaicinoides con el fin de entender y mejorar estas características en el fruto. Se conoce la enzima putativa de la catálisis de la acetilación de vainillilamina y una cadena de ácidos grasos para la generación de diversos capsaicinoides. Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo (2017), reportaron la identificación de un gen de un factor de transcripción que aparentemente regula la ruta de biosíntesis mediante la interacción, demostrando la disminución de capsaicinoides al silenciar ese gen.

La gran variedad de compuestos y el impacto que poseen éstos en el mercado mundial, dadas las características organolépticas y nutraceuticas citadas, ha aumentado el interés sobre el estudio del metabolismo secundario de Chile a diferentes niveles moleculares utilizando distintas técnicas ómicas (Estrada, Bernal, Díaz, Pomar, & Merino, 2000; Martínez-López, Ochoa-Alejo, & Martínez, 2014).

Las ciencias ómicas, así como las herramientas bioinformáticas han comenzado a desempeñar un papel importante para la comprensión y el análisis molecular de diferentes organismos. En la primera década de este siglo, los estudios genómicos en plantas modelos promovieron el descubrimiento de diversos genes importantes en el desarrollo o de respuesta biológica, creando una vía para la genómica funcional. Se han logrado dilucidar con precisión diversos procesos en sistemas biológicos complejos, como son las funciones de defensa a estrés abiótico o biótico y procesos de desarrollo (Mochida & Shinozaki, 2011).

Para lograr entender los procesos celulares de un organismo, las ciencias ómicas abordan las interrogantes en base a los diferentes niveles moleculares. Dentro de ellas se encuentran la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica, principalmente (Fukushima, Kusano, Redestig, Arita, & Saito, 2009).

En los últimos años se han destacado los estudios metabolómicos globales en la búsqueda de nuevos blancos moleculares ante condiciones específicas o la sinergia que pudieran tener en una matriz molecular compleja. Éstos dan un hincapié al establecimiento de una clasificación basada en el contexto final de la expresión genética y el peso de las condiciones ambientales expuestas (Glinski & Weckwerth, 2006).

En este trabajo se obtuvieron y analizaron los perfiles metabólicos globales de los tejidos de pericarpio, placenta y semilla del fruto de chile Tabasco (*C. annuum* L.) en el estadio maduro (60 días después de antesis; DAA).

## 2. Antecedentes

### 2.1. *Capsicum* spp.

El chile es uno de los cultivos hortícolas encontrados en todo el mundo, principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Wahyuni et al., 2013). Perteneciente a la familia Solanaceae, el género *Capsicum* está compuesto por 40 especies de las cuales *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*, son cultivados de manera extensa en el territorio mexicano y su demanda en el mercado es requerida durante todo el año (Morán-Bañuelos et al., 2008; ThePlantList.com, 2013).

Tabla 1. Taxonomía del género *Capsicum*.

Taxonomía	
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Asteridae
<b>Orden:</b>	Solanales
<b>Familia:</b>	Solanaceae
<b>Subfamilia:</b>	Solanoideae
<b>Tribu:</b>	Capsiceae
<b>Género</b>	<i>Capsicum</i>

Se tiene registrado que distintas civilizaciones de México, Centro y Sudamérica utilizaban los frutos de chile no sólo como alimentos, sino como remedio herbolario o en diferentes rituales espirituales (Morán-Bañuelos et al., 2008). Se le han otorgado diferentes nombres a los frutos dependiendo de la cultura, incluidos aji, paprika, chili y chilie entre otros (Guzman et al., 2011).

Hoy en día, es uno de los ingredientes más importantes para la identidad culinaria en México. *Capsicum annum* es la especie más consumida en el mercado por su valor nutrimental y características sensoriales (Kim et al., 2008). Los niveles de

pungencia de los platillos mexicanos son una referencia a nivel global sobre las características de la comida típica en este país (Waizel-Bucay & Camacho Morfín, 2011).

México es uno de los mayores productores de chile a nivel mundial, por lo que su impacto económico es de suma importancia (De, 2003). Los estados productores de mayor impacto en el país son Chihuahua, Sinaloa y Zacatecas (Sagarpa, 2017). En 2014, México fue el segundo productor a nivel mundial teniendo un registro de producción de 2,732,635 toneladas (FAO, 2014).

Entre las variedades de *Capsicum annuum* más consumidas en México se encuentra la variedad Tabasco. Los frutos son de aspecto liso, con punta y de coloración rojo brillante al momento de cosecha en el día 60 DAA (Fig. 1); posee un nivel de pungencia media alta, por lo cual es cultivado extensamente a lo largo de todo el país (Moreno, 1996). Este cultivar anteriormente formaba parte de la especie *C. frutescens*, sin embargo, fue reasignada dentro de *C. annuum*.

Los frutos de chile además son considerados como una fuente de metabolitos que poseen beneficios para la salud. Los metabolitos secundarios como el ácido ascórbico (vitamina C), los carotenoides (provitamina A), tocoferoles (vitamina E), flavonoides, terpenoides y capsaicinoides (Howard & Wildman, 2006) han sido analizados mediante métodos fitoquímicos tradicionales en diferentes variedades del género. Estos grupos de compuestos han sido reportados por sus diferentes propiedades bioactivas: mejora en afectación de tejido muscular, dolores reumáticos, dolor de ojos e inflamación, entre otros (Waizel-Bucay & Camacho Morfín, 2011). Más recientemente, los extractos complejos del fruto han sido analizados en búsqueda de características medicinales de alto interés comercial; por ejemplo, como antiaterosclorético, antitumoral, antimutagénico, antibacterial y antiviral en mayor o menor medida (Bijttebier et al., 2016; Cai, Luo, Sun, & Corke, 2004). Esto ha aumentado el interés hacia la producción del fruto y la extracción de dichos metabolitos con el fin de generar fármacos (Howard & Wildman, 2006).

Sin embargo, la distribución espacio-temporal específica de los compuestos en el fruto aún se desconoce. Diversos trabajos se han presentado sobre la atribución de

ciertas propiedades, pero sin declarar la presencia de cierto metabolito o clase de éstos responsables de la bioactividad (Castro-Concha, Tuyub-Che, Moo-Mukul, Vazquez-Flota, & Miranda-Ham, 2014; Chávez-Mendoza, Sánchez, Carvajal-Millán, Muñoz-Márquez, & Guevara-Aguilar, 2013; Marion & Dempsey, 1964; Nugroho, 2016; Tanaka et al., 2017).

### 2.1.1. Anatomía y composición del fruto

En el fruto de chile se pueden diferenciar a simple vista los principales tejidos que lo componen, tanto por sus características físicas como sus características organolépticas (Figura 1). Principalmente, tres tejidos son los más reportados dependiendo de sus características morfológicas: pericarpio, placenta y semillas (Presilla, 2017).

El pericarpio del fruto se compone de cuatro partes principales: la parte externa se conoce como epidermis compuesta principalmente por células sub-rectangulares. El mesocarpio está compuesto por células rodeadas de parénquima con pared celular. Las glándulas vasculares se ubican en la parte interna del fruto, conocidas como células gigantes. El endocarpio, consiste en una capa celular delgada con paredes onduladas (Nugroho, 2016). Materska (2014), reporta una mayor abundancia de compuestos glucosilados en este tejido mediante técnicas tradicionales.

La placenta, también conocida como septum, la cual parte del interior del pericarpio, consiste en una serie de glándulas ubicadas en el parénquima del endocarpio. Esta estructura forma compartimentos dentro del fruto donde es posible el desarrollo de las semillas (Nugroho, 2016). Diferentes compuestos han sido atribuidos a este tejido: capsaicinoides, capsinoides, alcaloides y tocoferoles. Dichos grupos de compuestos presentan propiedades interesantes para el beneficio humano, por lo cual, el análisis de este tejido ha aumentado durante los últimos años (Materska, 2014).

Las semillas se desarrollan sobre la placenta, donde permanecen adheridas o son desprendidas y acumuladas en el espacio vacío del fruto. Mayormente son de color crema o de un ligero tono amarillo. Ácidos grasos, saponinas y compuestos lipofílicos han sido identificados en esta área del fruto, los cuales, se conoce que representan una reserva de energía para el crecimiento y desarrollo adecuado del embrión (Baud, Dubreucq, Miquel, Rochat, & Lepiniec, 2008; Marion & Dempsey, 1964).

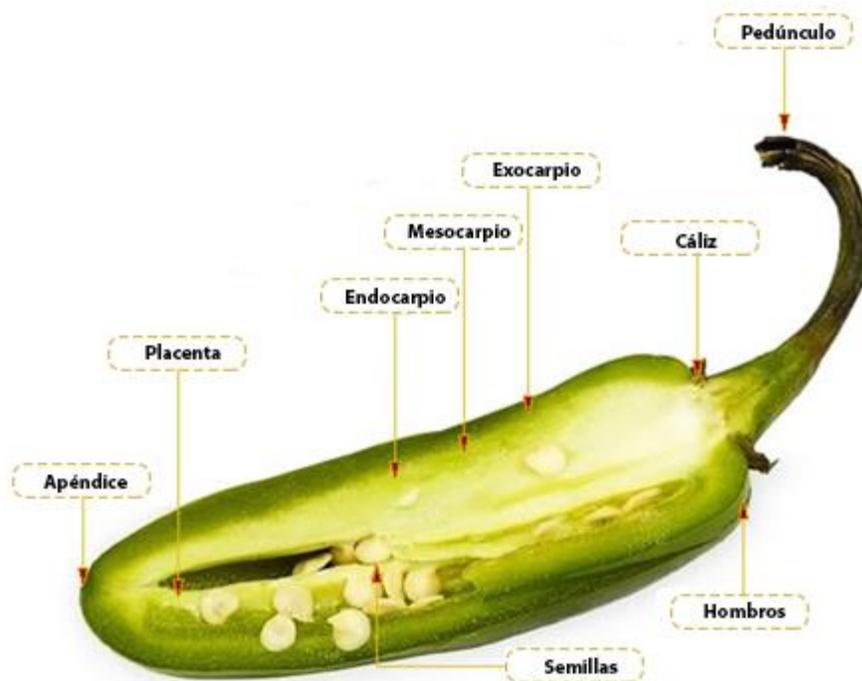


Figura 1. Corte transversal del fruto de chile (*C. annuum*) en un estadio joven, aprox. 30 DAA. (Modificado de <http://www.chilipeppermadness.com>).

## 2.2. Las ciencias ómicas

Las ciencias basadas en tecnologías ómicas han ganado interés para la exploración y definición de procesos biológicos, y en la biología de sistemas, ya que permite el análisis profundo desde distintos niveles de organización molecular, en células, tejidos u organismos complejos, como las plantas (Mochida & Shinozaki, 2011). Es remarcable la diferencia que existe de los análisis tradicionales, los cuales están

basados en una hipótesis preestablecida, en cambio, los experimentos ómicos generalmente inician con una interrogante general o como una exploración del estado de un sistema; sin embargo, los datos adquiridos son analizados para determinar y postular una futura hipótesis que puede ser probada posteriormente (Horgan & Kenny, 2011).

Dependiendo del nivel de organización molecular que se utilice para el análisis, se les han otorgado sus respectivos nombres; varios ejemplos se presentan en la Figura 2. El estudio ómico de un organismo se puede abordar mediante la detección de sus genes (genómica), transcritos (transcriptómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica) (Horgan & Kenny, 2011).

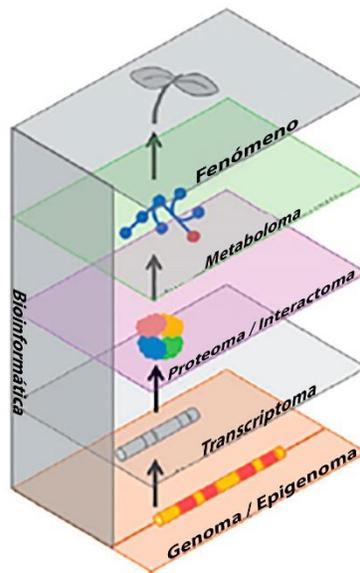


Figura 2. Esquema de los diferentes niveles de organización de los estudios ómicos en plantas partiendo desde el análisis genómico hasta el fenotipo de un organismo (Modificada de: Mochida & Shinozaki, 2011).

La aplicación de estas técnicas en plantas se ha considerado un reto para las ciencias ómicas debido al gran número de interferencias que existen desde la extracción de material genético u obtención de metabolitos con alta pureza, hasta el análisis correcto de los datos obtenidos. Se calcula que existen al menos 200,000

metabolitos secundarios en el reino vegetal, por lo que el uso de extracciones conlleva a una gran diversidad de compuestos con características similares que llevan a interferir con la calidad del material a analizar (Bijttebier et al., 2016).

### 2.2.1. Análisis metabolómicos

Los análisis metabolómicos se definen como la detección y cuantificación de todos los metabolitos de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico en un momento dado y bajo condiciones específicas mediante el uso de técnicas analíticas (Shulaev, 2006).

Los compuestos de bajo peso molecular son el producto final de un gran número de redes metabólicas y representan la actividad regulatoria de los diferentes procesos celulares. Detectar y monitorear los perfiles metabólicos globales de un sistema biológico nos permite conocer la distribución y el comportamiento de posibles compuestos claves en los diferentes niveles de organización del organismo (Hall, 2011).

Actualmente, esta área posee un papel importante en el análisis funcional y aplicado para la biotecnología vegetal. Se ha logrado la detección de diferentes metabolitos, tanto de interés farmacéutico como para la industria de los alimentos. Además, el mejoramiento en la instrumentación, metodologías analíticas y recursos de información han permitido el avance en genética funcional, comprensión de sistemas biológicos y mejoramiento molecular de diversos organismos (Mochida & Shinozaki, 2011). Sin embargo, los organismos vegetales siguen siendo uno de los mayores desafíos para la metabolómica debido a la amplia diversidad de compuestos que poseen; se estima un aproximado de 100,000-200,000 metabolitos existentes para el reino vegetal (Allwood & Goodacre, 2010).

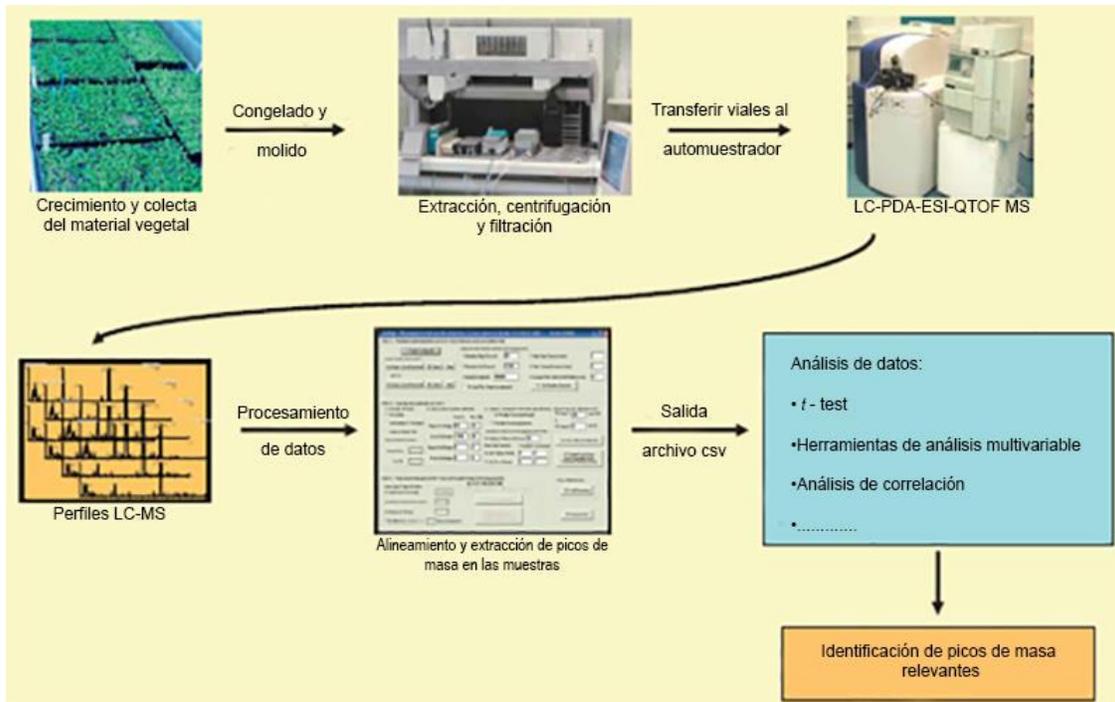


Figura 3. Diagrama de flujo del análisis metabólico no dirigido en plantas (*Arabidopsis thaliana*) mediante LC-MS (QTOF) y análisis de datos mediante MetAlign para la detección de diferencias significativas entre las muestras (Modificado de De vos et al., 2007).

Con el avance de la tecnología se han desarrollado diferentes plataformas para el análisis de metabolitos en muestras complejas, de entre ellas destaca la espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (NMR). El uso de NMR ha demostrado ser de utilidad en los estudios de metabolómica no dirigida, en particular, en aquellas muestras con un alto contenido de ciertos metabolitos, lo cual es una de las limitante: una sensibilidad baja (Allwood & Goodacre, 2010). La técnica de inyección directa (DIMS) permite generar una “huella metabólica” rápida, que es útil como primer paso en un análisis no dirigido, ya que permite conocer la robustez de la muestra o del método de extracción. Por otro lado, sin una cromatografía previa no es posible llegar a caracterizar los metabolitos presentes (Catchpole et al., 2005). La cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) posee los mayores índices de reproducibilidad y robustez para el análisis de

compuestos orgánicos volátiles; además, es posible la detección de compuestos no volátiles por la adición de derivatizantes. Por su parte, la cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS) permite la detección de una amplia diversidad de metabolitos sin requerir derivatizar los metabolitos, por lo que ha demostrado tener el rango más grande para la detección de diferentes clases de compuestos (Allwood & Goodacre, 2010).

### 2.2.2. Cromatografía de líquidos en matrices complejas

En el campo de la metabolómica, los análisis en GC o LC acopladas a espectrometría de masas son los más utilizados (T'Kindt, Storme, Deforce, & Van Bocxlaer, 2008). En general, estas técnicas consisten en la separación de una muestra con matriz compleja en base a sus interacciones con dos fases en el sistema: una fase estacionaria (o columna) y una fase móvil (acarreador de la muestra). El intercambio de moléculas entre la fase móvil y la estacionaria ocurre dependiendo de las características que posee cada compuesto en relación con la superficie del recubrimiento interno de la columna, adsorbiendo los más afines y eluyendo rápidamente aquellos con más compatibilidad a la fase móvil (Khopkar, 2012).

Las características de la columna cromatográfica son fundamentales para el desarrollo de métodos en metabolómica. Debido a la gran diversidad de metabolitos que existen, se han diseñado fases estacionarias con diferentes características, tanto físicas como químicas, orientados a distintos grupos de compuestos. En cromatografía de gases (GC) usualmente se utiliza una columna, conocida como capilar, que posee un recubrimiento interno adherido con ciertos grupos químicos para mejorar la separación de algunos compuestos (R. Singh, 2002), mientras que las columnas usadas en LC, pueden separarse en dos grandes grupos según la configuración de la fase: fase normal y fase reversa (T'Kindt et al., 2008).

En cromatografía de líquidos, la separación en fase normal (NP-LC), la fase estacionaria posee características más polares que la fase móvil. La capacidad de retención aumenta mientras la polaridad de la fase móvil disminuye, siendo los

metabolitos polares fuertemente retenidos mientras que los no polares eluyen fácilmente. Por su parte, el caso opuesto es conocido como cromatografía en fase reversa (RP-LC; Buszewski & Noga, 2012).

En los últimos años, la cromatografía en fase reversa ha tenido un aumento en su utilización para la elaboración de perfiles globales, siendo el más utilizado con propósitos metabolómicos (T'Kindt et al., 2008). La fase estacionaria posee características no polares y consiste, comúnmente, en partículas esféricas de sílice recubiertas con cadenas hidrocarbonadas (Figura 4). Se ha logrado mejorar la estabilidad y la reproducibilidad de la interacción de las columnas, añadiendo diferentes grupos funcionales a la cadena hidrocarbonada. Se usa como fase móvil un gradiente que va de un solvente muy polar ( $H_2O$ ) a uno orgánico, comúnmente acetonitrilo (Dorsey & Dill, 1989).

