

10 y 11 de noviembre de 2020

CENTRO UNIVERSITARIO SANTA ANA

XLII JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA TIERRA DE BARROS

II Congreso Agroalimentario de Extremadura



**XLII JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
DE LA TIERRA DE BARROS**
II Congreso agroalimentario de Extremadura

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Colabora: Cajalmendralejo

Ilustración de portada:

© Jaime Fenollera
Viñedos en Tierra de Barros

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: Virginia Pedrero

ISBN: 978-84-7930-110-4

D.L.:

Imprime: Impresal

Influencia de la maduración del fruto sobre el contenido de compuestos bioactivos en la variedad de pimiento Naga Jolokia

VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.

GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A.V.

ESPADA-BELLIDO, E.

FERREIRO-GONZÁLEZ, M.

GARCÍA-BARROSO, C.

BARBERO, G.F.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz,
Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), IVAGRO, 11510,
Puerto Real, Cádiz, España

RESUMEN

“Naga Jolokia” (*Capsicum chinense*) es una variedad de pimiento picante nativa de la India, que ha recibido la atención de la comunidad científica mundial debido a su alta pungencia. El presente estudio evalúa la influencia de la maduración del fruto en los capsaicinoides totales e individuales, así como en el contenido de capsiato. Se empleó la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la cromatografía de ultra alta eficacia en fase inversa (rp-UHPLC-PDA). Los capsaicinoides se acumulan gradualmente en los pimientos desde el momento en que comienzan a crecer hasta alcanzar una concentración máxima

($7,99 \pm 0,11$ mg g⁻¹ de peso fresco (FW)) a los 33 días después de la anthesis (dpa). A partir de entonces, hay una fuerte disminución (96,35% de la concentración total) debido a las enzimas peroxidadas. Esta evolución tiene un comportamiento diferente con respecto a lo reportado con anterioridad para pimientos que, tras el conocimiento de esta investigación, puede atribuirse a cada genotipo de pimiento. El contenido de capsiato alcanzó su valor máximo a 19 dpa ($0,27 \pm 0,01$ mg g⁻¹ de FW), seguido de una caída gradual por la acción de las peroxidadas básicas. Dada la importante actividad biológica de los capsaicinoides y capsinoides, la información aquí descrita permite determinar el momento óptimo para cosechar los pimientos "Naga Jolokia", dependiendo de sus propiedades picantes.

Palabras claves: "Naga Jolokia"; *Capsicum chinense*; capsaicinoides; capsiato; maduración de frutos de pimiento; extracción asistida por ultrasonidos (UAE).

ABSTRACT

'Naga Jolokia' (*Capsicum chinense*) is a hot pepper variety native from India which has received the attention of world scientific community due to its high pungency. The present study evaluates the influence of fruit ripening on the total and individual capsaicinoids, as well as capsiate content. Ultrasound-assisted extraction (UAE), and reverse phase ultra-high-performance liquid chromatography (rp-UHPLC-PDA) were employed. Capsaicinoids gradually accumulate in the peppers from the moment they start growing until they reach a maximum concentration (7.99 ± 0.11 mg g⁻¹ of fresh weight (FW)) at 33 days post-anthesis (dpa). From then on, there is a sharp decrease (96.35% of the total concentration) due to the peroxidase enzymes. This evolution has a different behavior with respect to the previously reports for peppers that, after the knowledge of this research, can be attributed to each pepper genotype. Capsiate content reached its maximum value at 19 dpa (0.27 ± 0.01 mg g⁻¹ of FW), followed by a gradual drop due to the action of the basic peroxidases. Given the important biological activity of capsaicinoids and capsinoids, the information described here allows determining the optimal time to harvest the 'Naga Jolokia' peppers, depending on their pungent properties.

Keywords: 'Naga Jolokia'; *Capsicum chinense*; capsaicinoids; capsiate; ripening of pepper fruits; ultrasound-assisted extraction (UAE).

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace varias décadas, la asociación entre nutrición y salud ha ido ganando popularidad y, por lo tanto, se ha dado una importancia creciente a las dietas basadas en verduras y frutas ricas en compuesto antioxidantes. El pimiento (*Capsicum spp.*) es una de las verduras más valoradas por su rico contenido en compuestos nutraceuticos, incluidos minerales, vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico y tocoferol, componentes bioactivos que promueven la salud en la dieta humana [1]. Tradicionalmente, los frutos maduros de las diferentes variedades de pimientos se empleaban como colorantes naturales, y actualmente son ampliamente utilizados en todo el mundo como condimento culinario por su sabor, aroma y color. Se puede comercializar como producto fresco, pimiento seco triturado, oleorresina de pimentón o pasta de pimiento. Los pimientos no solo son valorados por sus atributos sensoriales, sino también porque tienen un papel significativo en las aplicaciones médicas y farmacéuticas [2]. El consumo de pimiento rojo se asocia generalmente a sensaciones picantes o ardientes. La acidez de este vegetal es causada por dos familias de compuestos químicos conocidas como capsaicinoides y capsinoides [3].

