



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

# Estudo da oxidación de capsinoides por peroxidasas vexetais

**Traballo de Fin de Mestrado**

**Alberto Lema Blanco**

17/06/2014

D. Federico Pomar Barbeito, Profesor Titular de Fisioloxía Vexetal e Dña. Cristina Silvar Pereiro, Profesora Axudante Doutora de Fisioloxía Vexetal, certifican:

Que o traballo titulado “Estudo da oxidación de capsinoides por peroxidases vexetais”, presentado polo graduado D. Alberto Lema Blanco, foi realizado baixo a nosa supervisión e cumpre os requisitos reflectidos na normativa do Mestrado en Bioloxía Molecular, Celular e Xenética.

E para que así conste, asinamos a presente en A Coruña a 17 de xuño de 2014

Fdo. Federico Pomar Barbeito

Fdo. Cristina Silvar Pereiro

## Índice

<b>Introducción</b> .....	3
<i>O pemento: fonte de capsaicinoídes e capsinoídes</i> .....	3
<i>Capsaicinoídes e capsinoídes como compostos bioactivos</i> .....	4
<i>Metabolismo e acumulación de capsaicinoídes</i> .....	8
<i>Peroxidasas vexetais de clase III</i> .....	8
<i>O papel da peroxidasa de pemento no metabolismo dos capsaicinoídes</i> .....	12
<b>Obxectivos do traballo</b> .....	14
<b>Materiais e métodos</b> .....	15
<i>Peroxidasa semipurificada de pemento</i> .....	15
<i>Síntese de capsiato e dihidrocapsiato</i> .....	15
<i>Oxidación de capsinoídes pola peroxidasa</i> .....	16
<i>Extracción dos produtos da oxidación</i> .....	17
<i>Extracción de compostos do pemento</i> .....	17
<i>Análise por HPLC</i> .....	18
<b>Resultados e discusión</b> .....	19
<i>Oxidación dos capsinoídes pola peroxidasa de pemento (Capsicum annum L.)</i> .....	19
<i>Reacción de oxidación do capsiato e cálculo do coeficiente de extinción molar</i> .....	19
<i>Reacción de oxidación do dihidrocapsiato e cálculo do coeficiente de extinción molar</i> .....	22
<i>Comprobación da natureza peroxidasa das reacción mediante o uso de inhibidores</i> .....	24
<i>Ácido ferúlico vs tropolona</i> .....	24
<i>Ferrocianuro potásico vs ferricianuro potásico</i> .....	25
<i>Cinéticas da oxidación do capsiato e dihidrocapsiato</i> .....	26
- <i>Cinética da oxidación do capsiato</i> .....	26
- <i>Cinética da oxidación do dihidrocapsiato</i> .....	28
<i>Afinidade e reactividade da peroxidasa de Capsicum annum L. polo capsiato e dihidrocapsiato</i> .....	29
<i>Proposta de oxidación</i> .....	30
<i>Caracterización dos produtos de oxidación do capsiato</i> .....	32
<i>Análise da presenza de capsinoídes e de produtos de oxidación do capsiato oxidados pola peroxidasa de C. annum en froitos maduros de variedades galegas</i> .....	37
<b>Conclusións</b> .....	38
<b>Bibliografía</b> .....	39

## Introducción

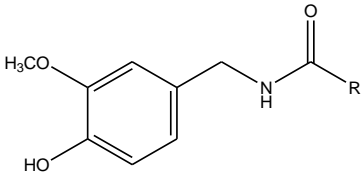
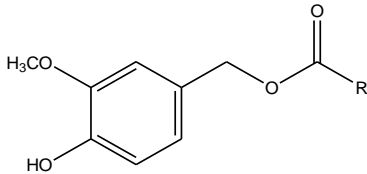
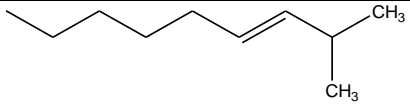
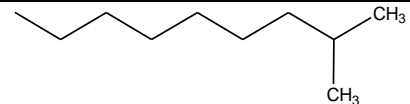
*O pemento: fonte de capsaicinoídes e capsinoídes*

O pemento (*Capsicum* spp.) é unha planta herbácea que pertence a familia das Solanáceas e é nativa de América Central e Sur (Mosquera & Mendez, 1994). Este xénero ten cinco especies que están amplamente recoñecidas como domesticadas: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum pubescens*. Aínda que hai documentadas unhas 20 especies salvaxes (Heiser, 1973). A especie máis comercializada é *Capsicum annuum* L. (Nadeem *et al.*, 2011). Os seus froitos cultívanse para a alimentación e tamén son usados como especias, proporcionando sabor e aroma á comida. Os pementos son unha fonte de nutrientes como glúcidos, azucres, calcio, magnesio, ácidos fenólicos,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e tocoferoles (Cichewicz & Thorpe, 1996). Dentro do gran abanico de compostos orgánicos que conteñen os froitos do pemento, resaltan os capsaicinoídes. Estes produtos encóntranse en especies picantes de *Capsicum* spp. e son coñecidos polas súas propiedades farmacéuticas, antimicrobianas e insecticidas (Cowan, 1999). Por outra parte, os pementos son tamén populares por ser unha fonte importante de antioxidantes (Lee *et al.*, 1995).

Todos os capsaicinoídes son amidas de entre 9 e 11 carbonos cunha cadea de ácidos graxos mais unha vanilamida. A maior diferenza entre os distintos capsaicinoídes é a lonxitude da cadea alifática, a presenza ou ausencia dun dobre enlace, o punto de ramificación e a súa relativa acritude (Táboa 1). Dentro dos capsaicinoídes, a capsaicina é o compoñente activo principal dos pementos picantes xunto ca dihidrocapsaicina (Davis *et al.*, 2007). Sintetízanse como amidas pola condensación de ácidos graxos e a vanilamina (Bennet & Kirby, 1968). A vanilamina dos capsaicinoídes deriva do aminoácido fenilalanina que se sintetiza a través da ruta do ácido shikímico/arogenato e a cadea alifática deriva dunha valina. A súa acumulación está especialmente asociada co estadio particular de desenvolvemento no que se encontra o froito (Díaz *et al.*, 2004). Na placenta do froito é onde se sintetiza a maior cantidade de capsaicinoídes (Iwai *et al.*, 1979). Os capsaicinoídes son estables tanto en solventes polares e apolares e producen a sensación de queimadura cando entra en contacto coa pel (Díaz *et al.*, 2004). Por outra parte, existen uns compostos análogos aos capsaicinoídes denominados capsinoídes, descubertos nos pementos doces CH-19 “*Sweet pepper*” (Yazawa *et al.*, 1989). Os capsinoídes maioritarios son o capsiato e dihidrocapsiato, sendo a cadea carbonada a mesma que na capsaicina e dihidrocapsaicina; respectivamente (Kobata *et al.*, 1998). Quimicamente, son ésteres

formados a partir da condensación dun alcol vanílico e ácidos graxos similares aos que interveñen na formación dos capsaicinoides (Fernández, 2007). A diferenza estrutural que presentan os capsinoides con respecto aos capsaicinoides é o tipo de enlace que presenta o esqueleto bencénico coa cadea carbonada da molécula. Nos capsinoides é de tipo éster, mentres que nos capsaicinoides é de tipo amida (Barbero *et al.*, 2010). En canto a percepción sensorial os capsaicinoides mostran un carácter picante, mentres que os capsinoides non presentan ningún tipo de acritude (Bernard *et al.*, 2008). Ao pesar destas diferenzas, os capsinoides teñen moitas funcións fisiolóxicas similares aos capsaicinoides, mais sen causar unha estimulación prexudicial. Ao non presentar as características picantes dos capsaicinoides pero si as súas funcións beneficiosas, fainos moi útiles para o seu uso en medicina e alimentación (Fernández, 2007).

**Táboa 1.** Estrutura química dos principais capsaicinoides e capsinoides

Capsaicinoides		Capsinoides	
			
<b>R</b>		<b>Composto</b>	
	<b>Capsaicina</b>		<b>Capsiato</b>
		<b>Dihidrocapsaicina</b>	<b>Dihidrocapsiato</b>

#### *Capsaicinoides e capsinoides como compostos bioactivos*

A capsaicina ten efectos analxésicos. Tense utilizado para reducir inflamacións, para aliviar episodios de alerxia a químicos nocivos e para reducir a dor causada pola artrite reumatoide e a fibromialxia (Fraenkel *et al.*, 2004). Ademais, é o compoñente principal da Adlea (ALGRX-4975), unha droga que aínda se encontra nun segundo estadio de desenvolvemento e que está concibida como analxésico de longa duración para tratar a dor post-quirúrxica e a osteoartrite (Remadevi & Szallisi, 2008). Estes compostos activan receptores de capsaicinoides, coñecidos como receptores vaniloides (VR1) ou receptor de potencial transitorio V1 (*Transient receptor potential vanilloid subfamily member 1*, TRPV1) (Zygmunt *et al.*, 1999). TRPV1 é un canal de catións non selectivo

que se activa cunha ampla variedade de substancias químicas e factores, como o calor nocivo e os vaniloides (Cortright & Szallasi, 2009). En canto o seu mecanismo de acción, os capsaicinoides son únicos entre os produtos naturais, xa que inicialmente actúan como irritantes para a continuación desensibilizar as neuronas sensitivas (Kissin, 2008). Polo tanto, o mecanismo principal dos capsaicinoides na loita contra a dor e unha insensibilización neuronal (Luo *et al.*, 2011). Os capsinoides, similares aos capsaicinoides, tamén son capaces de activar aos receptores TRPV1 e inducir respostas nociceptivas en ratos cando se lles inxecta directamente na pel (Iida *et al.*, 2003). Aínda así, non hai traballos que confirmen a capacidade analxésica dos capsinoides, xa que son pouco estables en comparación cos capsaicinoides (Luo *et al.*, 2011). O capsiato é moi lipófilo e non é picante, mais se descompón facilmente en medios acuosos normais (Iida *et al.*, 2003).

Os capsaicinoides (capsaicina e dihidrocapsaicina) tamén se coñecen pola súa actividade anticarcinoxénica (Surh, 2002). Xeran actividade antitumoral tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. A capsaicina bloquea o crecemento e migración de células tumorais do peito, destrúe células cancerixenas de cancro de próstata e xunto coa dihidrocapsaicina fomentan a autofaxia de células cancerixenas de colon de humanos (Luo *et al.*, 2011).

En experimentos con animais, o consumo de capsaicina produce unha diminución do 50% no tamaño do cancro de mama e un 80% no desenvolvemento de neoplasias (Thoennissen *et al.*, 2010). En estudos clínicos, a capsaicina natural mostra a capacidade de inhibir o crecemento de células leucémicas (Ito *et al.*, 2004). En contraposición, os capsinoides teñen unha literatura máis limitada sobre a súa capacidade anticarcinoxénica. Estudos recentes demostran que o capsiato e o dihidrocapsiato son capaces de previr a tumoroxénese en ratos atímicos. Estes resultados apoian a capacidade antitumoral dos capsinoides (Macho *et al.*, 2003). Outros estudos revelan que o capsiato induce a apoptosis de liñas celulares tumorais por incrementar as especies reactivas de osíxeno (ROS) na célula que provoca a perda do potencial da membrana mitocondrial (Macho *et al.*, 2003). Á súa vez, nun estudo *in vitro* o capsiato e o dihidrocapsiato parece que bloquean a permeabilidade dos factores de crecemento do endotelio vascular (VEGF), uns dos maiores indutores da formación de tumores vasculares (Pyun *et al.*, 2008).

Aínda que se coñezan estes efectos e estean demostrados como compostos beneficiosos para o tratamento do cancro, existen resultados contraditorios. Un estudo revela que a capsaicina podería actuar como promotor tumoral (Surh & Lee, 1996).

Estudios epidemiolóxicos revelan que os consumidores de Chile en grandes cantidades poden ter un alto risco a padecer cancro de estómago fronte aos non consumidores (Luo *et al.*, 2011). Isto mostra o que parecen as dúas caras dunha mesma moeda no caso do cancro e os capsaicinoides. O descubrimento dos capsinoides (capsiato e dihidrocapsiato) como análogos non picantes dos capsaicinoides que reteñen unha capacidade anticanceríxena similar e unha actividade quimiopreventiva podería ser unha substitución ideal da capsaicina, posuíndo un potencial antitumoral considerable (Luo *et al.*, 2011).

Un dos efectos farmacolóxicos máis interesantes dos capsaicinoides e capsinoides e a súa utilización para a perda de peso. Os pementos picantes coñécense por provocar a sensación de calor e incrementar a liberación de enerxía cando se comen. Debido a que a termoxénese e o metabolismo enerxético xogan un papel fundamental na regulación da obesidade, entón son alimentos potenciais para o control desta enfermidade (Luo *et al.*, 2011). Existen evidencias confirmadas da capacidade dos capsaicinoides como produtos contra a obesidade (Joo *et al.*, 2010). Parece que estes compostos alteran as proteínas relacionadas coa termoxénese e o metabolismo de lípidos polo que xogan un papel importante no metabolismo enerxético, mais aínda que estean demostrados estes efectos o seu uso clínico está limitado polos seus efectos secundarios (Luo *et al.*, 2011). Neste punto e onde cobran importancia os capsinoides. Unha dose de pementos CH-19 “Sweet pepper” incrementa a temperatura corporal e o consumo de osíxeno mentres que doses repetidas poderían reducir o peso corporal e promover a oxidación de graxas (Reinbach *et al.*, 2009). Unha dose aguda de capsiato produce un incremento na actividade nerviosa simpática e a termoxénese e á súa vez un tratamento crónico deste composto podería suprimir a acumulación de graxas no corpo (Kawabata *et al.*, 2006). Actualmente o capsiato é un produto dispoñible no mercado de Xapón e USA para a perda de peso (Capsiate natura, Copyright Natural Standar).

Por outra parte, existen evidencias dos efectos beneficiosos dos capsaicinoides no sistema cardiovascular (Harada & Okajima, 2009). O sistema cardiovascular é rico en nervios sensoriais que responden ante o contacto coa capsaicina, regulando a función cardiovascular pola liberación de neurotransmisores como o CGRP (Peng & Li, 2010). Este neurotransmisor actúa como protector da función cardiovascular (Li & Peng, 2002). A capsaicina estimula a liberación de CGRP activando á súa vez os receptores TRVP1, axudando beneficiosamente á función cardiovascular (Peng & Li, 2010). Tamén parece que a capsaicina e a dihidrocapsaicina inhiben a agregación de plaquetas e a actividade de factores de coagulación VIII e IX (Adams *et al.*, 2009).