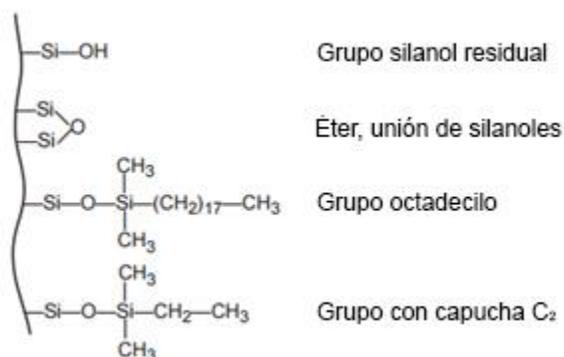


Figura 4. Estructuras de los compuestos utilizados como complementos de la columna en cromatografía de fase reversa (Modificado de: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/ReversePhase/AmershamRPCManual.pdf>).

La versatilidad que poseen los métodos cromatográficos permite un análisis más extenso para las técnicas no dirigidas. La posibilidad de nutrir los resultados de una muestra utilizando columnas diferentes es una de las ventajas más llamativas en

esta plataforma. Además, cuando se cuenta con datos a otro nivel molecular, es posible inferir con mejor resolución las diferentes cuestiones que pueden conllevar a dichos resultados fenotípicos (Fiehn, 2002; Hall, 2011; Jang et al., 2015; Savoi et al., 2017). Por ello, es indispensable la indagación en metodologías multi-ómicas.

### 2.2.3. Bases de datos disponibles para la comparación de compuestos en espectrometría de masas

Desde el punto de vista biológico, los metabolitos poseen la ventaja de estar conservados entre distintas especies, haciendo posible la pre-identificación and semi-cuantificación de compuestos mediante la comparación de los datos obtenidos contra diferentes bases de datos disponibles en línea o generando las propias (Klie et al., 2014). Las bases de datos actuales contienen principalmente información del ion precursor en términos de masa/carga ( $m/z$ ), así como de sus patrones de fragmentación (Matsuda et al., 2009). Dados los distintos modos de cromatografía existentes, resulta complicado generar una base de datos universal con tiempos de retención; sin embargo, es posible el almacenamiento de datos de retención de manera personal (“in-house”) de cada compuesto para la corroboración de las pre- anotaciones.

Se han comenzado a generar datos de caracterización global en cultivos de interés comercial, como son la papa, el tomate, el arroz, el trigo, la fresa, el pepino y el tabaco (Frank & Engel, 2013; Schauer & Fernie, 2006). El uso de plataformas de alta definición para la pre-identificación de compuestos en matrices ha comenzado a ganar terreno. Debido a la alta sensibilidad, compatibilidad y capacidad de análisis, la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas es el método más utilizado para el desarrollo de bases de datos de perfiles metabolómicos (Bijttebier et al., 2016; Böttcher et al., 2008; Matsuda et al., 2009).

Actualmente, existen disponibles bases de datos globales disponibles on-line, para la comparación de datos generados en LC-MS/MS. Human Metabolome Database (HMDB), una de las bases de datos más utilizadas actualmente, engloba alrededor

de 114,000 anotaciones de compuestos en LC-MS (Wishart et al., 2013). Otras bases de datos disponibles en internet y de uso libre son “PubChem” (Kim et al., 2016), “Chemical Entities of Biological Interest, ChEBI” (Degtyarenko et al., 2008), “ChemSpider” (Pence & Williams, 2010), “MassBank” (Horai et al., 2010), “Metlin” (Smith et al., 2005) and “isoMetlin” (Cho et al., 2014). Las anteriores, del mismo modo cuentan información de valores  $m/z$ , masa exacta, posibles aductos y patrones de fragmentación de diferentes metabolitos y han sido usadas para el análisis global de plantas (Meier, Ruttkies, Treutler, & Neumann, 2017), permitiendo la pre-anotación y discriminación de compuestos con una alta seguridad. Además, bases de datos como “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG)” (Kanehisa, Goto, Kawashima, Okuno, & Hattori, 2004), y “Biocyc” (Caspi et al., 2016) sirven como apoyo para la asignación de roles biológicos a los compuestos encontrados en los modelos biológicos. Sin embargo, estas no cuentan con datos específicos del método cromatográfico (tiempo de retención) que pudiera marcar la diferencia en la identificación de un compuesto a otro.

### **2.3. Análisis de la diversidad metabólica en *C. annuum***

Existe un gran número de trabajos referentes a la caracterización y cuantificación tradicional de compuestos de interés comercial en los frutos de chile, como son los carotenoides (Schweiggert, Kammerer, Carle, & Schieber, 2005), las antocianinas (Aza-González, Herrera-Isidró, Núñez-Paleniús, Martínez de La Vega, & Ochoa-Alejo, 2013) y los capsaicinoides (Estrada et al., 2000).

Al ser uno de los rasgos visuales más característicos durante la maduración del fruto, los carotenoides han sido uno de los blancos de análisis para tratar de comprender el desarrollo del fruto (Davies, Matthews, & Kirk, 1970; Deli, Matus, Molnár, & Tóth, 2014). Schweiggert et al, realizaron la caracterización de más de 30 carotenoides en frutos de chile mediante el uso de LC-MS usando ionización química a presión atmosférica (APCI), tanto en modo positivo como negativo. Utilizando hidrólisis enzimática se detectaron por primera vez tres  $\beta$ -criptoxantinas y el monoéster de zeaxantina de manera tentativa según los perfiles de ionización.

Aizat (2014), analizó el proceso de maduración del fruto de chile cv. Aries en diferentes estadios del desarrollo mediante metabolómica no dirigida en GC-MS, y correlacionó los datos obtenidos en LC-MS y ensayos enzimáticos sobre rutas metabólicas conocidas. Encontró que el grupo de carbohidratos presenta un número de cambios significativos en diferentes intermediarios de diversas rutas metabólicas.

Wahyuni et al. (2013) compararon las diferencias en la composición de distintas especies (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. frutescens*) enfocándose a metabolitos de interés farmacéutico. Posteriormente, en 2015, decidieron analizar de manera no dirigida los metabolitos presentes en las especies de chile mediante espectrometría de masas para dilucidar la diversidad metabólica entre los cultivares de chiles domesticados. Usando 32 accesiones se analizaron los compuestos volátiles y semi-polares presentes, mostrando ciertas diferencias metabólicas entre los genotipos analizados. El agrupamiento en base a los perfiles de compuestos volátiles sugiere la existencia de variación genética bien establecida entre las distintas especies, siendo los análisis de metabolómica una posible herramienta útil para el mejoramiento de cruces de chile.

En México, existen variedades del fruto de chile no caracterizadas metabólicamente a pesar de poseer una importante bioactividad. Hayano-Kanashiro y colaboradores (2016) demostraron la importancia que posee otra variedad de especie *annuum*: el chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*); debido a la abundante presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, capsaicinoides, carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico y volátiles. Se han realizado diferentes estudios bioquímicos en otras variedades de la especie basados en estos grupos de compuestos (Aza-González, Núñez-Palenius, & Ochoa-Alejo, 2012; Gómez-García & Ochoa-Alejo, 2016; Singh et al., 2009), dada su importante bioactividad, sin embargo, aún se desconoce la identidad completa de los metabolitos involucrados. La identificación de las moléculas que componen estos grupos representa un paso esencial para conocer los protagonistas de las propiedades nutraceuticas que se le atribuyen a este fruto (Martinez, 2007).

A la fecha no se han generado los perfiles metabólicos globales de pericarpio, placenta y semilla mediante una plataforma de espectrometría de masas. Existen diferentes reportes, en los cuales se analiza la composición bioactiva de los tejidos, es decir, la cuantificación tradicional de capsaicinoides, fenoles, flavonoides y antioxidantes. Lahbib et al. (2017), realizaron la determinación de distintas propiedades bioquímicas de pericarpio, placenta y semillas del fruto de chile de diferentes variedades, encontrando una dispersión remarcable entre las variedades al agruparse en base a la actividad antioxidante según la determinación de fenoles, flavonoides o capsaicinoides. Sin embargo, no se realizó la dilucidación de los principales efectores de este comportamiento en los diferentes tejidos.

De esta manera, el presente trabajo es una exploración en la diversidad metabólica global de diferentes tejidos que componen el fruto de chile Tabasco (*C. annuum* L.) en un estadio maduro (60 días después de antesis). Utilizando un sistema LC-ESI-QToF-MS/MS de alta definición en conjunto con bases de datos disponibles, se logró la pre-identificación de distintos metabolitos secundarios específicos de cierto tejido con posible potencial bioactivo.

### 3. Justificación

El fruto de chile es uno de los cultivos hortícolas más importantes para México. Su valor comercial y el nivel de producción nos posiciona a nivel mundial, y su complejidad bioquímica le otorga cualidades únicas. Su extenso metabolismo secundario, ha propiciado el descubrimiento de aplicaciones tanto en el área gastronómica, farmacéutica y cosmetológica. Sin embargo, sigue sin dilucidarse claramente cuáles son las propiedades específicas de cada tejido en un estado de maduración comercial del fruto.

Mediante el uso de análisis metabólico no dirigido se presenta la oportunidad de conocer con una mayor definición las propiedades, así como la complejidad molecular de las distintas partes del fruto. Además, más y más trabajos se han reportado recientemente utilizando este tipo de análisis usando plantas como objeto de estudio, que, mediante análisis fitoquímicos tradicionales resultaría desgastante y económicamente costoso, demostrando la viabilidad que posee una explorativa de esta naturaleza.

Analizar el perfil metabólico global de distintos tejidos de la especie *C. annuum* nos puede permitir conocer posibles rutas de biosíntesis específicas que le confieren las propiedades de interés comercial que le caracterizan. Además, se da hincapié acerca de la especialización biológica y la función molecular de los mismos en base a sus propiedades metabólicas. Actualmente, se tiene acceso a una variedad de bases de datos online, que proporcionan una pre-identificación basada en la similitud del ion principal y su patrón de fragmentación, por lo que se puede contar con anotaciones de alta calidad. Al mismo tiempo, se planea establecer una base de datos local para la generación de una base de datos general de los compuestos presentes en este género.

Los resultados de este trabajo presentan una indagación hacia la diversidad metabólica completa del fruto de chile, abriendo una brecha para el mejoramiento de los frutos desde una perspectiva de ingeniería metabólica y las posibilidades de incrementar el valor nutricional y nutraceutico del mismo. La consolidación de una base de datos local con los diferentes compuestos presentes en el perfil metabólico

global del fruto de chile, la cual contenga información complementaria (tiempo de retención); permitiría el análisis rápido de diferentes variedades de *Capsicum* spp. y la determinación de su valor nutricional y organoléptico, así como la selección de individuos para realizar cruces genéticas con el fin de mejorar una o varias características en particular.

#### **4. Hipótesis**

Los análisis no dirigidos en espectrometría de masas para la generación de perfiles metabólicos de los tejidos del fruto de chile Tabasco poseen la capacidad de pre-identificar metabolitos específicos del pericarpio, placenta o semillas del fruto, dando un mejor panorama de las propiedades nutraceuticas del fruto de chile y sus características en la medicina tradicional.

## 5. Objetivo general

Realizar los perfiles metabólicos globales del pericarpio, placenta y semillas del fruto de chile en un estadio maduro, así como la pre-identificación de compuestos del metabolismo secundario.

### 5.1. Objetivos específicos

- Realizar los perfiles metabólicos globales de frutos de chile en pericarpio, placenta y semilla de *Capsicum annuum* L. var. Tabasco mediante LC-ESI-QToF-MS/MS.
- Comparar los perfiles metabólicos entre los diferentes tejidos.
- Realizar la pre-identificación de los compuestos presentes en la muestra mediante Progenesis QI.
- Generar una lista auxiliar de los tiempos de retención y datos de fragmentación de las anotaciones.

## 6. Metodologías

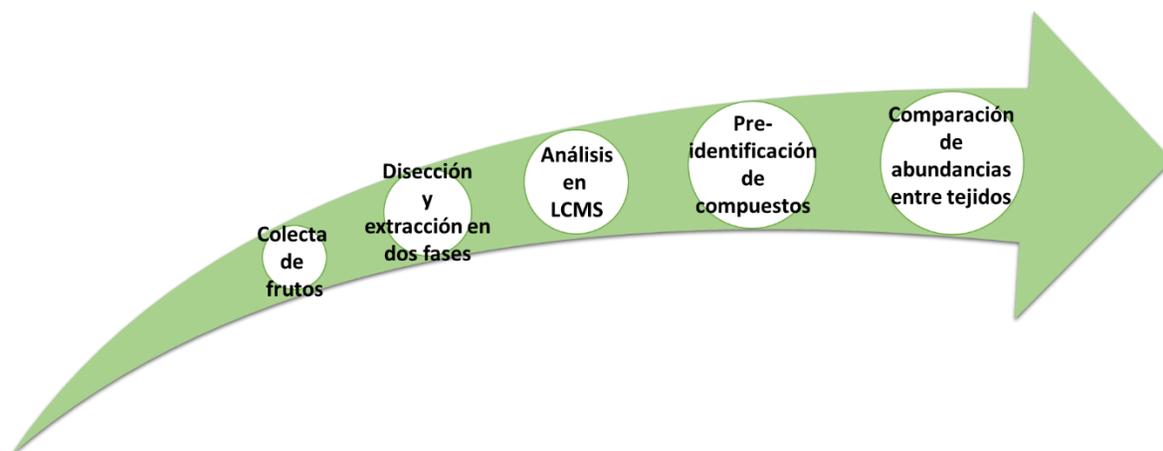


Figura 5. Diagrama de flujo de las principales etapas experimentales del proyecto.

### 6.1. Diseño experimental

Se realizó un diseño en columnas aleatorias para homogeneizar los factores ambientales en el área de crecimiento. Se mantuvieron 10 plantas de la variedad Tabasco; sin embargo, se consideraron 6 plantas aleatorias como réplicas biológicas independientes.

Para el análisis en LC-MS, se generaron muestras artificiales, a manera de controles de calidad, realizando una combinación homogénea de alícuotas tomadas de las extracciones de cada muestra biológica. En total se generaron 6 (3 por cada fase de extracción) de controles de calidad (QC). También se incluyeron blancos experimentales que consistieron en la utilización de la misma técnica y materiales de extracción que las réplicas biológicas, sin embargo, no se añadió el tejido vegetal; éstos se inyectaron al principio de la lista de inyecciones para calibrar la columna y después cada 15 muestras inyectadas con el fin de comprobar el funcionamiento del método cromatográfico (ver Anexos).

Las muestras se inyectaron en el sistema de LC-MS de manera aleatoria.

## 6.2. Establecimiento de variedades y material biológico

### 6.2.1. Esterilización y germinación de semillas

Se colocaron alrededor de 20 semillas en una solución de blanqueador comercial (3%) durante 3 min. Después, se lavaron las semillas utilizando agua destilada estéril durante 1 minuto dos veces consecutivas. Se utilizó el método de cámara húmeda añadiendo óxido de calcio 2% para la escarificación artificial de la testa y mejorar la germinación de las semillas. Por último, se colocaron en un ambiente oscuro y cálido.

### 6.2.2. Riego y fertilización de plantas en invernadero

Las plantas de 1 mes de desarrollo se fertilizaron utilizando solución Long Ashton (Hewitt, 1966; Tabla 2) con un riego de 250 ml dos veces por semana. Además, se aplicó de manera preventiva fungicida sistémico, 0.1% Ridomil Gold SL (Syngenta, México), cada 15 días.

Tabla 2. Composición de la solución Long-Ashton (Hewitt, 1966).

Elemento	%	Elemento	%
N	20	Cu	0.05
P	30	Mg	0.05
K	10	Br	0.10
Fe	0.20	Mo	0.01
Zn	0.20	Co	0.001
Mg	0.20		

### 6.2.3. Recolección de material vegetal

Se cosecharon los frutos e inmediatamente se sanitizaron superficialmente con una solución de etanol al 100%. Posteriormente, se congelaron usando nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su posterior manipulación y análisis.

#### 6.2.4. Disección de tejidos del fruto de chile “Tabasco”

Cada fruto fue manualmente disectado en pericarpio, placenta y semillas con un bisturí, utilizando una navaja nueva para cada muestra y manteniendo una baja temperatura con ayuda de hielo seco. Posteriormente, se trituró cada tejido utilizando un molino de bolas como homogeneizador (Retsch MM301, USA) en condiciones congeladas utilizando para ello nitrógeno líquido.

#### 6.3. Extracción en dos fases (Agua:Metanol/Éter dietílico)

Se modificó la metodología usada por Matyashs y colaboradores (2008). Se añadieron 1.5 ml de metanol a 100 mg de muestra en tubos de ensayo de vidrio y se agitaron durante 2 minutos en un vortex. Posteriormente, se añadieron 5 ml de éter dietílico. Se colocaron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Al terminar, se añadieron 1.5 ml de H<sub>2</sub>O<sub>miliq</sub>, se homogeneizaron durante 1 min de manera manual y se dejaron reposar durante 10 min. Después, se sometieron a centrifugación a 1000 g durante 10 min. Se colectó la fase superior (orgánica) y se reextrajo la fase acuosa con 2 ml de éter. Se juntaron las dos fases superiores. Las fases colectadas por separado (acuosa y orgánica) se secaron al vacío (miVac, Genevac, USA), para su posterior re-suspensión en 1 ml de solución ACN/H<sub>2</sub>O<sub>miliq</sub> (50:50) antes de ser inyectadas en LC-MS para su análisis.

#### 6.4. Análisis en LC-MS

Se utilizó un equipo ESI-QToF Synapt High Definition Mass Spectrometry G1 (Waters, UK) en modo de ionización positivo y negativo. La separación cromatográfica fue realizada en un equipo UPLC-PDA Aquity class I (Waters) acoplado a la plataforma de espectrometría QToF de alta definición, se usó una columna de fase reversa (CSH C<sub>18</sub>; 1.7 µm, 2.1 mm X 150 mm, Waters). El gradiente y las condiciones cromatográficas se presentan en la Tabla 3.

Los parámetros para el método de ionización por electro spray (ESI) utilizado en modo positivo fueron: voltaje del capilar =3 kV; voltaje del cono =40 V; temperatura de la fuente =130°C; temperatura de desolvatación =350°C; flujo del gas de desolvatación =700 L/h. Para el modo negativo se utilizaron las siguientes condiciones: voltaje del capilar =2 kV; voltaje del cono =40 V; temperatura de la fuente =150°C; flujo del gas del cono =20 L/h; temperatura de desolvatación =350°C; flujo del gas de desolvatación =600 L/h.

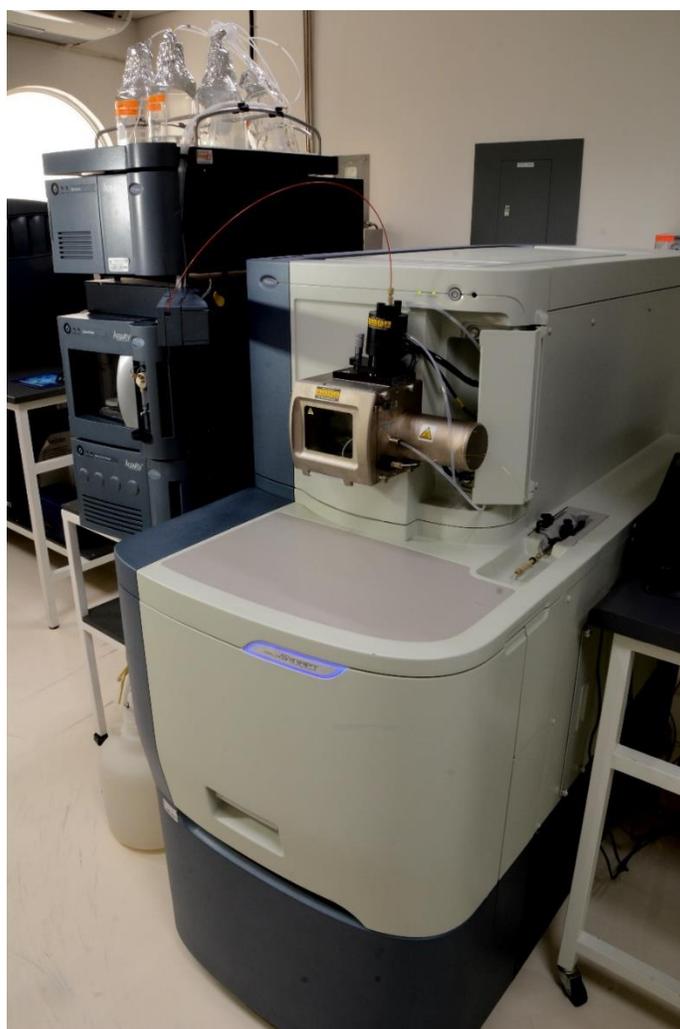


Figura 6. Sistema cromatográfico de líquidos UPLC Acquity clase I (Waters, USA) acoplado a un espectrómetro de masas SYNAPT HDMS G1 (Waters, USA).

