

LA BIOSÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES, EL PRINCIPIO PICANTE DEL CHILE

BIOSYNTHESIS OF CAPSAICINOIDS, THE PUNGENT PRINCIPLE OF PEPPERS

Felipe Vázquez-Flota*, María de Lourdes Miranda-Ham, Miriam Monforte-González, Guadalupe Gutiérrez-Carbajal, Cinthya Velázquez-García y Yuriana Nieto-Pelayo

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Calle 43 No. 130, Chuburná, 97200, Mérida, Yucatán, México.

*Autor para correspondencia (felipe@cicy.mx)

RESUMEN

El típico sabor picante de los frutos de chile del género *Capsicum*, se debe a la presencia de un grupo de compuestos conocidos como capsaicinoides que se sintetizan y acumulan en el tejido placentario. Los capsaicinoides son amidas formadas por la unión de la vainillilamina con un ácido graso y aunque se conocen alrededor de 20 de estos compuestos, la capsaicina [(E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonanamida] y su análogo 6,7-dihidro, la dihidrocapsaicina, en conjunto llegan a representar más de 90 % del total de los capsaicinoides presentes en los frutos. Se presenta una revisión de la ruta de síntesis de los capsaicinoides y se analizan las bases genética y bioquímica del picor, una característica única del género *Capsicum*.

Palabras clave: *Capsicum*, biosíntesis, capsaicinoides, picor.

SUMMARY

The typical pungent or hot flavor of *Capsicum* fruits, commonly known as chili peppers, results from their unique ability to produce capsaicinoids, a group of around 20 amides formed from the condensation of vanillylamine (a phenolic compound) with a fatty acid. The main capsaicinoids are capsaicin [(E)-N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methyl-6-nonanamide] and its 6,7-dihydro derivative, dihydrocapsaicin. This article presents a review of the biosynthetic pathway of these compounds and analyzes the genetic and biochemical basis of pungency, an exclusive property of *Capsicum*.

Index words: *Capsicum*, biosynthesis, capsaicinoids, pungency.

INTRODUCCIÓN

Se conocen como chiles los frutos de las plantas del género *Capsicum*. Este género, originario de la región andina, comprende cerca de 27 especies, cinco de las cuales han sido domesticadas: *C. annuum* (L), *C. baccatum* (L), *C. chinense* (Jacq), *C. frutescens* (L) y *C. pubescens* (R & P). Se ha propuesto que estas especies, con sus más de 2000 cultivares, se derivaron a partir de entre tres y cinco especies silvestres (Andrews, 1995). El consumo del chile se debe principalmente a su sabor picante, causado por la

presencia de capsaicinoides (CAP's), un grupo de amidas ácidas derivadas de la vainillilamina, que se sintetizan y acumulan en el tejido de la placenta. Las diferentes especies de *Capsicum* pueden variar en grado de picor, lo que se relaciona con su capacidad de acumular CAP's. El chile habanero (*C. chinense*) es considerado el de mayor picor; sin embargo, algunas variedades de *C. annuum* pueden alcanzar niveles similares, en función de las condiciones en que se cultiven (Cázares-Sánchez *et al.*, 2005).

Debido a su localización en el tejido de la placenta, se supone que los CAP's tienen un papel en la protección química de las semillas (García-Galindo *et al.*, 1995). No obstante, las aves son insensibles a los CAP's, lo que ha permitido la dispersión de las semillas silvestres (Tewksbury *et al.*, 2006). Independientemente de su función en la naturaleza, los CAP's tienen diversas aplicaciones en diferentes industrias, como la de los alimentos o en la elaboración de pinturas, y la capsaicina con 98 % de pureza alcanza valores cercanos a 3000 dólares (García-Galindo *et al.*, 1995).

Metabolismo de los capsaicinoides

Se conocen más de 20 diferentes CAP's cuya estructura química consiste en un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso. La porción fenólica es la vainillilamina, que se forma a partir de la fenilalanina por medio de la ruta de los fenilpropanoides. El ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina. Las diferencias estructurales de los diversos CAP's residen precisamente en la naturaleza de la cadena lateral, que puede ser de 9 u 11 carbonos de largo, con un número variable de enlaces dobles colocados en diferentes posiciones (Figura 1). La capsaicina [(E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonanamida] y la

dihidrocapsaicina (su análogo 6,7-dihidro) representan más de 90 % del contenido total de los CAP's presentes en los chiles. No es claro si las diferencias en los CAP's se deben

a modificaciones que sufre la cadena de ácido graso antes o después de su unión con la vainillilamina.