Los capsaicinoides son alcaloides no volátiles, es decir, amidas de ácidos grasos de cadena ramificada C₉-C₁₁ y vanillilamina. Los principales compuestos dentro de esta familia son la capsaicina (C) y la dihidrocapsaicina (DHC), que generalmente representan alrededor del 77-98% del contenido total en capsaicinoides. Otros compuestos como la nordihidrocapsaicina (n-DHC), la homocapsaicina (h-C) o la homodihidrocapsaicina (h-DHC), también están presentes en cantidades menores entre más de 20 compuestos registrados [4]. Estos compuestos presentan numerosas propiedades biológicas de relevancia farmacológica, como antioxidantes, antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos y anticancerígenos. Además, están relacionados con un aumento de la energía corporal y una disminución de la acumulación de grasa y colesterol, lo que conduce a una reducción de enfermedades cardiovasculares, diabetes o accidentes cerebrovasculares [5].

Uno de los aspectos negativos de estos compuestos es que las altas dosis o la exposición a largo plazo tiene un efecto perjudicial en la mucosa gástrica y, en última instancia, en la salud. A finales de la década de 1980, se identificó una familia de compuestos naturales en el cultivar de diferentes variedades de pimientos dulces CH-19 (*Capsicum annum L.*), conocidos

como capsinoides. Estos compuestos tienen una estructura química muy similar a la de los capsaicinoides, con la única diferencia de su enlace central, siendo ésteres de alcohol vainílico con cadenas de ácidos grasos similares a la de los capsaicinoides. Esta diferencia estructural podría ser la responsable de su menor estabilidad. Hasta la fecha, se han aislado tres capsinoides diferentes en los frutos de algunas variedades de pimiento (capsiato (CTO), dihidrocapsiato (DHCTO) y nordihidrocapsiato (n-DHCTO)) [6]. Los capsinoides muestran propiedades beneficiosas para la salud similares a los capsaicinoides, aunque son menos irritantes, no picantes (su acritud es aproximadamente 1000 veces menor que la de los capsaicinoides) y más sabrosos, por lo que se pueden incluir en una dieta diaria y en mayores concentraciones para aplicaciones agroalimentarias. Las diferencias en la percepción de la acritud están relacionadas con el sitio de activación del receptor vanilloide tipo 1 (TRPV1): los capsaicinoides lo activan en la lengua, mientras que los capsinoides tienen la capacidad de activarlos en el intestino con un efecto fisiológico similar [7].

Los capsaicinoides se sintetizan naturalmente en la placenta de los pimientos por condensación enzimática de la vanillilamina y cadenas de ácidos grasos de diferente longitud [8]. Los pimientos se cosechan y consumen en diferentes etapas de maduración, desde verde inmaduro hasta completamente maduro (amarillos o rojos principalmente). A lo largo de su maduración, se producen numerosos cambios bioquímicos, fisiológicos y estructurales. Estos cambios no solo tienen implicaciones agronómicas bien conocidas (sabor, color, tamaño, etc.), sino que también son relevantes para determinar la aplicabilidad y calidad de la fruta cosechada. Dependiendo de la intensidad del sabor, la forma, el tamaño, el color y la textura en sus diferentes etapas de desarrollo, se utilizan en diversas preparaciones culinarias. [1]. Por esta razón, el conocimiento sobre la acumulación de compuestos antioxidantes durante el desarrollo del fruto es esencial.

La producción y concentración de estos compuestos está influenciada por factores genéticos y ambientales, como las especies y cultivares de *Capsicum*, las condiciones de crecimiento y las técnicas de cultivo, la disponibilidad de agua, la adición de suplementos minerales al cultivo, las condiciones de luz o las altas temperaturas [2,9]. Se han llevado a cabo varios estudios para dilucidar el proceso de síntesis y acumulación de capsaicinoides durante el proceso de maduración. Se ha observado que estos compuestos comienzan a acumularse durante las primeras etapas del desarrollo del fruto hasta alcanzar una concentración máxima, que generalmente ocurre

40-60 días después de la antesis (dpa). A continuación, hay un cambio más o menos drástico en la tendencia debido a su degradación por la acción de unas enzimas específicas llamadas peroxidadas [10,11]. Bernal y col. informaron los primeros datos de la oxidación de C y DHC presentes en pimientos por una peroxidasa vegetal secretora [12]. Lema y col. demostraron que las peroxidadas básicas también son responsables de la degradación de los capsinoides en pimientos [13].

El presente estudio se ha centrado en la variedad de pimiento “Naga Jolokia” originaria de las regiones del noreste de la India y cultivada principalmente en Bangladesh y los estados indios de Assam, Nagaland y Manipur, además de en otras muchas partes del mundo como en Brasil [14]. “Naga Jolokia” ha recibido la atención de la comunidad científica mundial debido a su pungencia extremadamente alta y aroma único. En 2010 fue reconocido por el libro de los récords Guinness como el chile más picante del mundo, llegando a más de 1 millón de unidades Scoville (SHU) [5]. Se usa como especia tanto en forma fresca como seca o se come cruda junto con los alimentos básicos. Debido a su aroma refrescante, palatabilidad y propiedades medicinales, las personas lo emplean para preparar encurtidos, dar sabor al curry o como remedio popular para algunas dolencias como gastritis, artritis o problemas de indigestión crónica. También se puede utilizar para tonificar los músculos del cuerpo después de sesiones intensas de entrenamiento, y las infusiones calientes para el dolor de muelas o muscular [15].