La información fue obtenida y grabada en forma continua. Se utilizó leucina-encefalina (2 ng/ml) como referencia interna del LockSpray para la calibración de masa a un flujo de 5  $\mu$ L/min con una adquisición de la señal cada 10 s. El tiempo de escaneo de los datos fue establecido a 1.5 s. Ambos modos de ionización fueron adquiridos utilizando el método de adquisición en modo MS<sup>E</sup> (Expression), con una energía de 10 eV (Función 1, canal de baja energía) en el área de la trampa y una rampa de 20-40 eV (Función 2, canal de alta energía).

Tabla 3. Método de separación cromatográfica en columna C<sub>18</sub>.

Columna C <sub>18</sub>				
Fase móvil A:	Tiempo	Flujo ml/min	%A	%B
H <sub>2</sub> O + 0.1%	0	0.300	99	1
ácido fórmico.	0.5	0.300	99	1
Fase móvil B:	30	0.300	25	75
ACN + 0.1%	31	0.300	25	75
ácido fórmico.	31.5	0.300	0	100
Temp: 30°C	33	0.300	0	100
	33.1	0.300	99	1
	36	0.300	99	1

### 6.5. Análisis de datos y diseño experimental

Se consideraron, al menos 5 réplicas por tejido, además de incluir controles de calidad (QC) durante la realización de los experimentos. Los QC consistieron en una mezcla equitativa de las muestras y colocados aleatoriamente durante la corrida del análisis. Los datos crudos fueron importados a “Progenesis QI for small molecules” (Non-Linear Dynamics, UK) para el alineamiento, normalización y deconvolución automática. La pre-identificación se realizó utilizando las bases de datos en línea disponibles en ChemSpider (Plantcyc, Plant Metabolic Network,

KEGG y CHEbi), además de contar con una tabla auxiliar de los compuestos previamente detectados con un >90% de similitud en el ion precursor. Posteriormente, los datos fueron exportados a R (3.3.3 v) para la realización de análisis por ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ), False Discovery Rate (FDR;  $q < 0.01$ ) y gráficas para la interpretación de resultados.

## 7. Resultados

### 7.1. Material vegetal y colecta de frutos

Alrededor de  $30 \pm 4$  días fueron requeridos desde la germinación de semillas, utilizando el método de cámara húmeda, y el desarrollo de las primeras cuatro hojas verdaderas, hasta el trasplante a sustrato en invernadero.

Se tomaron datos referentes al crecimiento e inicio de floración de las plantas de chile Tabasco (*C. annuum* L.) en invernadero (Tabla 4).

Tabla 4. Información del crecimiento y colecta de las réplicas biológicas incluidas en el experimento.

	<b>Tabs 1</b>	<b>Tabs 2</b>	<b>Tabs 3</b>	<b>Tabs 4</b>	<b>Tabs 5</b>	<b>Tabs 6</b>
<b>Germinación</b>	01/03/2016	01/03/2016	04/03/2016	03/03/2016	03/03/2016	01/03/2016
<b>Trasplante</b>	29/03/2016	02/04/2016	30/03/2016	29/03/2016	05/04/2016	01/04/2016
<b>1ª Flor</b>	04/05/2016	04/05/2016	03/05/16	04/05/2016	03/05/2016	04/05/2016
<b>Estatura (cm)</b>	34	25	33	32	25	30

---

Tabs: Planta de chile Tabasco (*C. annuum* L.)

Se seleccionaron los frutos maduros de diferentes plantas con características morfológicas similares (tamaño, pigmentación, sin daño físico) como replicas biológicas independientes.

### 7.2. Estandarización del método cromatográfico

Debido a la disponibilidad de las muestras, se analizaron dos cultivares distintos: Tampiqueño 74 (T74) y Criollo de Morelos 334 (CM334), a dos diferentes estadios del desarrollo (20 y 60 DAA) con el propósito de conocer el comportamiento de las muestras verdaderas. Se utilizó la columna CSH C<sub>18</sub> en ambos modos de ionización.

### 7.2.1. Robustez del método de extracción

Se comparó la reproducibilidad de dos diferentes métodos de extracción: la extracción utilizando MetOH:H<sub>2</sub>O:Dietiléter (Matyash, 2008) contra el método reportado por De vos (2007) utilizando MetOH para un análisis metabolómico no dirigido (Figura 7). En el cual se pudo observar una remarcable reproducibilidad de la fase polar (MetOH:H<sub>2</sub>O) del método de Matyash en comparación con el método de De vos (2007).

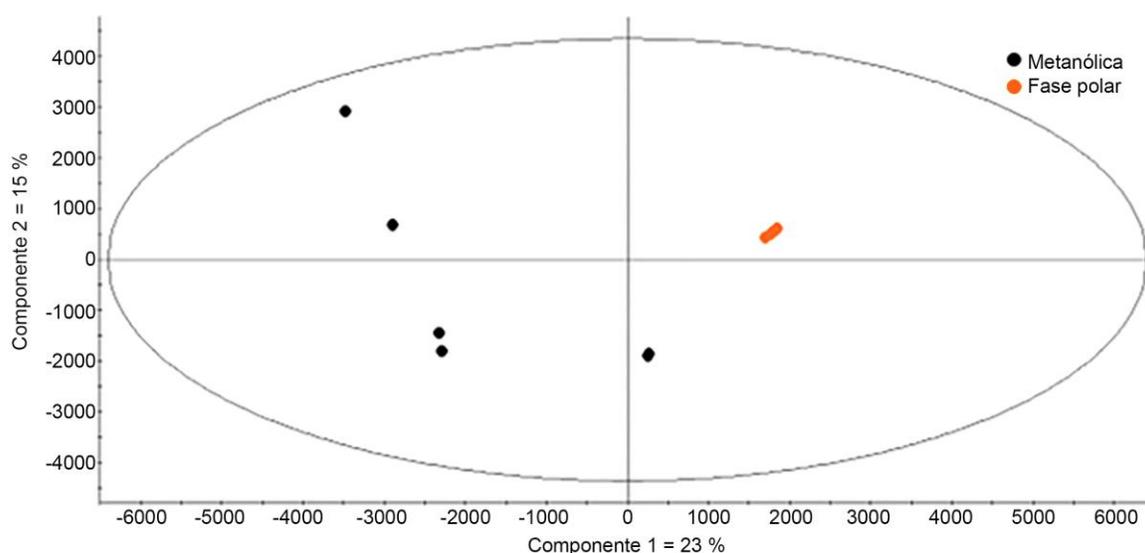


Figura 7. Análisis de componentes principales (PCA) de dos distintos métodos de extracciones no dirigidas del fruto de chile T74 a 60 DAA. El porcentaje de dispersión de los componentes 1 y 2 se presentan en el eje X y Y, respectivamente.

### 7.2.2. Estandarización del método y análisis para LC-MS

Las muestras de T74 a 20 y 60 DAA, fueron inyectadas a la plataforma LC-MS con una columna CSH C<sub>18</sub> instalada. Los perfiles encontrados se presentan en las Figuras 8 y 9. En ellos se aprecian las diferencias en la abundancia de compuestos, tanto en intensidad como por los distintos tiempos de retención obtenidos entre ambas fases del método de extracción. Las fracciones polares (Figura 8. A y C; Figura 9. A y C) muestran una abundancia mayor en compuestos con un tiempo de

retención bajo (<15 min), confirmando el funcionamiento del proceso de extracción en dos fases. También se logra apreciar una preferencia por la ionización en ESI- en esta fase. Por su parte, la fase orgánica (Figura 8. B y D; Figura 9. B y D), demostró tener una mayor abundancia en tiempos de retención superiores a los 15 min, lo cual significa que hay compuestos presentes con características no polares que, por ende, tienen afinidad con la columna C<sub>18</sub> utilizada. La comparación entre los modos de ionización de esta fase no presentó una gran diferencia en la detección, sin embargo, fue mayor la abundancia de los picos obtenidos en las muestras en ESI+. En comparación, las muestras provenientes de diferentes variedades de *Capsicum* a 60 DAA se comportaron de una manera similar durante el proceso de extracción, aunque los frutos provenientes "T74" demostraron tener una mayor abundancia en compuestos polares.

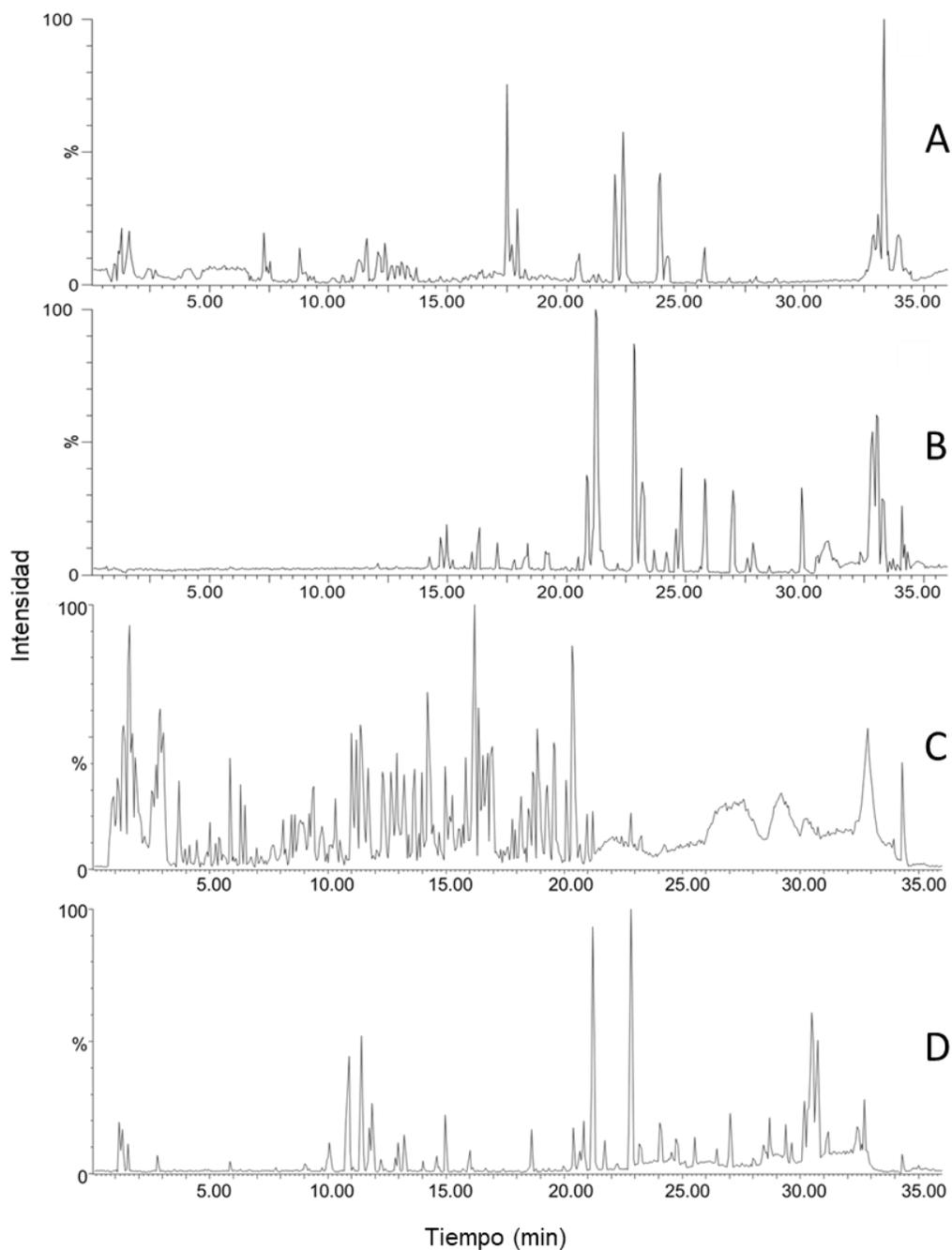


Figura 8. Perfil cromatográfico de muestras del fruto completo de T74 a 60 DAA. A) Fase Acuosa (MetOH:H<sub>2</sub>O), ESI +; B) Fase Orgánica (dietiléter), ESI +; C) Fase acuosa, ESI -; D) Fase orgánica, ESI -.

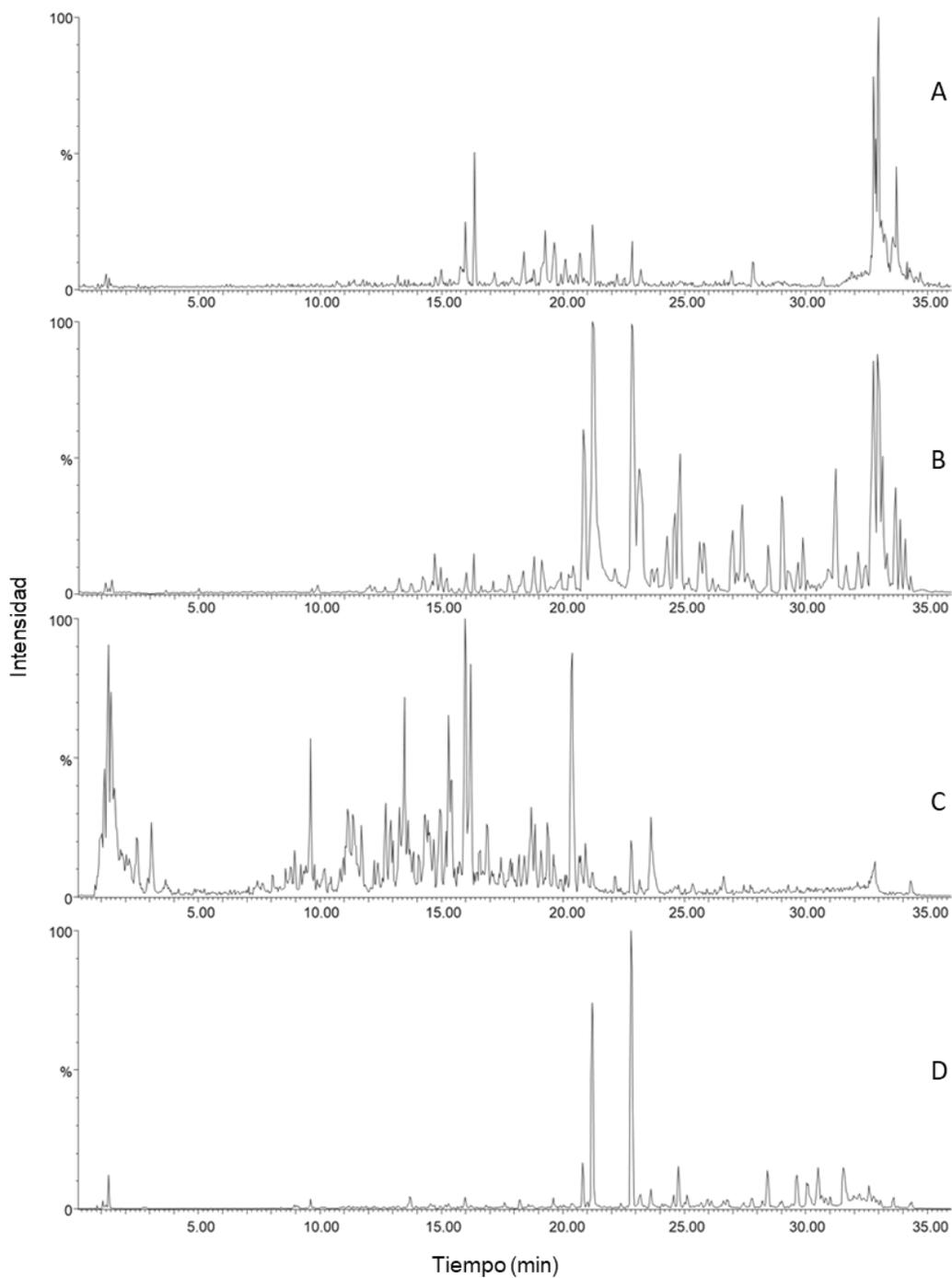


Figura 9. Perfil cromatográfico de muestras del fruto completo de CM334 a 60 DAA. A) Fase acuosa (MetOH:H<sub>2</sub>O), ESI +; B) Fase orgánica (dietiléter), ESI +; C) Fase acuosa, ESI -; D) Fase orgánica, ESI -.

Posteriormente, se realizó la comparación de dos distintos estadios después de la antesis mediante gráfica de volcán. Se confrontó la tasa de cambio entre condiciones (“fold change”; FC) contra vs el valor de  $p$  obtenido por ANOVA de una vía (Figura 10). Se logra observar la existencia de ciertas  $m/z$  compartidas entre ambos estadios (puntos verdes), pero lo más remarcable es la determinación de características orientadas hacia uno de los dos tratamientos (puntos rojos y azules), las cuales se pueden asociar a uno de los mismos. Además, el valor de  $p$  nos permite determinar aquellos que son significativos en el análisis. En la Figura 10, se encontró un mayor número de características en el estadio maduro; cerca del doble de iones significativos fueron encontrados en dicha etapa del desarrollo, Un total de 36 y 83 cambios significativos fueron determinados para los días 30 y 60 después de antesis, respectivamente.

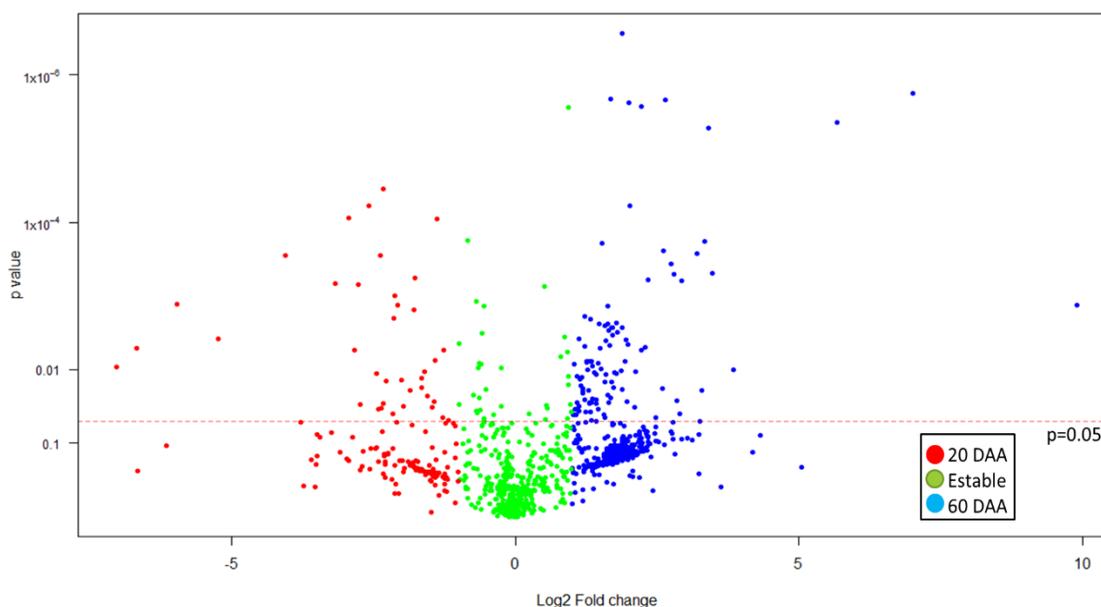


Figura 10. Comparación de la abundancia de iones entre dos estadios del desarrollo del fruto de T74. Se analizó mediante LC-MS con una columna CHS C18 en ESI +.

Por último, se llevó a cabo una búsqueda robusta en las bases de datos para conocer el panorama de los compuestos a detectar usando las bases de datos online. En la Tabla 5, se resumen los compuestos encontrados preliminarmente.

Tabla 5. Metabolitos del metabolismo secundario pre-identificados en muestras de chile T74.