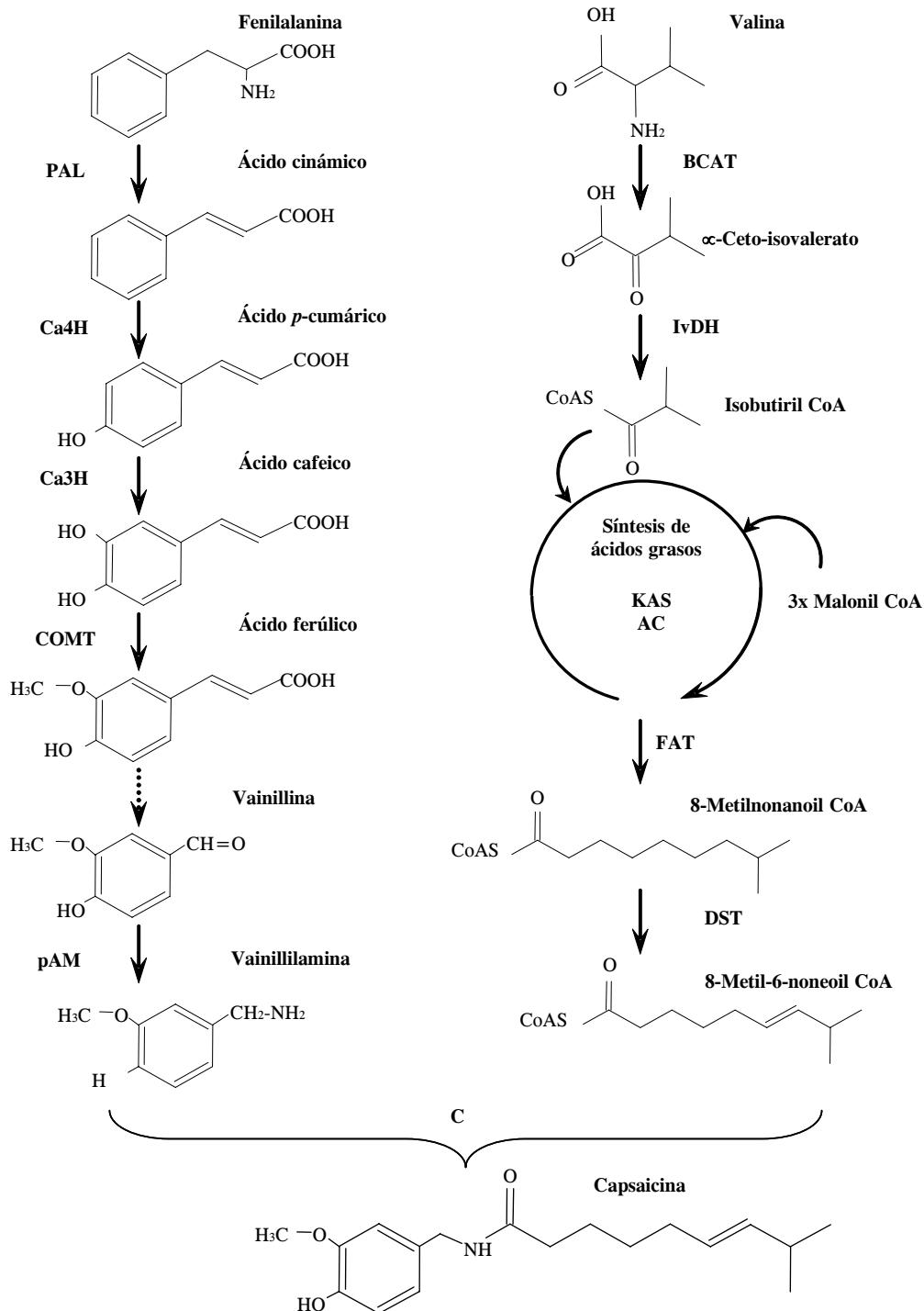


Figura 1. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género *Capsicum*. PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H cumarato 3 hidroxilasa; COMT, ácido cafeíco *O*-metiltransferasa; pAMT, presunta aminotransferasa de la vainillina; BCAT, aminotransferasa de los aminoácidos ramificados, IvDH α cetovalerato deshidrogenasa; Kas β -cetoacil sintasa; ACL, proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST, desaturasa; CS capsaicinoide sintasa. La flecha punteada representa a reacciones por caracterizar.

La vainillilamina se forma mediante conversiones sucesivas de la fenilalanina en los ácidos *trans*-cinámico, cumaríco, cafeico y ferúlico, por acción de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H), cumarato 3-hidroxilasa (Ca3H) y ácido cafeico metiltransferasa (COMT). La vainillina es un intermedio tardío que es aminado por acción de una transaminasa, para dar lugar a la vainillilamina la cual, por acción de una aciltransferasa llamada capsaicinoide sintasa (CS), se condensa con el derivado acil-graso para dar lugar a los CAP's. Se ha propuesto que el ácido graso se puede formar a partir de la leucina o la valina (García-Galindo *et al.*, 1995). La Figura 1 despliega la ruta propuesta para la síntesis de los CAP's, que una vez formados se almacenan en vesículas derivadas de las células epidermales de la placenta (Zamski *et al.*, 1987).

