

# EFECTO DEL ELICITORES QUÍMICOS Y UN FÍSICO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA DE PIMIENTO

EFFECT OF THE CHEMICAL AND PHYSICAL ELICITORS ON THE ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PEPPER

Ignacio Tovar Zamora  
Ramón Gerardo Guevara González  
Israel Macías Bobadilla  
Rosario Guzman Cruz  
Juan Manuel Vera Morales  
Irineo Torres Pacheco  
Marcela Vargas Hernández\*

Universidad Autónoma de Querétaro, México

\*marcela.vhz@gmail.com

# Resumen

La especie de Chile con mayor proliferación de cultivo en el mundo es el *Capsicum annuum*. Los frutos de esta especie contienen metabolitos secundarios que pueden inducirse mediante la aplicación de elicitores. El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), ácido salicílico (AS) y riego deficitario controlado (RDC) sobre las variables fenológicas de la planta, la actividad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* de los frutos de pimiento. El diseño experimental fue al azar y los tratamientos consistieron en la aplicación exógena de  $H_2O_2$  (6, 14, y 18 mM), AS (0.01, 0.1 y 0.5 mM) y RDC (50 %). La concentración total de fenoles, flavonoides y taninos se cuantificó por el método colorimétrico.

Se determinó la actividad antioxidante por los métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS (2,2'-acino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico); además, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*. La concentración más alta de fenoles y flavonoides correspondieron a los tratamientos AS 0.5 mM,  $H_2O_2$  14 mM y 18 mM y RDC 50 %. El mayor nivel de taninos se encontró en los tratamientos AS 0.1 mM y AS 0.01 mM. La actividad antioxidante fue elevada en los tratamientos con las concentraciones más altas de los elicitores de AS y  $H_2O_2$ . Finalmente, los AS 0.01 y 0.5 mM manifestaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. En consecuencia, las aplicaciones de AS,  $H_2O_2$  y RDC 50 % resultaron una estrategia adecuada para mejorar el crecimiento y desarrollo de la planta de pimiento.

**Palabras clave:** antioxidantes, elicitores, pimiento, *Staphylococcus aureus*.

*Capsicum annuum* is the most cultivated species of chili in the world. The fruits of this species contain secondary metabolites that can be induced by the application of elicitors. The objective of this study was to evaluate the effect of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), salicylic acid (SA) and regulated deficit irrigation (RDI) on the plant phenological variables and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activity of pepper fruits. The experimental design was completely random and the treatments consisted of exogenous application of  $H_2O_2$  (6, 14, and 18 mM), SA (0.01, 0.1 and 0.5 mM), and RDI (50%). The concentration of phenols, flavonoids and tannins was quantified by colorimetric

methods. The antioxidant activity was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) techniques, in addition the *in vitro* antimicrobial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus*. The highest concentrations of phenols and flavonoids corresponded to treatments SA 0.5 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 14 mM and 18 mM and RDI 50%. The highest level of tannins was reported for treatments SA 0.1 mM and AS 0.01 mM. The antioxidant activity was higher in the treatments with the highest concentrations of the elicitors of SA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finally, the treatments AS 0.01 and 0.5 mM showed antimicrobial activity against *S. aureus*. Therefore, the application of AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and RDC 50% were an adequate strategy to improve the growth and development of the bell pepper plant.

**Keywords:** antioxidant, elicitors, pepper, *Staphylococcus aureus*.

---

## Introducción

El género *Capsicum* corresponde a las plantas de Chile nativas de las regiones tropicales de América [1]. Existen alrededor de 30 especies, de las cuales cinco están domesticadas, y la *Capsicum annum* ostenta mayor relevancia económica [2]. Es importante añadir que el Chile pimiento a nivel mundial es el protagonista de la familia *Solanáceas* después del jitomate [3]. Los pimientos son una fuente abundante de compuestos antioxidantes, tal como el ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides, compuestos fenólicos y flavonoides [4]. En este contexto, los compuestos mencionados presentan actividades biológicas anticancerígenas, antiinflamatorias y antimicrobianas contra bacterias (Gram+ y Gram-) [5].

En la actualidad se han desarrollado diversas estrategias con la finalidad de aumentar la cantidad de compuestos bioactivos en las plantas. Por ejemplo, la aplicación de factores de estrés tanto biótico y abiótico (elicitors) benefician al incremento de su actividad farmacológica [6]. Entre



los elicitores empleados, encontramos el  $H_2O_2$ , ácido salicílico (AS), ácido jasmónico, óxido nítrico, entre otros. El  $H_2O_2$  participa en diversos procesos de respuesta en las plantas, como son la aclimatación al estrés, defensa antioxidante, entrecruzamiento de la pared celular, comportamiento de las estomas, producción de fitoalexina, regulación del ciclo celular y fotosíntesis [7], [8]. A este respecto, se suma el riego deficitario, mismo que consiste en reducir drásticamente la cantidad de agua utilizada para el riego y ofrece un impacto positivo sobre el rendimiento, la eficiencia nutritiva y la maduración del fruto [9], [10].

La capsaicina es el compuesto primigenio del género *Capsicum*, derivado de ello se realizan numerosos estudios sobre la aplicación de elicitores en cultivares picantes [11]. Conviene señalar que, aunque los pimientos contengan compuestos análogos, como los capsinoides, las investiga-

ciones enfocadas en evaluar el efecto de los elicitores sobre su desarrollo, síntesis de bioactivos y actividades biológicas de sus extractos son limitadas. Además, carecen reportes sobre la actividad antimicrobiana de extractos de pimientos contra *S. aureus*, y escasean informes de elicitores sobre el incremento de la actividad antimicrobiana. La bacteria *S. aureus* es del tipo coco grampositiva, comúnmente coloniza la dermis humana y cavidades mucosas como la microflora, en casos determinados actúa como un agente patógeno de enfermedades infecciosas [12], [13]. Debido a lo anterior, el objetivo de la presente es evaluar el efecto de la elicitación a través del  $H_2O_2$ , AS y el estrés hídrico por déficit de riego sobre variables fenológicas, concentración de bioactivos, actividad antioxidante y antimicrobiana contra *S. aureus*.