Nombre	<i>m/z</i>
Torvosido G	609.3939
S-Propil hexanetioato	175.1140
Fitosfingosina	318.3029
3-Indoleacetamida	213.0429
2-Metoxifenil hidrogeno sulfato	409.0252
Triptofil-Serina	309.1532
1-Octadecanol	312.3286
Caffeoilcicloartenol	611.4095
Notoginsenosido I	1110.6312
Monodehidroascorbato	175.024262956
Matesaponina 5	1405.6615
Homodihidrocapsaicina-I	322.2407
Obtustireno	241.1237
Capsaicina	306.2063
Dihidrocapsaicina	308.2220
Capsiamida	270.2809

### 7.3. Análisis de los diferentes tejidos del fruto de chile “Tabasco”

Se inyectó un total de 174 muestras en la plataforma UPLC-ES-QToF. Además, fueron inyectados aleatoriamente durante el experimento distintos QC y blancos de la extracción para corroborar el funcionamiento y la reproducibilidad de los resultados del experimento.

En la Figura 11 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos de la fracción orgánica (dietiléter) de tres diferentes tejidos del fruto de chile Tabasco. Como se esperaba en esta fracción, los compuestos obtenidos poseen un tiempo de retención mayor a los 15 min. En la figura se observa que la placenta fue el tejido con un mayor número de picos, así como en la intensidad de los mismos, mientras que el pericarpio posee la menor cantidad de picos entre las tres muestras.

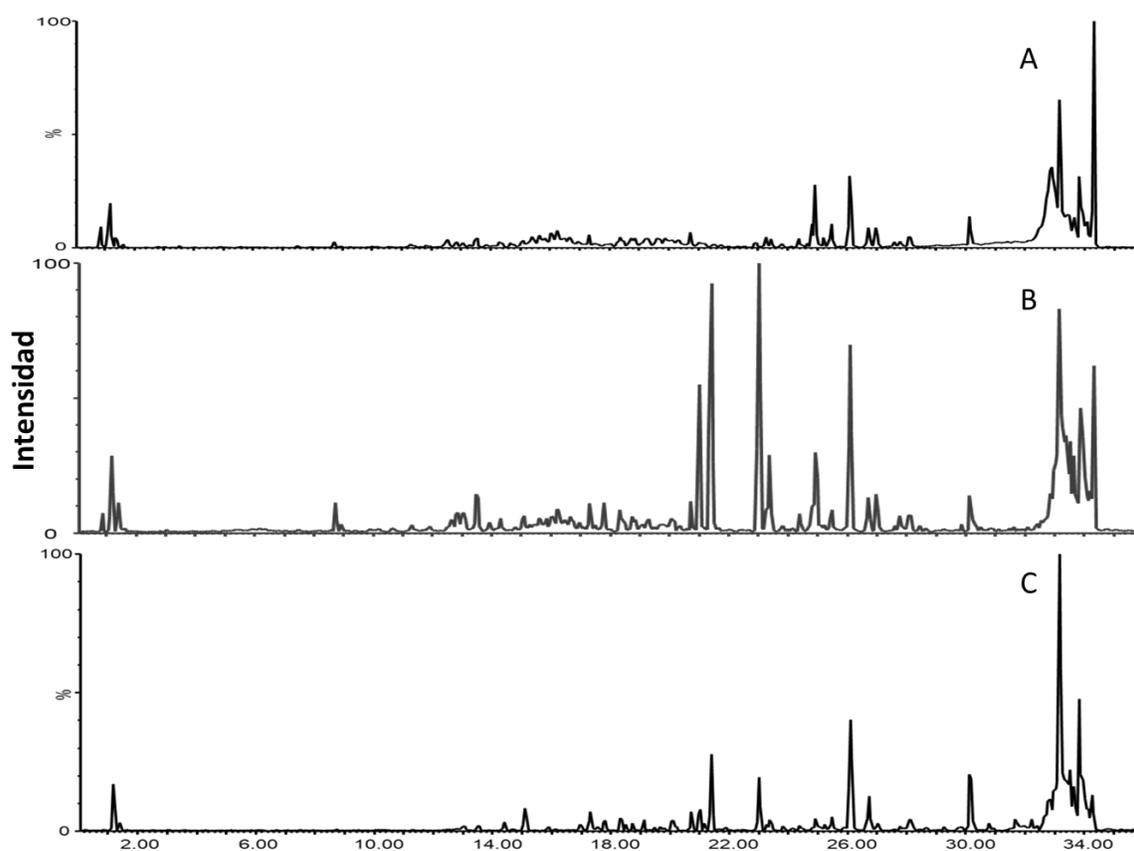


Figura 11. Diferencias cromatográficas de la fase extraída con dietiléter en ESI (+) utilizando una columna CHS C<sub>18</sub>. A) Pericarpio, B) Placenta y C) Semilla.

Utilizando “Progenesis QI for metabolomics”, se crearon proyectos independientes para cada modo de ionización como fase de extracción. Cada modo de ionización consideró 87 archivos crudos. Durante el alineamiento, un cromatograma fue seleccionado automáticamente como referencia, ya que incluye la mayor cantidad

de información y rango de similitud para la comparación con las otras muestras dentro del experimento. El rango de similitud encontrado fue de 72 a 96.5% entre las muestras de cada análisis. Después, el proceso de selección de los picos representativos del cromatograma fue realizado de manera automática, dando como resultado un total de 1,774 características (“features”) en modo positivo y 778 características para modo negativo.

El proceso de deconvolución se realizó considerando los aductos descritos en la Tabla 6 dependiendo del modo ESI.

Tabla 6. Aductos utilizados en “Progenesis QI for metabolomics”.

ESI (+)		ESI (-)
M+H+H <sub>2</sub> O	M+2Na-H	M-H <sub>2</sub> O-H
M+H-H <sub>2</sub> O	M+ACN+Na	M+Na-2H
M+NH <sub>4</sub>	M+2H	M+K-2H
M+Na	M+H+Na	M-2H
M+CH <sub>3</sub> OH+H	M+3H	2M-H
M+K	M+2H+Na	2M+Hac-H
M+ACN+H	M+2Na+H	3M-H
2M+H	2M+NH <sub>4</sub>	M-H
2M+Na	2M+3H <sub>2</sub> O+2H	M+Cl
2M+K	M+2H+Na	M+FA-H
M+2Na+H	2M+H	M-3H
2M+NH <sub>4</sub>	2M+Na	2M+FA-H
2M+3H <sub>2</sub> O+2H	2M+K	
2M+ACN+H	2M+ACN+Na	

Los PCA generados para cada análisis se presentan a continuación en las Figuras 12 y 13. Considerando los 3 componentes principales, en ellos se encontró un porcentaje de dispersión total en un rango de 61.64% a 58.55% para el modo positivo. A su vez, se realizaron los análisis para el modo negativo; sin embargo, existió una baja resolución de los datos obtenidos por problemas en la agrupación

de las muestras, por lo que el porcentaje de dispersión total del análisis fue menor del observado en las muestras en ESI +.

La Figura 12 muestra los análisis de la fase orgánica; la gráfica A) considera los dos mayores componentes (análisis en 2D) y se logra apreciar la separación de las muestras en base al tejido de procedencia, así como la distinción del “Pool” y su ubicación en la zona céntrica a los otros tratamientos, significando un correcto funcionamiento del equipo y del método de análisis para la agrupación de los mismos. En la gráfica B), se consideró el tercer mayor componente para la representación en 3D, la cual corroboró la dispersión de las muestras en la gráfica anterior.

Un comportamiento similar se logró observar en la Figura 13, en dónde una marcada dispersión en los PCA (2D y 3D) de la fase acuosa de la extracción de los tejidos separados y analizados en modo positivo. Al mismo tiempo, la ubicación del “Pool” se encuentra de manera céntrica a las agrupaciones de los tejidos, lo cual también se logra apreciar en su representación 3D (gráfica B), dando cierta confiabilidad a los datos obtenidos en el experimento.

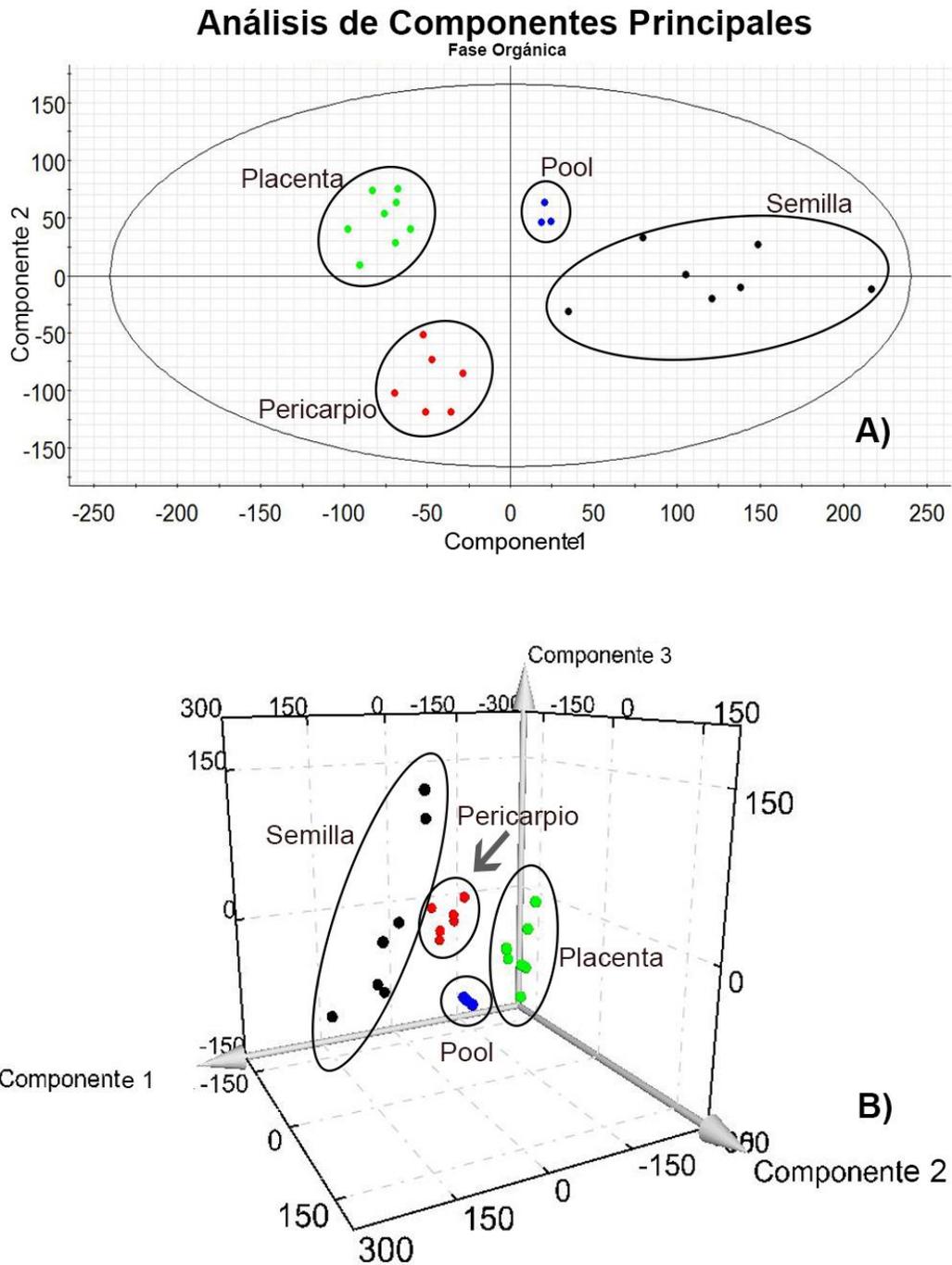


Figura 12. Análisis de componentes principales de la fase orgánica de los tejidos del fruto de chile “Tabasco”. A) PCA 2-D (Componente 1: 37.15%; Componente 2: 15.14%). B) Representación 3D (Componente 3: 9.35%).

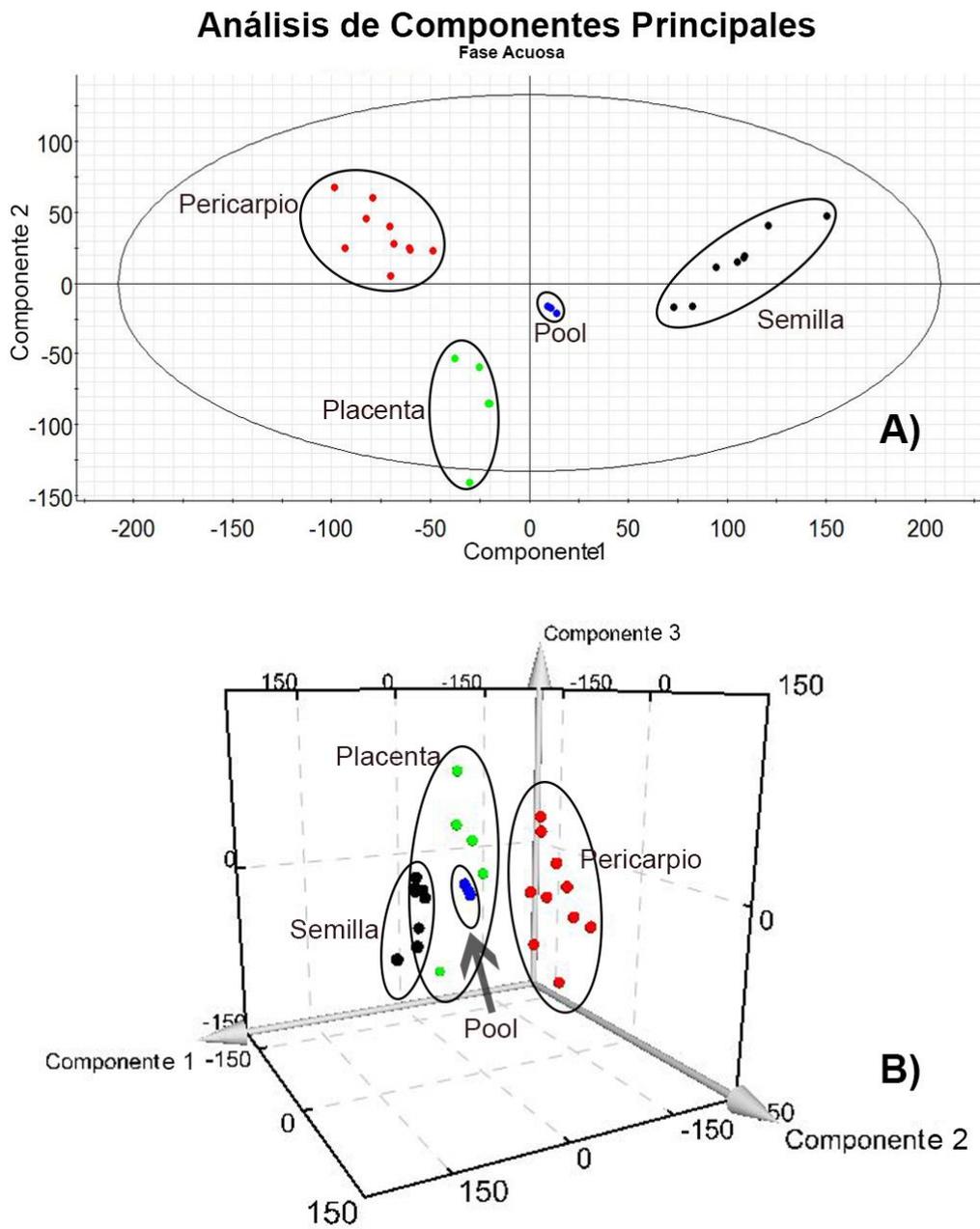


Figura 13. Análisis de componentes principales de la fase acuosa de los tejidos del fruto de chile “Tabasco”. A) PCA 2-D (Componente 1: 33.10%; Componente 2: 15.72%). B) Representación 3D (Componente 3: 9.73%).

Posteriormente, se confrontaron las características presentes en los tejidos, comparando el valor de incremento (“fold change”) de cada uno. En las Figuras 14 y 15 se resumen los análisis mediante gráficas de volcán para cada una de las fases de extracción. Se consideró a partir de un valor de incremento de  $>2$  para la atribución de un tejido específico (Böttcher et al., 2008; Tautenhahn, Patti, Rinehart, & Siuzdak, 2012). El valor  $p$  se estableció a 0.05 (línea punteada).

Las gráficas de volcán de la fase orgánica (Figura 14), muestran las comparaciones entre pericarpio, placenta y semilla, donde se observa la existencia de iones significativos para los distintos tejidos. El máximo valor de incremento observado para algunos iones fue de 1000 ( $\log_2(1000) = 10$ ), presente en casi todos los casos de las gráficas, con excepción del pericarpio al ser comparado con placenta. Así mismo, fue destacable la cantidad de posibles compuestos que poseen una diferencia significativa entre los tratamientos, teniendo un valor mínimo de  $1E-8$  ( $-\log_{10}(1E-8) = 8$ ). Por su parte, la fase acuosa (Figura 15) alcanzó un máximo valor de incremento en la comparación de placenta y semilla igual a 912,838 ( $\log_2(912838.4275) = 19.8$ ), además de contar con valores de significancia menores a los observados en la fase orgánica de hasta  $1E-12$  ( $-\log_{10}(1E-12) = 12$ ). En comparación, la fase polar presentó diferencias más marcadas en la composición de los tejidos.

Los tres tejidos demostraron tener una gran cantidad de iones representativos, de los cuales fueron introducidos y analizados con “Progenesis QI for small molecules” para la determinación putativa de compuestos.

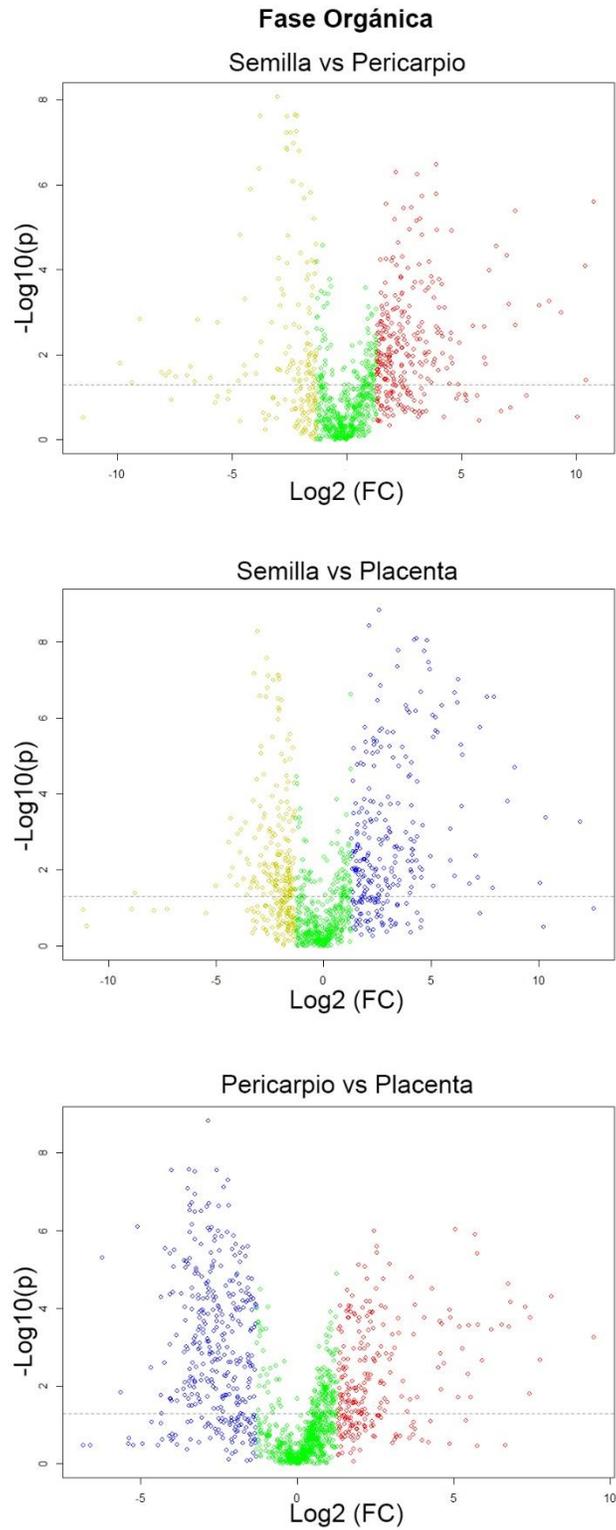


Figura 14. Características diferenciales entre los diferentes tejidos en la extracción con dietiléter presentados en gráficas de volcán ( $p < 0.05$ ;  $\text{FC} > 2$ ).