Formación de la vainillilamina, la porción fenólica de los CAP's. La primera enzima que dirige carbono del metabolismo primario a la síntesis de CAP's es la PAL. Esta enzima está codificada por una familia multigénica en diversas especies, con una regulación diferencial por condiciones ambientales, de desarrollo, o a través de los diferentes tejidos. Debido a la posición que ocupa en esta ruta de síntesis, PAL representa un blanco biotecnológico potencial para promover la biosíntesis de los CAP's (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001). En *C. chinense* esta enzima está codificada por una familia génica de entre tres y cuatro miembros que, en la placenta, se expresa principalmente en las etapas previas a la maduración del fruto. Al igual que PAL, Ca4H y COMT forman familias génicas que también se expresan principalmente en el tejido de placenta antes de la maduración del fruto. De hecho, los niveles de expresión de los transcriptos para estas tres enzimas se correlacionan positivamente con el nivel de picor en diferentes genotipos. No obstante, prácticamente no existe información sobre las características de la expresión de estas enzimas en un mismo genotipo expuesto a las diferentes condiciones que alteran el contenido de CAP's. A partir de una genoteca sustractiva, construida de ARN de placentas de *C. chinense*, se ha logrado aislar un ADNc con una alta homología a las aminotransferasas, denominada pAMT, que se propone podría participar en la aminación de vainillina para formar vainillilamina. La identidad de esta presunta aminotransferasa no se ha confirmado, pero sigue un patrón de expresión transcripcional específico para el tejido de placenta, similar al de otros genes involucrados en la síntesis de CAP's, lo que da apoyo a su posible intervención (Curry *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2006).

Formación de la cadena lateral de ácido graso. La síntesis de CAP's requiere de una cadena lateral acilo que se forma a partir de la valina o leucina. El primer paso involucra la desaminación de estos aminoácidos por acción

de una aminotransferasa específica (BCAT, acrónico del inglés para BranChed aminoacid AminoTransferase), para producir β -cetoisovalerato que posteriormente se transforma en isobutiril-CoA, con la participación de la isovalerato deshidrogenasa (IvDH). El ADNc correspondiente a una presunta BCAT ya ha sido aislado de chile habanero (Blum *et al.*, 2003). El isobutiril-CoA formado se convierte en el 8-metil-6-nonenoil-CoA mediante la participación del complejo multienzimático de la ácido graso sintasa (FAS, por su acrónico en inglés; Fatty Acid Synthase), que consiste de tres componentes: una β -ceto acil sintasa (KAS), una proteína acarreadora de grupos acilo (ACL) y una tioesterasa (FAT). Las reacciones catalizadas por este complejo involucran la condensación del isobutiril-CoA con grupos malonilo, catalizada por el componente KAS. El componente ACL es el encargado de transportar los grupos malonilo al isobutiril-CoA, y se pierde una molécula de CO₂ en cada ciclo de elongación. Después de tres ciclos sucesivos de elongación, el ácido graso final es liberado por acción de la tioesterasa. Los tres componentes de este complejo (KAS, ACL y FAT) han sido aislados de la genoteca referida (Curry *et al.*, 1999; Aluru *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 2003). Tanto ACL como FAT resultaron genes unicopia en *C. chinense* y en *C. annuum*, mientras que KAS está codificado por una familia de ocho miembros, dos de los cuales son específicos para placenta. Aunque solamente la identidad del ADNc para la KAS ha sido confirmada, todos los componentes del complejo FAS desplegaron un patrón de expresión transcripcional similar al de las enzimas involucradas en la formación de la vainillilamina, lo que sugiere su participación en la síntesis de los CAP's (Aluru *et al.*, 2003).

Formación de los CAP's por acción de la capsaicinoide sintasa. La reacción final en la síntesis de CAP's es la condensación de la vainillilamina con la cadena lateral acilo catalizada por una aciltransferasa denominada capsaicinoide sintasa (CS). La actividad de esta enzima está relacionada directamente con el grado de picor de diferentes chiles, aunque puede llegar a detectarse aún en extractos proteicos obtenidos de chiles no picantes (Sutoh *et al.*, 2006).

Mediante una estrategia de clonación de enzima a gen, se logró el aislamiento de una secuencia denominada *csy1*, que corresponde a la CS (Prasad *et al.*, 2006b). La enzima fue purificada a homogeneidad electroforética a partir de placentas de *C. frutescens* y, después de haber obtenido información acerca de la secuencia del extremo N-terminal, se logró el aislamiento del ADNc correspondiente. La expresión heteróloga en bacterias del ADNc correspondiente a *csy1* ha dejado claro que su producto corresponde a la actividad de CS y que la enzima despliega una elevada especificidad por sus sustratos (vainillilamina y

ácido 8-metilnonenoico). Además, su patrón de expresión corresponde al nivel de picor de distintos cultivares, así como con las etapas de máxima acumulación de CAP's (Prasad *et al.*, 2006b).

Catabolismo de los CAP's. Tanto en *C. annuum* como en *C. chinense*, la degradación de los capsaicinoides se produce mediante la participación de peroxidásas, cuya actividad aumenta al disminuir el contenido de CAP's, lo que normalmente ocurre al término del proceso de maduración del fruto (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). Estas peroxidásas, principalmente del tipo básico, están localizadas en la vacuola de las células placentarias, al igual que los CAP's (Bernal *et al.*, 1993).

Localización de las enzimas de la síntesis de CAP's. Las enzimas requeridas para la formación de los CAP's se encuentran en el tejido placentario de frutos inmaduros (Lindsey y Yeoman, 1984). El componente KAS del complejo FAS también se localiza en la placenta, específicamente en las células epiteliales (Aluru *et al.*, 2003), al igual que *csy1* (Prasad *et al.*, 2006b) y *Pun1* (Stewart Jr *et al.*, 2007). Los CAP's son acumulados con pequeñas vesículas o ampollas en las vacuolas de estas células epiteliales (Stewart Jr *et al.*, 2007; Zamski *et al.*, 1987).