El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno, ácido salicílico y riego deficitario controlado sobre las variables fenológicas de la planta, actividad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* de los frutos de pimiento.

## Metodología

### Material biológico

Las semillas de *C. annuum* var. revolution se adquirieron en la distribuidora Agro Guanajuato. Asimismo, la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro proporcionó la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

### **Establecimiento del cultivo**

El cultivo de chiles se realizó en un invernadero de 108 m<sup>2</sup>, ubicado en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las coordenadas estipuladas fueron de entre 20° 31' y 20° 58' de latitud norte y entre 100° 09' y 100° 24' de longitud oeste y 1850 msnm. Las semillas se desinfectaron con 200 ppm de solución de nitrato de potasio, y a *posteriori* se colocaron en un sustrato de peatmoss-vermiculita (1:4).

Al transcurrir dos semanas las semillas se trasplantaron a bolsas de 5 litros con tezontle, las condiciones de crecimiento fueron 26 °C, HR de 60 % y 16 h luz. Los tratamientos consistieron en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a las concentraciones de 6, 14 y 18 mM, AS a una IDEM-de 0.01, 0.1 y 0.5 mM y RDC 50 %, vertidos en la mitad del riego diario recomendado, y como testigo experimental se aplicó agua destilada. Las soluciones se aplicaron en forma foliar hasta el punto de rocío en intervalos de 15 días. El diseño experimental fue completamente al azar con unidades de análisis de seis plantas en tres repeticiones. Las variables a medir fueron la altura, cantidades de frutos y flores. Cabe señalar, en los frutos se midió la longitud, peso fresco y perímetro ecuatorial; además fueron cosechados a los 113 días después de trasplantar al invernadero. A este respecto se unen los pimientos, mismos que se congelaron mediante inmersión en nitrógeno líquido y molieron con hielo seco para obtener la materia fresca, finalmente se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

### **Preparación de extractos metanólicos**

La extracción de compuestos se realizó bajo el método de maceración, utilizando como disolvente metanol en una proporción de 1:10 y materia fresca; a su vez la muestra fue trasladada a un agitador por 24 h a 200 RPM (Orbit 1000 model s2030-1000; Labnet, Woodbridge, NJ, EE. UU.). Los extractos se centrifugaron a 5 000 RPM (Sorvall Biofuge Primo R model 75005448; Thermo Scientific, Osterode, Germany); el sobrenadante fue aprovechado para realizar la evaporación del disolvente de los extractos metanólicos en un rotavapor a una temperatura de 40 °C (Schwalbach, Heidolph Instruments Gmb H & Co. KG).



### Determinación del contenido de metabolitos secundarios en los frutos de pimiento

Los compuestos fenólicos totales se determinaron conforme al método propuesto por Folin-Ciocalteu [14]. Conviene señalar que, en las pruebas se utilizaron 10 mg/ml de extracto  $\text{mL}^{-1}$ , es decir, esto pesaron 10 mg de extracto y se añadió 1 mL de metanol de grado reactivo. En los viales se colocaron 40  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico, se agregaron 460  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 250  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu (1N). Como siguiente paso se reposaron 5 minutos y se agregó 1.25 ml de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 % para neutralizar; se dejó incubar 2 h. 200  $\mu\text{L}$  de cada muestra de metanol (blanco), después se colocaron en una placa de 96 pozos. Se midió la absorbancia contra el blanco a 760 nm en un lector de microplacas Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EE.UU.). Se realizó una curva de calibración con ácido gálico entre 0-1  $\text{mg/L}^{-1}$ . Las concentraciones se reportaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por mililitro de extracto.

Los flavonoides se determinaron mediante el método descrito por Oomah et al. [17]. Nuevamente 50  $\mu\text{L}$  de los extractos metanólicos o blanco prediluido anteriormente se colocaron en una placa de 96 pozos; después se adicionaron 180  $\mu\text{L}$  de agua destilada y 20  $\mu\text{L}$  de una solución de 10g  $\text{L}^{-1}$  de 2-aminoetil-difenilborato (Sigma-Aldrich). Las muestras se midieron a una absorbancia de 404 nm en un lector de microplacas Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EE. UU.). La curva de calibración consistió en una solución de rutina (Sigma-Aldrich, 0 -200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Las concentraciones se reportaron como miligramos de equivalentes rutinarios por ml de extracto.

Para la determinación de taninos condensados, el método utilizado fue el de (+)-catequina-vainillina. A 50  $\mu\text{L}$  blanco se les adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de una solución 1:1 de HCl 8 % -vainillina 1 %. Las muestras se leyeron a 492 nm en un lector de microplacas Spectra Max (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EE. UU.). Para la curva de calibración, se utilizó una solución de catequina (0-1  $\text{mg/ml}^{-1}$ ). Los resultados se reportaron como miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra.

### Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de Chile Pimiento

La prueba de ABTS se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Nenadis et al. [18]. La curva estándar se realizó con una solución Trolox a una concentración entre 50-800  $\mu\text{mol}$ . Para generar el radical ABTS  $\bullet+$  se preparó una solución madre de ABTS 7 mM; para la cual se añadieron 5 ml de la solución acuosa y 88  $\mu\text{l}$  de persulfato de potasio 140 mM ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), esta solución se almacenó en oscuridad por 12 h. Posteriormente, la solución que contiene el radical se midió a 734 nm y se diluyó en etanol (de 20 a 25 ml) hasta que el valor de absorbancia alcanzó un valor inferior a 1.0. Después, se adicionaron las muestras en una placa de 96 pozos y finalmente se agregaron 230  $\mu\text{l}$  de ABTS  $\bullet+$ . El blanco se preparó con 20  $\mu\text{l}$  de la muestra y 230  $\mu\text{l}$  de etanol, los controles consistieron en 20  $\mu\text{l}$  de metanol (C1) y agua destilada (C2) con 230  $\mu\text{l}$  de ABTS  $\bullet+$ . La medición de la absorbancia se realizó a 730 nm durante un período de 0-6 min.

La prueba de DPPH se realizó en una placa de 96 pozos. A continuación, se describe brevemente: a 20  $\mu\text{l}$  de los extractos se les adicionó 200  $\mu\text{l}$  de una solución de DPPH  $\bullet$  (metanol a 80 %). Como control positivo se utilizó Trolox y para el negativo se utilizaron todos los reactivos, excepto los extractos. La absorbancia se midió a 520 nm en diferentes tiempos (0, 4, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos). Los resultados para ambos métodos se reportaron como  $\mu\text{M}$  de Trolox y % ARA (actividad antirradical).

### Actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos metanólicos del pimiento

La cepa *Staphylococcus aureus* ATCC se cultivó en caldo de soya tripticasina 24 h a 37 °C, de la misma manera, en agar tripticasina de soya y se incubó nuevamente. Asimismo, aisló una colonia que fue transferida a agar sangre e incubó nuevamente en las mismas condiciones. La cepa fue inoculada en un medio de caldo de tripticasina de soya para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC. En últimas, fue sembrada en placas de Petri con agar Muller Hilton y colocaron discos con un extracto metanólico de 20  $\mu\text{l}$  a las concentraciones de 100, 200 y 400  $\text{mg}/\text{ml}^{-1}$ . El extracto de cada tratamiento se suspendió en DMSO. Como testigo positivo se utilizaron Multidiscos Gram positivos II BioRad®:



- Ampicilina (10 µg)
- Cefalotina (30 µg)
- Cefotaxima (30 µg)
- Cefepime (30 µg)
- Cefuroxina (30 µg)
- Dicloxacilina (1 µg)
- Eritromicina (15 µg)
- Gentamicina (10 µg)
- Levofloxacin (5 µg)
- Penicilina (10 µg)
- Tetraciclina (30 µg)
- Trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg)

#### **Análisis estadístico**

Con los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para detectar diferencias entre los tratamientos, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurion XV Version 15.2.06. StatPoint, Inc., Herndon, 2007.

## **Resultados y discusión**

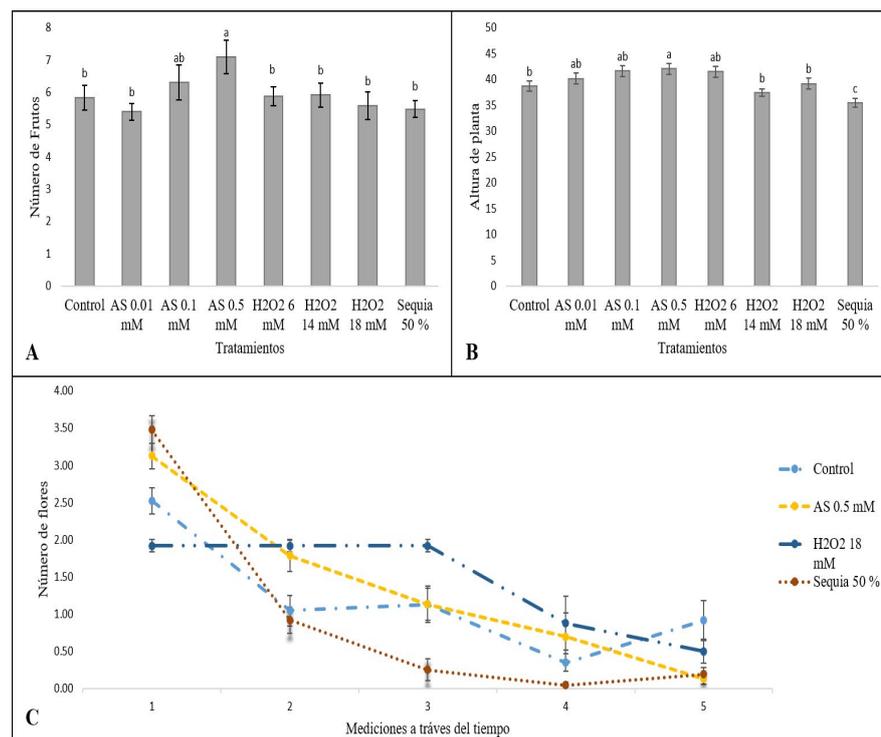
#### **Variabes fenológicas de la planta y fruto**

Con la finalidad de evaluar el efecto de los elicitores sobre las plantas de pimiento se midieron las variables independientes a los 113 días de desarrollo. El tratamiento de AS 0.5 mM generó significativamente mayor cantidad de frutos en comparación con los tratamientos aplicados, a excepción del AS 0.1 mM; también se observó mayor altura de la planta en comparación con AS 0.01 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 14 mM y sequía 50 % (Figura 1).

FIGURA 1.

Efecto del AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y RDC 50 % sobre las variables fenológicas de la planta:

- a) número de frutos,
- b) altura de la planta y
- c) número de flores a través del tiempo (se muestra cada tratamiento y el control).