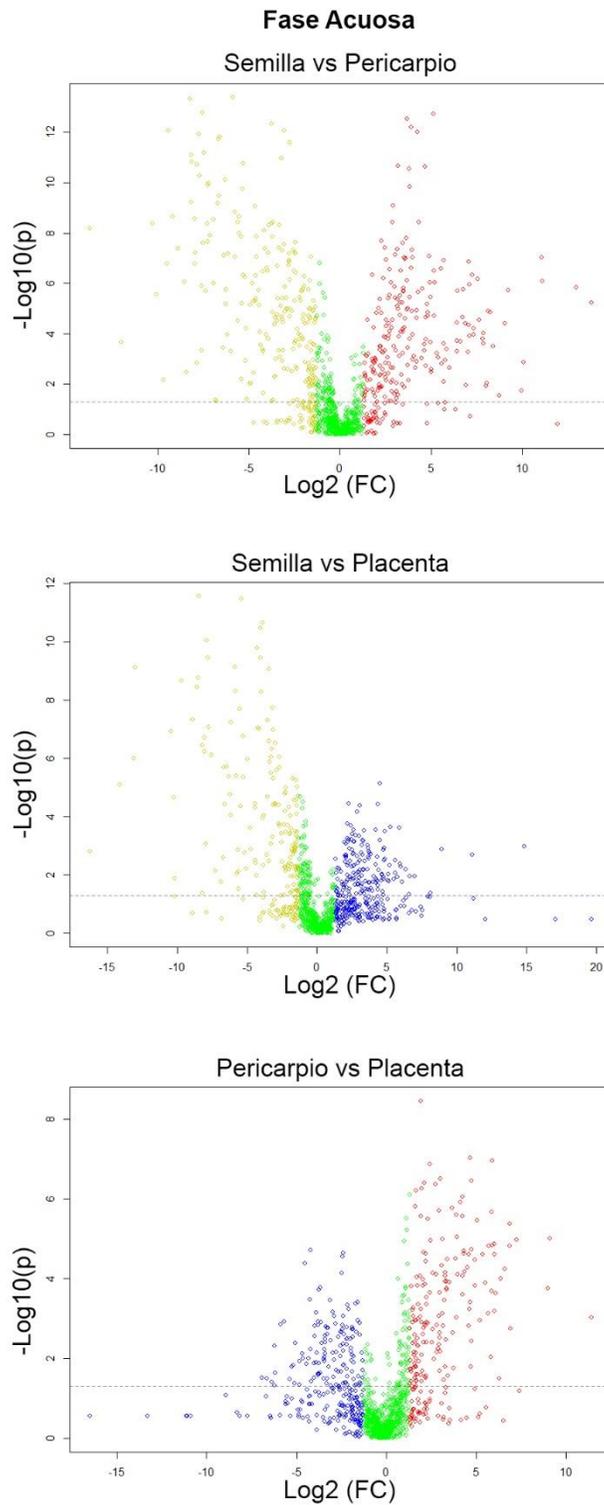
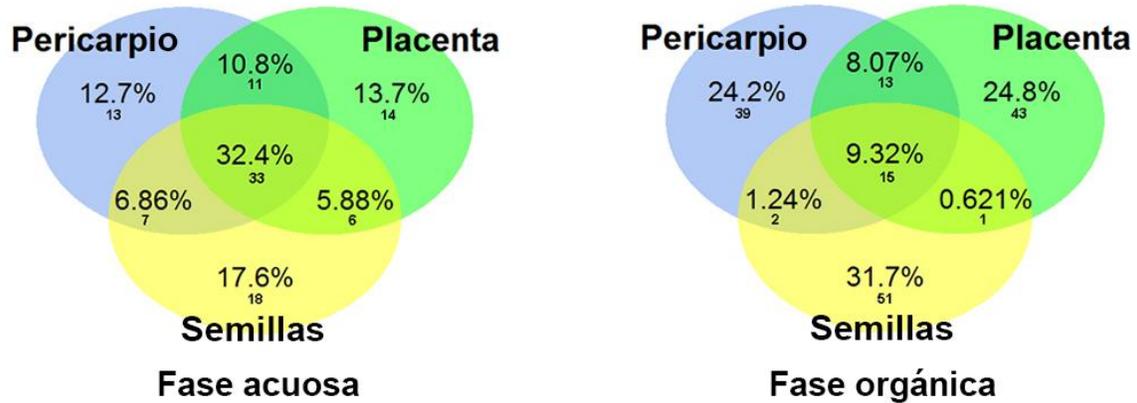


Figura 15. Características diferenciales entre los diferentes tejidos en la extracción con MetOH:H<sub>2</sub>O presentados en gráficas de volcán ( $p < 0.05$ ;  $FC > 2$ ).

Alrededor de 700 posibles compuestos con un alto valor total (>90% ion precursor) fueron encontrados en total de los distintos análisis realizados con Progenesis Q1 y las diferentes bases de datos consultadas. Sin embargo, después de la depuración manual basada en referencias se determinó un total de 334 identificaciones putativas. En la Figura 16, se resume la distribución de los compuestos pre-identificados en los diferentes tejidos.

Se determinaron alrededor de 200 metabolitos para el modo positivo y 150 para el modo negativo, repartidos entre los diferentes tejidos analizados. El porcentaje de la composición de los compuestos putativos se mantuvo entre el 29.6% y 32.4%, excepto en la fase orgánica del modo negativo en la cual se encontró un porcentaje bajo en comparación con los anteriores. La relación más baja de compuestos putativos compartidos entre los tejidos se vio entre Semilla – Placenta en los diferentes análisis (5.88% - 0.621%); por su parte, Placenta – Pericarpio obtuvieron porcentajes más altos de los compuestos putativos compartidos (6.09% - 10.8%). Semilla presentó la mayor cantidad de identificadores atribuidos a este tejido en los cuatro diferentes análisis, seguido por Placenta y posteriormente Pericarpio. Estos dos últimos, tuvieron un porcentaje muy similar durante los distintos análisis, sin embargo, Placenta se mantuvo con un rango de (13.7% - 24.8%) y Pericarpio (12.7% - 24.2%).

### Modo Negativo



### Modo Positivo

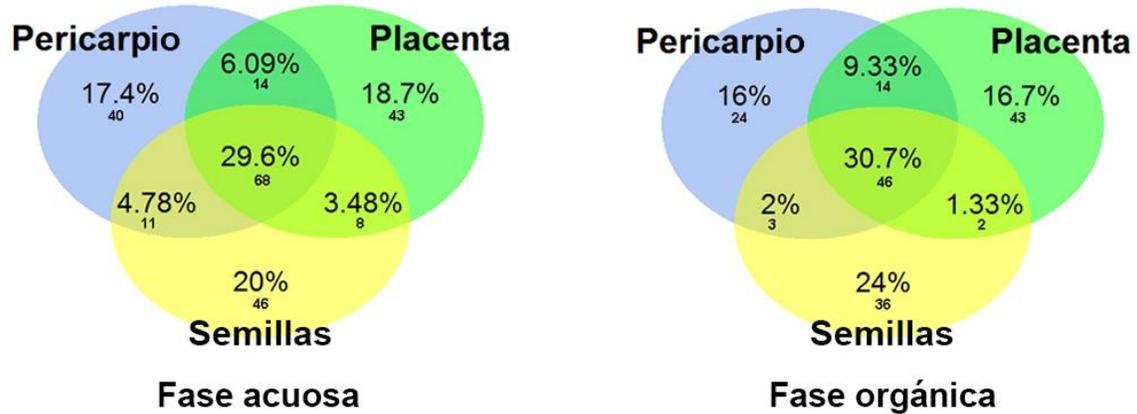


Figura 16. Diagramas de Venn de la distribución de compuestos pre-identificados.

Para validar las identificaciones de Progenesis, se analizaron manualmente ciertos compuestos altamente conocidos en tejidos del fruto de chile. En la Figura 17, se presentan los espectros de fragmentación que fueron comparados con los ya existentes en bases de datos en línea y validar su pre-identificación (MassBank). Los espectros de fragmentación de Capsaicina,  $\beta$ -carotinal y dihidrocapsaicina (Figura 17. A, B y C, respectivamente) presentaron los patrones descritos, así como la intensidad del ion precursor (extremo derecho del espectro) y de sus fragmentos a un voltaje de 20 V.

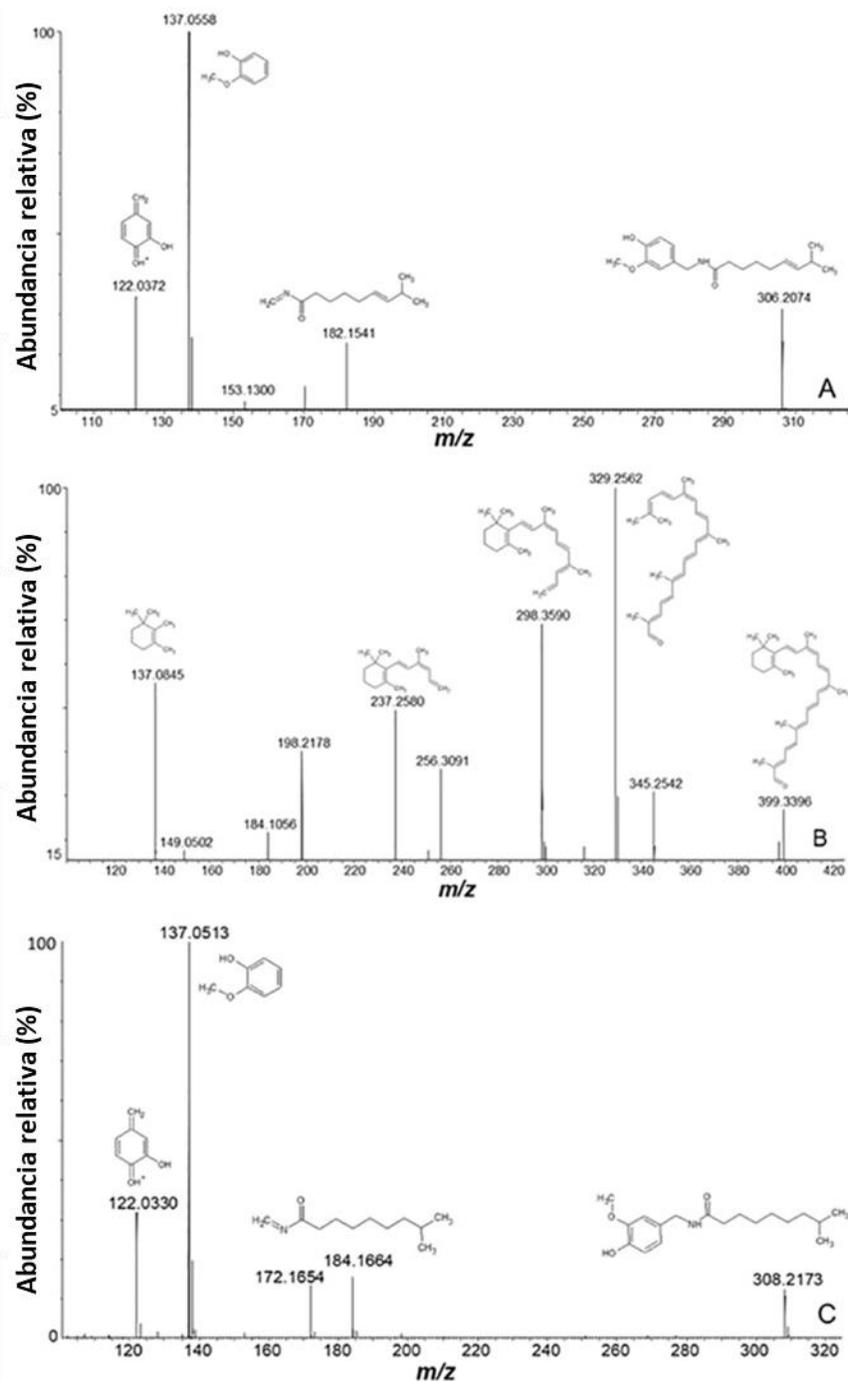


Figura 17. Espectros de fragmentación (ESI +). A) Capsaicina, B) β-carotinal, y C) dihidrocapsaicina.

Posteriormente, se pudo asignar un tiempo de retención a los compuestos, además de crear una lista con tiempos de retención (min) para futuros análisis bajo las mismas condiciones cromatográficas (Figura 18).

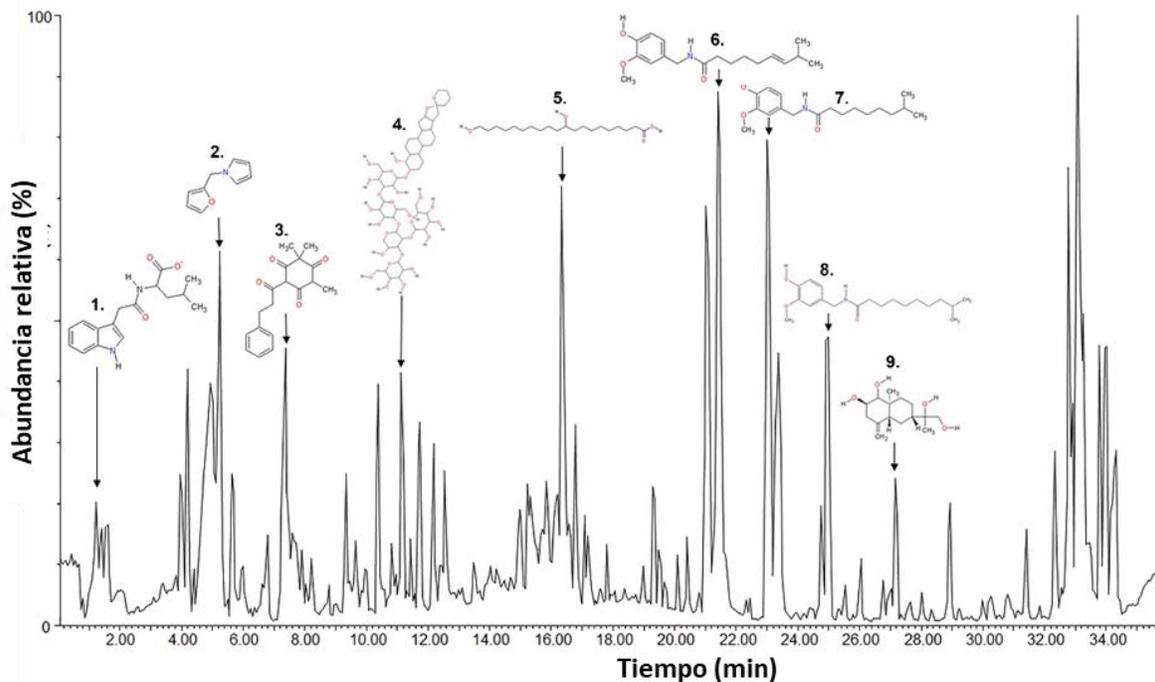


Figura 18. Tiempos de retención para compuestos en placenta del fruto de chile en columna C<sub>18</sub>. 1. 2-[(1H-indol-3-ilacetil)amino]-4-metilpentanoato; 2. indol-3-acetamida; 3. mirigalona A; 4. capsicosina; 5. ácido 10,20-dihidroieicosanoico; 6. capsaicina; 7. dihidrocapsaicina; 8. homodihidrocapsaicina; 9. liratul C.

Los compuestos pre-identificados se agruparon dependiendo de la clase biológica en la que se encuentran asignados en las bases de datos (Tabla 7).

Tabla 7. Clases de compuestos pre-identificados en las diferentes fases de extracción y análisis.

Clases	MODO POSITIVO		MODO NEGATIVO		
	Total	Fase Acuosa	Fase Orgánica	Fase Acuosa	Fase Orgánica
<b>Ácidos grasos</b>	53	16	14	10	13
<b>Terpenoides</b>	33	17	5	7	5
<b>Compuestos glicosilados</b>	28	16	6	3	4
<b>Derivados de aminoácidos</b>	27	7	7	7	6

<b>Derivados de benzoides</b>	15	6	4	2	3
<b>Alcaloides</b>	14	3	10	1	1
<b>Capsaicinoides</b>	14	7	2	1	4
<b>Saponinas</b>	12	11	0	0	1
<b>Fosfolípidos</b>	9	0	2	1	7
<b>Carotenoides</b>	8	3	2	1	2
<b>Furanos</b>	7	4	0	2	1
<b>Polifenoles</b>	7	1	1	3	2
<b>Flavonoides</b>	6	6	0	0	0
<b>Esfingolípidos</b>	6	1	0	3	2
<b>Derivados de fitohormonas</b>	4	2	1	0	1
<b>Derivados de jasmonatos</b>	4	2	1	0	1
<b>Derivados de ácido ascórbico</b>	3	1	2	1	0
<b>Lactonas</b>	3	1	1	1	0
<b>Derivados de indol</b>	3	3	0	0	0
<b>Derivados de cumarina</b>	3	1	0	0	2
<b>Vitaminas</b>	2	0	2	0	0
<b>Tocoferoles</b>	2	0	1	1	0
<b>Otros</b>	71	20	21	19	11
<b>Total</b>	334				

Posteriormente, se realizó el FDR para la confirmación de los compuestos específicos, resultando en 77 compuestos con una abundancia significativa ( $q < 0.01$ ) de cierto tejido (Tabla 8).

Tabla 8. Compuestos pre-identificados con diferencias significativas entre tejidos.