Poderían contribuír como prevención do comezo dunha redución da actividade cardiovascular como consecuencia dunha enfermidade do corazón (Luo *et al.*, 2011). O sistema gastrointestinal tamén é rico en nervios sensoriais sensibles á capsaicina. Este composto parece que xoga un papel importante en manter a integridade da mucosa gastrointestinal fronte procesos prexudiciais (Peng & Li, 2010). No caso dos capsinoides, aínda non existen traballos que demostren este efecto. Aínda así, fixéronse estudos toxicolóxicos *in vivo* co capsiato e non se apreciaban efectos prexudiciais en ratos incluso con doses moi altas (1000 mg kg<sup>-1</sup>) (Bernard *et al.*, 2008). En cambio coa capsaicina, a doses de 50 mg kg<sup>-1</sup> xa se apreciaban inhibición dos efectos protectores da rutaecarpina (vasodilatador e agonista de TRPV1) no dano gástrico na mucosa por indución do ácido acetilsalicílico (Wang *et al.*, 2005). Polo tanto os capsinoides mostran unha toxicidade menor que os capsaicinoides aínda que se precisan de máis estudos.

Os pementos vermellos doces (*Capsicum annuum* L.) son coñecidos polo seu alto contido en antioxidantes (Simmons *et al.*, 1997). posúen unha enorme batería de antioxidantes e a súa composición química varía en función do cultivo, da estación e das condicións antes e despois da colleita (Nadeem *et al.*, 2011). Formando parte desa gran batería de compostos, os capsaicinoides (capsaicina e dihidrocapsaicina) teñen unha elevada capacidade antioxidante ao inhibir a peroxidación de lípidos mediada por metais e a oxidación dependente de cobre de lipoproteínas de baixa densidade (Murakami *et al.*, 2001). É un efecto debido a súa capacidade de formar complexos con metais reducidos e actuar como doadores de protóns. A capsaicina tamén podería prever a oxidación do ácido oleico durante as temperaturas que se alcanzan cando se cociña un alimento (Henderson & Henderson, 1992). Así tamén, a formación de hidroperóxidos lipídicos como produtos da autoxidación do ácido linoleico (Henderson & Slickman, 1999). O grave problema dos capsaicinoides para a súa utilización, como xa marcamos antes nas súas propiedades farmacolóxicas, é a súa acritude. Por outra parte, os capsinoides tamén mostran unha importante capacidade antioxidante. Os capsinoides actúan de maneira que rompen as cascadas na eliminación de radicais peróxido nos lípidos ao doar átomos de hidróxeno e ocultando aos radicais resultantes (Rosa *et al.*, 2002). O capsiato e dihidrocapsiato exercen unha actividade antioxidante comparable aos dos seus correspondentes capsaicinoides (Rosa *et al.*, 2002).



### *Metabolismo e acumulación de capsaicinoides*

Como xa indicamos anteriormente, os capsaicinoides encóntranse en maior medida na placenta do froito do pemento, así como a súa biosíntese (Fujiwake *et al.*, 1980). Os enzimas necesarios para a biosíntese dos capsaicinoides tamén se encontran na placenta (Díaz *et al.*, 2004). Ademais, os capsaicinoides encóntranse acumulados nos vacúolos das células epidérmicas da placenta (Fujiwake *et al.*, 1980). Unha vez rematado o crecemento, prodúcese un decaemento rápido dos capsaicinoides totais. Unha das posibilidades que pode acontecer cos capsaicinoides e a conxugación con azucres, diminuíndo os capsaicinoides libres ao largo da xénese do froito (Díaz *et al.*, 2004). Isto aínda non se puido confirmar e non parece que teña significacións relevantes nos procesos do froito do pemento. Porén, outra posibilidade para o metabolismo dos capsaicinoides é a degradación. Tense visto diminucións da cantidade de capsaicina e dihidrocapsaicina nos froitos despois dunha rotura celular que parece dependente dunha oxidación que á súa vez dependente da temperatura (Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002). Aínda que, probablemente as células do froito posúan algún enzima ou enzimas capaces de oxidar aos capsaicinoides. Bernal *et al.* (1993a) contemplaron evidencias do papel da peroxidasa (EC.1.11.1.7) como o enzima relacionado directamente co metabolismo dos capsaicinoides por oxidación, xa que este enzima é capaz de oxidar a capsaicina *in vitro* e a súa localización vacuolar apoia esta teoría. As peroxidases de *C. annuum* encóntranse localizadas nas células epidérmicas da placenta do froito, especialmente as peroxidases básicas, sendo capaces de oxidar ademais da capsaicina aos precursores fenólicos desta e á dihidrocapsaicina (Bernal *et al.*, 1994; Bernal *et al.*, 1993b). Nada se sabe aínda da posible degradación dos capsinoides ni da capacidade dos complexos peroxidasa para poder oxidar estes compostos.

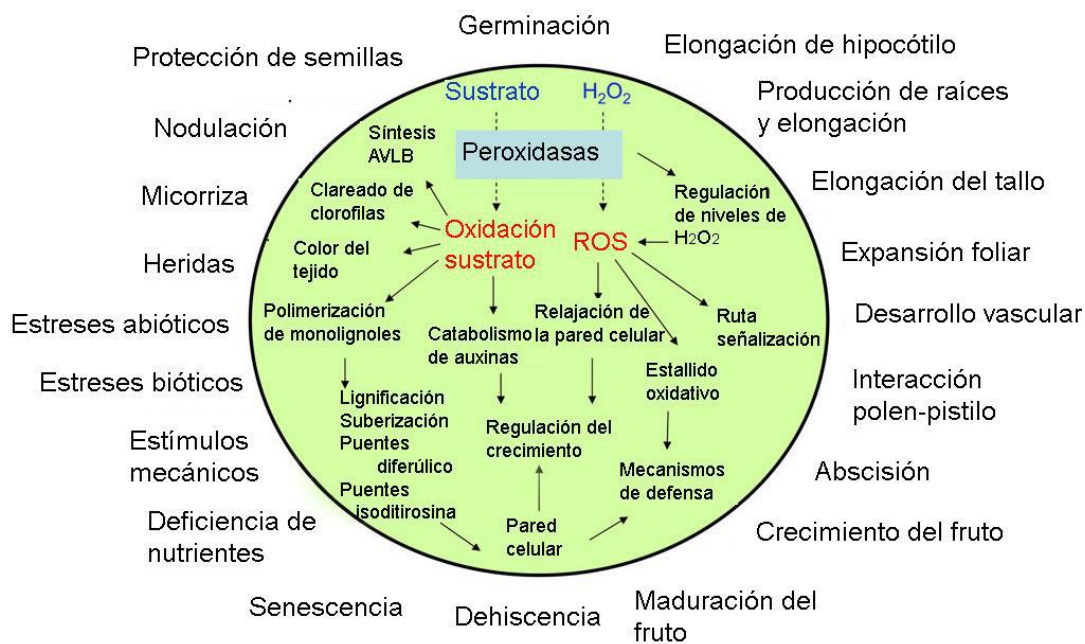
### *Peroxidasas vexetais de clase III*

As peroxidases (EC 1.11.1.7) son hemoproteínas que catalizan a oxidación monoeléctrica de diferentes substratos a expensas do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Martínez, 2013). Estas proteínas encóntranse amplamente distribuídas no reino vexetal e en todos os Espermatófitos estudados (Siegel, 1993). Por outra parte, as peroxidases clasifícanse en dúas grandes superfamilias (Hiraga *et al.*, 2001). A primeira inclúe as peroxidases de vexetais, fungos e bacterias. A outra superfamilia inclúe as peroxidases animais, non relacionadas estruturalmente cas anteriores (Hiraga *et al.*, 2001). Así mesmo, dentro da superfamilia das peroxidases de plantas, fungos e bacterias, defínense tres clases atendendo ás diferenzas estruturais existentes entre elas (Hiraga *et al.*, 2001).

As peroxidases bacterianas compoñen a clase I, sendo a citocromo c peroxidasa mitocondrial de lévedos e a ascorbato peroxidasa cloroplástica e citosólica de plantas superiores (Eisenstadt & Bogolitsyn, 2010). A clase II agrupa a todas as peroxidases de fungos, incluídas as lignina peroxidases (LiP), as manganeso peroxidases (MnP) e as peroxidases secretoras de fungos (Eisenstadt & Bogolitsyn, 2010). Por último, a clase III recolle as peroxidases de secreción de vexetais que son as que nós tratamos neste traballo. Estas proteínas son de natureza glicoproteica e están localizadas nos vacúolos e nas paredes vexetais. Mostran unha baixa especificidade de substrato e unha gran termoestabilidade (Passardi *et al.*, 2005). Ademais, presentan unha notable afinidade polo ácido coniferílico (Martínez, 2013).

As peroxidases de clase III sóense clasificar segundo o seu punto isoeléctrico en ácidas ( $pI < 7.0$ ), moderadamente básicas ( $7.0 < pI < 9.0$ ) e fortemente básicas ( $pI > 9.0$ ) (Quiroga *et al.*, 2000). Estes distintos grupos mostran unha diferente localización subcelular mais unha especificidade similar polo substrato. As peroxidases encóntranse localizadas tanto nas paredes celulares como nos vacúolos, mais mentres todo o espectro completo de peroxidases (ácidas e básicas) localízase nas paredes, nos vacúolos só hai peroxidases fortemente básicas (Pedreño *et al.*, 1993). Isto indica que na biosíntese e o recambio de metabolitos, como fenóis e alcaloides que están compartimentalizados principalmente no vacúolo, estean implicadas só as peroxidases básicas e nas reaccións relacionadas coa parede celular os dous tipos (Pedreño *et al.*, 1993).

As funcións referidas ás peroxidases son difíciles de especificar pola súa particular baixa especificidade de substrato e pola presenza de moitos isoenzimas (Hiraga *et al.*, 2001). Porén, poden considerarse como enzimas bifuncionais ao oxidar numerosos substratos en presenza de  $H_2O_2$  ou a través de producir especies activas de osíxeno (ROS) pola acción dos dous posíbeis ciclos catalíticos (peroxidativo e oxidativo) (Passardi *et al.*, 2005). Así, están implicadas en numerosas funcións fisiolóxicas. Moitas dos isoenzimas exprésanse de forma constitutiva, así que xogan un papel importante na estrutura e desenvolvemento das plantas, mentres que outras se inducen como resposta ao estrés (Martínez, 2013). Na figura 1 móstrase un esquema das funcións fisiolóxicas das peroxidases de clase III (Martínez, 2013).

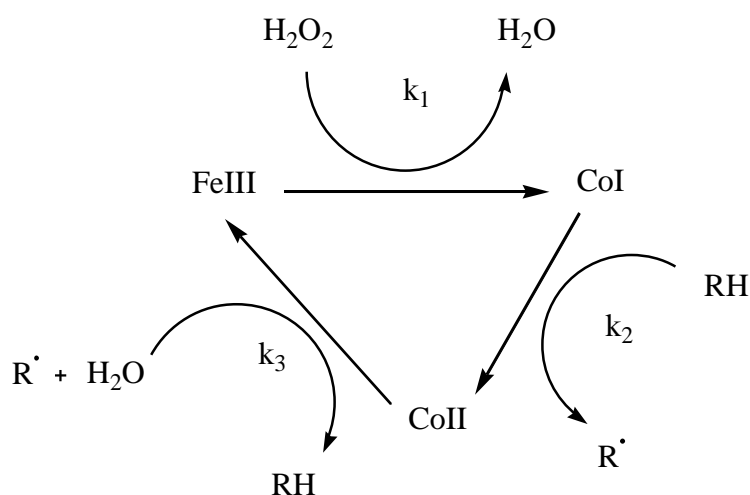


**Figura 1.** Esquema das principais funcións das peroxidasas de secreción de plantas superiores (Cortesía de T. Martínez, 2013)

Tendo en conta a gran variedade de substratos que son capaces de ser oxidados polas peroxidasas, estas presentan unha comportamentalización tisular moi específica. Nos froitos, as peroxidasas están fundamentalmente localizadas nas células epidérmicas e no xilema (Calderón *et al.*, 1993). En todos os tecidos as peroxidasas se encontran localizadas tanto nas paredes celulares como nos vacúolos, mais as localizadas nos vacúolos poden encontrarse en forma soluble (Crevecoeur *et al.*, 1997) ou firmemente ligadas a cara interna do tonoplasto (Sottomayor & Ros Barceló, 1997).

Por outra parte as peroxidasas teñen unha reactividade singular. Como hemoproteínas, gardan relación estrutural cos citocromos e con proteínas que unen osíxeno molecular; como as hemoglobinas. De acordo coa súa similitude, as peroxidasas sofren reaccións redox entre as formas férrica e ferrosa do enzima e, ao igual que a hemoglobina ou mioglobina, son capaces de ligar osíxeno (Pomar, 2000). Estas dúas propiedades xustifican o seu mecanismo de acción (Pomar, 2000). O ciclo catalítico das peroxidasas foi definido por Chance (1952) para a HRP (Peroxidasa de rábano picante) (Figura 2). O peróxido de hidróxeno ( $H_2O_2$ ) oxida a forma férrica do enzima (FeIII) para dar o composto I (CoI), un intermediario do enzima descrito como un catión radical de natureza oxidante. A continuación, CoI acepta un electrón e un protón dun substrato producindo o seu correspondente radical libre ( $R^*$ ) e un

intermediario hemo oxiferrilo coñecido como composto II (CoII). Finalmente, a redución monoeléctrica do CoI por unha segunda molécula de substrato rexenera de novo a forma férrica (FeIII), pechando así, o ciclo catalítico do enzima. En ausencia de  $H_2O_2$  e presenza do redutor FeIII, o ciclo catalítico pode ser completado con outros intermediarios do enzima, a ferroperoxidasa (FeII), formado pola redución da forma férrica e o composto III (CoIII), produto da unión da forma ferrosa co osíxeno molecular (Pomar, 2000). Tamén hai que sinalar que unha das características das reaccións catalizadas polas peroxidases é a produción de radicais libres do substrato. Estes radicais inestábeis poden ou ben dismutar ou xerar novas formas por acoplamento de dímeros e polímeros ou oxidar a outros substratos secundarios en reaccións non enzimáticas (Pomar, 2000).