Para la cuantificación de los compuestos de interés, se ha utilizado la extracción asistida por ultrasonidos (UAE), ya que es un método simple y económico, que mejora la eficiencia de extracción al romper las paredes celulares, reducir el tamaño de las partículas y mejorar la transferencia de masa gracias al efecto de la cavitación [3]. Se ha empleado la cromatografía líquida de ultra alta eficacia trabajando en fase inversa (rp-UHPLC) para la separación y cuantificación de los compuestos de interés.

Para minimizar los costes de producción, logrando niveles deseables de picante en los pimientos, es necesario determinar el momento óptimo para su cosecha, atendiendo a su concentración máxima de capsaicinoides y capsinoides, dando así un mayor valor agregado al producto. Por lo tanto, el objetivo final de este trabajo fue evaluar la acumulación de los capsaicinoides y capsinoides totales e individuales durante las etapas de maduración de la variedad de pimiento “Naga Jolokia” para determinar su momento óptimo de cosecha.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de “Naga Jolokia” (*Capsicum chinense*) fueron suministradas por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), ubicado en Zaragoza, España. Las semillas germinaron en placas de Petri hasta el desarrollo de los cotiledones, y luego cada plántula se colocó en una maceta Jiffi-7 (Clause-Tezeir Ibérica, Almería, España). Una vez que tuvieron tres hojas, cada maceta Jiffi-7 se trasplantó a una maceta de plástico negro, que contenía una mezcla de sustrato compuesta por arena, arcilla y tierra, enriquecida con 2 g de una solución fertilizante. Se cultivaron durante la temporada primavera-verano, bajo condiciones controladas en invernaderos climatizados y regadas mediante un sistema de riego por goteo. La floración comenzó a mediados de julio hasta finales de septiembre. El seguimiento del desarrollo del fruto se realizó marcando y fechando las flores en la antesis, para determinar su etapa de maduración. Los frutos se cosecharon y agruparon en 9 etapas de desarrollo: 12, 19, 26, 33, 40, 47, 54, 61 y 68 días después de la antesis (dpa).

El tallo y las semillas se desecharon; y el pericarpio y la placenta se molieron juntos para obtener una muestra completamente homogénea, conservándolas a -20 °C hasta su posterior análisis.

Los extractos se obtuvieron mediante UAE, empleando una sonda Sonoplus, BANDELIN ELECTRONIC (Heinrichstraße, Berlín, Alemania), que permite el control y modificación de la amplitud y el ciclo, acoplada a un baño termostático con control de temperatura 7 Liter (PolyScience, Illinois, EEUU) y sumergida en un vaso de doble pared para mantener las condiciones deseadas. Para los capsaicinoides, 1 g de muestra fresca se puso en contacto con 25 mL de metanol durante 10 minutos a 50 °C, utilizando el 80% de la potencia máxima (200 W) y un ciclo de 0,5 s. Por otro lado, para la extracción de capsinoides, se añadieron 15 mL de metanol a 0,5 g de pimiento fresco, y se extrajeron durante 2 minutos a 5,5 °C, utilizando el 80% de la potencia máxima (200 W) y un ciclo de 0,5 s. En ambos casos se empleó un método desarrollado y publicado previamente por nuestro grupo de investigación [16,17]. El proceso de extracción se realizó por triplicado para cada muestra homogénea obtenida cada día de maduración diferente.

La separación y cuantificación de los compuestos de interés se realizó mediante cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UHPLC) en un equipo Clase Acquity Ultra Performance LC (Waters Corporation, Milford, MA,

EEUU). Este equipo consta de un auto muestreador ACQUITY UPLC H-Class ajustado a 15 °C, un sistema de bomba cuaternario ACQUITY UPLC, un detector de matriz de fotodiodos ACQUITY UPLC (PDA) y una columna Waters ACQUITY UPLC BEH rp-C18 (100 mm x 2,1 mm, tamaño de partícula 1,7 µm) ajustada a 50 °C. Se empleó agua como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B, ambos acidificados con ácido acético al 0,1% y un flujo de 0,8 mL min⁻¹. El gradiente de elución empleado fue el siguiente (tiempo, %B): 0 min, 0%; 0,50 min, 45%; 1,60 min, 45%; 1,95 min, 50%; 2,45 min, 55%; 2,80 min, 63%; 3,00 min, 63%; 4,00 min, 100%; y 6,00 min, 100%. El volumen de inyección se ajustó a 3 µL y la longitud de onda para la detección ultravioleta fue de 280 nm. Para el control del equipo y la adquisición y tratamiento de los datos se empleó el software Empower 3 (Waters Corporation, Milford, MA, EEUU).