Regulación genética de la síntesis de CAP's

Desde principios del siglo pasado se estableció que el picor era una característica dominante simple, asociada con el locus *C* (Andrews, 1995). Basados en un mapa genético del cromosoma 2 de *C. annuum*, en el que se encuentra el locus *C*, y mediante un análisis de secuencias cortas de expresión (EST's) propias de placenta de variedades picosas de chile, el producto de *C* fue identificado y aislado, y se propuso cambiar la nomenclatura para este locus a *Pun1* (Stewart Jr *et al.*, 2005). El producto de *Pun1*, denominado AT3, corresponde a una presunta aciltransferasa específica para la placenta de los genotipos picosos de *C. annuum* y de *C. chinense*, y cuya mayor expresión coincide con acumulación de CAP's. El alelo *Pun1* tiene un comportamiento dominante simple que determina la ocurrencia del fenotipo picoso (Blum *et al.*, 2002; Blum *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005; Stewart Jr *et al.*, 2005). El alelo recesivo (*pun1*) ocupa el locus equivalente en los genotipos dulces o no picosos y carece de un fragmento de 2.5 kb próximo al extremo 5' que abarca una porción del promotor y del primer exón. Los genotipos no picosos de *C. annuum* son homocigóticos para el alelo recesivo de *pun1* (*pun1/pun1*) y la crusa de genotipos homocigóticos picosos (*Pun1/Pun1*) con no picosos resulta en una progenie híbrida picosa (*Pun1/pun1*) (Stewart Jr *et al.*, 2005). La homología de AT3, el producto de *Pun1*, con las aciltransferasas, así como el hecho de que el alelo recesivo no

podría producir una proteína funcional, se tomaron como evidencias de que éste podría corresponder a la CS (Lee *et al.*, 2005; Stewart Jr *et al.*, 2005). Sin embargo, con el aislamiento de *csy1* (Prasad *et al.*, 2006b), cuya secuencia es diferente a AT3, se estableció que *Pun1* no codificaba para esta enzima. Recientemente, se estableció que el producto de *Pun1* no está relacionado directamente con el proceso de formación de los CAP's sino con el desarrollo de las vesículas en las que se acumulan, ya que su expresión antecede a la aparición de estas estructuras y a la acumulación de CAP's. La formación de estas vesículas es indispensable para la ocurrencia del fenotipo picoso (Stewart Jr *et al.*, 2007).

Aunque el picor se hereda como un carácter dominante, sus niveles pueden mostrar una variación cuantitativa importante en una población híbrida, derivada de la crusa de genotipos contrastantes. Las variaciones en el grado de picor evidentemente resultan de diferentes contenidos de CAP's. Mediante el cruce de un genotipo no picoso de *C. annuum* con uno picoso de *C. frutescens* se logró identificar un QTL (esto es, un locus asociado a estas variaciones cuantitativas), denominado *cap*. Este QTL justifica alrededor de 30 % de la variación en el contenido de los CAP's observado en la población. No obstante, la localización física de *cap* no correspondió con la de ninguna de los genes estructurales de la síntesis de CAP's ya mapeados, ni con la de *Pun1* (Blum *et al.*, 2003; Stewart Jr *et al.*, 2005). Por otra parte, la secuencia de *cap* no corresponde a la de *csy1* (Prasad *et al.*, 2006b). Además, la ubicación de dos presuntos factores transcripcionales posiblemente asociados con la síntesis de CAP's tampoco coincidió con la de *cap* (Blum *et al.*, 2003).

De esta manera, las variaciones observadas en el contenido de los CAP's se podrían explicar como resultado de las diferencias en el flujo de intermediarios a lo largo de la ruta de síntesis, derivadas a su vez de diferencias en los niveles de expresión de los genes involucrados. Debido a la falta de correlación física entre *cap* y los genes involucrados en la síntesis de CAP's se ha postulado que éste podría estar involucrado en el control de la disponibilidad o flujo de los intermediarios biosintéticos, ya sea para la formación de CAP's o de alguno otro metabolito derivado de la ruta de los fenilpropanoides que compita con intermediarios comunes (Blum *et al.*, 2003). Recientemente, se han identificado tres nuevos QTL's, denominados *cap4.1*, *cap7.1* y *cap7.2*, uno de los cuales corresponde al gen para la BCAT (*cap4.1*). No obstante, éste solamente puede explicar una variación menor de 30 % en el contenido de capsaicina, pero no del total de CAP's (Ben Chaim *et al.*, 2006). Cualquiera que sea la función de estos QTL's, es evidente que el picor no depende únicamente del componente genético.