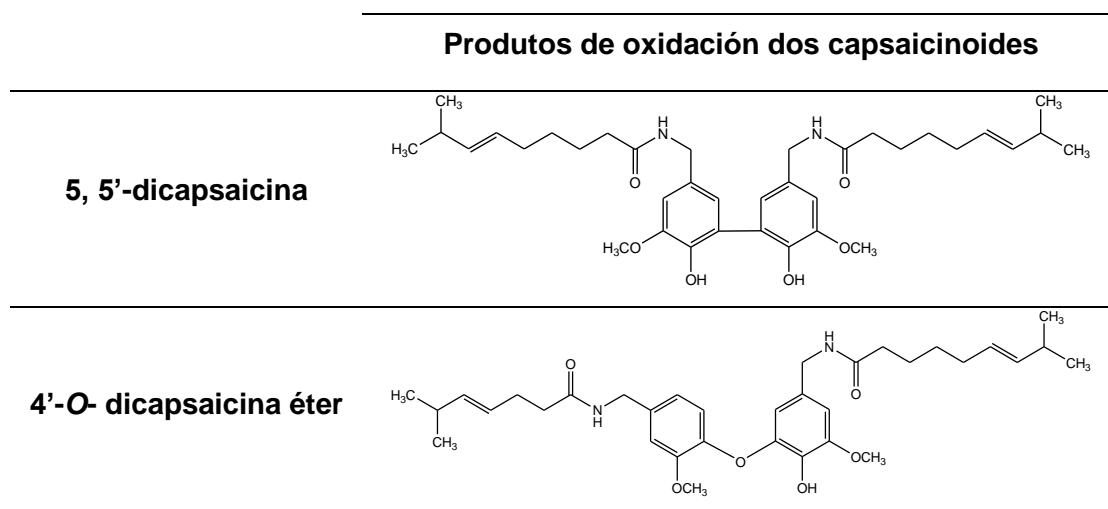
**Figura 2.** Ciclo catalítico da peroxidasa (Chance, 1952)

As peroxidases son altamente inespecíficas, característica que está principalmente determinada polos altos potenciais de oxidación dos intermediarios activos das peroxidases (CoI e CoII) o que as converte en axentes oxidantes adecuados para todos os compostos químicos que dean electróns ou átomos de hidróxeno. Así, as peroxidases son capaces de oxidar unha ampla variedade de compostos naturais como alcois cinamílicos e cinamaldehídos (Pomar, 2000) e alcaloides (Bernal *et al.*, 1993a). As reaccións de oxidación da peroxidasa e a súa plasticidade metabólica faina unha maquina importante de catálisis na síntese de produtos bioactivos para a planta (Ros Barceló & Pomar, 2002). A peroxidasa é capaz de oxidar a capsaicina cunha constante cinética similar aos dos fenóis, oxidándoa ao nivel da vanilamida (Bernal *et al.*, 1993a).

### *O papel da peroxidasa de pemento no metabolismo dos capsaicinoides*

Pomar *et al.* (1997) purificaron e caracterizaron a peroxidasa de pemento, extraída do pericarpo do froito. Como xa indicamos anteriormente, este enzima é capaz de oxidar numerosos compostos e tamén estruturas aromáticas a expensas do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ademais, os niveis de peroxidases e a distribución das súas isoformas ácidas e básicas acompaña a moitos procesos fisiolóxicos en plantas superiores (Pomar *et al.*, 1997). Por outra parte, as peroxidases están implicadas na senescencia do froito (Haard & Tobin, 1971). As peroxidases teñen un papel importante no metabolismo dos alcaloides, concretamente nos capsaicinoides ao modificarse e degradarse despois do desenvolvemento do froito (Pomar *et al.*, 1997). Así mesmo, Bernal *et al.* (1993a e b) demostrou que as peroxidases básicas de pemento cun punto isoeléctrico alto están directamente relacionadas co metabolismo dos capsaicinoides desde que a capsaicina, dihidrocapsaicina e os seus precursores fenólicos son facilmente oxidados por este enzima. Este enzima é estritamente dependente do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, está localizada na placenta do froito de pemento e o seu pH óptimo para a oxidación dos capsaicinoides está cerca do 6.0, indicando unha boa adaptación ao pH ácido dos vacúolos. Polo tanto, a peroxidasa de pemento está no lugar correcto para a oxidación dos capsaicinoides (Díaz *et al.*, 2004). Bernal e Ros Barceló (1996) identificaron un tipo de produtos de oxidación dos capsaicinoides pola peroxidasa; os dímeros de capsaicina, 5, 5'-dicapsaicina e 4'-O- dicapsaicina éter (Táboa 2). Por outra parte, Pomar *et al.* (1997) demostrou *in vitro* a oxidación dos capsaicinoides por isoenzimas de pemento cun punto isoeléctrico ácido, concluíndo que a capsaicina é oxidada eficientemente por este enzima. Todo isto corrobora o importante papel das peroxidases presentes no vacúolo e a súa posible acción como degradadoras dos capsaicinoides acumulados durante o desenvolvemento do froito. En canto da importancia dos capsinoides como análogos dos capsaicinoides, sería importante coñecer se estas peroxidases son capaces tamén de oxidalos e de producir a súa mobilización durante o desenvolvemento do froito.

**Táboa 2.** Dímeros de capsaicina: 5, 5'-dicapsaicina e 4'-O- dicapsaicina éter. Ambos son produtos de oxidación da capsaicina pola peroxidasa (Bernal & Ros Barceló, 1996).



Tendo en conta o papel fundamental dos capsaicinoides e dos seus análogos nos diferentes casos que tratamos, este traballo ten como obxectivo analizar aos capsinoides e ver se a peroxidasa presente nos froitos dos pementos é capaz de oxidalas. Isto é partindo da posibilidade observada no caso dos capsaicinoides ao ser degradados pola peroxidasa, vendo se ocorre un proceso similar nos capsinoides e observar se se forman compostos que se manteñan no froito e estean presentes de forma natural.

## **Obxectivos do traballo**

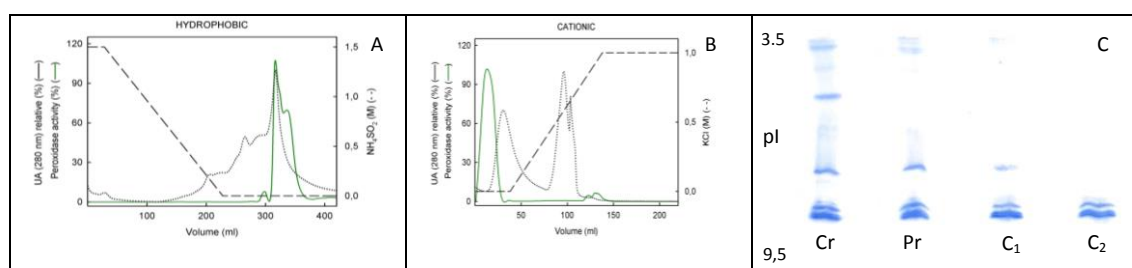
Este traballo ten como obxectivos principais os seguintes:

- Estudar a capacidade da peroxidasa básica de pemento (*C. annuum*) para oxidar aos capsinoides maioritarios, capsiato e dihidrocapsiato.
- Caracterizar a cinética da catálise da oxidación dos capsinoides pola peroxidasa básica secretora de pemento (*C. annuum*).
- Caracterizar espectralmente os posibles produtos de oxidación mediado pola peroxidasa de *C. annuum*.
- Avaliar a posible presenza destes produtos de oxidación en distintas variedades de pemento galego.

## Materials e métodos

### *Peroxidasa semipurificada de pemento*

O extracto proteico que utilizamos foi obtido en traballos anteriores e provén de froitos de pemento do Couto en estadio comercial. O proceso de purificación incluíu, unha precipitación fraccionada con sulfato amónico e dous pasos cromatográficos: unha cromatografía hidrófoba sobre Fenil-Sefarosa<sup>TM</sup> 6 *Fast Flow*, seguida dunha cromatografía de intercambio iónico sobre SP-Sefarosa. Este protocolo de purificación permitiu obter unha fracción de peroxidasas básicas semipurificadas. Estas peroxidasas de carácter básico son as maioritarias no vacúolo, onde previsiblemente terá lugar a hipotética oxidación dos capsinoides (Figura 3).



**Figura 3.** Semipurificación de peroxidasas básicas. A, perfil cromatográfico da cromatografía hidrófoba sobre fenil-sefarosa, B, perfil cromatográfico da cromatografía de intercambio iónico sobre SP-sefarosa, C, Isoelectroenfoque das distintas etapas da purificación: extracto cru (Cr), extracto da precipitación con sulfato amónico (Pr) e picos recollidos tras as dúas cromatografías (C<sub>1</sub> e C<sub>2</sub>)

### *Síntese de capsiato e dihidrocapsiato*

O capsiato presenta na súa cadea lateral un dobre enlace *trans*. Para lograr a súa síntese, pártese do ácido *cis*-8-metil-6-nonenoico, que se encontra dispoñible comercialmente. A continuación, utilízase a vainillina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído) sofre unha sililación para protexer ao único grupo hidroxilo da molécula con cloruro de *t*-butil-dimetilsililo e permitir a redución do grupo aldehído que permitirá esterificar nesta posición e introducir así a cadea alifática (ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico). Ao se formar o alcol e estar protexido o hidroxilo aromático, poderase realizar a esterificación para formar o capsiato. O axente redutor utilizado foi o hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL). O terceiro paso é esterificar a vainillina reducida sililada co cloruro de acilo xerado a partir do ácido *trans*-8-metil-6-nonenoico e finalmente cunha mixtión de HCL 0,25 M / etanol na proporción 1:5, dessililazarse ou desprotexer ao grupo hidroxilo do anel aromático para obter o capsiato.



No caso do dihidrocapsiato non se necesita a isomerización xa que non posúe un dobre enlace (Táboa 1). O ácido 8-metilnonanoato, cadea alifática do dihidrocapsiato, se transforma no seu correspondente cloruro de acilo para a súa posterior acilación da vainillina reducida sililada, como se comentou anteriormente na síntese do capsiato. Seguidamente, se esterifica a vainillina reducida sililada co cloruro do ácido 8-metilnonanoato que finalmente ao desprotexer o grupo hidroxilo do anel aromático coa mestura HCL 0,25 M / etanol na proporción 1:5, renderá a dihidrocapsiato.

#### *Oxidación de capsinoides pola peroxidasa*

O primeiro paso no estudo cinético da oxidación dos capsinoides pola peroxidasa de pemento, foi o cálculo dos coeficientes de extinción molar para a reacción, a partir das diferenzas de absorbancia, antes e despois da oxidación pola peroxidasa. Para o cálculo destes coeficientes de extinción incubáronse 1  $\mu$ l dos capsinoides capsiato e dihidrocapsiato a unha concentración de 0,44 mM e 0,54 mM, respectivamente, en presenza de peroxidasa e un exceso de  $H_2O_2$ , en tampón fosfato pH 5,5 a 25°C. Sucesivas adicións de enzima ou peróxido foron realizadas para asegurar a completa oxidación dos substratos. Realizáronse controis en ausencia de  $H_2O_2$  e en ausencia de peroxidasa. O curso da reacción seguiu-se por medio de espectros consecutivos do medio de reacción tomados a intervalos de 30 s no rango de 200 a 400 nm.

Unha vez realizado o seguimento da oxidación mediante os espectros consecutivos, determinouse a lonxitude de onda na cal a variación de absorbancia observada foi máxima, e foi calculado o coeficiente de extinción molar da reacción.

A natureza da peroxidasa destas reaccións testouse fronte a diferentes inhibidores, usados todos eles a unha concentración final de 1 mM. O primeiro grupo conformárono o ácido ferúlico e a tropolona e o segundo o ferrocianuro potásico ( $K_4Fe[CN]_6$ ) e o ferricianuro potásico ( $K_3Fe[CN]_6$ ). Os inhibidores engadíronse ao medio de reacción 1 minuto antes de se iniciar a reacción coa adición do substrato.

Para a caracterización cinética da oxidación do capsiato e do dihidrocapsiato pola peroxidasa de *C. annuum*, realizáronse reaccións a 25°C en tampón fosfato pH 5,5, en presenza de distintas concentracións dos substratos:

- Capsiato: 0,22 mM, 0,44 mM, 0,87 mM, 1,31 mM;  $H_2O_2$ : 0,5 mM. As medidas da oxidación fixéronse a 230 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar para a reacción de  $0,27 \text{ UA } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

- Dihidrocapsiato: 0,27 mM, 0,54 mM, 0,81 mM, 1,36mM; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,5 mM. As medidas da oxidación fixéronse a 235 nm, utilizando un coeficiente de extinción molar para a reacción de 0,22 UA  $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### *Extracción dos produtos da oxidación*

A extracción de produtos de oxidación realizouse a partir de medios de reacción tras completarse totalmente a oxidación do substrato pola peroxidasa. A oxidación seguíuse a través de espectros consecutivos de absorbancia. O medio de reacción cun volume final de 40 ml, mantiña as proporcións de reactivos iguais as usadas na caracterización cinética. Unha vez terminada a oxidación de todo o substrato, procedeuse a extracción dos produtos resultantes da oxidación. Para iso, dividiuse o volume total en dous tubos de 20 ml e realizouse unha partición cun solvente orgánico. A cada tubo engadiuse acetato de etilo na proporción 1:1 e tras unha forte axitación recolleuse a fase superior a un matraz Erlenmeyer. Tras repetir esta operación varias veces, agregamos sulfato de sodio anhidro para eliminar o exceso de auga que podía conter. Filtramos o acetato de etilo e evaporámolo a sequidade usando un rotatorio en baleiro ou un SpeedVac evaporatorio. Tras evaporarse todo o solvente e o precipitado formado era resuspendido en 1 ml de metanol grado HPLC e filtrado a través dun filtro de xiringa de 0,45  $\mu\text{m}$  para ser analizado polo HPLC. Paralelamente extraeuse un control no que se preparaba un medio de reacción sen substratos.