Los resultados muestran que el AS aparte de su capacidad de inducir respuestas de defensa contra estrés, también juega un papel sustancial al regular procesos fisiológicos y bioquímicos relacionados con el crecimiento y desarrollo. Entre dichas fases se encuentran la germinación de semillas, el crecimiento vegetativo, floración, rendimiento del fruto, senescencia, termogénesis, cierre estomático, crecimiento rízico y la fotosíntesis. La respuesta del cultivo con el agente (hormesis) será positiva o negativa dependiendo de la relación dosis [17], [19]. No obstante, a pesar de que se ha reportado que el AS es un compuesto importante para la generación de flores [20]; en el presente trabajo se descubrió que la aplicación de este compuesto a 0.5 mM (dosis más alta) evidencia una cantidad baja de flores al momento de realizar la medición. Estos resultados pueden ligarse al hecho de que la planta aceleró su desarrollo y, por ende, los frutos brotaron más rápido después de la aplicación exógena del elicitor. Además, los tratamientos donde fue aplicado AS mostraron un comportamiento hormético (dosis-respuesta) en las variables de altura y número de frutos.

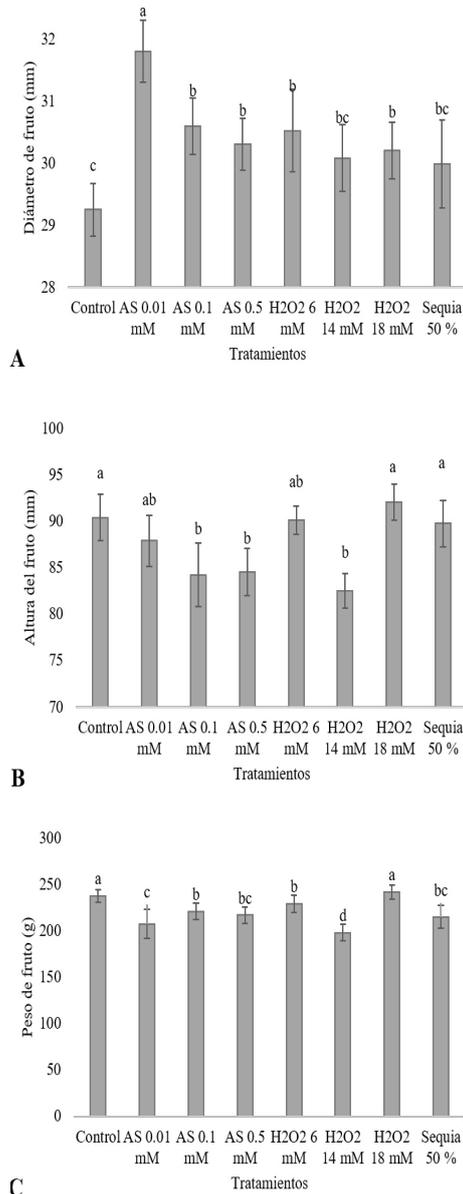
Existen reportes de que algunos procesos en las plantas son inducidos por AS, debido al efecto dosis-respuesta, activándose a bajas cantidades y se inhiben cuando son altas. Lo anterior se relaciona al papel del AS en la regulación del estado redox celular, ya que las bajas concen-



traciones inducen un nivel bajo de ROS. Estas concentraciones de ROS tienen la función de señalización para activar procesos biológicos, y a dosis altas causan estrés oxidativo y muerte celular [17]. Por lo tanto, se sugiere que las concentraciones de ROS (0.01, 0.1 y 0.5 mM) fueron las que activaron los procesos de desarrollo en el chile.

Debido a que el AS regula los procesos biológicos del chile a través de la inducción de ROS, del cual forma parte el  $H_2O_2$ , la aplicación de este elicitador también mostró cambios en las variables fenológicas del chile. Como se mencionó anteriormente, la concentración de ROS está relacionada al impacto en el desarrollo de la planta tanto de manera positiva como negativa. Así lo muestran los resultados obtenidos en las variables medidas en el fruto (Figura 2).

**FIGURA 2.**  
Efecto del AS,  $H_2O_2$  y RDC 50 % sobre las variables fenológicas del fruto:  
a) diámetro, b) altura y c) peso.



La concentración más alta de  $H_2O_2$  (18 mM) evidenció un efecto positivo sobre las variables fenológicas del fruto al igual que el control, ya que exhibieron mayor peso en comparación con los demás tratamientos. La misma concentración de  $H_2O_2$  mostró mayor altura en el fruto en comparación con AS 0.1 mM y  $H_2O_2$  14 mM; en contraparte, el control fue el que obtuvo menor diámetro. Existen reportes que posicionan a los elicitores como compuestos estimulantes ante la defensa del vegetal, promueve el metabolismo secundario a costa del primario [16]; en consecuencia, la aplicación de AS y  $H_2O_2$  tuvo un efecto positivo de igual modo que el control sobre el rendimiento de la planta de chile.

Por último, el tratamiento de sequía al 50 % tuvo un impacto negativo sobre el desarrollo de la planta, empero, se observó que el fruto mostró resultados positivos en comparación al control; así mismo, el AS 0.01 mM reportó menor peso de fruto, en comparación con el control. Con la finalidad de maximizar la producción de chile frente a la presencia de sequía existen estrategias como la implementación de riego deficitario controlado [21]. La aplicación de RDC 50 % demostró que la planta de chile fue susceptible al estrés por escasez de agua, impactando de manera negativa el desarrollo de la planta y el peso del fruto. Lo anterior puede relacionarse al estrés hídrico que disminuye la división celular y el alargamiento de las células de las plantas [22].

#### **Determinación del contenido de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante de los extractos de *C. annuum* elicitados con $H_2O_2$ , AS y RDC 50 %**

El sofisticado mecanismo de defensa que tiene la planta es encendido por diversos compuestos de señalización. Tales como  $H_2O_2$ , jasmonatos, ácido abscísico, AS, etc. o factores ambientales que potencian la acumulación de bioactivos defensivos, por lo tanto su actividad antioxidante se ve beneficiada. Se evaluó la concentración de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en los frutos de pimiento bajo el efecto de los elicitores químicos y uno físico (Tabla 1).