Compuesto	Formula	"FoldChange"			Clase
		Pericarpio-Placenta	Pericarpio-Semilla	Placenta-Semilla	
Piridoxaminium(1+)	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	12.653 <sup>***</sup>	Inf <sup>***</sup>	Inf <sup>**</sup>	AD
Ala-Asp-Pro	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	3.387 <sup>***</sup>	26.423 <sup>***</sup>	7.802 <sup>*</sup>	AD
Licopodano	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> N	0.155 <sup>***</sup>	Inf <sup>**</sup>	Inf <sup>***</sup>	AK
Cuscohigrina	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	0.871	0.263 <sup>**</sup>	0.302 <sup>**</sup>	AK
xi-8-Acetonildihidrosanguinarina	C <sub>23</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub>	16.756 <sup>***</sup>	Inf <sup>***</sup>	Inf <sup>**</sup>	AK
2,4-Nonadienal	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O	0.197 <sup>***</sup>	1.437	7.299 <sup>***</sup>	ALDH
2,5-Dimetilpirazina	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	0.363 <sup>***</sup>	5.325 <sup>**</sup>	14.67 <sup>***</sup>	APYR
β-L-arabinosa 1-fosfato(2-)	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub> P <sup>-2</sup>	0.215	0.078 <sup>***</sup>	0.364 <sup>**</sup>	ARB
1-[(2Z)-1-Hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-2-propen-1-il]-7-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro-2,6-naftalenediol	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	0.888	0.189 <sup>***</sup>	0.213 <sup>***</sup>	BZD
2,4-Pentadinilbenceno	C <sub>11</sub> H <sub>8</sub>	0.103 <sup>***</sup>	Inf <sup>*</sup>	Inf <sup>***</sup>	BZD
Sinefrin acetona	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	0.249	0.031 <sup>**</sup>	0.125 <sup>**</sup>	BZD
Pratenol B	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	20.501 <sup>***</sup>	525.121 <sup>***</sup>	25.614	BZD
Uralenneosida	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	44.357 <sup>***</sup>	453.177 <sup>***</sup>	10.217	BZD
Capsaicina	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	0.105	2.049	19.542	CAPS
Dihidrocapsaicina	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	0.214 <sup>*</sup>	8.325	38.876 <sup>**</sup>	CAPS
Nordihidrocapsaicina	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>3</sub>	0.052	5.741 <sup>**</sup>	110.213	CAPS
12'-apo-β-carotenal	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O	2.896	7.811 <sup>***</sup>	2.698	CARO
Capsianosida I	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>14</sub>	3.352 <sup>**</sup>	6.536 <sup>**</sup>	1.95	CARO
Nigroxantina	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	0.45	0.006 <sup>***</sup>	0.013 <sup>***</sup>	CARO
Ácido sandorinico A	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	2.762 <sup>*</sup>	Inf <sup>***</sup>	Inf	CHX
4-[(6E)-3-hidroxi-7-fenilhept-6-en-1-il]fenol	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	10.599 <sup>*</sup>	0.013 <sup>***</sup>	0.001 <sup>***</sup>	DHT
Tridecanoato	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.275 <sup>***</sup>	2.615	9.509 <sup>***</sup>	FAT

<b>Ácido esterculinico</b>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	1.941	0.007***	0.004***	FAT
<b>3,16-dihidroxipalmitato</b>	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> O <sub>4</sub>	5.355***	92.169***	17.212**	FAT
<b>TG(14:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/14:0)</b>	C <sub>49</sub> H <sub>86</sub> O <sub>6</sub>	3.601***	103.585***	28.763*	FAT
<b>DG(24:0/0:0/20:4n3)</b>	C <sub>47</sub> H <sub>84</sub> O <sub>5</sub>	1.685	0.002**	0.001***	FAT
<b>4,4-Dimetilcolesta-8(9),14-dien-3β-ol</b>	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	1.15	0.361***	0.314***	FAT
<b>Mirciacitrin V</b>	C <sub>30</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	0.035*	0.092***	2.617	FLV
<b>5,7,3'-trihidroxi-3,5'-dimetoxi-2'-(3'-metilbut-2-enil)flavona</b>	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	0.175*	0.036***	0.205***	FLV
<b>Pedalitin</b>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	59.828***	Inf***	Inf	FLV
<b>Ramnazin 3-rutinosido</b>	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	Inf***	Inf***	NA	FLV
<b>N-{1-amino-6-[(5-nitro-2-furoil)amino]-1-oxohexan-2-il}-23-(indol-3-il)-20-oxo-4,7,10,13,16-pentaoxa-19-azatricosan-1-amida</b>	C <sub>36</sub> H <sub>52</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub>	50.788***	Inf***	Inf	FRN
<b>Acalifin</b>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	23.469***	Inf***	Inf	GC
<b>Amarogentin</b>	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	Inf**	Inf**	NA	GC
<b>Kidjoranin-3-O-β-digitoxopyranosida</b>	C <sub>36</sub> H <sub>48</sub> O <sub>10</sub>	8.681***	98.841***	11.386*	GC
<b>Diosgenin 3-O-beta-D-glucosido</b>	C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>	0.092	0.005***	0.051***	GC
<b>Kaempferol 3-xilosilglucosido</b>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	19.726***	307.425***	15.585	GC
<b>Catecol-β-L-glucoronido</b>	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	154.838***	Inf***	Inf	GC
<b>Isovitexin</b>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	117.343***	Inf***	Inf*	GC
<b>Kaempferol 3-O-arabinosido</b>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	116.508***	Inf***	Inf	GC
<b>Quercetin 3-(6"-malonil-glucosido)</b>	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>15</sub>	Inf***	Inf***	NA	GC
<b>Ácido 2-Hidroxifenilacetico O-glucosido</b>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	0.439**	1.733	3.946***	GC
<b>Licoricesaponina C2</b>	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>15</sub>	4.651***	161.705***	34.77**	GC
<b>(3"-Apiosil-6"-malonil)astragalin</b>	C <sub>29</sub> H <sub>30</sub> O <sub>18</sub>	58.472***	601.735***	10.291*	GC
<b>1-Nitroheptano</b>	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub> +	3.407***	1.535	0.45	JASM
<b>Jasmolona</b>	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	3.078***	13.946***	4.53*	JASM
<b>Artocarbeno</b>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	0.762	0.286***	0.375**	PPH

Ácido Cafeico 3-sulfate	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> S	0.451	0.102***	0.226**	PPH
3-[3,4-Dihidroxi-2-(hidroximetil)-1-pirrolidinil]propanamida	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0.509	0.181***	0.356***	PRL
Ubiquinol-6	C <sub>39</sub> H <sub>60</sub> O <sub>4</sub>	7.011***	125.398***	17.886**	QNN
all-trans-3,4-didehidroretinoato	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	4.279***	19.873***	4.644**	RTN
Vestitona 7-glucosido	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>9</sub>	0.071*	0.008***	0.113***	SCOH
Esfingomielin 39:1	C <sub>44</sub> H <sub>91</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> P	3.884***	22.266***	5.733**	SPGL
Cloastragenol	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O <sub>5</sub>	2.469***	4.533***	1.836	SPNN
Yamogenintetrosido B	C <sub>52</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	3.029**	2.171**	0.716	SPNS
Eleuterosido L	C <sub>59</sub> H <sub>96</sub> O <sub>25</sub>	0.374	0.012***	0.032***	SPNS
Tragopogonsaponina F	C <sub>56</sub> H <sub>80</sub> O <sub>21</sub>	Inf	0.061***	0***	SPNS
Trigofenosido G	C <sub>56</sub> H <sub>92</sub> O <sub>27</sub>	Inf**	0.007***	0***	SPNS
Fistulosido A	C <sub>39</sub> H <sub>62</sub> O <sub>13</sub>	0.111	0.01***	0.093***	SPNS
Tuberosido L	C <sub>51</sub> H <sub>84</sub> O <sub>23</sub>	0.364*	0.045***	0.124***	SPNS
Matesaponina 5	C <sub>65</sub> H <sub>106</sub> O <sub>31</sub>	0.573	0.002***	0.004***	SPNS
Capsicosida A	C <sub>63</sub> H <sub>106</sub> O <sub>35</sub>	Inf	0.004***	0***	SPNS
Ácido isopimarico	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	14.344***	35.974***	2.508	TER
Ácido Oleanolico 3-O-[O-β-D-glucopiranosil-(1->4)-O-β-D-glucopiranosil-(1->3)-O-α-L-ramnopiranosil-(1->2)-α-L-arabinopiranosido]	C <sub>53</sub> H <sub>86</sub> O <sub>21</sub>	2.559*	0.007***	0.003***	TER
Cinnassiol C	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>	0.183***	1.346	7.368***	TER
6-O-Acetilaustronin	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	0.082**	1.365*	16.599**	TER
Ácido ursolico 3-[glucosil-(1->4)-xilosido]	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>12</sub>	Inf	0.013***	0***	TER
α-camfolenaldehido	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	3.164***	1.827***	0.577	TER
Hovenosido D	C <sub>57</sub> H <sub>92</sub> O <sub>26</sub>	1.426	0.026***	0.018***	TER
3,7-dihidroxi-25-metoxicucurbita-5,23-dien-19-al	C <sub>31</sub> H <sub>50</sub> O <sub>4</sub>	3.384***	4.981***	1.472	TER
Nerolidil acetato	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	18.85***	85.85***	4.554	TER

<b>Feruloil-β-sitosterol</b>	C <sub>39</sub> H <sub>58</sub> O <sub>4</sub>	4.497**	47.416**	10.544	TER
<b>Melilotosido B</b>	C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	0.345	0.121***	0.351**	TER
<b>Capsicosin</b>	C <sub>57</sub> H <sub>94</sub> O <sub>29</sub>	0.821	0.002***	0.002***	TER
<b>11'-Carboxi-α-tocoferol</b>	C <sub>26</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	0.105***	Inf*	Inf***	TPHE
<b>β-tocoferol</b>	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	0.221	0.052**	0.238	TPHE
<b>Piridoxamina</b>	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.386*	Inf**	Inf**	VT

**AD:** Derivados de aminoácidos; **AK:** Alcaloides; **ALDH:** Aldehídos; **APYR:** Acylpirasinas; **ARB:** Arabinosas; **BZD:** Derivados de benzoides; **CAPS:** Capsaicinoides; **CARO:** Carotenoides; **CHX:** Ciclohexanonas; **DHT:** Dearilheptanoides; **FAT:** Ácidos grasos; **FLV:** Flavonoides; **FRN:** Furanos; **GC:** Compuestos Glicosilados; **Jasm:** Jasmonas; **PPH:** Polifenoles; **PRL:** Pirrolidinas; **QNN:** Quinonas; **RTN:** Retinoides; **SCOH:** Alcoholes secundarios; **SPGL:** Esfingolípidos; **SPNN:** Sapogeninas; **SPNS:** Saponinas; **TER:** Terpenoides; **TPHE:** Tocoferoles; **VT:** Vitaminas.

\*:  $p < 0.05$

\*\* :  $p < 0.01$

\*\*\*:  $p < 0.001$

## **8. Discusión**

### **8.1. Robustez del método de extracción**

Mediante la aplicación de un método no dirigido de análisis metabólico por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas, se probaron muestras con características contrastantes de fruto de chile a 20 y 60 DAA, demostrando una buena resolución de los cromatogramas. Bijttebier et al. (2016), propusieron que uno de los pasos más cruciales es la verificación del proceso de extracción; con nuestra metodología se ha logrado observar una correcta clasificación de diferentes muestras, agrupándose tanto por condición como por proceso de extracción. Se compararon las extracciones metabólicas presentadas por De vos et al. (2007), encontrando una mejor agrupación de la fase polar (Metanol:H<sub>2</sub>O) en nuestras muestras, como se muestra en la separación por análisis de componentes principales (PCA) de la Figura 7.

A su vez, para mejorar la robustez del método de extracción, así como para determinar un gradiente cromatográfico, se analizaron frutos de chile con características morfológicas diferentes (“T74” y “CM334”) y días de maduración distintos (30 y 60 DAA). Como se observa en las Figuras 8 y 9, los perfiles muestran una dispersión en cuanto a los compuestos retenidos en las diferentes variedades como en los modos de ionización. Se optó por utilizar un gradiente cromatográfico que favoreciera a las distintas fases de extracción para utilizar los tiempos de retención al momento de la identificación entre análisis independientes. Sin la necesidad de variar el gradiente cromatográfico, Progenesis permite el uso de listas auxiliares para el aumento del valor de similitud. El uso de una plataforma de alta definición en combinación con las herramientas disponibles en Progenesis, demostró una ventaja ante los métodos reportados para la identificación (Aranha et al., 2017; De Vos et al., 2007; Jang et al., 2015; Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, Bino, & Bovy, 2011), en los cuales se reporta sólo un cierto número de compuestos que cumplen con los parámetros de aceptación, por lo que el panorama global del metabolismo secundario es reducido.

En la pre-identificación detallada, ciertos compuestos fueron detectados con un alto nivel de similitud con las bases de datos disponibles, entre ellos, compuestos

relacionados con la pungencia se encontraron con facilidad en los frutos. Además, se demostró el poder del análisis en la identificación rápida de compuestos en las diferentes bases de datos consultados. En la Tabla 5 se muestran las pre-identificaciones. De éstos, es sobresaliente la presencia de capsiamida, monodehidroascorbato, y 1-octadecanol que ya han sido previamente reportados en el fruto de chile (Liu, Zhang, Knochenmuss, Siems, & Hill, 2016; Mateos et al., 2013; Pino, Sauri-Duch, & Marbot, 2006). Los compuestos encontrados de manera rápida poseen diferencias en sus propiedades químicas, confirmando la versatilidad del uso de las columnas de fase reversa en estudios metabolómicos (Allwood & Goodacre, 2010; De Vos et al., 2007).

Los cromatogramas obtenidos mediante la columna CHS C<sub>18</sub> (Fig. 8 y 9), se observa el comportamiento de las distintas fases de extracción. Como era de esperarse, la fase acuosa posee una mayor abundancia en compuestos con un tiempo de retención bajo que los encontrados en la fase orgánica. Las columnas de fase reversa permiten la interacción de un amplio rango de metabolitos, dentro del rango de los semi-polares que incluye una gran parte del metabolismo secundario (De Vos et al., 2007). En las identificaciones preliminares se encuentran capsaicinoides y 1-octadecanol, conocidos por ser no polares; compuestos semi-polares como el monodehidroarcorbato, cafeoilcicloartenol; y compuestos relativamente más polares como la capsiamida y la 3-indoleacetamida; dando un panorama del potencial de detección al usar una columna de fase reversa.

Jang y colaboradores (2015) realizaron la comparación de diferentes estadios de maduración del fruto de CM334 mediante LC-MS, en la cual se reportó un total de 16 metabolitos secundarios. En comparación, el sistema SYNAPT HDMS (UPLC-ESI-QToF-MS/MS) logró obtener un mayor número de posibles compuestos en base al método MS<sup>E</sup> de adquisición usado en nuestro caso, de manera rápida fue posible la identificación de alrededor de 25 compuestos del metabolismo secundario en un proceso de análisis rápido, demostrando así, el potencial para un análisis más profundo.

## **8.2. Composición en los tejidos del fruto de chile en base a sus perfiles metabólicos no dirigidos**

Sin un antecedente metabolómico en tejido-específico del fruto de chile, como se presenta en este trabajo, se logró la identificación putativa y la asignación de diversos compuestos a un tejido específico. Una gran proporción de los posibles compuestos encontrados ha sido reportada con propiedades bioactivas consistentes con las descritas para extractos completos del fruto de chile, dando un indicio de posibles compuestos presentes que no han sido descritos todavía en el género *Capsicum*.

Como se muestra en las Figuras 12 y 13, la distribución de metabolitos en los tejidos estuvo entre un rango total de 52.29% para el extracto con dietiléter y 48.46% para el extracto acuoso, como se muestra en el 2D-PCA del modo positivo. Algunos estudios han reportado la dispersión entre muestras del fruto a distintos estadios de desarrollo (Jang et al., 20115) observando una dispersión total de 28.72% entre las condiciones del fruto completo de CM334. Wahyuni y colaboradores (2013), analizaron 32 accesiones diferentes del fruto de chile en base a la diversidad de metabolitos secundarios, un 54% en la dispersión total fue observado al analizar mediante LC-MS. Con el porcentaje de la varianza encontrada se pueden hipotetizar las diferencias en la composición de los iones en las muestras. Además, las muestras artificiales de control de calidad, o QC, tuvieron una reproducibilidad consistente dentro del experimento, sugiriendo que las diferencias entre los análisis se pueden atribuir a la naturaleza biológica de las muestras, es decir, las agrupaciones entre las muestras de un mismo tejido y la separación entre ellas en el análisis de componentes principales obedece a la naturaleza misma de los extractos y no a un artefacto del análisis. De tal manera que, mezclando los extractos de todas las muestras extraídas se pueden uniformizar las diferencias entre la composición metabólica y resultando con esto que los QC se encuentran al centro del PCA (Figura 12 y 13).

En una perspectiva global, en el diagrama de Venn (Fig.16) se encontró que alrededor de 30% de las identificaciones fueron compartidas entre los tejidos analizados, tanto en las diferentes extracciones como en los modos de ionización.

Sin embargo, la fase orgánica analizada en ESI negativo presentó únicamente el 9.3% de los posibles compuestos compartidos entre los tejidos, lo que se explica por la facilidad de detección de estos compuestos en modo negativo, así como por la compatibilidad con la fase de extracción.

Dependiendo de los grupos funcionales, se conoce que ciertos grupos funcionales de los compuestos presentan una afinidad o preferencia hacia alguno de los dos modos de ionización (Pitt, 2009; Rosu, Pirotte, Pauw, & Gabelica, 2006), es decir, ciertos compuestos ionizan mejor en un modo de ionización que en otro, dependiendo de la naturaleza misma de los grupos funcionales en la molécula. En modo negativo (donde se forman mayoritariamente iones desprotonados, con la fórmula  $[M-H]^-$ ) se encontró prevalencia de algunas clases de compuestos como la de los fosfolípidos, sapogeninas, ceramidas, esfingolípidos, así como ciertos polifenoles y derivados de cumarinas, mientras que en el modo de ionización positiva (donde mayoritariamente se observan iones protonados con la fórmula  $[M+H]^+$ ) se pre-identificaron compuestos glucosilados, alcaloides, terpenoides, flavonoides y saponinas; y compuestos relacionados al ácido ascórbico, al benceno, indol y aldehídos fueron fácilmente detectables en modo positivo. Como describe De vos (2007), para el análisis global del metabolismo, es indispensable la comparación entre los dos modos de ionización con el fin de cubrir el rango de protonación o desprotonación de los compuestos presentes en la muestra.

Las comparaciones entre tejidos (Fig. 14 y 15) demuestran un mayor número de posibles metabolitos compartidos entre placenta y pericarpio, los cuales, aparentan tener una mejor correlación en su diversidad metabólica, mientras que, en semilla se encontró incrementada la presencia de compuestos de la clase de los ácidos grasos. Desde un punto de vista biológico, la semilla es la parte del fruto que provee al embrión de los nutrientes de reserva para la correcta germinación (Baud et al., 2008), por lo que, el nivel de especialización metabólica de las semillas se ve reflejado en una mayor abundancia de ácidos grasos y saponinas, los cuales fueron altamente detectados en el experimento. En la Figura 16 se presenta un número

importante de compuestos presentes únicamente en semillas, los cuales corresponden, principalmente a distintos ácidos grasos pre-anotados en este tejido.

Aumentar el número de réplicas biológicas pudo haber sido de gran ayuda para una corroboración más exhaustiva, así como la adición de diferentes variedades de *Capsicum* nos pudo ayudar al reconocimiento de metabolitos presentes a través de otros procesos biológicos, como la adaptación a un ecosistema en particular; o caso contrario, la existencia de compuestos altamente conservados en el género.

### **8.3. La diversidad de compuestos encontrados en las partes del fruto de chile y sus posibles propiedades bioactivas**

Como se menciona en la sección anterior, se encontró una cantidad considerable de compuestos del grupo de ácidos grasos, seguido por compuestos como terpenoides y compuestos glicosilados en las clases más pre-anotadas en los tejidos.

En la Tabla 8 se encuentran las detecciones putativas de los metabolitos con diferencias significativas entre la abundancia relativa de los distintos tejidos del fruto de chile a un estadio maduro. Una parte de ellos, como: ácido isopimarico, mirciacitrin v, sinefrin acetona y hovenosido D no ha sido previamente reportada en el fruto de *C. annum*, sin embargo, otros como: ubiquinol-6, trigofenosido g, 2,4-nonadienal y licopodano sí en diferentes plantas de la familia de las solanáceas (Aranha et al., 2017; Rabara, Tripathi, & Rushton, 2017; Wahyuni et al., 2013).

En comparación, las semillas presentaron un mayor número de identificaciones putativas entre los tejidos, sin embargo, éstas eran referentes a ácidos grasos y saponinas, los cuales son altamente conocidos por estar presentes en este tejido (Baud et al., 2008). Por su parte, la placenta mostró una abundancia mayor en compuestos previamente reportados como capsaicina, alcaloides y tocoferoles (Materska, 2014; Nugroho, 2016). El pericarpio presentó un mayor número de compuestos glucosilados, así como jasmonatos, terpenoides y carotenoides,

consistente con los resultados de Materska (2014) en otras variedades de *C. annuum*.

Los compuestos glicosilados poseen un mayor índice de diferencias significativas en el análisis comparativo. Metabolitos como isovitexina, quercetina 3-(6"-malonilglucosido), catecol- $\beta$ -L-glucoronido, y el kaempferol 3-O-arabinosido, Kaempferol 3-xilosilglucosido han sido descritos en diferentes hierbas y especias, las cuales se conocen por tener un aroma y sabor muy característico. Se encontraron también compuestos relacionados a la síntesis de antocianinas las cuales proporcionan protección contra el daño solar en algunas plantas, además de atraer polinizadores (Aza-González et al., 2013) y reportados en el pericarpio (Li, Somavat, Singh, Chatham, & Gonzalez de Mejia, 2017).

El grupo de los terpenoides se logró detectar a lo largo de los tres tejidos, sin embargo, se encontró una mayor abundancia en el pericarpio. Gastronómicamente, estos compuestos se encuentran abundantemente en hierbas y especias representando uno de los principales contribuyentes a los atributos organolépticos que este tipo de plantas poseen (Guzman et al., 2011). El ácido isopimarico, 6-O-acetilaustroinulina, feruloil- $\beta$ -sitosterol y el  $\alpha$ -camfolenaldehído, compuestos previamente reportados en plantas, pudieron detectarse en tejidos del fruto de chile (Khodakov, Kotikov, & Pankovetskii, 2009; Novillo, Velasco, & Delgado, 2015; E. Smith, Williamson, Zloh, & Gibbons, 2005).