#### *Extracción de compostos do pemento*

Extraéronse os compostos de froitos de varias variedades cultivadas de pemento (*Capsicum annuum* L.) propias de Galicia: Couto, Vilanova, Couto Grande, Padrón, Mougán, Entenza, Arnoia, Oímbra, Piñeira, Punxín e Blanco Rosal. Os pementos liofilizados moéronse cun muiño eléctrico para deseguido pesar 1 g de cada pemento e homoxeneizarse en 5 ml de acetonitrilo (ACN). A mestura incubouse nun sonicador Bandelin Sonorex durante 1 h a 60°C. A continuación, centrifúgase a 5000g durante 10 min a 15°C cunha centrífuga refrixerada Eppendorf. Unha vez transcorrido o tempo de centrifugación, recóllese o sobrenadante nun matraz de evaporación e evapórase en baleiro no Speedvac. Finalmente resuspéndese o precipitado do matraz en metanol, filtrándose a través dun filtro de xiringa de 0,45  $\mu\text{m}$  para posteriormente analizar por HPLC. Este procedemento fíxose por triplicado para cada mostra de pemento.

### *Análise por HPLC*

As mostras analizáronse utilizando un sistema cromatográfico Alliance de Waters usando un detector de diodos Waters 2996 e un detector de fluorescencia Waters 2475. Para iso utilizouse una columna de fase reversa C-18 Waters SunFire de 4,6x 150 mm. A estación de control e procesado de datos realizábase mediante un software Empower PRO (Copyright 2002, Waters Corporation). O volume de inxección utilizado foi de 10 µl, sendo a temperatura da columna de 30°C e o fluxo de 0,8 ml minuto<sup>-1</sup>. O programa de gradiente usado foi o seguinte:

<b>Tempo (min)</b>	<b>Curva de Gradiente</b>	<b>Solvente B (Acético 2%)</b>	<b>Solvente B (ACN)</b>
<b>0</b>	6	85%	15%
<b>15</b>	6	20%	80%
<b>35</b>	6	0%	100%
<b>40</b>	6	0%	100%
<b>45</b>	6	85%	15%

Os detectores traballaron no seguinte rango de lonxitudes de onda: o detector de PDA rexistrou desde 200 a 450 nm. Pola súa parte o detector de fluorescencia rexistrou desde ós 325 ata 490 nm, usando una lonxitude de onda de excitación de 280 nm.

### *Análise por Orbitrap-MS*

Para a análise de masas utilizamos un equipo HPLC Thermo Accela acoplado a un detector de masas Thermo LTQ Orbitrap Discovery. O programa de HPLC e a columna cromatográfica foi igual ao usado con anterioridade. A ionización das mostras realizouse mediante *electrospray* cunha voltaxe 3,51 kV, tanto en modo negativo (voltaxe do capilar -35 V) como positivo (voltaxe do capilar -35 V). A temperatura de traballo do capilar foi de 350°C. As presións de gas utilizadas foron, gas-1 50 UAT e gas-2 10 UAT. O detector de masas rexistrou entre o rango de 80 a 800 uma cunha resolución mínima de 30.000.

## Resultados e discusión

### *Oxidación dos capsinoides pola peroxidasa de pemento (*Capsicum annuum* L.)*

Traballos realizados previamente revelan que as peroxidases básicas vacuolares presentes en células da placenta dos froitos do pemento son capaces de oxidar, cunha constante cinética similar aos fenois, aos capsaicinoides que se acumulan tamén no vacúolo destas células. Porén, non existe ate o de agora ningunha investigación sobre a capacidade destes enzimas de oxidar aos compostos análogos dos capsaicinoides, os capsinoides. Estes compostos suponse que teñen unhas propiedades e actividades moi parecidas aos capsaicinoides, pero que non mostran os efectos secundarios non desexables daqueles, se encontran maioritariamente en froitos de pementos non picantes (CH-19 *Sweet pepper*) ou en moi baixa concentración. A falta de estudos previos sobre estes compostos fai que exista un baleiro de coñecementos sobre o seu metabolismo nos pementos, sendo un dos pasos completamente descoñecidos a súa posible oxidación por parte da peroxidasa. O primeiro paso que se abordou foi a comprobación da capacidade das peroxidases para oxidar os principais capsinoides, o capsiato e o dihidrocapsiato, usando para iso un extracto semipurificado de peroxidases básicas de pemento. Complementariamente, e co fin de abordar un estudio cinético da oxidación, procedeuse a calcular os coeficientes de extinción molar para cada unha das reaccións de oxidación dos substratos.

### *Reacción de oxidación do capsiato e cálculo do coeficiente de extinción molar*

No caso do capsiato, a súa oxidación pola peroxidasa en presenza de  $H_2O_2$  (Figura 4, A), maniféstase fundamentalmente por un ascenso na absorbancia a 230 nm.

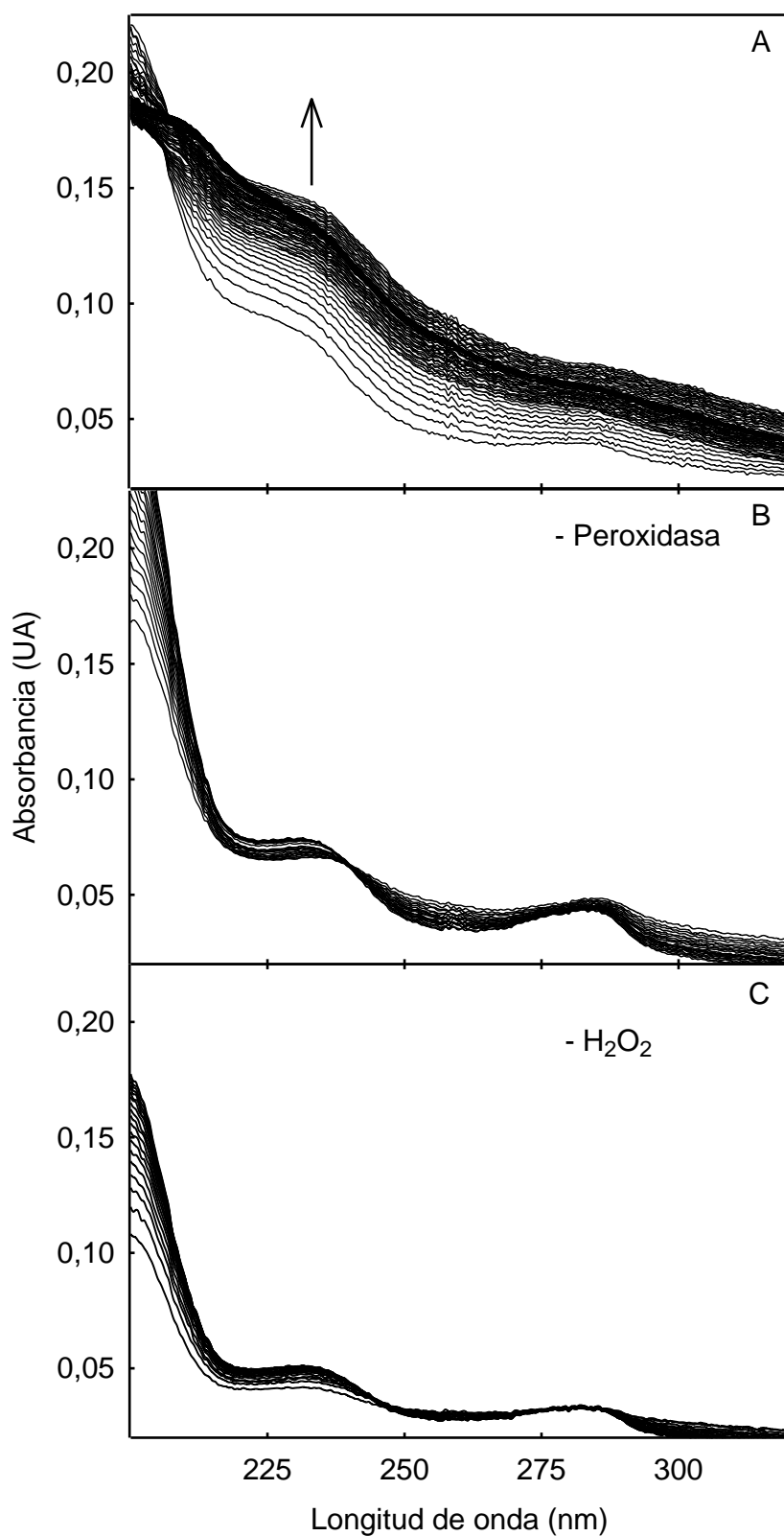
Na figura 4 tamén se inclúen os resultados obtidos para os controis realizados en ausencia da peroxidasa (B) e en ausencia de peróxido de hidróxeno (C). En ambos casos obtense un espectro similar ao anteriormente citado, pero nesta ocasión os cambios observados nos sucesivos espectros son de moita menor intensidade. Os lixeiros cambios observados en ausencia de peroxidasa (Figura 4, B), pode ser debido a unha oxidación non enzimática do capsiato, esta ben descrito a baixa estabilidade destes compostos en solución (Sutoh *et al.*, 2001). No caso do control en ausencia de peróxido pode os cambios observados poden ser debidos de novo a esta inestabilidade do substrato e a capacidade oxidativa das peroxidases, que poden chegar a autoxerar o seu propio peróxido de hidróxeno (Ros Barceló & Pomar, 2002).

Para calcular o coeficiente de extinción da reacción de oxidación do capsiato seguiuise o curso da mesma durante 2 h, ao cabo do cal xa non se producía ningún cambio

significativo nos valores de absorbancia. O coeficiente de extinción aparente para a reacción calculouse a través da seguinte ecuación:

$$\epsilon_{230} = \frac{A_{230}^I - A_{230}^F}{[S]}$$

Onde  $A_{230}^I$  é a absorbancia inicial e  $A_{230}^F$  é a absorbancia final dos medios de reacción a 230 nm, sendo [S] a concentración do capsato no medio de reacción, concretamente 0,44 mM . O valor obtido proporcionase na táboa 3.



**Figura 4.** (A) Espectros consecutivos da oxidación do capsiato pola peroxidasa de *C. annuum*. O medio de reacción estaba composto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, capsiato 0,44 mM e peroxidasa de *C. annuum* en presenza de tampón fosfato pH 5,5. Os rexistros realizáronse con intervalos de 3 min. A frecha indica a dirección dos cambios espectrais. (B) Control en ausencia de peroxidasa. (C) Control en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### *Reacción de oxidación do dihidrocapsiato e cálculo do coeficiente de extinción molar*

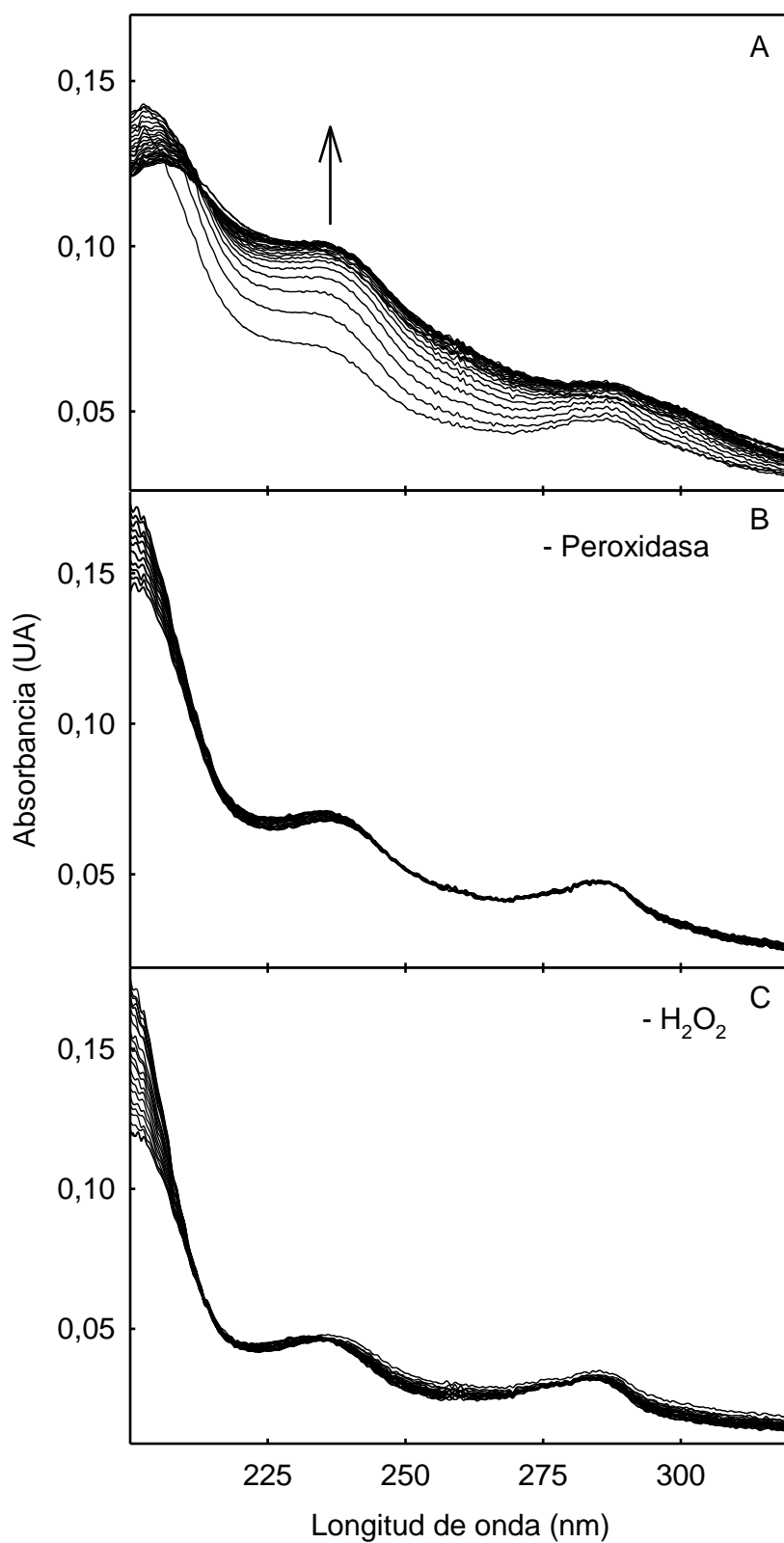
No caso do dihidrocapsiato, a súa oxidación pola peroxidasa e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 5, A) manifestase fundamentalmente polo ascenso na absorbancia a 235 nm, valor onde ten o seu máximo de absorción.