TABLA 1.

Contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos en los extractos de *C. annuum* bajo los efectos de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y RDC 50 %.

TRATAMIENTO	*COMPUESTOS FENÓLICOS	**FLAVONOIDES	***TANINOS
Control	13.03±0.27 <sup>b</sup>	9.28±1.05 <sup>ab</sup>	7.346±0.64 <sup>c</sup>
AS 0.01mm	11.45±0.22 <sup>c</sup>	9.14±0.42 <sup>b</sup>	11.92±0.75 <sup>a</sup>
AS 0.1mm	13.27±0.10 <sup>b</sup>	9.73±0.96 <sup>ab</sup>	13.45±0.85 <sup>a</sup>
AS 0.5mm	13.54±0.08 <sup>a</sup>	10.30±1.05 <sup>a</sup>	10.38±1.02 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6 mM	12.78±0.13 <sup>b</sup>	7.79±1.07 <sup>b</sup>	9.57±0.99 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 14 mM	15.00±0.19 <sup>a</sup>	9.31±0.61 <sup>a</sup>	6.844±0.71 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18 mM	15.07±0.28 <sup>a</sup>	9.53±0.53 <sup>a</sup>	6.315±0.58 <sup>c</sup>
RDC 50 %	15.66±0.74 <sup>a</sup>	9.53±0.26 <sup>a</sup>	9.69±1.02 <sup>ab</sup>

\* Concentración de fenoles expresados en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g<sup>-1</sup> de extracto.

\*\* Concentración de flavonoides en mg equivalentes de (+) - rutina (RUE) g<sup>-1</sup> extracto.

\*\*\* Concentración de taninos en mg equivalentes de (+) - catequina (CE) g<sup>-1</sup> extracto.

Los resultados son el promedio de tres ensayos independientes ± DE.

Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa entre tratamientos ( $\alpha = 0.05$ ).

Los tratamientos con mayor abundancia de compuestos fenólicos y flavonoides fueron AS 0.5 mm, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 14 mm, 18 mm y RDC 50 %. Se encontraron datos similares en chiles habaneros de la variedad Jaguar y Chichen Itzá tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 18 mm, los cuales produjeron mayor cantidad de fenoles y flavonoides totales en comparación con el control [18]. La actividad antioxidante por el método de ABTS de los extractos metanólicos fue mayor para los tratamientos AS 0.5 mm, 6 mm, 14 mm, 18 mm H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y RDC 50 %. Para el DPPH fueron los tratamientos as 0.5 mm y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 18 mm (Tabla 2).

TABLA 2.

Actividad antioxidante de los extractos meta-nólicos de *C. annuum* bajo el efecto de AS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y RDC 50 %.

TRATAMIENTO	ABTS		DPPH	
	μM DE TROLOX	% ARA	μM DE TROLOX	% ARA
Control	292.63 ±4.00 <sup>b</sup>	95.57±1.29 <sup>b</sup>	571.76±0.81 <sup>ab</sup>	73.33 ±0.11 <sup>ab</sup>
AS 0.01mm	290.13 ±2.75 <sup>b</sup>	94.76 ±0.89 <sup>bc</sup>	509.47 ±1.69 <sup>c</sup>	64.65 ±0.59 <sup>c</sup>
AS 0.1mm	286.12 ±3.39 <sup>c</sup>	93.46 ±1.10 <sup>c</sup>	488.12 ±4.14 <sup>c</sup>	61.70 ±0.82 <sup>c</sup>
AS 0.5mm	300.06 ±1.24 <sup>a</sup>	97.98 ±0.40 <sup>a</sup>	579.92 ±18.39 <sup>a</sup>	73.93±2.15 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6 mM	298.24 ±3.15 <sup>a</sup>	97.39±1.02 <sup>a</sup>	486.56 ±16.77 <sup>d</sup>	60.35±0.82 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 14 mM	298.54 ±3.14 <sup>a</sup>	97.49±1.01 <sup>a</sup>	554.82 ±14.01 <sup>c</sup>	71.82±2.62 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 18 mM	301.57 ±2.37 <sup>a</sup>	98.47±0.77 <sup>a</sup>	643.64 ±3.76 <sup>a</sup>	83.33±0.75 <sup>a</sup>
RDC 50 %	294.07 ±6.35 <sup>ab</sup>	96.04 ±2.06 <sup>ab</sup>	565.34 ±23.22 <sup>ab</sup>	71.49 ±6.05 <sup>c</sup>

\* La capacidad antioxidante de ABTS y DPPH se indica como μmol equivalentes de Trolox (TE) 10 g<sup>-1</sup> de extracto y porcentaje de inhibición (% de actividad antirradical). ARA = actividad antirradical.

Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa entre tratamientos (α = 0.05).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consigue inducir la expresión de la fenilalanina amonio-liasas (PAL); la enzima central de la ruta de los fenilpropanoides es responsable de la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides [23].

La manera en que el AS induce la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es mediante su intervención en las respuestas antioxidantes para gestionar el estrés oxidativo y con ello evitar el daño a las células de las plantas [24]. En lo que respecta a la sequía, provoca el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en diferentes compartimentos celulares, concretamente los cloroplastos y las mitocondrias [25]. Diversos estudios sustentan el hecho de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posee la capacidad



de incrementar el contenido de metabolitos secundarios y aumentar la acumulación de biomas. Los tratamientos con mayor cantidad de fenoles y flavonoides mostraron mayor actividad antioxidante. Esta respuesta se debe a que los compuestos fenólicos, como los flavonoides sustentados en su estructura química, contribuyen de manera imperante en la actividad, posicionando a los flavonoides como protagonistas debido a su alta cantidad de grupos de hidroxilo [26].