La cuantificación de los compuestos de interés se realizó a partir de las rectas de calibrado de C ($y = 1669.70x + 36.08$, $R^2 = 0.9997$), DHC ($y = 1688.31x + 29.42$, $R^2 = 0.9998$) y CTO ($y = 1682.50x - 164.74$, $R^2 = 0.9997$), que son los estándares disponibles comercialmente. La n-DHC, h-C y h-DHC tuvieron que cuantificarse en base a la recta de calibración de DHC para n-DHC y h-DHC y de C para h-C, dada las similitudes estructurales entre estas moléculas y teniendo en cuenta sus pesos moleculares. Finalmente, la significación estadística del modelo se evaluó mediante un Test de Tuckey, utilizando el programa Statgraphic Centurión Versión XVII (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, Virginia, EEUU).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evolución del contenido de capsaicinoides totales

Las plantas “Naga Jolokia” comenzaron a producir pimientos durante la segunda semana de julio y se cosecharon el 30 de septiembre. La evolución de los compuestos del fruto durante su maduración se controló a partir del día 12 después de la antesis (dpa). El estado visual de los pimientos en el momento de la cosecha se muestra en la Tabla 1.

La Figura 1 muestra que el contenido total de capsaicinoides aumenta hasta alcanzar un nivel máximo a 33 dpa, con una concentración de $7,99 \pm 0,11$ mg g⁻¹ de pimiento fresco (FW). Este valor es similar al de otras variedades

de pimiento *C. chinense*, como “Habanero” [18] o “Bhut Jolokia” [19]. A continuación, entre 33 y 40 dpa, se produce una disminución muy marcada de la concentración hasta $0,41 \pm 0,10 \text{ mg g}^{-1}$ de FW, lo que corresponde a una reducción del 96,35% del contenido total de capsaicinoides. Esta reducción tan drástica podría atribuirse a la acción de las enzimas peroxidasas básicas, que tienen la capacidad de degradar a las moléculas de capsaicina y dihidrocapsaicina [12]. Dicha degradación coincide con el cambio de color de verde a rojo que tiene lugar durante la maduración de los pimientos.

Varios autores han indicado que el mayor contenido de capsaicinoides en pimientos se produce a 40 dpa, seguido de una degradación gradual y considerablemente menor debido a la acción de las enzimas peroxidasas, que oscila entre el 30 y 65% [18,19]. Sin embargo, durante este estudio, se observó que los pimientos de la variedad “Naga Jolokia” alcanzaron su concentración máxima antes de 40 dpa (concretamente a 33 dpa), y posteriormente se produjo una caída mucho más drástica, de aproximadamente el 96%. Cabe señalar que esta fuerte disminución no se ha detectado previamente en otros cultivares de pimiento y nunca se había observado en ninguna otra variedad. Estas diferencias podrían atribuirse al genotipo, las condiciones de crecimiento o los factores ambientales.

Meghvansi y col. [5] presentaron un estudio comparando la concentración de estos compuestos en pimientos sembrados en diferentes lugares y sugirieron que el tiempo y las condiciones climáticas pueden afectar a la pungencia de los pimientos “Naga Jolokia”. Sin embargo, Olguín-Rojas y col. emplearon condiciones de crecimiento similares en otras variedades de pimientos cultivadas simultáneamente y no observaron ninguna reducción brusca en la cantidad total de capsaicinoides [21]. Esto puede sugerir que los cambios en el contenido de dichos compuestos bioactivos podrían atribuirse a cada genotipo de pimiento. Como puede observarse en la Figura 1, después de esta caída tan drástica, se produce un nuevo aumento en la concentración de capsaicinoides hasta los 47 dpa. A partir de este momento, la concentración disminuye ligeramente y luego permanece prácticamente constante hasta el final del proceso de maduración. Los días posteriores no se trataron debido a la maduración excesiva observada en el fruto, que provocó la pérdida de agua y el consiguiente arrugamiento, entre otros cambios.

Evolución del contenido de capsaicinoides individuales

Los cinco capsaicinoides identificados en la variedad “Naga Jolokia” fueron n-DHC, C, DHC, h-C y h-DHC, observándose sus concentraciones durante la maduración del fruto en la Figura 2.

Se puede ver que la C fue el principal capsaicinoide durante todo el proceso, seguido de la DHC, n-DHC, h-C y finalmente h-DHC. Esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios similares de *C. chinense*, donde la C es el capsaicinoide mayormente responsable de la elevada pungencia del fruto, seguido de la DHC [11,18].

La evolución de cada capsaicinoide individual fue similar a la de los capsaicinoides totales. De esta manera, los cinco capsaicinoides individuales aumentaron su concentración hasta alcanzar el máximo a 33 dpa, seguido de la característica caída drástica hasta los 40 dpa. Como se explicó anteriormente, hubo un nuevo aumento de la concentración hasta 47 dpa, y luego una disminución gradual de los capsaicinoides individuales entre 47 y 61 dpa.