Na Figura 5, tamén se presentan os resultados obtidos para os controis realizados en ausencia de peroxidasa (B) e ausencia de peróxido de hidróxeno (C). En ambos casos obtense un espectro similar ao anteriormente citado, cun máximo de absorbancia aos 235 nm, pero sen producirse os ascensos significativos nos valores de absorbancia nos sucesivos espectros. De forma análoga ó que sucedía no caso da oxidación do capsiato obsérvanse, cambios de menor rango provocados previsiblemente por procesos de oxidación non enzimática ou autoxeración de peróxido por parte da peroxidasa.

Para calcular o coeficiente de extinción da reacción de oxidación do dihidrocapsiato seguíuse o curso da mesma durante 2 h, ao cabo do cal xa non se producía ningún cambio significativo nos valores de absorbancia. O coeficiente de extinción aparente para a reacción calculouse a través da seguinte ecuación:

$$\epsilon_{235} = \frac{A_{235}^I - A_{235}^F}{[S]}$$

Onde  $A_{235}^I$  é a absorbancia inicial e  $A_{235}^F$  é a absorbancia final dos medios de reacción a 235 nm. Sendo [S] a concentración de dihidrocapsiato usada no medio de reacción, concretamente 0,27 mM. O valor obtido para o coeficiente de extinción molar da reacción proporcionase na táboa 3.



**Figura 5.** (A) Espectros consecutivos da oxidación do dihidrocapsiato pola peroxidasa de *C. annuum*. O medio de reacción estaba composto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, dihidrocapsiato 0,27 mM e peroxidasa de *C. annuum* en presenza de tampón fosfato pH 5,5. Os rexistros realizáronse con intervalos de 3 min. A frecha indica a dirección dos cambios espectrais. (B) Control en ausencia da peroxidasa. (C) Control en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Os valores obtidos para os coeficientes de extinción molar do capsiato e do dihidrocapsiato para a reaccións de oxidación, móstranse na táboa 3.

**Táboa 3.** Coeficientes de extinción calculados para o capsiato e o dihidrocapsiato nas súas correspondentes reaccións de oxidación, catalizadas pola peroxidasa

<b>Coeficientes de extinción (<math>\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}</math>) (<math>\lambda</math>)</b>	
<b>Capsiato</b>	0,27 (230 nm)
<b>Dihidrocapsiato</b>	0,22 (235 nm)

Estes coeficientes de extinción usaranse a continuación na determinación da velocidade de oxidación do capsiato e o dihidrocapsiato pola peroxidasa de *C. annum*, así como a caracterización das súas cinéticas.

#### *Comprobación da natureza peroxidasa das reacción mediante o uso de inhibidores*

O estudo do efecto dos distintos inhibidores sobre a actividade peroxidasa na oxidación dos capsinoides fíxose para confirmar o papel deste enzima como mediadora da oxidación destes compostos. Os inhibidores utilizados foron o ácido ferúlico, a tropolona, o ferricianuro potásico e o ferrocianuro potásico.

#### *Ácido ferúlico vs tropolona*

No primeiro caso, utilizamos como inhibidor ao ácido ferúlico. Este composto mostra unha afinidade moi alta pola peroxidasa, reaccionando con composto II do enzima, tratándose dun dos seus mellores substratos e a súa vez, presenta unha gran capacidade de acomodarse no centro activo do enzima. Estas características fan ao ácido ferúlico un dos mellores inhibidores competitivos da peroxidasa, provocando no noso caso unha inhibición total da actividade peroxidasa (Táboa 4). Ademais, o ácido ferúlico a esta concentración de 1,0 mM non ten efecto sobre as polifenoloxidasas de tipo lacasa (Ranocha *et al.*, 1999). Polo tanto, os resultados obtidos descartan a actividade lacasa como o enzima responsable da oxidación dos capsinoides. Aínda así, o ácido ferúlico é un importante inhibidor da actividade enzimática das polifenoloxidasas de tipo catecolasa (Richardson *et al.*, 1997). Por este motivo, o uso do ácido ferúlico non nos permite discernir entre a peroxidasa e as catecolasas o que fai necesario o uso doutro inhibidor para distinguir entre estes dous tipos de enzimas.

A continuación, para discriminar entre as polifenoloxidasas de tipo catecolasas e as peroxidasas, utilizamos a tropolona. A tropolona é un inhibidor selectivo das actividades de tipo catecol-oxidasa (Savidge & Udagama-Randeniya, 1992), que non

ten efecto conocido sobre as peroxidases. O efecto da tropolona sobre a oxidación dos capsinoides pola peroxidasa de *C. annuum* móstrase na táboa 4. A tropolona non mostra inhibición a unha concentración de 1,0 mM, aparecendo incluso un efecto activador. O feito de que a actividade peroxidasa non se vexa afectada pola presenza de tropolona na oxidación dos capsinoides descarta as polifenoloxidasas de tipo catecolasa como as responsables desta actividade e apoia o posible papel das peroxidases como responsables da oxidación destes compostos.

#### *Ferrocianuro potásico vs ferricianuro potásico*

Para confirmar seguidamente o papel da peroxidasa como responsable da oxidación dos capsinoides pola peroxidasa de *C. annuum*, utilizouse o ferrocianuro potásico ( $K_4Fe[CN]_6$ ), como inhibidor competitivo do enzima. O ferrocianuro potásico é un bo substrato da peroxidasa, sobre todo do composto I (Henriksen *et al.*, 1999). Na táboa 4, móstrase o efecto do ferrocianuro potásico sobre a oxidación dos capsinoides pola peroxidasa de *C. annuum*. Igualmente, probamos como inhibidor da peroxidasa ao ferricianuro potásico ( $K_3Fe[CN]_6$ ), análogo do ferrocianuro potásico e non inhibidor do enzima. O seu uso permítenos determinar si o efecto observado ao usar o ferrocianuro potásico é debido á súa natureza como substrato da peroxidasa, ou ben debido a efectos colaterais provocados polos complexos de tipo cianuro-ferro sobre as metaloproteínas. Os efectos do ferrocianuro potásico e do ferricianuro potásico sobre a oxidación dos capsinoides pola peroxidasa móstranse na táboa 4. Como se pode observar, na táboa dada o ferrocianuro potásico a concentracións de 1,0 mM provoca a inhibición total da actividade enzimática, mentres que co ferricianuro potásico non hai efecto. Este resultado, permítenos concluír que o efecto do ferrocianuro potásico sobre a oxidación dos capsinoides é debido a unha inhibición de tipo competitiva, actuando o ferrocianuro como substrato preferente ante os capsinoides.

**Táboa 4.** Inhibidores da peroxidasa e o seu efecto sobre a oxidación dos capsinoides, capsiato e dihidrocapsiato, pola peroxidasa de *Capsicum annuum* L.

	<b>Actividade peroxidasa (nmoles s<sup>-1</sup>)</b>	
	<b>Capsiato</b>	<b>Dihidrocapsiato</b>
<b>Control</b>	1,61 ± 0,39	1,53 ± 0,80
<b>Ácido ferúlico</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Tropolona</b>	2,69 ± 0,68	7,67 ± 0,64
<b>Ferrocianuro potásico (<math>K_4Fe[CN]_6</math>)</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Ferricianuro potásico (<math>K_3Fe[CN]_6</math>)</b>	1,55 ± 0,57	1,80 ± 2,55

### *Cinéticas da oxidación do capsiato e dihidrocapsiato*

Unha vez calculados os coeficientes de extinción para as reaccións de oxidación do capsiato e do dihidrocapsiato e definir a peroxidasa como enzima mediadora da oxidación a través dos inhibidores, estudamos a capacidade da peroxidasa de *C. annuum* de oxidar os capsinoides xa nomeados. Os resultados móstranse na táboa 5.

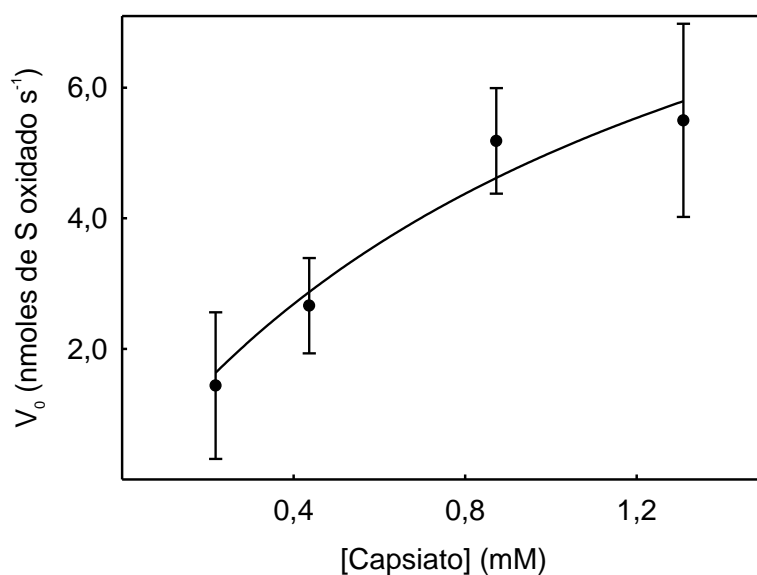
**Táboa 5.** Velocidades de oxidación do capsiato e do dihidrocapsiato pola peroxidasa de *C. annuum*. O medio de reacción estaba composto por tampón fosfato 5,5 pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, 1,31 mM de capsiato ou 1,36 mM de dihidrocapsiato e peroxidasa de *C. annuum*. Os datos son a media ± SE (n=3).

<b>nmoles de substrato oxidado s<sup>-1</sup></b>	
<b>Capsiato</b>	5,50 ± 1,48
<b>Dihidrocapsiato</b>	3,46 ± 0,32

Como se pode ver na táboa, a peroxidasa de *C. annuum* é capaz de oxidar aos dous substratos. Ademais, os datos da táboa 5, permítenos concluír que a peroxidasa de *C. annuum* mostra, en presenza de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, unha actividade catalítica diferencial fronte a cada substrato, oxidando maiormente ao capsiato fronte ao dihidrocapsiato

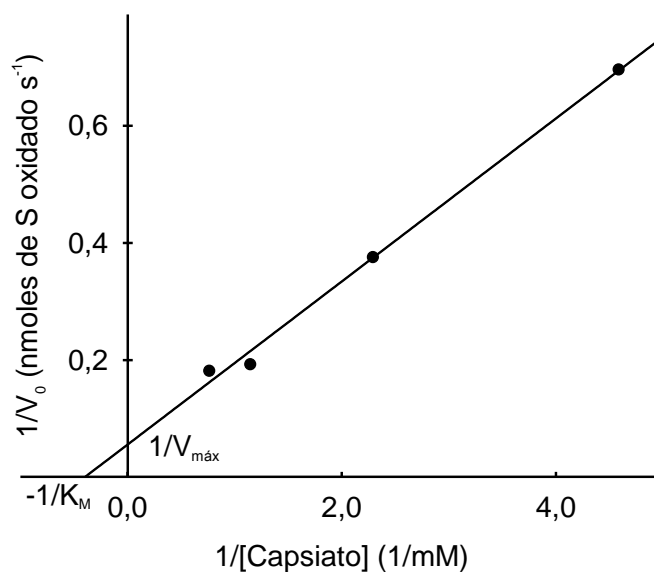
#### *- Cinética da oxidación do capsiato*

Para a análise das características cinéticas da reacción de oxidación do capsiato pola peroxidasa, efectuáronse curvas de saturación medindo a dependencia da velocidade de oxidación da concentración de capsiato. Como se pode ver na figura 6, a oxidación do capsiato pola peroxidasa de *C. annuum* mostrou unha cinética de tipo hiperbólica ( $R^2 = 0,96$ ) fronte a concentración do capsinoide. Isto permítenos axustar os datos a unha ecuación de Michaelis-Menten a baixas concentracións de substrato, presentando inhibicións a altas concentracións de capsiato (datos xa non mostrados no gráfico).



**Figura 6.** Dependência da velocidade de oxidação do capsaiato da concentração de substrato pela peroxidase de *C. annuum*. O meio de reação estava composto por peroxidase de *C. annuum*,  $H_2O_2$  0,5 mM e capsaiato 0,22 mM, 0,44 mM, 0,87 mM, 1,31 mM, em tampón fosfato pH 5,5.

A representação de dobres recíprocos de Lineweaver-Burk ( $1/v$  frente a  $1/[capsaiato]$ ) permitiunos calcular os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_M$ . Como se pode apreciar na gráfica (Figura 7), vese unha dependencia lineal ( $R^2= 0,99$ ) que está de acordo co modelo cinético antes proposto.

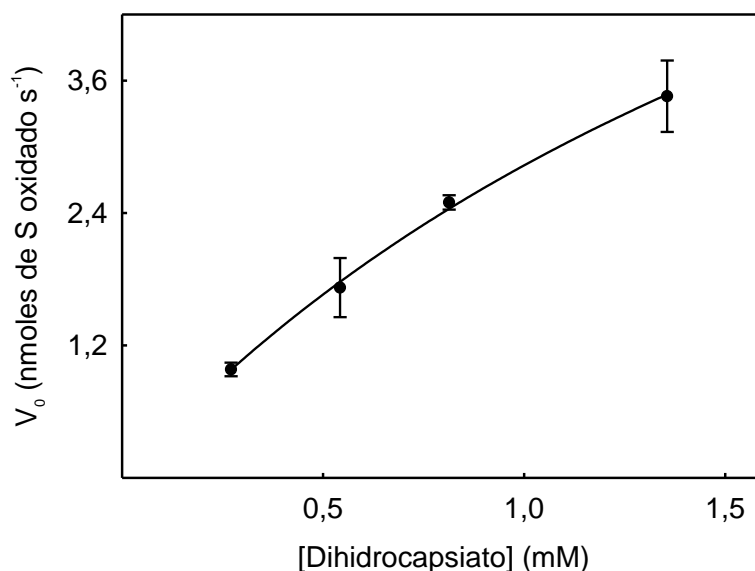


**Figura 7.** Representación de dobres recíprocos de Lineweaver-Burk ( $1/v$  frente a  $1/[capsaiato]$ ), onde podemos coñecer os valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_M$ .