La correlación entre la cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y la capacidad antioxidante se determinó mediante los extractos metanólicos del pimiento (Tabla 3). Entre los fenólicos y flavonoides, se observó una alta correspondencia. La cantidad de metabolitos y la actividad antioxidante es baja, la mayor correlación fue obtenida de los métodos DPPH y ABTS, sin embargo, no tienen un comportamiento lineal. Una diferencia mostrada entre la actividad antioxidante determinada por los métodos ABTS y DPPH es la reacción contraria del radical frente a los compuestos fenólicos, a causa de su estructura. Además, el ABTS reacciona con los fenoles rápidamente y el DPPH lo hace lentamente de 1 a 6 h. Por otro lado, el ABTS tiene una mayor flexibilidad para reaccionar a diferentes pH, asimismo el radical es más estable [27].

**TABLA 3.**

Correlación entre la cantidad de bioactivos y capacidad antioxidante de los extractos de *C. annuum* elicitados con  $AS$ ,  $H_2O_2$  y RDC 50 %.

	COMPUESTOS FENÓLICOS	FLAVONOIDES	TANINOS CONDENSADOS	ABTS	DPPH
Compuestos Fenólicos	1				
Flavonoides	0.5844	1			
Taninos	0.0348	0.0246	1		
ABTS	0.1255	0.3605	-0.2562	1	
DPPH	0.1776	0.1251	-0.7051	0.7802	1

Al mismo tiempo, se observó una correlación no lineal entre los metabolitos secundarios y la actividad antioxidante, además de la actividad sinérgica aditiva o antagonista de los compuestos fenólicos para inhibir las especies reactivas de oxígeno [28]. La aplicación de los elicitores en concentraciones más altas ostenta un impacto positivo en la acumulación de bioactivos, actividad antioxidante y en el desarrollo de la planta,

ya sea aumentando su crecimiento o mitigando el efecto de las condiciones extremas de temperatura y humedad.

Los resultados indicaron que los niveles más altos de taninos corresponden a los tratamientos de AS 0.1 mM y AS 0.01 mM. Las concentraciones bajas de AS favorecieron la producción de taninos condensados, mientras que, por el contrario, el tratamiento de AS 0.5 mM favoreció la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides. Es posible que las dosis bajas de AS favorezcan las rutas de síntesis de taninos que implican un costo energético importante para el crecimiento y desarrollo vegetal. Por otro lado, el AS en la concentración de 0.5 mM favoreció la síntesis de moléculas que influyen en el crecimiento y desarrollo vegetal, sugiriendo su función como un bioestimulante, mientras que a dosis bajas actúa como eustresor [29]. Debido a lo anterior, es necesario un estudio hormético más completo sobre el efecto del AS en el crecimiento y desarrollo de las plantas de Chile, además del síntesis de metabolitos defensivos para una mejor explicación del fenómeno [6].

#### Actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos metanólicos de *C. annuum* elicitados con AS

Un cuantioso número de los compuestos defensivos de la planta se sintetizan para limitar el crecimiento de organismos patógenos. Por lo tanto, existe la posibilidad de presentar actividad antimicrobiana. En el presente estudio se determinó esta actividad en los extractos metanólicos de *C. annuum* bajo la aplicación de los elicitores contra *S. aureus* (Tabla 4). No se encontró actividad antimicrobiana para los tratamientos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en todas las concentraciones y RDC 50 % (datos no mostrados).

TABLA 4.

Actividad antimicrobiana de los extractos de *C. annuum* bajo el efecto del AS contra *S. aureus*.



Concentración (mg/ml-1)	TRATAMIENTO			
	Control	AS 0.01 mM	AS 0.1 mM	AS 0.5 mM
400	-	11.11±0.03 <sup>a</sup>	-	11.97±0.11 <sup>a</sup>
300	-	9.16±0.15 <sup>b</sup>	-	9.00±0.06 <sup>b</sup>
200	-	8.75±0.11 <sup>b</sup>	-	7.68±0.08 <sup>c</sup>

Los resultados son el promedio de tres ensayos independientes ± DE. Letras iguales en la misma columna no tienen diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).



El control positivo consistió en antimicrobianos comerciales, donde se observó actividad antimicrobiana con los medicamentos cefepima (30  $\mu\text{g}$ ) y gentamicina con un halo de inhibición de  $19.29 \pm 0.16$  y  $22.18 \pm 0.20$  mm. Con respecto a los extractos de las plantas elicidadas con AS, se observó actividad antimicrobiana en los tratamientos de 0.01 y 0.5 mm contra *Staphylococcus aureus* ATCC concentraciones de 200, 300 y 400  $\text{mg/ml}^{-1}$ ; además se observó un efecto dosis-respuesta.

El valor más alto de inhibición fue para el AS 0.5 mm. En el tratamiento control no se presentó actividad antimicrobiana, sucedió lo mismo para las plantas tratadas con AS 0.1 mm. Lo anterior sugiere que la concentración del elicitador provocó un efecto diferencial en la síntesis de los compuestos con actividad antimicrobiana. Estudios previos de nuestro grupo indican que los extractos de chile habanero (*Capsicum chinense*) elicidados con  $\text{H}_2\text{O}_2$  18 mm presentaron una mayor actividad antimicrobiana a las concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 200  $\text{mg/ml}^{-1}$ . La información previa evidencia, en comparación con las plantas no elicidadas contra *S. aureus*, una actividad antimicrobiana más alta [18]. Los resultados podrían estar relacionados a que los pimientos *Capsicum chinense* poseen capsaicina, un compuesto cuya actividad antimicrobiana se ha demostrado contra una amplia gama de microorganismos [30]. La actividad antimicrobiana mostrada deriva, probablemente, metabolitos secundarios inducidos en respuesta al AS de las plantas de pimiento.