La Figura 3 muestra los porcentajes relativos de los cinco capsaicinoides principales durante el proceso de maduración. Se puede observar que los incrementos en el porcentaje de C corresponden a disminuciones en el porcentaje de DHC, y viceversa. Además, se puede ver que la capsaicina aumenta ligeramente su concentración durante el desarrollo del fruto, mientras que la dihidrocapsaicina disminuye levemente. Estos dos capsaicinoides principales representan entre el 93 y 96% del contenido total. Los tres capsaicinoides minoritarios (n-DHC, h-C y h-DHC) tuvieron un comportamiento semejante, ya que estaban presentes en porcentajes similares, que oscilaban entre el 0 y 3% para cada uno de ellos, variando también según la madurez del fruto.

Evolución de los valores estandarizados de capsaicinoides

La evolución estandarizada de los principales capsaicinoides de la variedad “Naga Jolokia” se puede observar en la Tabla 2. Se trata de valores normalizados con respecto al día de mayor concentración de cada compuesto, es decir, todos ellos se refieren al 100% de su máximo contenido, que coincide a los 33 dpa. Se observó que la evolución del porcentaje relativo a lo largo de la maduración sigue la misma tendencia explicada anteriormente.

Es de destacar que todos los capsaicinoides siguen el mismo patrón durante la maduración, aunque esto no ocurre en otros cultivares de pimiento reportados en la bibliografía. Por ejemplo, en la variedad Cayena, n-DHC, DHC, h-C y h-DHC siguieron el mismo patrón, mientras que C presentó un comportamiento diferente, alcanzando su máximo porcentaje relativo mucho antes que los otros [20]. En el caso de la variedad Peter Pepper, C, h-DHC y DHC mostraron el mismo patrón lineal, mientras que h-C y n-DHC presentaron una tendencia diferente [10].

En este sentido, es necesario controlar cada detalle de las condiciones de cultivo, así como el resto de factores ambientales, ya que pueden influir considerablemente en la composición del producto final [9]. Si estos parámetros están perfectamente controlados y descritos, los resultados deberían ser reproducibles y comparables con los obtenidos por otros investigadores.

Evolución del contenido de capsiato

La Figura 4 muestra la evolución del contenido de capsiato durante el desarrollo del fruto. La acumulación de capsiato alcanza su valor máximo a los 19 dpa. Posteriormente, su contenido disminuye significativamente, correspondiendo aproximadamente al 70% del máximo. Dicha reducción podría estar asociada a una disminución de la expresión de los genes estructurales biosintéticos de los capsinoides o, alternativamente, a las actividades de diferentes enzimas peroxidadas, como se describe para los capsaicinoides. Las peroxidadas básicas se encuentran en las paredes celulares y las vacuolas, que es lugar hipotético para la acumulación de capsiato. El uso de diferentes inhibidores permitió confirmar la naturaleza de estas peroxidadas básicas de *C. annuum* como las responsables de la oxidación del capsiato [13]. En los días posteriores, el contenido de capsiato permaneció prácticamente constante. Se han observado tendencias similares en la acumulación de capsinoides durante la maduración del fruto en varios cultivares de *Capsicum* de diferentes niveles de pungencia [22,23]. En este caso, para obtener un alto nivel de capsinoides, las frutas verdes maduras deben recolectarse aproximadamente a 19 dpa, cuando el contenido de capsiato alcanza su nivel máximo.

4. CONCLUSIONES

La evolución de los capsaicinoides presentes en la variedad de pimientos “Naga Jolokia” durante la maduración del fruto difiere con respecto a otros cultivares de *Capsicum* reportados previamente en la bibliografía. La capsaicina fue el principal capsaicinoide y su proporción con respecto al resto de capsaicinoides individuales no varió con el estado de madurez del fruto. Una vez que los capsaicinoides alcanzaron su concentración máxima a los 33 dpa, ésta se redujo drásticamente (en un 96,35%). Tal disminución está algo avanzada con respecto a lo que está descrito en la bibliografía y, tras una comparación con otras variedades cultivadas simultáneamente en similares condiciones de crecimiento, se puede sugerir que los cambios en el contenido podrían atribuirse a los factores genéticos propios de esta variedad. Se ha demostrado que un estudio de maduración es esencial para determinar el momento óptimo de recolección (cuando su contenido en compuestos bioactivos esté en su valor máximo debido a sus excelentes propiedades biológicas antes mencionadas), debido a los cambios drásticos observados en los compuestos de interés durante dicho proceso. Esto es de gran relevancia ya que uno de los atributos más buscados en los pimientos y, particularmente en la variedad “Naga Jolokia”, es su contenido en compuestos pungentes que le confieren su alto carácter picante. En base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, el momento óptimo sería a los 33 dpa. Además, la cosecha se debe realizar antes de que las etapas de sobre maduración de la fruta se hayan alcanzado visiblemente. Con respecto al contenido de capsaiato, el máximo se alcanza en las primeras semanas de maduración, después de lo cual se observa una caída moderada en su concentración.