- *Cinética da oxidación do dihidrocapsiato*

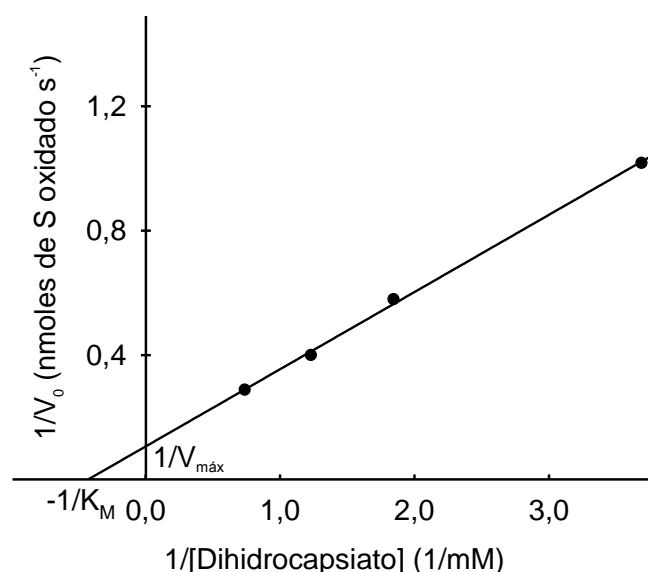
Para a análise das características cinéticas da reacción de oxidación do dihidrocapsiato pola peroxidasa, efectuáronse curvas de saturación medindo a dependencia da velocidade de oxidación da concentración de dihidrocapsiato.

Na figura 8, pódese ver como a oxidación do dihidrocapsiato pola peroxidasa de *C. annum* mostrou unha cinética de tipo hiperbólico ( $R^2 = 0,99$ ) fronte a concentración de dihidrocapsiato, polo que pode ser axustada a unha ecuación de Michaelis-Menten a baixas concentracións de substrato e presentando inhibición a altas concentracións de dihidrocapsiato (datos xa non mostrados no gráfico).



**Figura 8.** Dependencia da velocidade de oxidación do dihidrocapsiato da concentración de substrato pola peroxidasa de *C. annum*. O medio de reacción estaba composto por peroxidasa de *C. annum*,  $H_2O_2$  0,5 mM e dihidrocapsiato 0,27 mM, 0,54 mM, 0,81 mM, 1,36 mM, en tampón fosfato pH 5,5.

Como xa fixemos antes no caso do capsiao, a representación dos dobres recíprocos de Lineweaver-Burk ( $1/v$  fronte a  $1/[dihidrocapsiao]$ ) permitiunos calcular os valores de  $V_{máx}$  e  $K_M$  para cada unha das concentracións de dihidrocapsiao ensaiadas. Como se pode apreciar na gráfica (Figura 9), vese unha dependencia lineal ( $R^2 = 0,99$ ) que está de acordo co modelo cinético antes proposto.



**Figura 9.** Representación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk ( $1/v$  fronte a  $1/[\text{dihidrocapsiato}]$ ), onde podemos coñecer os valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$ .

#### *Afinidade e reactividade da peroxidasa de *Capsicum annuum* L. polo capsiato e dihidrocapsiato*

Os valores aparentes de  $K_M$  para os capsinoides, capsiato e dihidrocapsiato, móstranse na táboa 6. A peroxidasa mostra unha afinidade maior polo capsiato fronte ao dihidrocapsiato.

**Táboa 6.** Valores de  $K_M$  para os capsinoides capsiato e dihidrocapsiato durante a súa oxidación pola peroxidasa de *C. annuum* a pH 5,5 e a unha concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 0,5 mM

Substrato	$K_M$
Capsiato	$1,36 \pm 0,83$
Dihidrocapsiato	$2,39 \pm 0,36$

Estes valores poderíanse comparar cos valores acadados polos análogos capsaicinoides en canto os seus valores  $K_M$  ou con outras  $K_M$  de outros compostos, aínda que existen poucas  $K_M$  calculadas para oxidacións catalizadas polas peroxidases polo seu característico ciclo catalítico. Porén, Bernal *et al.* (1994) definiu  $K_M$  da peroxidasa de *C. annuum* para precursores fenólicos da capsaicina, como a vanilina ou o ácido ferúlico, con valores de 0,98 mM e 0,18 mM, respectivamente. Polo tanto, en comparación a afinidade do enzima é menor nos capsinoides que nestes compostos.

Na táboa 7 móstranse os valores da relación  $V_{m\acute{a}x}/K_M$  para cada un dos substratos. Esta relación danos unha medida da reactividade do enzima fronte aos distintos substratos, e ademais mantén unha relación directa co valor da  $K_3$ , constante cinética do último paso do ciclo catalítico da oxidación mediada pola peroxidasa (Figura 2), que segundo o modelo cinético caracterizado por Pomar *et al.* (1997) segue a relación seguinte:

$$\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_m} = 2[E]K_3$$

A constante microscópica  $K_3$  é unha medida directa da reactividade do composto II cos substratos capsinoides. Como se pode ver na táboa, a peroxidasa de *C. annuum* presenta, en presenza de peróxido de hidróxeno, unha maior reactividade fronte ao capsiato que fronte ao dihidrocapsiato. O capsiato presenta case o dobre de reactividade que o dihidrocapsiato.

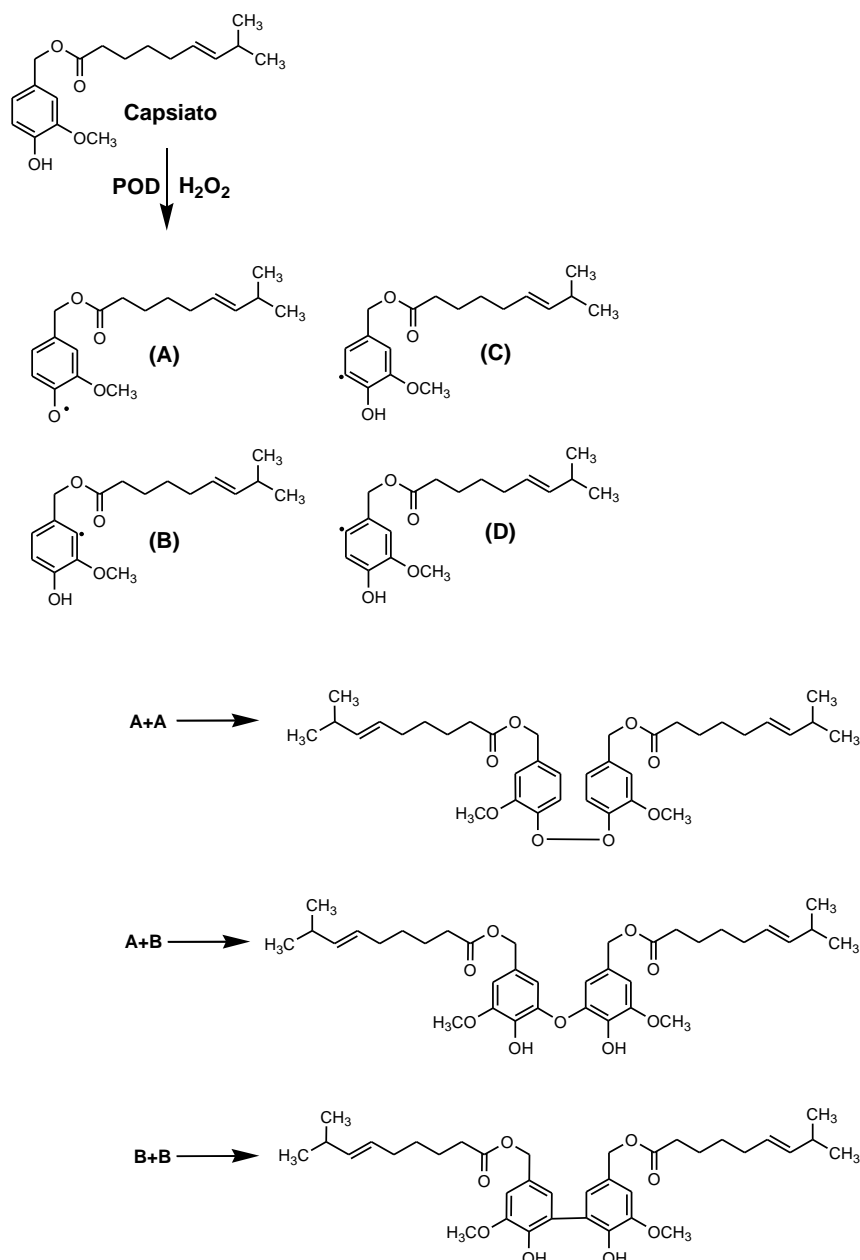
**Táboa 7.** Valores da relación  $V_{m\acute{a}x}/K_M$  para os capsinoides, capsiato e dihidrocapsiato, durante a súa oxidación pola peroxidasa de *C. annuum* a pH 5,5 e a unha concentración de  $H_2O_2$  de 0,5 mM

<b>Substrato</b>	<b><math>V_{m\acute{a}x}/K_M</math> (<math>\propto K_3</math>)</b>
<b>Capsiato</b>	8,690
<b>Dihidrocapsiato</b>	4,020

### *Proposta de oxidación*

Chegados a este punto é necesario establecer, xa que outro dos nosos obxectivos é caracterizar os produtos da oxidación dos capsinoides, cales serían os posibles compostos que se formarían na catálise do capsiato e dihidrocapsiato mediado pola peroxidasa de *C. annuum*. Collendo ao capsiato como modelo e como xa indicamos, a peroxidasa oxidaría aos residuos do ciclo aromático que conforma o alcol vaníllico. Tras esta oxidación hai varias propostas de radicais e dímeros que se poderían formar (Figura 10). O primeiro radical (Figura 10, A) formaríase pola oxidación do grupo hidroxilo do C4 do grupo aromático. Outra oxidación podería ocorrer no carbono 2' (Figura 10, B), outro no carbono 5' (Figura 10, C) e por último no carbono 6' (Figura 10, D). Estes radicais son altamente inestables e desaparecerían captando de novo electróns do medio ou poden conxugarse e formar dímeros de capsiato. Un deses dímeros podería formarse ao establecerse un enlace peroxidativo entre dous radicais A (Figura 10, A+A). Este tipo de enlace é moi inestable, polo que case está descartada a súa detección. Tamén entre o radical A mais o B, dando lugar ao 4'-O-5-dicapsiato

(Figura 10, A+B) ou entre o radical B mais outro radical B, orixinándose 5-5'-dicapsiato (Figura 10, B+B). Os radicais C e D terían problemas estéricos para formar dímeros xa que os radicais estarían oxidados nunha zona moi preto da cadea lateral. Polo tanto, e tendo en conta o que se coñece sobre a oxidación da capsaicina (Díaz *et al.*, 2004), os produtos de oxidación máis probables de ser detectados son os dímeros A+B: 4'-O-5-dicapsiato, en o dímero B+B: 5-5'-dicapsiato. De forma análoga sucedería na oxidación do dihidrocapsiato.

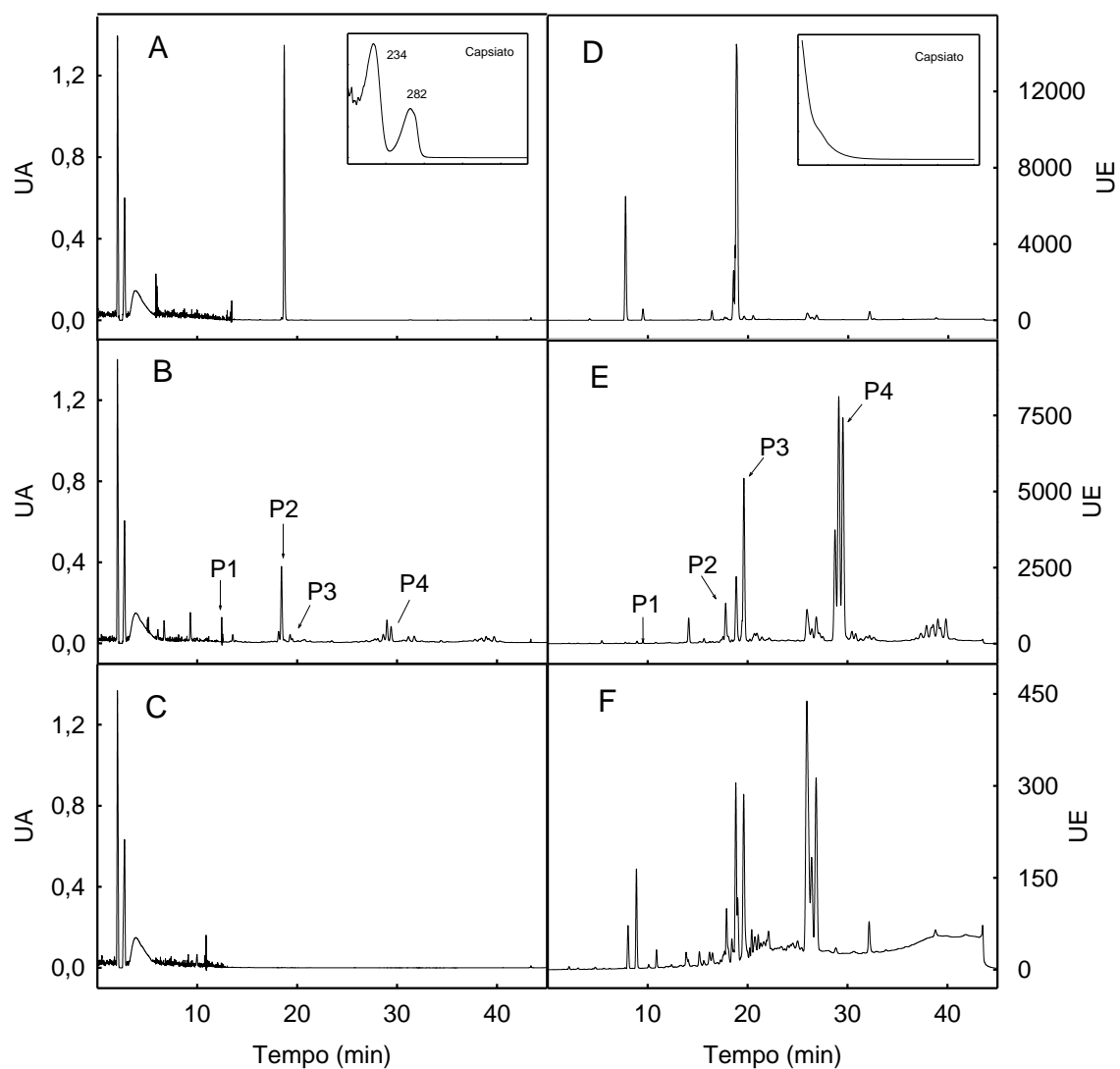


**Figura 10.** Proposta de radicais e dímeros de capsiao tras a súa oxidación pola peroxidasa básica de *C. annuum*. (A+A) Dímeros formado polo enlace peroxidativo entre dous radicais A; (A+B) 4'-O-5-dicapsiato; (B+B) 5-5'-dicapsiato.