Regulación de la acumulación de CAP's por factores ambientales y por desarrollo

Los factores ambientales tienen un efecto importante sobre la acumulación de los CAP's. En una población dihaploide de *C. annuum* se presentaron variaciones de hasta ocho veces en el contenido de CAP's cuando fueron cultivados simultáneamente en condiciones ambientales diferentes (Harvell y Bosland, 1997). Uno de los factores ambientales que mayor efecto tiene sobre el picor es la limitación de agua, aunque este efecto puede no ser el mismo en diferentes genotipos. Por ejemplo, el mismo tratamiento de sequía aplicado a las variedades 'Beauty Zest' y 'Home Flavor' de *C. annuum* dio lugar a un aumento en el contenido de CAP's, mientras que no tuvo ningún efecto en la variedad 'Hungarian'. El aumento en el contenido de CAP's coincidió con mayores actividades enzimáticas de PAL, Ca4H y CS, mientras que la actividad de las peroxidases del fruto permanecieron constantes, lo que sugiere que estas condiciones produjeron una mayor capacidad de síntesis de CAP's, sin modificar su catabolismo (Sung *et al.*, 2005).

Es importante recalcar que muchos de los productos finales de la ruta de los fenilpropanoides, que es la que da origen a los intermediarios biosintéticos de los CAP's, se acumulan en respuesta a diferentes condiciones ambientales adversas. Estos productos, como el ácido clorogénico, las cumarinas y las ligninas, se forman a partir de los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico, todos ellos intermediarios tempranos en la síntesis de CAP's (Figura 1) (Dixon y Paiva, 1995).

El estado nutricional de la planta también tiene un efecto en la acumulación de los CAP's. En *C. annuum 'Jalapeño'* se ha encontrado que la dosis de nitrógeno aplicado como fertilizante tiene valor óptimo para la máxima acumulación de CAP's, y dosis mayores pueden ocasionar su disminución (Johnson y Decoteau, 1996). No obstante, no hay reportes de la posible relación entre estos efectos y la acumulación de fenilalanina y valina. El efecto del potasio es contradictorio, ya que en algunos trabajos con chile 'Jalapeño' la aplicación de fertilizantes con este mineral tiene efectos positivos, mientras que en otros trabajos con la misma variedad no tuvo efecto alguno (Johnson y Decoteau, 1996). Las heridas en el fruto pueden reducir su picor, probablemente porque el contacto de los CAP's con oxígeno promueve su oxidación (Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002).

El estado de desarrollo también tiene efectos importantes sobre la síntesis de CAP's. Dependiendo de los genotipos utilizados y de las condiciones de cultivo, la síntesis de CAP's ocurre durante las etapas tempranas del desarrollo

del fruto, esto es entre los 20 y 50 d después de antesis (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). La posición del fruto en los tallos también determina el grado de picor en *C. annuum 'Jalapeño'*, debido a la diferencia en la temporalidad de desarrollo, lo que puede relacionarse con variaciones en el suministro de algunos de los nutrientos y fotoasimilados necesarios para el crecimiento y maduración de los frutos (Zewdie y Bosland, 2000).

Síntesis de capsaicinoides mediante cultivo *in vitro*

Cultivos celulares de *C. annuum* y *C. frutescens* tienen la capacidad de acumular CAP's (Lindsey *et al.*, 1983), aunque en menor cantidad en comparación con los frutos. Esto se ha relacionado con el bajo nivel en la actividad de algunas enzimas involucradas en su formación. En cultivos de *C. annuum 'Tampiqueño'*, las actividades de la PAL, la Ca4H y la Ca3H fueron similares a las encontradas en los frutos, mientras que las actividades de la COMT y la CS fueron cerca de seis veces menores, lo que indica que estas últimas enzimas podrían ser las principales limitantes en los cultivos *in vitro* (Ochoa-Alejo y Gómez-Peralta, 1993). No obstante, debido a que en *Capsicum* los genes para PAL, Ca4H y COMT constituyen una pequeña familia, y que estas enzimas son parte de la ruta general de los fenilpropanoides, no está claro si el total de la actividad detectada se relacionó con la formación de CAP's o con la formación de otros compuestos fenólicos (Curry *et al.*, 1999).

En cultivos *in vitro* también se ha observado que el bloqueo de la formación del 8-metil-6-nonenoil-CoA, mediante la aplicación de cerulenina -un inhibidor de la FAS- redujo la acumulación de CAP's, mientras que la aplicación de amino oxi-acetato -un inhibidor de la aminotransferasa (AMT)- no la redujo, a pesar de que ocasionó una importante disminución en la acumulación de vainillilamina. En contraste, en cultivos expuestos a homogeneizados fúngicos, en los que se indujo la acumulación de CAP's, tanto la síntesis de vainillilamina como la de 8-metil-6-nonenoil-CoA presentaron aumentos en la misma proporción, lo que sugiere que ambas rutas son necesarias para sostener el incremento observado (Prasad *et al.*, 2006a).

Se han intentado diferentes estrategias para promover la acumulación de CAP's en cultivos *in vitro*, las cuales se basan en el hecho de que en estos cultivos la acumulación de CAP's ocurre cuando se ha detenido la acumulación de biomasa. De este modo, la reducción o eliminación de reguladores de crecimiento y nutrientes del medio (como el nitrato, el fosfato, o la sacarosa) promueven la acumulación de CAP's (Lindsey, 1986). Otras estrategias incluyen el suministro de precursores como la fenilalanina, el ácido ferúlico o la vainillilamina, tanto a cultivos de células en

suspensión como a células inmovilizadas (Sudhakar *et al.*, 1996). Con base en la misma idea, se ha propuesto que la selección de líneas sobreproductoras de los precursores, como la fenilalanina, debe conducir a la acumulación de CAP's. Así, líneas celulares resistentes a la *para*-fluorofenilalanina -un análogo tóxico de la fenilalanina- mostraron una mayor acumulación de este aminoácido y de CAP's, en comparación con cultivos no seleccionados de *C. annuum*. Además, las líneas seleccionadas también presentaron una alta actividad de PAL (Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990).