Agradecimientos: Proyecto RTA2015-00042-C02-01, financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España por el contrato predoctoral FPU17-02962.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] CHIAIESE, P.; CORRADO, G.; MINUTOLO, M.; BARONE, A.; ERRICO, A., "Transcriptional regulation of ascorbic acid during fruit ripening in pepper (*Capsicum annuum*) varieties with low and high antioxidants content", *Plants*, 8, 2019, 206.
- [2] GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G., "Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination", *Food Chemistry*, 140, 2013, 794-802.
- [3] BAIÃO DIAS, A.L.; ARROIO SERGIO, C.S.; SANTOS, P.; BARBERO, G.F.; REZENDE, C.A.; MARTÍNEZ, J., "Effect of ultrasound on the supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*)", *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 2016, 284-294.
- [4] BARBERO, G.F.; LIAZID, A.; AZAROUAL, L.; PALMA, M.; BARROSO, C.G., "Capsaicinoid contents in peppers and pepper-related spicy foods", *International Journal of Food Properties*, 19 (3), 2016, 485-493.
- [5] MEGHVANSI, M.K.; SIDDIQUI, S.; HANEEF KHAN, Md.; GUPTA, V.K.; VAIRALE, M.G.; GOGOI, H.K.; SINGH, L., "Naga chilli: A potential source of capsaicinoids with broad-spectrum ethnopharmacological applications", *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 2010, 1-14.
- [6] SUTOH, K.; KOBATA, K.; YAZAWA, S.; WATANABE, T., "Capsinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annuum* L. cv. CH-19 sweet", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (6), 2006, 1513-1516.
- [7] SWINT, J.M.; BEINING, K.M.; BRYANT, J.A.; TUCKER, R.M.; LUDY, M.J., "Comparison of capsaicin and capsiate's effects at a meal", *Chemosenory Perception*, 8, 2015, 174-182.
- [8] AMINUL ISLAM, Md.; SUNDAR SHARMA, S.; SINHA, P.; SINGH NEGI, M.; NEOG, B.; BHUSHAN TRIPATHI, S., "Variability in capsaicinoid content in different landraces of *Capsicum* cultivated in north-eastern India", *Scientia Horticulturae*, 183, 2015, 66-71.
- [9] HARVELL, K.P.; BOSLAND, P.W., "The environment produces a significant effect on pungency of chiles", *HortScience*, 32, 1997, 1292.

- [10] BARBERO, G.F.; De AGUIAR, A.C.; CARRERA, C.; OLACHEA, A.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; MARTÍNEZ, J.; PALMA, M.; BARROSO, C.G., "Evolution of capsaicinoids in Peter pepper (*Capsicum annuum* var. *annuum*) during fruit ripening", *Chemistry & Biodiversity*, 13, 2016, 1068-1075.
- [11] FAYOS, O.; De AGUIAR, A.C.; JIMÉNEZ-CANTIZANO, A.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; GARCÉS-CLAVER, A.; MARTÍNEZ, J.; MALLOR, C.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G.; BARBERO, G.F., "Ontogenetic variation of individual and total capsaicinoids in Malagueta peppers (*Capsicum frutescens*) during fruit maturation", *Molecules*, 22, 2017, 736.
- [12] BERNAL, M.A.; CALDERÓN, A.A.; PEDREÑO, M.A.; MUÑOZ, R.; ROS BARCELÓ, A.; MERINO DE CÁCERES, F., "Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (Var. *Annuum*) fruits", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1993, 1041-1044.
- [13] LEMA, A.; MARTÍNEZ, T.; GARCÉS, A.; FAYOS, O.; POMAR, F.; GONZÁLEZ, S.; SILVAR, C.; MALLOR, C.; BARBERO, G.F., "Study of the oxidation of capsaicinoids by basic peroxidases from pepper", *XIV Spanish-Portuguese Congress of Plant Physiology*, SEFV, Toledo, Spain, 2015. ISBN: 978-84-606-8883-9.
- [14] MOIRANGTHEM, S.S.; GOGOI, S.; THONGBAM, P.D.; RAMYA, K.T.; FIYAZ, R.A.; PANDEY, D.S., "Effect of sowing time and crop geometry on the capsaicinoid content in Bhoot Jolokia (*Capsicum chinense* Jacq.)", *Journal of Science & Technology*, 51, 2014, 1974-1981.
- [15] PURKAYASTHA, J.; ALAM, S.I.; GOGOI, H.K.; SINGH, L.; VEER, V., "Molecular characterization of 'Bhut Jolokia' the hottest chilli", *Journal of Biosciences*, 37 (4), 2012, 757-768.
- [16] BARBERO, G.F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G., "Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers", *Talanta*, 75, 2008, 1332-1337.
- [17] VÁZQUEZ-ESPINOSA, M.; GONZÁLEZ-De-PEREDO, A.V.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; BARROSO, C.G.; PALMA, M.; BARBERO, G.F.; ESPADA-BELLIDO, E., "Optimizing and comparing ultrasound- and microwave-assisted extraction methods applied to the extraction of antioxidant capsinoids in peppers", *Agronomy*, 9, 2019, 633.