De los alcaloides pre-anotados, se pudieron encontrar algunos reportados en solanáceas: 1-(1,2,3,4,5-pentahidroxipent-1-il)-1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolin-3-carboxilato (Herraiz & Galisteo, 2002) y cuscohigrina (Eich, 2008). Además, cuatro alcaloides presentes en distintas familias de plantas fueron pre-anotados: adepostatina A (Kubo, Nitoda, Tocoli, & Green, 2011; A. Tanaka, Arai, Kim, Ham, & Usuki, 2011), xi-8-acetonildihidrosanguinarina (Yannai, 2004), berberrubina (Park et al., 2006; Yannai, 2004) y UNII:TBV5O16GAP (Yannai, 2004). Los anteriores no han sido reportados en el género *Capsicum*, sin embargo, al estar presentes en una gama de familias, existe la posibilidad de encontrarse en alguno de los tejidos analizados.

Distintos capsaicinoides fueron encontrados significativamente en la placenta del fruto, reforzando investigaciones previas (Cesar Aza-González et al., 2011; Hayano-Kanashiro, Gámez-Meza, & Medina-Juárez, 2016). Además de las características organolépticas que aportan al fruto, se han reportado distintas posibles aplicaciones clínicas a este grupo de compuestos (Reyes-Escogido, Gonzalez-Mondragon, & Vazquez-Tzompantzi, 2011). Se ha reportado como analgésico (Derry, Lloyd, Moore, & McQuay, 2009), suplemento en la pérdida de peso (Kawada, Hagihara, & Iwai, 1986) y en tratamientos gastrointestinales (Mózsik, Szolcsányi, & Rácz, 2005).

En la medicina naturista tradicional, la cual se conoce extensamente por el uso de diversos extractos provenientes de plantas (Ayrle et al., 2016), se tiene reportado el uso del fruto de chile como tratamiento para distintos malestares (Wildman, 2007). La mayor parte de las investigaciones sobre los efectos bioactivos del fruto se han realizado utilizando a los capsaicinoides como protagonistas; sin embargo, en este estudio pre-identificamos diferentes compuestos con propiedades similares a las que se atribuyen a los extractos complejos del chile en la medicina tradicional, existiendo la posibilidad de una acción conjunta de diferentes metabolitos sobre un mismo efecto nutracéutico.

#### **8.4. Ciertas propiedades nutracéuticas del fruto y la presencia de compuestos no reportados**

Desde hace siglos se conoce la utilización del fruto de chile como preventivo de enfermedades y contra distintos síntomas, debido a la cantidad de compuestos antioxidantes (Wildman, 2007). Sin embargo, solo una fracción de éstos se ha logrado aislar y caracterizar. Como se encontró en este trabajo y consistente con la literatura, los compuestos más predominantes en el fruto pertenecen a las clases de capsaicinoides, ácidos grasos, carotenoides, flavonoides, alcaloides y terpenoides, de los cuales, una porción se encuentra reportada por métodos fitoquímicos tradicionales, mientras que otros compuestos menos abundantes, no se han determinado aún en el género *Capsicum*.

Recientemente, nuevas características como nutracéutico se han atribuido al añadir dosis moderadas del fruto de chile a una dieta continua (Chávez-Mendoza et al., 2013; Joshi et al., 2017). En conjunto, los metabolitos secundarios del fruto se han aplicado en la medicina tradicional contra enfermedades degenerativas, desordenes intestinales, contusiones musculares, problemas de salud mental, entre otros, así como la neutralización de radicales libres (Chávez-Mendoza et al., 2013; Joshi et al., 2017; Kouassi Kouassi et al., 2012).

Mediante el uso de una plataforma para espectrometría de masas de alta definición y la consulta de diversas bases de datos, se pudo pre-anotar otra proporción de anotaciones no descritas en el género *Capsicum*. Compuestos como alcaloides, terpenoides y otros compuestos bioactivos, extraídos de plantas de distintas familias fueron detectados en los tejidos del fruto.

## 9. Conclusiones

El análisis de tejido específico mediante técnicas metabolómicas no dirigidas demostró tener el potencial para la detección y pre-anotación de cambios significativos a nivel metabólico entre distintas partes del fruto de chile “Tabasco”.

Se logró el establecimiento de un método en dos fases inmiscibles con alta robustez para la extracción de compuestos procedentes de diferentes tejidos del fruto de chile utilizando una mezcla de MetOH:H<sub>2</sub>O:Dietileter. Se pudo apreciar la eficiencia de la separación de las fases al ser inyectada de manera independiente, encontrando compuestos con distintos tiempos de retención entre ellas. Además, se identificó la presencia putativa de distintos compuestos bioactivos reportados para este género, así como algunos otros no reportados en la familia de las solanáceas que, sin embargo, pudieran explicar con más profundidad las propiedades ancestrales que posee este cultivo.

Estas técnicas representan una oportunidad como primer paso hacia alternativas de nuevos blancos para la ingeniería metabólica, por ejemplo, la identificación de compuestos bioactivos no reportados en tejido del fruto de chile pudiera dar indicios al mejoramiento genético de este producto, con el fin de aumentar las cualidades nutraceuticas que empíricamente ya se conocen.

La generación de recursos virtuales para la comparación y pre-anotación de compuestos resulta indispensable para el desarrollo de nuevos métodos y el mejoramiento de aquellos ya realizados. En este trabajo se generó una lista de anotaciones que en conjunto a las bases de datos disponibles en línea aumentan la calidad de los valores de los posibles compuestos, tomando en consideración los patrones de fragmentación y los tiempos de retención. Con el fin de generar una base de datos metabólica para el género *Capsicum*, este trabajo representa uno de los primeros pasos para la construcción de una base de datos global de las moléculas presentes en el fruto de chile.

Las propiedades medicinales de distintas plantas, probadas desde hace miles de años, hoy en día presentan una oportunidad para el mejoramiento de diferentes

cultivares, así como, para la extracción dirigida de estos blancos moleculares. La comprobación y dilucidación estructural mediante la obtención del CCS de las anotaciones son el siguiente paso para el mejoramiento y extensión de los datos obtenidos.

## **10. Perspectivas**

- Incrementar el número de distintas columnas cromatográficas con características diferentes a las previamente utilizadas en el análisis.
- Realizar el análisis metabólico no dirigido durante todo el desarrollo del fruto de Chile.
- Utilizar distintas variedades del fruto de Chile para la creación de correlaciones y modelos del metabolismo secundario durante el tiempo.
- Aumentar el número de réplicas biológicas para el experimento.
- Comparar los perfiles transcriptómicos de las colectas.
- Obtener los distintos valores de CCS para cada una de las pre- anotaciones realizadas en este trabajo.

## 11. Referencias

- Allwood, J. W., & Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochemical Analysis*, 21(1), 33–47. <https://doi.org/10.1002/pca.1187>
- Aranha, B. C., Hoffmann, J. F., Barbieri, R. L., Rombaldi, C. V., & Chaves, F. C. (2017). Untargeted metabolomic analysis of *Capsicum spp.* by GC-MS. *Phytochemical Analysis*, (March). <https://doi.org/10.1002/pca.2692>
- Ayrle, H., Mevissen, M., Kaske, M., Nathues, H., Gruetzner, N., Melzig, M., & Walkenhorst, M. (2016). Medicinal plants--prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. *BMC Vet Res*, 12, 89. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0714-8>
- Aza-González, C., Herrera-Isidró, L., Núñez-Palenius, H. G., Martínez de La Vega, O., & Ochoa-Alejo, N. (2013). Anthocyanin accumulation and expression analysis of biosynthesis-related genes during chili pepper fruit development. *Biologia Plantarum*, 57(1), 49–55. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0265-1>
- Aza-González, C., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2011). Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum spp.*). *Plant Cell Reports*, 30(5), 695–706. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0968-8>
- Aza-González, C., Núñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2012). Molecular biology of chili pepper anthocyanin biosynthesis. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 93–98.
- Baud, S., Dubreucq, B., Miquel, M., Rochat, C., & Lepiniec, L. (2008). Storage Reserve accumulation in *Arabidopsis*: Metabolic and developmental control of seed filling. *The Arabidopsis Book*, e0113. <https://doi.org/10.1199/tab.0113>
- Bijttebier, S., Van der Auwera, A., Foubert, K., Voorspoels, S., Pieters, L., & Apers, S. (2016). Bridging the gap between comprehensive extraction protocols in plant metabolomics studies and method validation. *Analytica Chimica Acta*, 935, 136–150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.047>

- Böttcher, C., von Roepenack-Lahaye, E., Schmidt, J., Schmotz, C., Neumann, S., Scheel, D., & Clemens, S. (2008). Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *147*(4). Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/147/4/2107>
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *402*(1), 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, *74*(17), 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., ... Karp, P. D. (2016). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, *44*(Database issue), D471–D480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>
- Castro-Concha, L. A., Tuyub-Che, J., Moo-Mukul, A., Vazquez-Flota, F. A., & Miranda-Ham, M. L. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense Jacq.* (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/809073>
- Catchpole, G. S., Beckmann, M., Enot, D. P., Mondhe, M., Zywicki, B., Taylor, J., ... Draper, J. (2005). Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(40), 14458–14462. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503955102>
- Chávez-Mendoza, C., Sánchez, E., Carvajal-Millán, E., Muñoz-Márquez, E., & Guevara-Aguilar, A. (2013). Characterization of the nutraceutical quality and

antioxidant activity in bell pepper in response to grafting. *Molecules*, 18(12), 15689–15703. <https://doi.org/10.3390/molecules181215689>

Cho, K., Mahieu, N., Ivanisevic, J., Uritboonthai, W., Chen, Y.-J., Siuzdak, G., & Patti, G. J. (2014). isoMETLIN: A database for isotope-based metabolomics. *Analytical Chemistry*, 86(19), 9358–9361. <https://doi.org/10.1021/ac5029177>

Davies, B. H., Matthews, S., & Kirk, J. T. O. (1970). The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *Capsicum annuum*. *Phytochemistry*, 9(4), 797–805. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85183-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85183-3). Los nombres de especies deben escribirse con itálicas o cursivas.

De, A. K. (2003). *Capsicum: The genus Capsicum*. Taylor & Francis.

De Vos, R. C. H., Moco, S., Lommen, A., Keurentjes, J. J. B., Bino, R. J., & Hall, R. D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(4), 778–91. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.95>

Degtyarenko, K., de Matos, P., Ennis, M., Hastings, J., Zbinden, M., McNaught, A., ... Ashburner, M. (2008). ChEBI: A database and ontology for chemical entities of biological interest. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl\_1), D344–D350. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm791>

Deli, J., Matus, Z., Molnár, P., & Tóth, G. (2014). Separation and identification of carotenoids from different coloured paprika (*Capsicum annuum*) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *European Food Research and Technology*, 213(4–5), 301–305. <https://doi.org/10.1007/s002170100377>

Derry, S., Lloyd, R., Moore, R. A., & McQuay, H. J. (2009). Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), CD007393-CD007393. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007393.pub2>

- Dorsey, J. G., & Dill, K. A. (1989). The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography. *Chemical Reviews*, 89(2), 331–346. <https://doi.org/10.1021/cr00092a005>
- Eich, E. (2008). *Solanaceae and convolvulaceae - secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance: A handbook*. Berlin, Alemania. Springer.
- Estrada, B., Bernal, M. A., Díaz, J., Pomar, F., & Merino, F. (2000). Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6234–6239. <https://doi.org/10.1021/jf000190x>
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, 48, 155–171.
- Frank, T., & Engel, K.-H. (2013). 8 – Metabolomic analysis of plants and crops. In *Metabolomics in Food and Nutrition* (pp. 148–191). <https://doi.org/10.1533/9780857098818.2.148>
- Fukushima, A., Kusano, M., Redestig, H., Arita, M., & Saito, K. (2009). Integrated omics approaches in plant systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(5–6), 532–538. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.022>
- Glinski, M., & Weckwerth, W. (2006). The role of mass spectrometry in plant systems biology. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(2), 173–214. <https://doi.org/10.1002/mas.20063>
- Gómez-García, M. del R., & Ochoa-Alejo, N. (2016). Predominant role of the I-galactose pathway in l-ascorbic acid biosynthesis in fruits and leaves of the *Capsicum annuum* L. chili pepper. *Brazilian Journal of Botany*, 39(1), 157–168. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0232-0>
- Guzman, I., Bosland, P. W., & O'Connell, M. A. (2011). Heat, color, and flavor compounds in *Capsicum* fruit. In *The Biological Activity of Phytochemicals* (pp.

109–126). New York, NY: Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7299-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7299-6_8)

Hall, R. D. (2011). Plant metabolomics in a nutshell: Potential and future challenges. *Annual Plant Reviews Volume 43: Biology of Plant Metabolomics*, 43, 1–24. <https://doi.org/10.1002/9781444339956.ch1>

Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. Á. (2016). Wild pepper *L. var. glabriusculum*: Taxonomy, plant morphology, distribution, genetic diversity, genome sequencing, and phytochemical compounds. *Crop Science*, 56(1), 1. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.11.0789>

Herraiz, T., & Galisteo, J. (2002). Identification and occurrence of the novel alkaloid pentahydroxypentyl-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid as a tryptophan glycoconjugate in fruit juices and jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4690–4695. <https://doi.org/10.1021/jf020090m>

Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., ... Nishioka, T. (2010). MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(7), 703–714. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>

Horgan, R. P., & Kenny, L. C. (2011). “Omic” technologies: Genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 13(3), 189–195. <https://doi.org/10.1576/toag.13.3.189.27672>

Jang, Y. K., Jung, E. S., Lee, H. A., Choi, D., & Lee, C. H. (2015). Metabolomic characterization of hot pepper (*Capsicum annuum* “cM334”) during fruit development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(43), 9452–9460. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03873>

Joshi, D. D., Changkija, S., Sujata, W., Somkuwar, B. G., Rana, V. S., & Talukdar, N. C. (2017). Nutraceutical from *Capsicum chinense* fruits in shelf-stable herbal matrix. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42(Supplement C), 130–137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.06.006>

- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., & Hattori, M. (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue), D277–D280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh063>
- Kawada, T., Hagihara, K.-I., & Iwai, K. (1986). Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *The Journal of Nutrition*, 116(7), 1272–1278. Retrieved from <http://jn.nutrition.org/content/116/7/1272.short>
- Khodakov, G. V., Kotikov, I. V., & Pankovetskii, V. N. (2009). Component composition of essential oil from *Artemisia abrotanum* and *A. dracuncululus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(6), 905–908. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9472-1> Corregir nombres de especies con itálicas en los títulos de aquí en adelante.
- Khopkar, S. M. (2012). *Basic concepts of analytical chemistry*. New Delhi, India. New Academic Science.
- Kim, H.-J., Baek, K.-H., Lee, S.-W., Kim, J., Lee, B.-W., Cho, H.-S., ... Hur, C.-G. (2008). Pepper EST database: Comprehensive in silico tool for analyzing the chili pepper (*Capsicum annuum*) transcriptome. *BMC Plant Biology*, 8, 101. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-101>
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., ... Bryant, S. H. (2016). PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Research*, 44(Database issue), D1202–D1213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv951>
- Klie, S., Osorio, S., Tohge, T., Drincovich, M. F., Fait, A., Giovannoni, J. J., ... Nikoloski, Z. (2014). Conserved changes in the dynamics of metabolic processes during fruit development and ripening across species. *Plant Physiology*, 164(1), 55–68. <https://doi.org/10.1104/pp.113.226142>
- Kouassi Kouassi, C., Koffi-Nevry, R., Guillaume, L. Y., Yéssé, Z. N., Koussémon, M., Kablan, T., & Athanase, K. K. (2012). Profiles of bioactive compounds of some pepper fruit (*Capsicum* L.) varieties grown in Côte D'ivoire. *Innovative*

*Romanian Food Biotechnology*, 11. Retrieved from [http://www.bioaliment.ugal.ro/revista/11/paper 11.4.pdf](http://www.bioaliment.ugal.ro/revista/11/paper%2011.4.pdf)

- Kubo, I., Nitoda, T., Tocoli, F. E., & Green, I. R. (2011). Multifunctional cytotoxic agents from *Anacardium occidentale*. *Phytotherapy Research*, 25(1), 38–45. <https://doi.org/10.1002/ptr.3109>
- Li, Q., Somavat, P., Singh, V., Chatham, L., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). A comparative study of anthocyanin distribution in purple and blue corn coproducts from three conventional fractionation processes. *Food Chemistry*, 231, 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.146>
- Liu, W., Zhang, X., Knochenmuss, R., Siems, W. F., & Hill, H. H. (2016). Multidimensional separation of natural products using liquid chromatography coupled to hadamard transform ion mobility mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 27(5), 810–821. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1346-8>
- Marion, J. E., & Dempsey, A. H. (1964). Fatty acids of pimiento pepper seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 41(8), 548–549. <https://doi.org/10.1007/BF02898131>
- Martinez, T. (2007). Etnobotanica del chile quipín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) en la Sierra Gorda y semidesierto de Queretaro, (January 2007), 1–127. Retrieved from [file:///J:/arboles/Usos arboles de Mexico/Referencias/Queretaro/Etnobotanica chile quipin.pdf](file:///J:/arboles/Usos%20arboles%20de%20Mexico/Referencias/Queretaro/Etnobotanica%20chile%20quipin.pdf)
- Martínez-López, L. A., Ochoa-Alejo, N., & Martínez, O. (2014). Dynamics of the chili pepper transcriptome during fruit development. *BMC Genomics*, 15, 143. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-143>
- Mateos, M. R., Jiménez, A., Román, P., Romojaro, F., Bacarizo, S., Leterrier, M., ... Palma, M. J. (2013). Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum* L.): Involvement in the response to temperature changes in ripe fruits. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms14059556>

- Materska, M. (2014). Bioactive phenolics of fresh and freeze-dried sweet and semi-spicy pepper fruits (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Functional Foods*, 7, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.02.002>
- Matsuda, F., Yonekura-Sakakibara, K., Niida, R., Kuromori, T., Shinozaki, K., & Saito, K. (2009). MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *Plant Journal*, 57(3), 555–577. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03705.x>
- Meier, R., Ruttkies, C., Treutler, H., & Neumann, S. (2017). Bioinformatics can boost metabolomics research. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.018>
- Mochida, K., & Shinozaki, K. (2011). Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2017–2038. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr153>
- Morán-Bañuelos, H. S., Aguilar-Rincón, H., Corona-Torres, T., Castillo-González, F., Soto-Hernández, R. M., & San Miguel-Chávez, R. (2008). Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia*, 42(7), 807–816. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/302/30211207007.pdf>
- Mózsik, G., Szolcsányi, J., & Rácz, I. (2005). Gastroprotection induced by capsaicin in healthy human subjects. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 11(33), 5180–5184. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i33.5180>
- Novillo, F., Velasco, E., & Delgado, G. (2015). Tri- and diterpenoids from some species of Euphorbiaceae. Evaluation of their antiinflammatory and cytotoxic properties. *Planta Medica*, 81(16), PM\_106. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565483>
- Nugroho, L. H. (2016). Red pepper (*Capsicum spp.*) fruit: A model for the study of secondary metabolite product distribution and its management. *AIP Conference Proceedings*, 1744(1), 20034. <https://doi.org/10.1063/1.4953508>

- Park, K. D., Lee, J. H., Kim, S. H., Kang, T. H., Moon, J. S., & Kim, S. U. (2006). Synthesis of 13-(substituted benzyl) berberine and berberrubine derivatives as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16(15), 3913–3916. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.033>
- Pence, H. E., & Williams, A. (2010). ChemSpider: An online chemical information resource. *Journal of Chemical Education*, 87(11), 1123–1124. <https://doi.org/10.1021/ed100697w>
- Pino, J., Sauri-Duch, E., & Marbot, R. (2006). Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food Chemistry*, 94(3), 394–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.040>
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 30(1), 19–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224008>
- Presilla, M. E. (2017). *Peppers of the Americas: The remarkable capsicums that forever changed flavor*.
- Rabara, R. C., Tripathi, P., & Rushton, P. J. (2017). Comparative metabolome profile between tobacco and soybean grown under water-stressed conditions. *BioMed Research International*, 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/3065251>
- Reyes-Escogido, D. M., Gonzalez-Mondragon, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules16021253>
- Rosu, F., Pirotte, S., Pauw, E. De, & Gabelica, V. (2006). Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug–DNA complexes. *International Journal of Mass Spectrometry*, 253(3), 156–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.11.027>
- Savoi, S., Wong, D. C. J., Degu, A., Herrera, J. C., Bucchetti, B., Peterlunger, E., ... Castellarin, S. D. (2017). Multi-omics and integrated network analyses reveal