La acumulación de CAP's en cultivo *in vitro* también es afectada por la iluminación, ya que la exposición a la luz de callos de *C. annuum* resultó inhibitoria para su formación (Weathers *et al.*, 1992). Así mismo, la inmovilización de células en soportes inertes favorece la acumulación de CAP's, en comparación con cultivos de células en suspensión.

Síntesis de capsaicinoides en tejido placentario cultivado *in vitro*. Las placas aisladas de frutos de *C. annuum* tienen la capacidad de transformar fenilalanina y valina en CAP's (Lindsey, 1986), lo que indica que este tejido posee las enzimas necesarias. Más aún, las placas inmovilizadas en espuma de poliuretano tienen una mayor capacidad para producir CAP's, en comparación con células inmovilizadas en el mismo material (Sudhakar *et al.*, 1990). Sin embargo, no hay diferencias en la capacidad de acumulación de CAP's entre placas libres o inmovilizadas (Sudhakar *et al.*, 1991). La adición de ácido ferúlico a cultivos de placas *in vitro* duplica la acumulación de CAP's, no así la de fenilalanina o de ácido cafeico, que anteceden al ferúlico en la ruta de síntesis (Fig. 1). Tampoco la adición de valina, que da origen al ácido graso, aumenta la síntesis de CAP's (Sudhakar *et al.*, 1990).

Esto marca una diferencia importante con los cultivos de células en suspensión, en los que el exceso de fenilalanina, ya sea suministrada exógenamente (Lindsey y Yeoman, 1984; Hall y Yeoman, 1991), o producida intracelularmente (Salgado-Garciglia y Ochoa-Alejo, 1990), puede dirigirse hacia la síntesis de CAP's y sugiere que el estado de diferenciación del tejido tiene gran influencia en la capacidad de síntesis, como también para muchos metabolitos secundarios. Es importante mencionar que no existen reportes sobre el origen de la fenilalanina utilizada para la síntesis de CAP's, es decir, no se tiene información si ésta se produce en el mismo tejido o si es transportada desde el exterior. Tampoco existen reportes sobre el metabolismo de los aminoácidos en el tejido placentario de las solanáceas, aunque sí los hay sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos en placas de tomate y de chile (Liu *et al.*, 2006).

Inducción de la síntesis de CAP's en cultivos *in vitro*.

Como otros metabolitos secundarios, la acumulación de CAP's puede ser inducida en cultivos *in vitro* en respuesta a la adición de homogeneizados fúngicos. En cultivos de *C. frutescens* la aplicación de homogeneizados de *Gliocladium deliquescens* condujo a la acumulación de compuestos fenólicos, posiblemente asociados con los CAP's (Holden y Yeoman, 1994). En células inmovilizadas de esta misma especie, la aplicación de homogeneizados de *Aspergillus niger* resultó en el aumento de vainillina y de CAP's, después de 3 d de exposición, mientras que en tejidos de placenta la aplicación de homogeneizados de *A. niger* o de *Rhizopus oligosporus* ocasionaron la acumulación de CAP's sólo tras un periodo de 7 d de exposición (Sudhakar *et al.*, 1990; 1991). La inducción de la acumulación de CAP's en respuesta a estos tratamientos sugiere un papel en la defensa química.

Tanto en plantas íntegras como en cultivos celulares, este tipo de respuestas cuenta con la participación de intermediarios químicos que operan entre el estímulo inicial y la respuesta de final de defensa. El estímulo inicial está representado por moléculas liberadas por el microorganismo (o la preparación fúngica), mientras que las respuestas de defensa pueden incluir la acumulación de metabolitos secundarios, entre otras. Por ello, la exposición directa de cultivos celulares a estos mediadores químicos frecuentemente se emplea como una estrategia de inducción del metabolismo secundario. Entre los intermediarios químicos más utilizados se incluyen el ácido salicílico (AS) y el jasmónato de metilo (MeJa). En células en suspensión de *C. frutescens*, la exposición a AS y MeJa condujo a un aumento notable del contenido de CAP's cuando se aplicaron de manera independiente. Sin embargo, la aplicación combinada de ambos compuestos no presentó un efecto aditivo (Sudha y Ravishankar, 2003).

Estos resultados son diferentes de los obtenidos en nuestro laboratorio con células en suspensión de *C. chinense* (chile habanero), en los que se detectaron efectos diferenciales al tratamiento con AS o MeJa. Así, la exposición de cultivos de 12 d de edad a MeJa 250 µM durante 24 h provocó un aumento sustancial en la vainillina acumulada, pero no en los CAP's, mientras que la exposición a la misma concentración de AS durante el mismo tiempo tuvo el efecto contrario; hubo un aumento en la acumulación de CAP's, pero no de otros intermediarios analizados como ácido cinámico, ferúlico y vainillina (datos no publicados). Estos resultados sugieren que los dos mediadores químicos posiblemente ejercen sus efectos en diferentes partes de la vía de síntesis, o bien que lo hacen con una temporalidad diferente. Otra posible explicación sería que AS y MeJa operen en niveles diferentes de regulación. En este sentido, es importante recalcar que, aunque tanto AS

como MeJa participan en la mediación química para una respuesta de defensa, lo hacen a través mecanismos bioquímicos y genéticos diferentes.