## Conclusiones

Los resultados anteriores mostraron que los elicitores a diferentes dosis pueden impactar de maneras diversas el metabolismo primario de las plantas, lo que se refleja en el rendimiento. En este estudio, los elicitores químicos evaluados presentaron un impacto positivo en las variables morfológicas, mientras que el estrés por falta de agua en las plantas tuvo impacto negativo en las mismas. La aplicación de AS,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y RDC 50 % fueron una estrategia adecuada para mejorar el crecimiento y desarrollo de la planta de pimiento (*Capsicum annum* var. *grossum*). Además, la elicitación con AS 0.5 mm incremento la actividad antimicrobiana de sus extractos contra *S. aureus*. Por otro lado, como perspectiva se considera el estudio de otros niveles de riego deficitario en los cuales se puedan observar impactos positivos en las plantas y frutos de pimientos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante esta investigación.

## Fuentes de Financiamiento

La Dra. Marcela Vargas Hernández agradece al FONDEC UAQ 2022 por el apoyo FIN2022-18 otorgado.



## Referencias

- [1] U. I. Ramírez Novoa, F. C. Ortiz, S. M. Hernández, J. C. Raya Pérez, A. Cibrián, y E. A. Enriquez. (2018). *Diversidad morfológica del chile piquín (Capsicum annum L. var. Glabriusculum) de Querétaro y Guanajuato, México*. Rev. Mex. De Ciencias agríc., vol. 9, no. 6. Doi: 10.29312/remexca.v9i6.1581
- [2] V. Carvalho Lemos, J. Reimer, y A. Wormit. (2019, abr. 19). *Color for Life: Biosynthesis and Distribution of Phenolic Compounds in Pepper (Capsicum annum)*. Agríc. Doi: 10.3390/agriculture9040081
- [3] G. O. Nkansah, J. C. Norman, y A. M. Martey. (2017.). *Growth, Yield and Consumer Acceptance of Sweet Pepper (Capsicum annum L.) as Influenced by Open Field and Greenhouse Production Systems*. Journal of Horticulture., vol. 4. Doi: 10.4172/2376-0354.1000216.
- [4] F. Fratianni, A. d' Acierno, A. Cozzolino, P. Spingo, R. Riccardi, F. Raimo, C. Pane, M. Zaccardelli, V. Tranchida Lombardo, M. Tucci, S. Grillo, R. Coppolay, y F. Nazzaro. (2020, jun. 26). *Biochemical Characterization of Traditional Varieties of Sweet Pepper (Capsicum annum L.) of the Campania Region, Southern Italy*. Antioxidants. Doi: 10.3390/antiox9060556.
- [5] A. Panche, A. Diwan, y S. Chandra. (2016, dic. 29). *Flavonoids: An overview*. Journal of Nutritional Sci., vol. 5, no. 47. Doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [6] M. Vargas Hernandez, I. Macias Bobadilla, R. G. Guevara Gonzalez, S. de J. Romero Gomez, E. Rico Garcia, R. V. Ocampo Velazquez, L. de L. Alvarez Arquieta, e I. Torres Pacheco. (2017, oct. 12). *Plant Hormesis Management with Biostimulants of Biotic Origin in Agriculture*. Frontiers in Plant Sci., vol. 8. Doi: 10.3389/fpls.2017.01762.
- [7] W. L. Chen, y Y. T. Ko. (2021, nov. 17). *Exogenous hydrogen peroxide induces chilling tolerance in Phalaenopsis seedlings*. Sci. Horticulturae, vol 289. Doi: 10.1016/j.scienta.2021.110421.
- [8] M. A. Hossain, S. Bhattacharjee, S. M. Armin, P. Qian, W. Xin, H. Y. Li, D. J. Burritt, M. Fujita, y L. Tran. (2015, jun. 15). *Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: isights from*

- ROS detoxification and scavenging. *Front. Plant Sci.*, vol. 6. DOI: 10.3389/fpls.2015.00420.
- [9] M. Cano Lamadrid, I. Giron, R. Pleite, F. Burló, M. Corell, A. Moriana, y A. Carbonell Barrachina. (2015, jun.). *Quality Attributes of Table Olives as Affected by Regulated Deficit Irrigation. Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie.*, vol. 62, no. 1, pp. 19-26. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.12.063.
- [10] E. Coyago Cruz, M. Corell, C. Stinco, D. Hernanz, A. Moriana, y A. J. Meléndez Martínez. (2017, jun.). *Effect of regulated deficit irrigation on quality parameters, carotenoids and phenolics of diverse tomato varieties (Solanum Lycopersicum L.)*. *Food Research International*, vol. 96, pp. 72-83. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.03.026.
- [11] M. Giacalone, F. Forfori, y F. Giunta. (2015). *Chapter-20 Chili Pepper Compounds in the Management of Neurotraceuticals Pain*. *Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease.*, pp. 187-195. DOI: 10.1016/B978-0-12-411462-3.00020-5.
- [12] K. Becker. (2018,). *Chapter 2 Pathogenesis of Staphylococcus aureus*. A. P., pp. 13-38. DOI: 10.1016/B978-0-12-809671-0.00002-4.
- [13] N. Feyissa, T. Alemu, D. Jirata Birri, y A. Dessalegn. (2023, feb.). *Isolation, definition, and determination of antibiogram characteristics of Staphylococcus aureus in cow milk and milk products (yogurt and cheese) in West Showa Zone, Ethiopia*. *International Dairy Journal.*, vol. 137. DOI: 10.1016/j.idairyj.2022.105503.
- [14] V. Dewanto, X. Wu, K. K. Adom, y R. H. Liu. (2002, abr. 17). *Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity*. *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 10, pp. 3010-3014. DOI: 10.1021/jf0115589.
- [15] B. D. Oomah, y C. M. Anaberta. (2005, ene. 26). *Phenolics and antioxidative activities in common beans (Phaseolus vulgaris L.)*. *J. Sci. Agric. Food Agric.*, vol. 85, no. 6, pp. 935-942. DOI: 10.1002/jsfa.2019.
- [16] N. Nenadis, L. F. Wang, M. Tsimidou, y H. Y. Zhang. (2004, jun. 26). *Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABT S (\*+) assay*. *J. Agric. Food. Chem.*, vol. 52, pp. 4669-74. DOI: 10.1021/jf0400056.