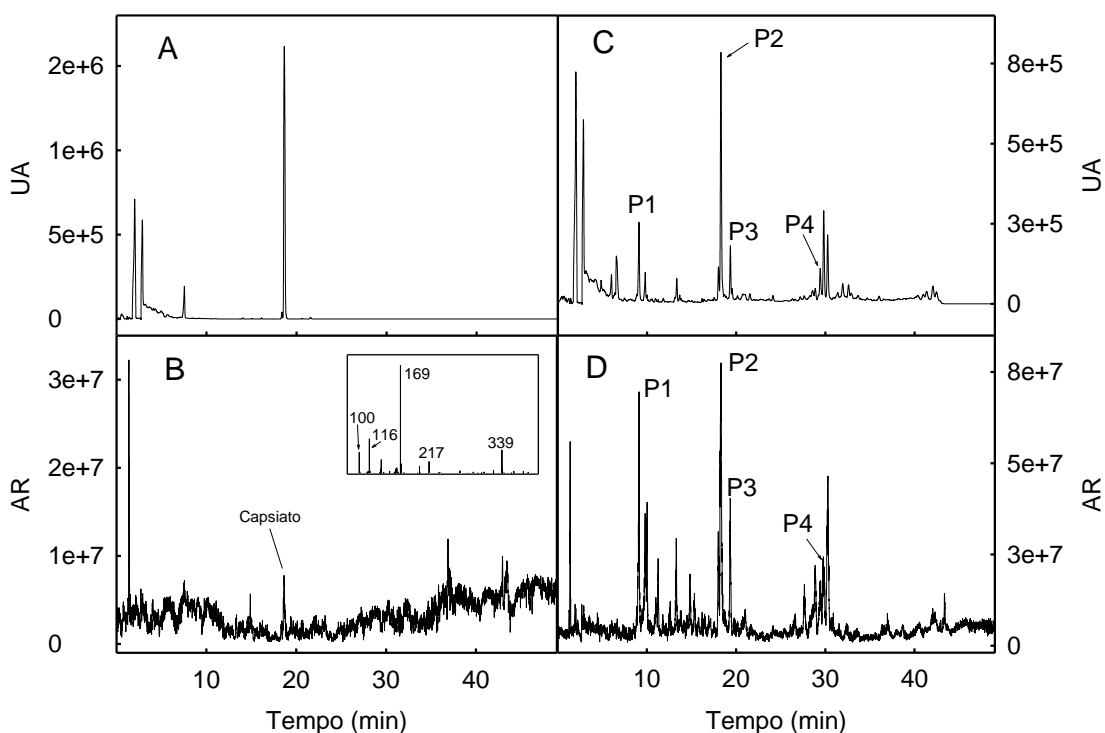
### *Caracterización dos produtos de oxidación do capsiato*

Como último paso neste traballo, tratamos de analizar espectralmente os produtos de oxidación xerados pola oxidación do capsiato a través da peroxidasa básica de *C. annuum*. Para lograr isto, realizamos unha oxidación de capsiato masiva e obtivemos os produtos da reacción mediante unha partición con solventes orgánicos. A continuación, analizamos a través do HPLC, varias solucións que contiñan o capsiato sintetizado quimicamente na Universidade de Cádiz, os posibles produtos de oxidación do capsiato mediado pola peroxidasa de *C. annuum* e o medio de reacción sen capsiao como control. Para cada mostra recolleuse o cromatograma proporcionado polo detector de fotodiodos (PDA) e o cromatograma de fluorescencia. Os datos móstranse na figura 11. O apartado A e D (Figura 11), mostran o cromatograma de PDA e de fluorescencia do capsiao, respectivamente. En ambos aparece a súa vez, o espectro de absorción e emisión do pico maioritario. Os seguintes apartados, o B e E da figura 11, expoñen os cromatogramas de PDA e fluorescencia dos produtos de oxidación do capsiao pola peroxidasa. Aquí ademais, se sinalan os picos de máximos seleccionados para o súa posterior análise. Estes picos revélanse a distintos tempos en minutos nos dous cromatogramas, sendo en PDA os picos P1, tendo un tempo de retención de 9,32 min, P2, cun tempo de retención de 18,43 min, P3, aos 19,30 min e P4 aos 29,30 min. De mesmo xeito no cromatograma de fluorescencia (Figura 11, E) tamén se mostran estes picos, aínda que o tempo varía un pouco pola separación espacial entre os detectores sendo a diferenza de tempo o que tarda o composto en pasar dun detector ao outro. Os últimos apartados da figura 11, C e F, son o cromatograma do medio de reacción utilizándoo como control das mostras anteriores. Neste caso, non se observan picos importantes que aparezan tamén nos medios de reacción.



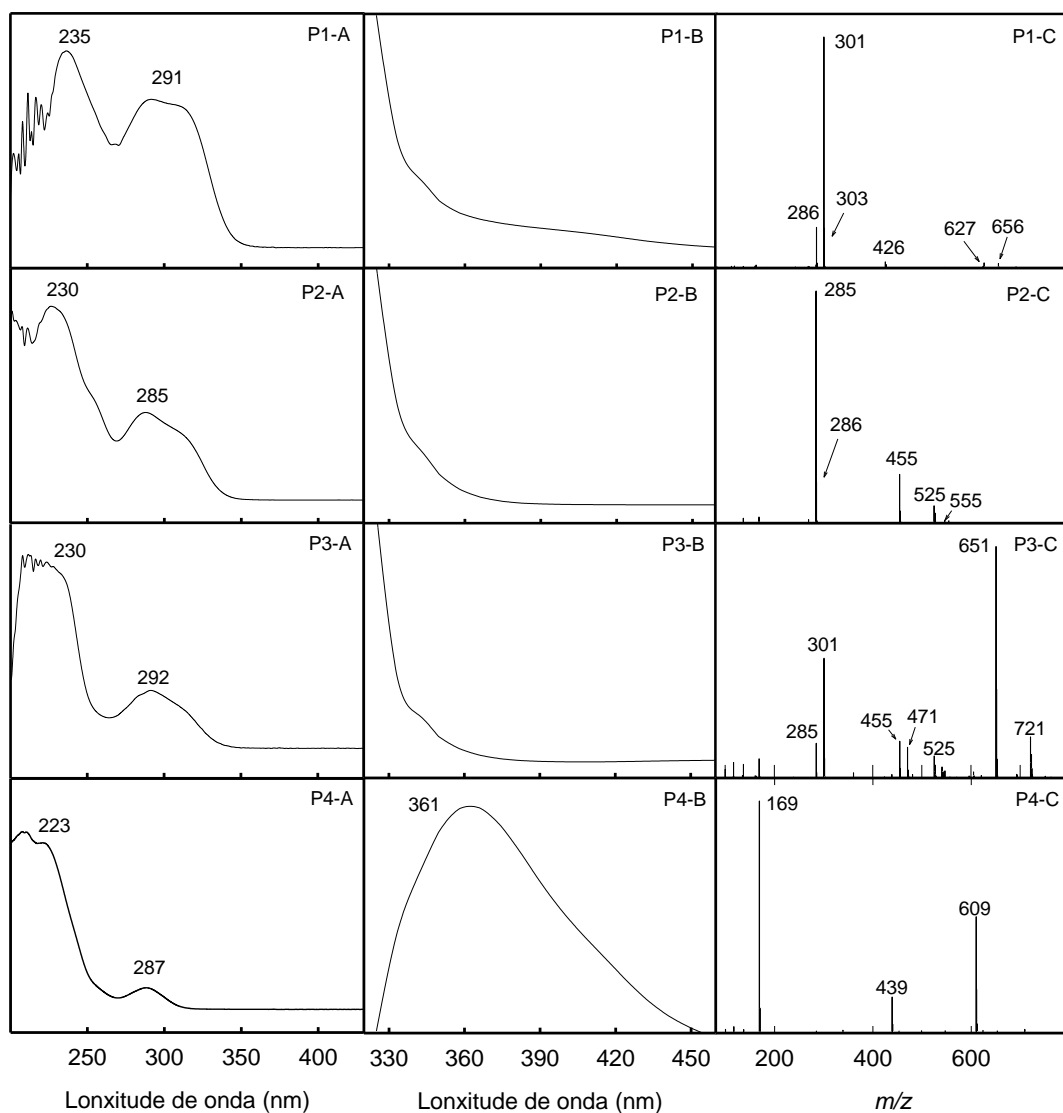
**Figura 11.** Análise cromatográfica do capsiato, dos produtos de oxidação do capsiato pola peroxidasa *C. annuum* e o medio de reacción polo HPLC (A) Cromatograma do fotodiodo UV-V (PDA) co espectro de absorción do capsiato. (B) Cromatograma de PDA dos produtos de oxidación do capsiato pola peroxidasa de *C. annuum* cos picos seleccionados P1 (9,32 min), P2 (18,43 min), P3 (19,30 min) e P4 (29,40 min). (C) Cromatograma de PDA do medio de reacción como control. (D) Cromatograma de fluorescencia do capsiato co espectro de absorción do capsiato. (E) Cromatograma de fluorescencia dos produtos de oxidación do capsiato pola peroxidasa de *C. annuum* e os picos seleccionados (P1, P2, P3 e P4). (F) Cromatograma de fluorescencia do medio de reacción como control. UA indica unidades de absorbancia e UE unidades de emisión

Para continuar a caracterización espectral dos produtos de oxidación fixemos unha análise por medio dun HPLC acoplado a un detector PDA e a un espectrómetro de masas (Orbitrap). A ionización dos compostos realizouse tanto por ionización positiva como por ionización negativa. Mostramos os resultados obtidos trala ionización negativa xa que na positiva a maior parte dos produtos de oxidación non ionizaron. Os resultados do capsiato e dos produtos de oxidación deste pola peroxidasa móstranse na figura 12. Nesta figura, o apartado A é o cromatograma de PDA do capsiato. A súa vez, o apartado B mostra o cromatograma de ións totais do capsiato e o seu espectro de masas xerado a partir dos datos obtidos polo Orbitrap. Os apartados C e D da figura 12, están referidos aos produtos de oxidación do capsiato. En ambos se sinala os picos P1, P2, P3 e P4 anteriormente citados e que se corresponden cos tempos de retención anteriores (P1, 9,32 min, P2, 18,43 min, P3, 19,30 min e P4, 29,40 min).



**Figura 12.** Cromatogramas de PDA e TIC para o capsiato e os produtos de oxidación do capsiato pola peroxidasa de *C. annuum* polo espectro de masas (Orbitrap). (A) Cromatograma de PDA do capsiato. (B) Cromatograma de TIC do capsiato, situado na esquina superior dereita o espectro de masas do composto. (C) Cromatograma de PDA dos produtos de oxidación do capsiato xerados pola oxidación da peroxidasa. (D) Cromatograma de TIC dos produtos de oxidación do capsiato. No cromatograma C e D sinálanse os picos seleccionados P1 (9,32 min), P2 (18,43 min), P3 (19,30) e P4 (29,40 min). UA indica unidades de absorbancia y AR abundancia relativa.

Finalmente, unha vez seleccionados os picos P1, P2, P3 e P4 polas análises anteriores dos produtos de oxidación do capsaiato pola acción da peroxidasa básica de *C. annum*, pasamos a definir as características espectrais de cada pico. Os resultados acadados axudarannos a caracterizar os picos e ver se se poderían tratar dalgún dos produtos de oxidación esperados. Os resultados móstranse na figura 13. De cada pico, proporciónase os espectros de absorción de PDA (A), os espectros de fluorescencia (B) e os espectros de masas (C). Comparando os distintos picos, pódese observar que todos teñen un espectro de absorción de PDA similar, con valores de máximos parecidos. O mesmo ocorre no caso dos espectros de fluorescencia, menos co pico 4 (P4-B) cun espectro indicando un máximo claro de fluorescencia a 361 nm. No caso dos espectros obtidos co detector de masas, hai que destacar o pico 4 (P4-C) no que hai un máximo claro a 609,34 m/z, que se corresponde moi fielmente ca masa do dímero de capsaiato, 5-5'-dicapsaiato (Figura 13, B+B), cunha masa de 610,35, que en ionización negativa (que é que usamos nós), aparecería hipotéticamente no detector cun ión molecular de 609,35 m/z Debido a gran exactitude do equipo que utilizamos como espectro de masas (Orbitrap), isto dannos un camiño para crer a posibilidade de que sexa ese composto e non outro. Aínda así, se necesitan continuar mellorando o método de análise para comprobar este feito. Debido a orixinalidade deste estudo, non hai datos para relacionar nin discutir estes datos que obtivemos.



**Figura 13.** Espectros de absorción de PDA (A), de fluorescencia (B) e de masas (C) dos picos seleccionados P1 (9,32 min), P2 (18,43 min), P3 (19,30 min) e P4 (29,40 min). A relación  $m/z$  indica masa/carga

*Análise da presenza de capsinoides e de produtos de oxidación do capsiato oxidados pola peroxidasa de *C. annuum* en froitos maduros de variedades galegas*

Analizamos a presenza dos capsinoides, preferentemente o capsiato, e os produtos de oxidación deste composto mediada pola peroxidasa de *C. annuum* nos froitos maduros de diferentes variedades de pemento galego. A través da obtención de extractos dos distintos pementos e o súa análise por HPLC, intentamos determinar se aparecía algún indicio da presenza destes compostos. Comparando os cromatogramas de PDA e de fluorescencia de cada variedade de pemento non atopamos ningún pico que nos fixera pensar que existisen estes compostos nas distintas mostras.