CONCLUSIONES

Esta revisión de la literatura científica, que incluye hasta mayo de 2007, revela que la mayoría de los trabajos recientes se concentran en el control genético del picor como una característica cualitativa, es decir, en su presencia o ausencia. Relativamente pocos trabajos se enfocan al estudios de las bases bioquímicas y moleculares de las diferencias en el grado de picor que pueden ocurrir en chiles con el mismo fondo genético expuestos a diferentes condiciones ambientales. También son escasos los trabajos recientes sobre la enzimología de la síntesis de CAP's, cuya ruta se estableció hace más de 30 años mediante el rastreo de intermediarios radiactivos.

A pesar de que la mayoría de enzimas involucradas ya han sido clonadas, la ruta originalmente propuesta no ha sido confirmada por enzimología. En este sentido, las rutas propuestas para la síntesis de algunos metabolitos secundarios han sido modificadas al combinar resultados de experimentos de rastreo con estudios de enzimología. Más aún, las enzimas involucradas en la formación de vainillilamina a partir de ácido ferúlico aún no han sido establecidas. El conocimiento de algunas propiedades de las enzimas involucradas en la formación de los CAP's, como la especificidad y la afinidad hacia sus sustratos y sus mecanismos de regulación, es necesario para confirmar si la ruta propuesta es válida o debe ser modificada. Esta información es importante para sentar las bases bioquímicas de las variaciones en el contenido de CAP's entre individuos con genotipos idénticos, así como para establecer si existen relaciones metabólicas entre la ruta de síntesis de CAP's con la de otros derivados de la ruta de los fenilpropanoides.

Por otro lado, la relación de *Pun1*, el gen que determina la ocurrencia del picor, con los genes involucrados en la formación de CAP's, incluyendo *csy1*, debe ser analizada. Respecto a *csy1*, es interesante hacer notar que su producto, la enzima capsaicinóide sintasa (CS) funciona como una aciltransferasa, aún sin presentar una aparente relación filogenética con las enzimas de este tipo. Estas características únicas de la CS posiblemente sean responsables de que ningún tejido, con excepción de la placenta del chile, pueda producir CAP's.

Debido a que se han realizado muy pocos estudios sobre la fisiología del tejido placentario, y prácticamente ninguno sobre el metabolismo de los aminoácidos, el origen de la fenilalanina y la valina que dan lugar a los CAP's aún no ha sido establecido. Obtener esta informa-

ción será de utilidad para comprender la regulación de la síntesis de CAP's a nivel bioquímico. Los aspectos aquí señalados representan sólo algunas de las preguntas que aún quedan por responder acerca del proceso de síntesis de estos compuestos responsables del picor, una de las características distintivas de la cocina mexicana.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue patrocinado por la Fundación Produce Yucatán, A.C. (Convenio 0635-2004) y por el CONACYT (Fondo Investigación Básica, P50879; 60746). Los autores desean reconocer la colaboración de la M. C. Lizbeth Castro Concha para la elaboración de este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aluru M, M Mazourek, L Landry, J Curry, M Jahn, M O'Connell (2003)** Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *J. Exp. Bot.* 54:1655-1664.
- Andrews J (1995)** Peppers. The domesticated *Capsicums*. University of Texas Press, Austin, TX, USA. 274 p.
- Ben-Chaim A, Y Borovsky, M Falise, M Mazourek, B C Kang, I Paran, M Jahn (2006)** QTL analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Gen.* 113:1481-1490.
- Bernal M A, A Calderón, M A Pedreño, R Muñoz, A Ros Barceló, F Medina de Cáceres (1993)** Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (var. *annuum*) fruits. *J. Agric. Food Chem.* 41:1041-1044.
- Blum E, K Liu, M Mazourek, E Y Yoo, M Jahn, I Paran (2002)** Molecular mapping of the *C* locus for presence of pungency in *Capsicum*. *Genome* 45:702-705.
- Blum E, M Mazourek, M O'Connell, J Curry, T Thorup, K Liu, M Jahn, I Paran (2003)** Molecular mapping of capsaicinoid biosynthesis genes and quantitative trait loci analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. *Theor. Appl. Gen.* 108:79-86.
- Cázares-Sánchez E, P Ramírez-Vallejo, F Castillo-González, M Soto-Hernández, T Rodríguez-González, J L Chávez-Servia (2005)** Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annuum* L.) del centro-oriente de Yucatán. *Agrociencia* 39:627-638.
- Contreras-Padilla M, E M Yahia (1998)** Changes in capsaicinoids during development, maturation, and senescence of chile peppers and relation with peroxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* 46:2075-2079.
- Curry J, M Aluru, M Mendoza, J Nevarez, M Melendrez, M O'Connell (1999)** Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Sci.* 148:47-57.
- Dixon R, N Paiva (1995)** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097.
- García-Galindo H, J Ortega-Martínez, M García-Rosales, C Martínez, C Beristáin (1995)** La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia* 46:84-102.
- Hall R, M Yeoman (1991)** The influence of intracellular pools of phenylalanine derivatives upon the synthesis of capsaicin by immobilized cell cultures of the chilli pepper, *Capsicum frutescens*. *Planta* 185:72-80.
- Harvell K P, P W Bosland (1997)** The environment produces a significant effect on pungency of chiles. *HortScience* 32:1292-1297.
- Holden P R, M M Yeoman (1994)** Variation in the growth and biosynthetic activity of cloned cell cultures of *Capsicum frutescens* and