- new insights into the systems relationships between metabolites, structural genes, and transcriptional regulators in developing grape berries (*Vitis vinifera* L.) exposed to water deficit. *Frontiers in Plant Science*, 8(July), 1124. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01124>
- Schauer, N., & Fernie, A. R. (2006). Plant metabolomics: Towards biological function and mechanism. *Trends in Plant Science*, 11(10), 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.08.007>
- Schweiggert, U., Kammerer, D. R., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(18), 2617–2628. <https://doi.org/10.1002/rcm.2104>
- Shulaev, V. (2006). Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in Bioinformatics*, 7(2), 128–139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbl012>
- Singh, R. (2002). *Gas chromatography*. Mittal Publications. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books?id=JhvyRkjiAwsC&dq=gas+chromatography+review&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.mx/books?id=JhvyRkjiAwsC&dq=gas+chromatography+review&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Singh, S., Jarret, R., Russo, V., Majetich, G., Shimkus, J., Bushway, R., & Perkins, B. (2009). Determination of capsinoids by HPLC-DAD in *Capsicum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3452–3457. <https://doi.org/10.1021/jf8040287>
- Smith, C. A., Maille, G. O., Want, E. J., Qin, C., Trauger, S. A., Brandon, T. R., ... Siuzdak, G. (2005). METLIN. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(6), 747–751. <https://doi.org/10.1097/01.ftd.0000179845.53213.39>
- Smith, E., Williamson, E., Zloh, M., & Gibbons, S. (2005). Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, 19(6), 538–542. <https://doi.org/10.1002/ptr.1711>

- T'Kindt, R., Storme, M., Deforce, D., & Van Bocxlaer, J. (2008). Evaluation of hydrophilic interaction chromatography versus reversed-phase chromatography in a plant metabolomics perspective. *Journal of Separation Science*, 31(9), 1609–1614. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700539>
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Rinehart, D., & Siuzdak, G. (2012). XCMS online: A web-based platform to process untargeted metabolomic data. *Analytical Chemistry*, 84(11), 5035–5039. <https://doi.org/10.1021/ac300698c>
- Tanaka, A., Arai, Y., Kim, S.-N., Ham, J., & Usuki, T. (2011). Synthesis and biological evaluation of bilobol and adipostatin A. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(4), 290–296. <https://doi.org/10.1080/10286020.2011.554828>
- Wahyuni, Y., Ballester, A.-R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry*, 72(11–12), 1358–1370. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.03.016>
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Tikunov, Y., de Vos, R. C. H., Pelgrom, K. T. B., Maharijaya, A., ... Bovy, A. G. (2013). Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum sp.*) biodiversity. *Metabolomics*, 9(1), 130–144. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0432-6>
- Waizel-Bucay, J., & Camacho Morfin, R. (2011). El género *Capsicum spp.* (“chile”) Una versión panorámica. *Revista de Divulgación Científica Y Tecnológica Aleph Zero*, 67–79.
- Wildman, R. E. C. (2007). *Hand book of Nutraceuticals and Functional Foods* (2nd ed.). Boca Raton, FL: Taylor & Francis.
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., ... Scalbert, A. (2013). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D801–D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1065>

Yannai, S. (2004). *Dictionary of food compounds with CD-ROM: Additives, flavors, and ingredients*. Chapman & Hall/CRC. Retrieved from <https://www.crcpress.com/Dictionary-of-Food-Compounds-with-CD-ROM-Additives-Flavors-and-Ingredients/Yannai/p/book/9781584884163>

## Anexos

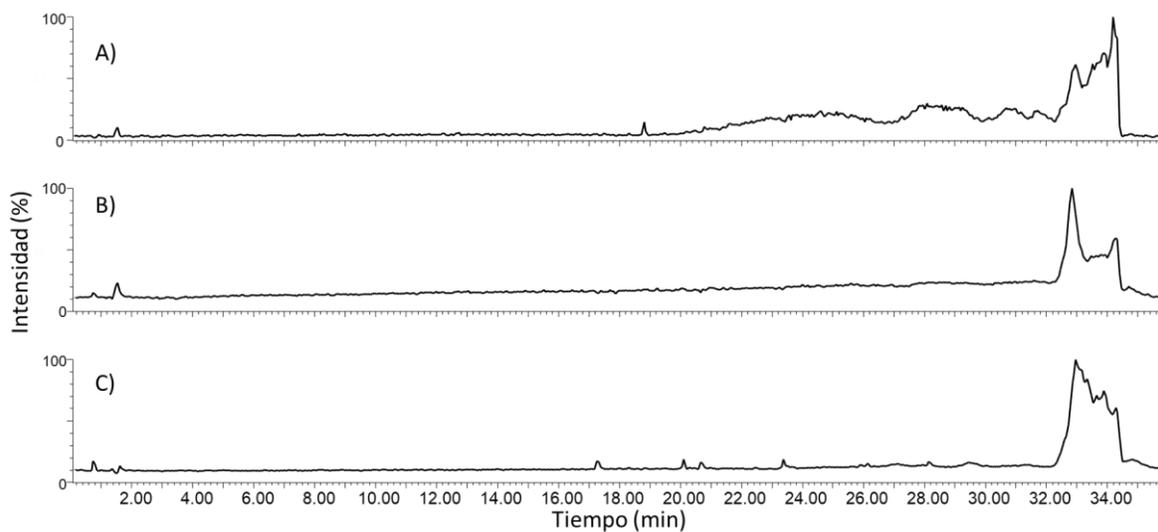
Tabla de pre-anotaciones en plantas:

<https://www.dropbox.com/s/3k3kxbx8bjpr89s5/Anexo1.xlsx?dl=0>

Tabla de pre-anotaciones de compuestos no reportados en plantas:

<https://www.dropbox.com/s/yaw8cu6ym89fhmc/Anexo2.xlsx?dl=0>

Blancos de extracción (ESI +). A) Primera inyección del experimento en la columna. B) Blanco intermedio del análisis. C) Blanco intermedio del experimento:



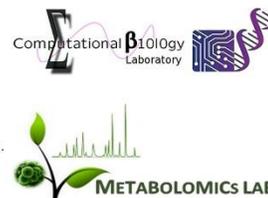
# Cartel 1. Explicación de anteproyecto de maestría. BioCinves (2016)



## Global metabolic profiling of different varieties of chili pepper during fruit development.

Felipe Cervantes Hernández, José Ordaz Ortiz y Octavio Martínez de la Vega.

Unidad de Genómica Avanzada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, Guanajuato.

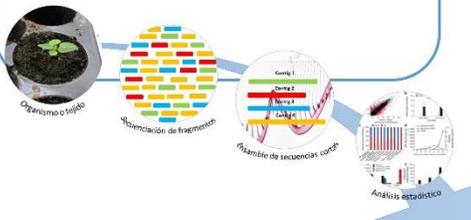



### El género *Capsicum*...

Pertenciente a la familia de las solanáceas, el chile es uno de los cultivos más importantes alrededor del mundo. Existen más de 26 especies registradas pero únicamente 5 han sido domesticadas. Los diversos compuestos encontrados en los frutos de chile son usados en sectores tanto gastronómicos, farmacéuticos y cosmetológicos.<sup>1</sup> Entre sus compuestos más característicos se encuentran los capsaicinoides, responsables de los niveles de pungencia; carotenoides y antocianinas. Dichos compuestos cambian su abundancia durante el proceso de maduración del fruto por diferentes cuestiones regulatorias.

### Transcriptómica...

Consiste en el set de ARN existentes en un organismo o tejido durante un tiempo y condiciones específicas. RNA-seq es un método para la secuenciación de manera masiva de fragmentos cortos que permite estimar el número y la frecuencia de los genes expresados en la condición dada.<sup>2</sup>

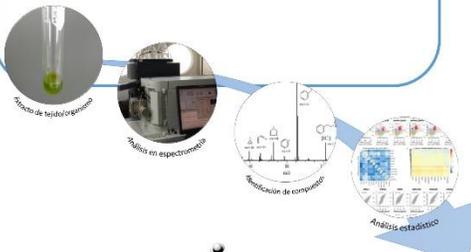
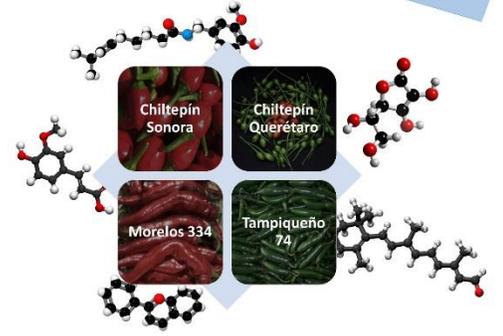
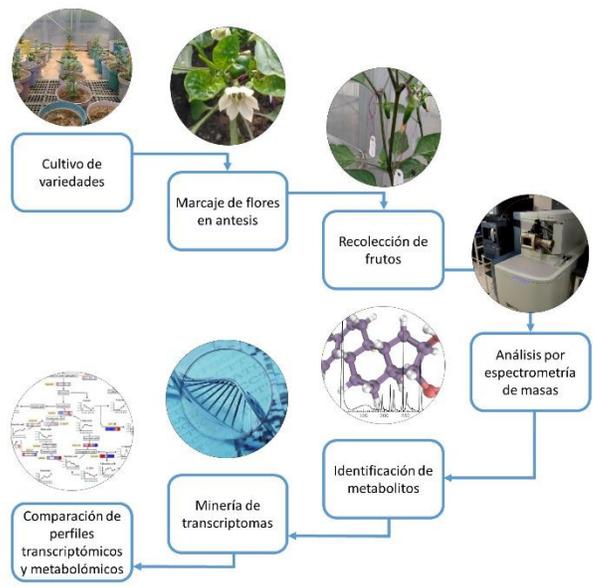


### Objetivos...

- Realizar los perfiles metabolómicos durante el desarrollo del fruto de chile en diferentes variedades de *Capsicum*.
- Realizar la comparativa entre los estados metabólicos y los cambios transcriptómicos durante el desarrollo del chile en diferentes variedades de *Capsicum*.

### Metabolómica...

Se define como la identificación y cuantificación de todos los compuestos de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico durante un momento y bajo condiciones específicas. La cromatografía acoplada a espectrometría de masas es de las técnicas más usadas en el área.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Waizel-Bucay, J., & Camacho Morfin, R. (2011). El género *Capsicum* spp. ("chile") Una versión panorámica. Revista de Divulgación Científica Y Tecnológica Aleph Zero, 67-79.  
<sup>2</sup> Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nature Reviews. Genetics, 10(1), 57-63.  
<sup>3</sup> Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L., & Bino, R. (2002). Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. The Plant Cell, 14(7), 1437-1440.

## Cartel 2. Análisis metabólico del fruto de chile (*Capsicum annuum*). Días Académicos 2016.



### Global metabolic profiling of different varieties of chili pepper during fruit development.

Felipe Cervantes Hernández, José Ordaz Ortiz y Octavio Martínez de la Vega.  
Unidad de Genómica Avanzada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, Guanajuato.



### Capsicum

Belonging to the family of solanaceae, chili pepper is one of the most important cultivars all around the world. There are more than 26 registered species but just 5 has been domesticated<sup>1</sup>. The compounds found in pepper are used in different areas as gastronomic, pharmaceutical, and cosmetic industries. During fruit development, compounds change their abundance by different regulatory motifs. Capsaicin, carotenoids and anthocyanins have been extensively studied during this biological process but there some more awaiting to be discovered.

### Global profiling

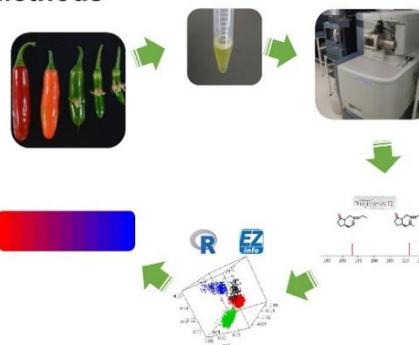
Is defined as the identification and quantification of all (almost) low molecular weight compounds in a biological system at specific time and conditions. Chromatography coupled to mass spectrometry is highly used for studies of global metabolic profiling.<sup>2</sup>



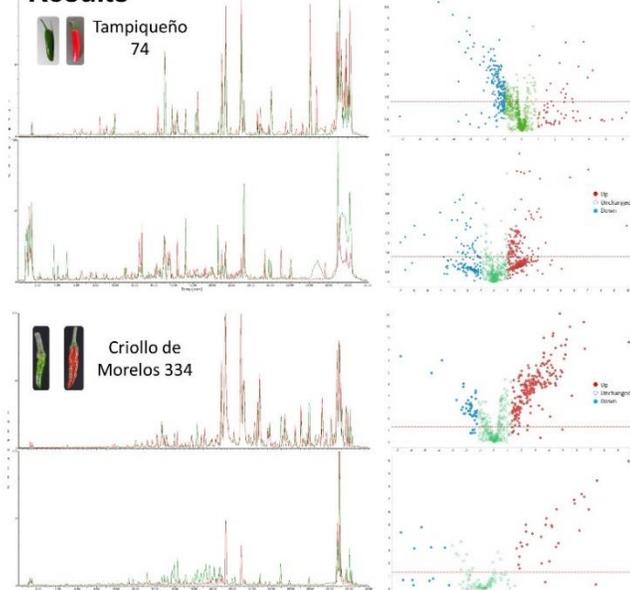
### Objectives

To obtain the metabolic global profiling during fruit development of different *Capsicum* varieties..

### Methods



### Results



### Pre-identified Metabolites

Homodihydrocapsaicin-I  
1-Methoxyficolinol  
Dihydrocapsaicin  
Caffeoylcycloartenol  
Capsiamide  
Homocapsaicin

Jasmonic acid  
Monodehydroascorbate  
Pantetheine 4'-phosphic acid

### Conclusion

Global profiling is a powerful tool to identify. We had pre-identify some compounds with significance changes during fruit development of chili pepper, most of them related to secondary metabolism of pepper using reverse phase chromatography coupled to mass spectrometry.

<sup>1</sup> Waizel-Bucay, J., & Camacho Morfín, R. (2011). El género *Capsicum* spp. ("chile") Una versión panorámica. Revista de Divulgación Científica Y Tecnológica Aleph 2ero, 67-79.  
<sup>2</sup> Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L., & Blino, R. (2002). Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. The Plant Cell, 14(7), 1437-1440.

# Cartel 3. Desarrollo del análisis de tejidos. XVII National Congress on Plant Biochemistry and Molecular Biology. X Joint Mexico - U. S. Symposium (2017).



## "Placenta, pericarp and seeds of Tabasco chili pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) show a contrasting diversity of bioactive metabolites"

Felipe Cervantes-Hernández, Paul Alcalá-González, Octavio Martínez de la Vega y José Ordaz-Ortiz

Unidad de Genómica Avanzada, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Irapuato, Guanajuato.



### Introduction

Chili pepper (*Capsicum annuum*) is one of the most produced crops around the world due its organoleptic properties, and also, healthy benefits has been known since centuries. Capsaicinoids, capsinoids, carotenoids, alkaloids, terpenoids and other bioactive compounds are formerly reported.<sup>1,2</sup> But, specific spatial-temporal localization has not been extensively described. Here, we present our findings by using non-targeted metabolomic analysis of pericarp, placenta and seeds of Tabasco chili pepper at a mature stage.



### Non-targeted Profiling

Mass spectrometry based metabolomics is an emerging technique to explore the metabolic diversity in a complex matrix. Is defined as the identification of all low molecular weight compounds in a biological system under specific conditions.<sup>3</sup>

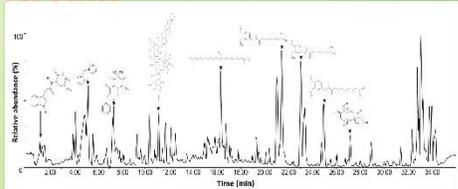
### Objectives

To compare global metabolic profiling of distinct tissues of Tabasco pepper fruit (*C. annuum* L.) at commercial mature stage and pre-identification using available online databases.

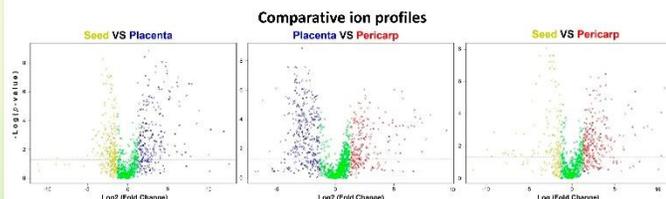
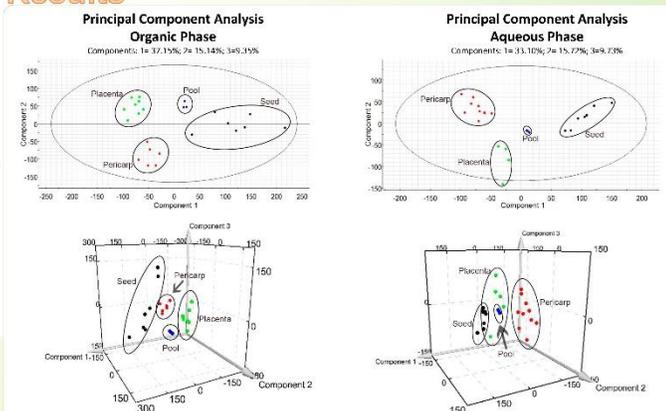
### Procedure



### Results



### Results



Shared and specific putative annotation		Compound class	Annotations	Tissue
<b>Negative Mode</b>		Fatty Acids	53	Seed
		Terpenoids	33	Placenta
		Glycoside compounds	28	Pericarp
		Benzoyl related	15	Placenta
		Capsaicinoids	14	Placenta
		Alkaloids	14	Placenta
		Saponins	12	Seed
		Phospholipids	9	Fruit
		Carotenoids	8	Pericarp
		Polyphenols	7	Placenta
		Furans	7	Fruit
		Flavonoids	6	Placenta
		Jasmonate related	4	Pericarp
		Ascorbic acid related	3	Fruit
		Quinones	3	Fruit
		Indole derivatives	3	Fruit
		Tocopherols	2	Seed
		Others	113	---

### Conclusion

We demonstrated that LC-MS non-targeted based metabolomics is a powerful tool for putative identification of tissue-specific secondary metabolites. A large range of compounds were covered under similar conditions. The use of databases available gave rise to a faster comprehensive elucidation of global characteristic of complex matrix than traditional phytochemical analysis. Nutraceutical, aroma, flavored and non-reported compounds have been putatively identified and related to pericarp, placenta or seed. Complementary analysis should be carried to confirm structural and bioactivity properties.

#### References

1. Wildman, R. E. C. (2007). Hand book of Nutraceuticals and Functional Foods (2nd ed.). Boca Raton, FL: Taylor & Francis.  
 2. Aranha, B. C., Hoffmann, J. F., Barbieri, R. L., Rombaldi, C. V., & Chaves, F. C. (2017). Untargeted Metabolomic Analysis of Capsicum spp. by GC-MS. Phytochemical Analysis, (March). <https://doi.org/10.1002/pca.2692>  
 3. Allwood, J. W., & Goodacre, R. (2010). An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. Phytochemical Analysis, 21(1), 33-47. <https://doi.org/10.1002/pca.1187>

Artículo sometido a Metabolomics in Crop Research – Current and Emerging Methodologies – Frontier in Plant Science (28 de Octubre, 2017).

✓ 1. Submission      2. Independent Review      3. Interactive Review      4. Review Finalized      5. Final V

**Placenta, pericarp and seeds of Tabasco chili pepper fruits show a contrasting diversity of bioactive metabolites**

Felipe Cervantes-Hernández, Paul Alcalá-González, Octavio Martínez and José Juan Ordaz-Ortiz\*

Original Research, Front. Plant Sci. - Plant Metabolism and Chemodiversity

Submitted on: 28 Oct 2017, Edited by: Andreia Figueiredo ✉

Research Topic: [Metabolomics in Crop Research - Current and Emerging Methodologies](#)

Keywords: Capsicum annum L., Metabolomics/Metabolite Profiling, secondary metabolism, LC-MS, non-targeted ...