## Conclusións

Dados os resultados obtidos neste estudo, chegamos as seguintes conclusións:

- As peroxidases básicas de *Capsicum annuum* L. oxidan eficientemente aos capsinoides, concretamente ao capsiato e ao dihidrocapsiato, compoñentes maioritarios destes compostos no pemento (*C. annuum*). A súa vez, o ensaio de inhibición da peroxidasa asigna a actividade catalítica observada ás peroxidases de secreción vexetais.
- Á vista dos resultados obtidos no estudo da cinética da peroxidasa básica de *C. annuum* de  $K_M$  e de  $V_{máx}$ , pódese concluír que presentan unha maior afinidade e reactividade fronte ao capsiato que ao dihidrocapsiato.
- Obtívose unha caracterización espectral usando detectores de díodos, de fluorescencia y de masas para catro posibles produtos de oxidación do capsiato mediado pola peroxidasa básica de *C. annuum*. Os datos obtidos dun deles, da un espectro de masas que podería ser compatible co dímero 5-5'-dicapsiato, pola súa masa semellante.
- Comprobouse cal das variedades de pemento galego (*C. annuum* L.) podería presentar os produtos de oxidación do capsiato mediado pola peroxidasa básica de pemento, véndose a ausencia deles en cada unha destas.

## Bibliografía

Adams, M. J., Ahuja, K. D. K. & Geraghty, D. P. (2009) Effect of capsaicin and dihydrocapsaicin on in vitro blood coagulation and platelet aggregation. *Thrombosis Research*, 124: 721-723.

Barbero, G.F., Molinillo, M.G., Varela, R.M., Palma, M., Macas, F.A. & Barroso, C.G. (2010) Application of Hansch's model to capsaicinoids and capsinoids: a study using the quantitative structure-activity relationship, a novel method for the synthesis of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 3342-3349.

Bennett, D. J. & Kirby, G. W. (1968) Constitution and biosynthesis of capsaicin. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, 442-446.

Bernal, M. A. & Barceló, A. R. (1996) 5, 5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-dicapsaicin ether, and dehydrogenation polymers with high molecular weights are the main products of the oxidation of capsaicin by peroxidase from hot pepper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3085-3089.

Bernal, M. A., Calderon, A. A., Ferrer, M. A., Merino de Cáceres, F. & Ros Barceló, A. (1994) Oxidation of capsaicin and capsaicin phenolic precursors by the basic peroxidase isoenzyme B6 from hot pepper. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 352-355.

Bernal, M. A., Calderon, A. A., Pedreno, M. A., Munoz, R., Ros Barceló, A. & Merino de Cáceres, F. (1993a) Capsaicin oxidation by peroxidase from *Capsicum annuum* (variety *annuum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1041-1044.

Bernal, M. A., Calderón, A. A., Pedreño, M. A., Muñoz, R., Barceló, R. & Cáceres, F. M. (1993b) Dihydrocapsaicin oxidation by *Capsicum annuum* (var. *annuum*) peroxidase. *Journal of Food Science*, 58: 611-613.

Bernard, B.K., Tsubuku, S., Kayahara, T., Maeda, K., Hamada, M., Nakamura, T., Shirai, Y., Nakayama, A., Ueno, S. & Mihara, R. (2008) Studies of the toxicological potential of capsinoids: Safety assessment and pharmacokinetics of capsinoids in healthy male volunteers after a single oral ingestion of CH-19 Sweet extract. *International Journal of Toxicology*, 27: 137-147

Calderón, A.A., Zapata, J.M., Muñoz, R. & Ros Barceló, A. (1993) Localization of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Horticultural Science*, 28: 38-40.

Chance, B. (1952). The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 41: 416-424.

Cichewicz, R.H. & Thorpe, P.A. (1996) The antimicrobial properties of Chile peppers (*Capsicum* spp.) and their uses in the Mayan medicine. *Journal Ethnopharmacology*, 52: 61-70.



- Cortright, D.N. & Szallasi, A. (2009) TRP channels and pain. *Current Pharmaceutical Desing*, 15: 1736-1749.
- Cowan, M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
- Crevecoeur, M., Pinedo, M., Greppin, H. & Penel, C. (1997) Peroxidase activity in shoot apical meristem from *Spinacia*. *Acta Histochemica*, 99: 177-186.
- Davis, C.B., Markey, C.E., Busch, M.A. & Busch, K.W. (2007) Determination of capsaicinoids in habanero peppers by chemometric analysis of UV spectral data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 5925-5933.
- Díaz, J., Pomar, F., Bernal, A. & Merino, F. (2004). Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annum* L. *Phytochemistry Reviews*, 3: 141-157.
- Eisenstadt, M. A. & Bogolitsyn, K. G. (2010) Peroxidase oxidation of lignin and its model compounds. *Russian Journal of Bioorganic chemistry*, 36: 802-815.
- Fernández, G. (2007) Tese Doutoral: Extracción, análisis, estabilidad y síntesis de capsaicinoides. Departamento de Química Análítica, Universidad de Cádiz, España.
- Fraenkel, L., Bogardus Jr., S.T., Concato, J. & Wittink, D.R. (2004) Treatment options in knee osteoarthritis: the patient's perspective. *Archives of Internal Medicine*, 164: 1299-1304.
- Fujiwake, H., Suzuki, T. & Iwai, K. (1980) Intracellular-localization of capsaicin and its analogs in capsicum fruit .2. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of *Capsicum* fruit. *Plant and Cell Physiology*, 21: 1023-1030.
- Harada, N. & Okajima, K. (2009) Effects of Capsaicin and Isoflavone on Blood Pressure and Serum Levels of Insulin-Like Growth Factor-I in Normotensive and Hypertensive Volunteers with Alopecia. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73: 1456-1459.
- Haard, N. F. & Tobin, C. L. (1971) Patterns of soluble peroxidase in ripening banana fruit. *Journal of Food Science*, 36: 854-857.
- Heiser, C.B. (1973) Seed to Civilization: The Story of Man's Food. San Francisco, California, USA.
- Henderson, D. E. & Henderson, S. K. (1992) Thermal-decomposition of capsaicin .1. interactions with oleic-acid at high-temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 2263-2268.
- Henderson, D. E., Slickman, A. M. & Henderson, S. K. (1999) Quantitative HPLC determination of the antioxidant activity of capsaicin on the formation of lipid hydroperoxides of linoleic acid: A comparative study against BHT and melatonin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 2563-2570.

Henriksen, A., Smith, A. T. & Gajhede, M. (1999) The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 35005-35011.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi, Matsui H. (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiology*, 42: 462-468.

Iida, T., Moriyama, T., Kobata, K., Morita, A., Murayama, N., Hashizume, S., Fushiki, T., Yazawa, S., Watanabe, T. & Tominaga, M. (2003) TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology*, 44: 3345-3349.

Ito, K., Nakazato, T., Yamato, K., Miyakawa, Y., Yamada, T., Hozumi, N., Segawa, K., Ikeda, Y. & Kizaki, M. (2004) Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: Implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by reactive oxygen species. *Cancer Research*, 64: 1071-1078.

Iwai, K., Suzuki, T. & Fujiwake, H. (1979) Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. *Agricultural and Biological Chemistry*, 43.

Joo, J. I., Kim, D. H., Choi, J.-W. & Yun, J. W. (2010) Proteomic Analysis for Antiobesity Potential of Capsaicin on White Adipose Tissue in Rats Fed with a High Fat Diet. *Journal of Proteome Research*, 9: 2977-2987.

Kawabata, F., Inoue, N., Yazawa, S., Kawada, T., Inoue, K. & Fushiki, T. (2006) Effects of CH-19 sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, in decreasing the body weight and suppressing body fat accumulation by sympathetic nerve activation in humans. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70: 2824-2835.

Kissin, I. (2008) Vanilloid-induced conduction analgesia: Selective, dose-dependent, long-lasting, with a low level of potential neurotoxicity. *Anesthesia and Analgesia*, 107: 271-281.

Kirschbaum-Titze, P., Hiepler, C., Mueller-Seitz, E. & Petz, M. (2002) Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1260-1263.

Kobata, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K. & Watanabe, T. (1998) Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 1695-1697.

Lee, Y., Howard, L.R. & Villalon, B. (1995) Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *Journal Food Science*, 60: 473-476.

Li, Y. J. & Peng, J. (2002) The cardioprotection of calcitonin gene-related peptide-mediated preconditioning. *European Journal of Pharmacology*, 442: 173-177.

- Luo, X.-J., Peng, J. & Li, Y.-J. (2011) Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*, 650: 1-7.
- Macho, A., Sancho, R., Minassi, A., Appendino, G., Lawen, A. & Munoz, E. (2003) Involvement of reactive oxygen species in capsaicinoid-induced apoptosis in transformed cells. *Free Radical Research*, 37: 611-619.
- Martínez, T. (2013) Tese Doutoral: Estudio y purificación de peroxidasas implicadas en la lignificación de plantas basales. Departamento de Biología Celular e Molecular, Universidade da Coruña, España.
- Mosquera, M.I.M. & Mendez, D.H. (1994) Formation and transformation of pigments during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola and Agriculce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 38-44.
- Murakami, K., Ito, M., Htay, H. H., Tsubouchi, R. & Yoshino, M. (2001) Antioxidant effect of capsaicinoids on the metal-catalyzed lipid peroxidation. *Biomedical Research-Tokyo*, 22: 15-17.
- Nadeem, M., Muhammad Anjum, F., Rafiq Khan, M., Saeed, M. & Riaz, A. (2011) Antioxidant Potential of Bell Pepper (*Capsicum annum* L.) a Review. *Pakistan Journal of Food Science*, 21: 45-51.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss knife army. *Plant Cell Reports*, 24: 255-265.
- Pedreño, M.A., Bernal, M.A., Calderón, A.A., Ferrer, M.A., López-Serrano, M., Merino de Cáceres, F., Muñoz, R. & Ros Barceló, A. (1993) A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in Vitaceae, Solanaceae y Leguminosae. *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, 307-314.
- Peng, J. & Li, Y.-J. (2010) The vanilloid receptor TRPV1: Role in cardiovascular and gastrointestinal protection. *European Journal of Pharmacology*, 627: 1-7.
- Pomar, F. (2000) Tese Doutoral: Caracterización de la actividad peroxidase implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción *Capsicum annum* L. var. *Annum-Verticillium dahliae* Kleb. Departamento de Biología Animal, Vexetal e Ecoloxía, Universidade da Coruña, España.
- Pomar, F., Bernal, M., Díaz, J. & Merino, F. (1997) Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase. *Phytochemistry*, 46: 1313-1317.
- Pyun, B.-J., Choi, S., Lee, Y., Kim, T.-W., Min, J.-K., Kim, Y., Kim, B.-D., Kim, J.-H., Kim, T.-Y., Kim, Y.-M. & Kwon, Y.-G. (2008) Capsiate, a nonpungent capsaicin-like compound, inhibits angiogenesis and vascular permeability via a direct inhibition of Src kinase activity. *Cancer Research*, 68: 227-235.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Ros Barceló, A., Amaanda, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., de Forchetti, S.M., Tigier, H. & Valpuesta, V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology*, 122: 1119-1127.

- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D. & Goffner, D. (1999) Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *European Journal of Biochemistry*, 259: 485-495.
- Reinbach, H. C., Smeets, A., Martinussen, T., Moller, P. & Westerterp-Plantenga, M. S. (2009) Effects of capsaicin, green tea and CH-19 sweet pepper on appetite and energy intake in humans in negative and positive energy balance. *Clinical Nutrition*, 28: 260-265.
- Remadevi, R. & Szallasi, A. (2008) Adlea (ALGRX-4975), an injectable capsaicin (TRPV1 receptor agonist) formulation for long-lasting pain relief. *Drugs*, 11: 120-132.
- Richardson, A., Stewart, D. & McDougall, G. J. (1997) Identification and partial characterization of a coniferyl alcohol oxidase from lignifying xylem of *Sitka spruce* (*Picea sitchensis*). *Planta*, 203: 35-43.
- Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M. & Dessi, M. A. (2002) Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7396-7401.
- Ros Barceló, A. & Pomar, F. (2002) Plant peroxidases: Versatile catalysts in the synthesis of bioactive natural products. *Studies in Natural Products Chemistry*, 27: 735-793.
- Savidge, R. & Udagama-Randeniya, P. (1992) Cell wall-bound coniferyl alcohol oxidase associated with lignification in conifers. *Phytochemistry*, 31: 2959-2966.
- Siegel, B.Z. (1993) Plant peroxidases—an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, 12: 303-312.
- Simmone, A. H., Simmone, E. H., Eitenmiller, R. R., Mills, H. A. & Green, N. R. (1997) Ascorbic acid and provitamin A contents in some unusually colored bell peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10: 299-311.
- Sottomayor, M. & Ros Barceló, A. (1997) What can we learn from  $\alpha$ -3', 4'-anhydrovinblastine synthase? *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 1: 225-233.
- Surh, Y. J. (2002) More than spice: Capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *Journal of the National Cancer Institute*, 94: 1263-1265.
- Surh, Y. J. & Lee, S. S. (1996) Capsaicin in hot chili pepper: Carcinogen, co-carcinogen or anticarcinogen? *Food and Chemical Toxicology*, 34: 313-316.
- Sutoh, K., Kobata, K. & Watanabe, T. (2001) Stability of capsinoid in various solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4026-4030.
- Thoennissen, N. H., O'Kelly, J., Lu, D., Iwanski, G. B., La, D. T., Abbassi, S., Leiter, A., Karlan, B., Mehta, R. & Koeffler, H. P. (2010) Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and -negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene*, 29: 285-296.

Yazawa, S., Suetome, N., Okamoto, K. & Namiki, T. (1989) Content of capsaicinoids and capsaicinoid-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annuum* L.) hybrids made with CH-19 sweet as a parent. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Japan)*.

Wang, L., Hu, C. P., Deng, P. Y., Shen, S. S., Zhu, H. Q., Ding, J. S., Tan, G. S. & Li, Y. J. (2005) The protective effects of rutaecarpine on gastric mucosa injury in rats. *Planta Medica*, 71: 416-419.

Welinder, K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2: 388-393.

Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H.H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. & Hogestatt, E.D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature*, 400: 452-457.