- their response to an exogenously supplied elicitor. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 38:31-37.
- Johnson C D, D R Decoteau (1996)** Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeño pepper plant growth, pod yield and pungency. *HortScience* 31:1119-1123.
- Kirschbaum-Titze P, C Hiepler, E Mueller-Seitz, M Petz (2002)** Pungency in paprika (*Capsicum annum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *J. Agric. Food Chem.* 50:1260-1263.
- Lee C J, E Y Yoo, J H Shin, J Lee, H S Hwang, B D Kim (2005)** Non-pungent capsicum contains a deletion in the capsaicinoid synthetase gene, which allows early detection of pungency with SCAR markers. *Mol. Cells* 19:262-267.
- Lee J M, S Kim, J Y Lee, E Y Yoo, M C Cho, M R Cho, B D Kim, Y Y Bahk (2006)** A differentially expressed proteomic analysis in placental tissues in relation to pungency during the pepper fruit development. *Proteomics* 6:5248-5259.
- Lindsey K (1986)** Incorporation of [¹⁴C] phenylalanine and [¹⁴C] cinnamic acid into capsaicin in cultured cells of *Capsicum frutescens*. *Phytochemistry* 25:2793-2801.
- Lindsey K, M Yeoman (1984)** The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. *annuum* immobilised in reticulate polyurethane. *J. Exp. Bot.* 35:1684-1696.
- Lindsey K, M Yeoman, G Black, F Mavituna (1983)** A novel method for the immobilisation and culture of plants cells. *FEBS Lett.* 155:143-149.
- Liu K, H Jiang, S Moore, C Watkins, M Jahn (2006)** Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*. *Planta* 223:672-683.
- Ochoa-Alejo N, J Gómez-Peralta (1993)** Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *J. Plant Physiol.* 141:147-152.
- Ochoa-Alejo N, R Ramírez-Malagón (2001)** *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:701-729.
- Prasad N B C, H B Gururaj, V Kumar, P Giridhar, R Parimalan, A Sharma, G A Ravishankar (2006a)** Influence of 8-methyl-nonenanoic acid on capsaicin biosynthesis and *in vivo* and *in vitro* cell cultures of *Capsicum* spp. *J. Agric. Food Chem.* 54:1854-1859.
- Prasad N B C, V Kumar, H B Gururaj, R Parimalan, P Giridhar, G A Ravishankar (2006b)** Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csyl*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:13315-13320.
- Salgado-Garciglia R, N Ochoa-Alejo (1990)** Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Cell Rep.* 8:617-620.
- Stewart Jr C, B C Kang, K Liu, M Mazourek, S L Moore, E Y Yoo, B D Kim, I Paran, M M Jahn (2005)** The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *Plant J.* 42:675-688.
- Stewart Jr C, M Mazourek, G M Stellari, M O'Connell, M Jahn (2007)** Genetic control of pungency in *C. chinense* via the *Pun1* locus. *J. Exp. Bot.* 58:979-991.
- Sudha G, A Ravishankar (2003)** Influence of methyl jasmonate and salicylic acid in the enhancement of capsaicin production in cell suspension cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Curr. Sci.* 85:1212-1217.
- Sudhakar J, A Ravishankar, L Venkataraman (1990)** *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annum* L. grown in liquid medium. *Plant Sci.* 70:223-229.
- Sudhakar J, A Ravishankar, L Venkataraman (1991)** Elicitation of capsaicin production in freely suspended cells and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens* Mill. *Food Biotechnol.* 5:197-205.
- Sudhakar T, G Ravishankar, L Venkataraman (1996)** Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44:117-121.
- Sung Y, Y Y Chang, N L Ting (2005)** Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46:35-42.
- Sutoh K, K Kobata, S Yazawa, T Watanabe (2006)** Capsaicinoid is biosynthesized from phenylalanine and valine in a non-pungent pepper, *Capsicum annum* L. cv. CH-19 sweet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:1513-1516.
- Tewksbury J J, C Manchego, D C Haak, D J Levey (2006)** Where did the chili get its spice? Biogeography of capsaicinoid production in ancestral wild chili species. *J. Chem. Ecol.* 32:547-564.
- Weathers P, A Mohd, R Cheetham (1992)** Light inhibits the formation of capsaicin from *Capsicum* callus. *Plant Med.* 58:278-279.
- Zamski E, O Shoham, D Palevitch, A Levy (1987)** Ultrastructure of capsaicinoid-secreting cells in pungent and nonpungent red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Bot. Gazz.* 148:1-6.
- Zewdie Y, P Bosland (2000)** Pungency of chile (*Capsicum annum* L.) fruit is affected by node position. *HortScience* 35:1174.