- [17] D. Dempsey, y D. Klessig. (2017, mzo. 23). *How does the multifaceted plant hormone salicylic acid combat disease in plants and are similar mechanisms utilized in humans?* BMC Biology, vol. 15, no. 23. DOI: 10.1186/s12915-017-0364-8.
- [18] M. Vargas Hernández, I Torres Pacheco, F. Gautier, B. Álvarez Mayorga, A. Cruz Hernández, L. García Mier, S. N. Jiménez García, R. V. Ocampo Velázquez, A. A. Feregrino Perez, y G. Guevara Gonzales. (2017, abr. 06). *Influence of hydrogen peroxide foliar applications on in vitro antimicrobial activity in Capsicum chinense*. Jacq. Plant Bio. International. J. Dealing with All Aspec. Plant Biology., vol. 151, no. 2, pp. 269-275. DOI: 10.1080/11263504.2016.1168494.
- [19] W. Poot Poot, R. Delgado Martínez, S Castro Nava, M. Segura Martínez, A. Carreón Pérez, y J. Hernández Martínez. (2018, dic.). *Effect of salicylic acid on pre-transplant acclimatization of native tomato populations*. Horticultura Brasileira, vol. 36, no. 4, pp. 480-485. DOI: 10.1590/s0102-053620180409.
- [20] Y. Arif, F. Sami, H. Siddiqui, A. Bajguz, y S. Hayat. (2020, jul.). *Salicylic acid in relation to other phytohormones in plant: a study towards physiology and signal transduction under challenging environment*. Environmental and Experimental Botany., vol. 175. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2020.1040.
- [21] M. Y. Kabir, S. U. Nambeesan, J. Bautista, y J. C. Díaz Pérez. (2021, nov. 17). *Effect of irrigation level on plant growth, physiology and fruit yield and quality in bell pepper (Capsicum annum L.)*. Sci. Horticulturae., vol. 281. DOI: 10.1016/j.scienta.2021.109902.
- [22] H. Nelissen, X. H. Sun, B. Ryman, Y. Jikumaru, M. Kojima, Y. Takebayashi, R. Abbeloos, K. Demuyne, V. Storme, M. Vuylsteke, J. De Block, D. Herman, F. Coppens, S. Maere, Y. Kamiya, H. Sasaki, y G. T. S. Beemster. (2017, jul. 21). *The reduction in maize drought affects the transition between cell division and cell expansion and cannot be restored by elevated gibberellic acid levels*. Plant Biotechnology J., vol. 16, no. 2, pp. 615-627. DOI: 10.1111/pbi.12801.
- [23] M. Świeca. (2016, mzo. 13). *Hydrogen Peroxide Treatment and the Phenylpropanoid Pathway Precursors*

- Feeding Improve Phenolics and Antioxidant Capacity of Quinoa Sprouts via an Induction of L-Tyrosine and L-Phenylalanine Ammonia-Lyases Activities.* J. Chem., vol. 2016. Doi: 10.1155/2016/1936516.
- [24] D. E. M. Radwan, A. K. Mohamed, K. A. Fayez, y A. M. Abdelrahman. (2019, may.). *Oxidative stress caused by Basagran® herbicide is altered by salicylic acid treatments in peanut plants.* Heliyon, vol. 5, no. 5. Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01791.
- [25] A. Kaur y B. Asthir. (2016, dic. 23). *Molecular responses to drought stress in plants.* *Biologia plantarum*, vol. 61, no. 2, pp. 201-209. Doi: 10.1007/s10535-016-0700-9.
- [26] S. Aryal, M.K. Baniya, K. Danekhu, P. Kunwar, R. Gurung, y N. Koirala. (2019, abr. 11). *Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal.* *Plants Basel, Switzerland*, vol. 8, no. 4. Doi: 10.3390/plants8040096.
- [27] E. Shalaby, y S. Shanab. (2013, sep.). *Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of Spirulina platensis.* *Indian J. Marine Sci.*, vol 42, no. 5, pp.556-564.
- [28] A. Becerra Moreno, M. Redondo Gil, J. Benavides, V. Nair, L. Cisneros Zevallos, y D. A. Jacobo Velázquez. (2015, oct. 14). *Combined effect of water loss and wounding stress on gene activation of metabolic pathways associated with phenolic biosynthesis in carrot.* *Front. Plant Sci.*, vol. 6. Doi: 10.3389/fpls.2015.00837.
- [29] M. C. Vázquez Hernández, I. Parola Contreras, L. M. Montoya Gómez, I. Torres Pacheco, D. Schwarz, y R. G. Guevara González. (2015, may. 10). *Eustressors: Chemical and physical stress factors used to enhance vegetables production.* *Sci. Horti.*, vol. 250, pp. 223-229. Doi: 10.1016/j.scienta.2019.02.053.
- [30] E. Marini, G. Magi, M. Mingoia, A. Pugnali, y B. Facinelli. (2015, nov. 12). *Antimicrobial and Anti-Virulence Activity of Capsaicin Against Erythromycin-Resistant, Cell-Invasive Group A Streptococci.* *Front. Microbiol.*, vol. 6. Doi: 10.3389/fmicb.2015.01281.