- [18] MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; BONESI, M.; LOIZZO, M.R.; CONFORTI, F.; STATI, G.; De CINDIO, B.; HOUGHTON, P.J.; MENICHINI, F., "The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. Cv Habanero", *Food Chemistry*, 114, 2009, 553-560.
- [19] BOSLAND, P.W.; BARAL, J.B., "'Bhut Jolokia' - The world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid", *HortScience*, 42 (2), 2007, 222-224.
- [20] BARBERO, G.F.; RUIZ, A.G.; LIAZID, A.; PALMA, M.; VERA, J.C.; BARROSO, C.G., "Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (*Capsicum annuum* L.)", *Food Chemistry*, 153, 2014, 200-206.
- [21] OLGUÍN-ROJAS, J.A.; FAYOS, O.; VÁZQUEZ-LEÓN, L.A.; FERREIRO-GONZÁLEZ, M.; RODRÍGUEZ-JIMENES, G.C.; PALMA, M.; GARCÉS-CLAVER, A.; BARBERO, G.F., "Progression of the total and individual capsaicinoids content in the fruits of three different cultivars of *Capsicum chinense* Jacq.", *Agronomy*, 9, 2019, 141.
- [22] JANG, S.; HAN, K.; DEUK JO, Y.; HEE-JIN, J.; IRFAN SIDDIQUE, M.; BYOUNG-CHEORT, K., "Substitution of a dysfunctional pAMT allele results in low-pungency but high levels of capsinoid in *Capsicum chinense* 'Habanero'", *Plant Breeding and Biotechnology*, 3 (2), 2015, 119-128.
- [23] JARRET, R.L., "509-45-1, a *Capsicum annuum* pepper germplasm containing high concentrations of capsinoids", *HortScience*, 49 (1), 2014, 107-108.

FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Evolución de la concentración de capsaicinoides totales (mg g^{-1} FW) durante la maduración de los frutos de pimiento “Naga Jolokia” ($n = 3$). De acuerdo con el test de Tuckey, los resultados con un p -valor inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente diferentes. Teniendo esto en cuenta, el uso de diferentes letras indica la existencia de una diferencia significativa entre dichos resultados.

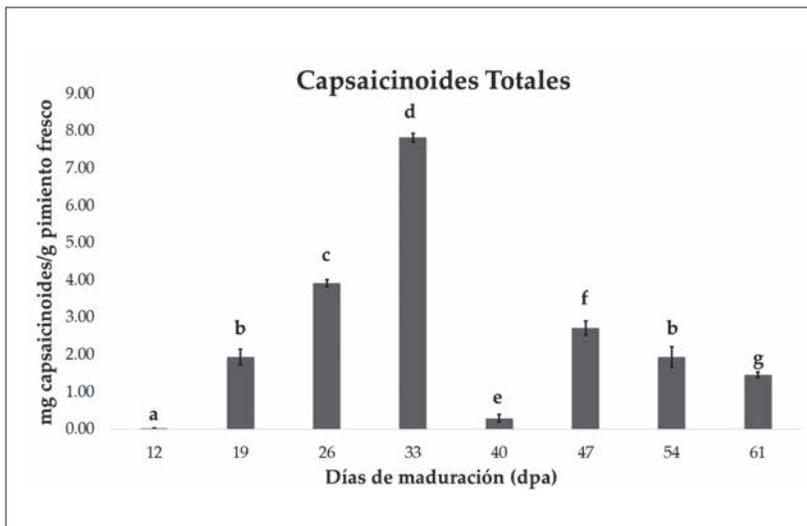


Figura 2: Evolución de la concentración de capsaicinoides individuales (mg g^{-1} FW) durante la maduración de los frutos de pimiento “Naga Jolokia” ($n = 3$). De acuerdo con el test de Tuckey, los resultados con un p -valor inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente diferentes. Teniendo esto en cuenta, el uso de diferentes letras indica la existencia de una diferencia significativa entre dichos resultados. Solo se indicaron estas diferencias en los dos compuestos mayoritarios para una mejor visualización.

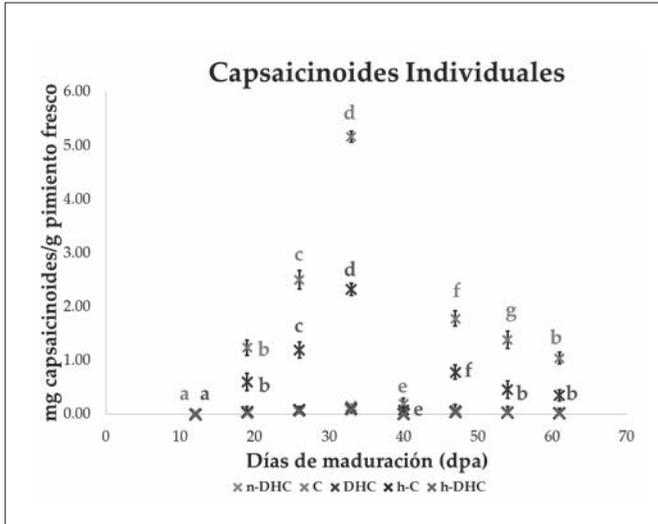


Figura 3: Evolución del porcentaje de capsaicinoides individuales durante la maduración de los frutos de pimiento “Naga Jolokia” ($n = 3$). De acuerdo con el test de Tuckey, los resultados con un p -valor inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente diferentes. Teniendo esto en cuenta, el uso de diferentes letras indica la existencia de una diferencia significativa entre dichos resultados. Solo se indicaron estas diferencias en los dos compuestos mayoritarios para una mejor visualización.

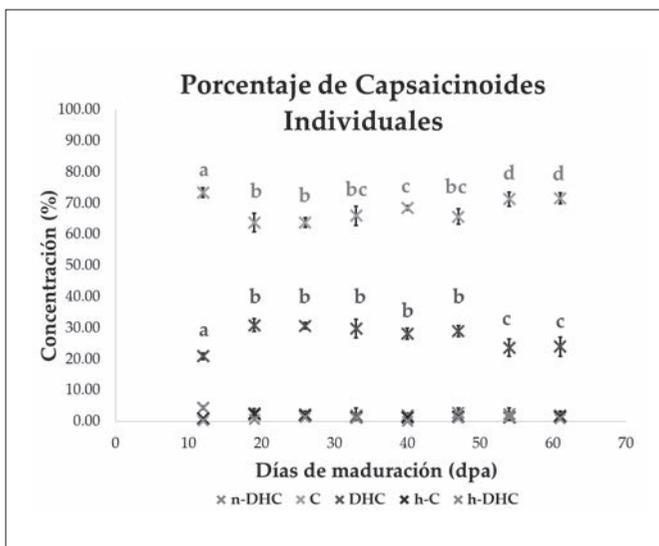


Figura 4: Evolución de la concentración de capsiato (mg g^{-1} FW) durante la maduración de los frutos de pimiento “Naga Jolokia” ($n = 3$). De acuerdo con el test de Tuckey, los resultados con un p -valor inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente diferentes. Teniendo esto en cuenta, el uso de diferentes letras indica la existencia de una diferencia significativa entre dichos resultados.

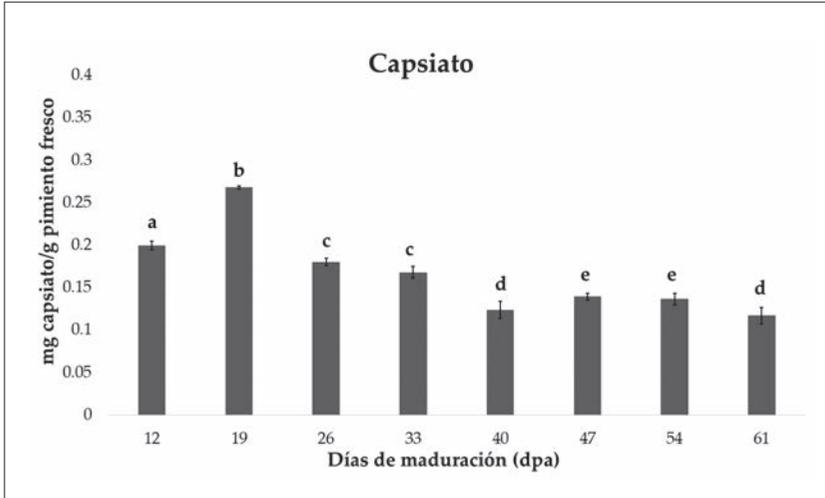


Tabla 1: Código y estado visual de los frutos de pimiento “Naga Jolokia” en los diferentes estados de desarrollo (días después de la antesis, dpa).

CÓDIGO	GERMINACIÓN DE LA FRUTA	Dpa	ESTADO VISUAL
M-1	18/09	12	Color verde
M-2	11/09	19	Color verde
M-3	04/09	26	Color verde
M-4	28/08	33	Color verde
M-5	21/08	40	Color amarillo
M-6	14/08	47	Color naranja
M-7	07/08	54	Color rojo
M-8	31/07	61	Color rojo
M-9	24/07	68	Color rojo / sobremaduración

Tabla 2: Porcentaje relativo (%) de los capsaicinoides individuales durante la maduración de los frutos de pimiento “Naga Jolokia” ($n = 3$).

Dpa	n-DHC	C	DHC	h-C	h-DHC
12	1.03	0.48	0.31	0.29	0.12
19	27.59	24.04	25.83	46.03	16.88
26	62.01	48.44	51.38	71.82	59.82
33	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
40	3.65	3.90	3.56	3.83	0.00
47	50.96	34.55	33.71	37.83	37.97
54	30.34	26.89	19.79	25.32	31.55
61	19.46	20.25	15.02	20.22	16.92