



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES,  
CAPSAICINA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CHILE  
SERRANO (*Capsicum annum*) BAJO DISTINTO MANEJO  
AGRONÓMICO Y SISTEMA DE CULTIVO”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

**MARIO IVÁN TRUJILLO CONTRERAS**

DIRIGIDA POR

**Dra. ANA ANGÉLICA FEREGRINO PÉREZ**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES,  
CAPSAICINA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CHILE  
SERRANO (*Capsicum annum*) BAJO DISTINTO MANEJO  
AGRONÓMICO Y SISTEMA DE CULTIVO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**MARIO IVÁN TRUJILLO CONTRERAS**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ANA ANGÉLICA FEREGRINO PÉREZ**

**SINODALES**

**Dra. ANA ANGÉLICA FEREGRINO PÉREZ** \_\_\_\_\_  
DIRECTOR

**Dra. MA. GUADALUPE FLAVIA LOARCA PIÑA** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**Dr. RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**Dr. IRINEO TORRES PACHECO** \_\_\_\_\_  
SINODAL

**Dr. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ** \_\_\_\_\_  
SINODAL

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Sistemas de cultivo	3
II.1.1 Sistemas de invernadero	4
II.2 Chile	5
II.2.1 Situación botánica	5
II.2.2 Morfología del chile serrano	5
II.2.3 Composición química	6
II.2.4 Metabolismo de los capsaicinoides	8
II.3 Compuestos antioxidantes	8
II.3.1 Compuestos fenólicos	10
II.3.1.2 Flavonoides	11
III. HIPÓTESIS	13
IV. OBJETIVOS	14
IV.1 General	14
IV.2 Específicos	14
V. METODOLOGÍA	15
V.1 Materiales	15
V.1.1 Material biológico	15
V.1.2 Reactivos	16
V.2 Métodos	19
V.2.1 Recolección y procesamiento de material biológico	19
V.2.2 Cuantificación de compuestos antioxidantes	20

V.2.2.1 Extracción metanólica	20
V.2.2.2 Determinación de taninos condensados	20
V.2.2.3 Determinación de flavonoides	21
V.2.2.4 Determinación de fenoles totales	21
V.2.3 Determinación de capacidad antioxidante	22
V.2.3.1 Determinación de capacidad antioxidante DPPH	22
V.2.3.1.1 Preparación de muestras	22
V.2.3.1.2 Cálculo de capacidad antioxidante	23
V.2.3.2 Determinación de capacidad antioxidante ABTS	24
V.2.4 Cuantificación de capsaicina por HPLC	25
V.2.4.1 Extracción de capsaicinoides	25
V.2.4.2 Cuantificación de capsaicinoies	25
V.2.5 Análisis estadístico	26
VI. RESULTADOS	27
VI.1 Contenido de compuestos fenólicos	27
VI.1.1 Taninos condensados	27
VI.1.2 Flavonoides	27
VI.1.3 Fenoles totales	28
VI.2 Capacidad antioxidante	29
VI.2.1 Capacidad antioxidante por el método DPPH	29
VI.2.2 Capacidad antioxidante por el método ABTS	29
VI.3. Cuantificación de capsaicina	31
VI.3.1 Contenido de capsaicina	31
VII. DISCUSIONES	34
VII.1 Compuestos antioxidantes	34
VII.1.1 Contenido de taninos condensados	34
VII.1.2 Contenido de flavonoides	35
VII.1.3 Contenido de fenoles totales	35
VII.2 Determinación de capacidad antioxidante	36
VII.2.1 Capacidad antioxidante por el método DPPH	36

VII.2.2 Capacidad antioxidante por el método ABTS	37
VII.3 Cuantificación de capsaicina	38
VIII. CONCLUSIONES	39
IX. BIBLIOGRAFÍA	40
X. ANEXOS	44

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Principales componentes del chile	7
2	Formulación de la fuente de nutrición química	17
3	Formulación de la fuente de nutrición orgánica	18
4	Formulación para el tratamiento de fertilización Integral	19
5	Diseño experimental 2,2-difenil picrilhidrazilo (DPPH)	24
6	Contenido de taninos condensados en chile serrano	27
7	Contenido de flavonoides en chile serrano	28
8	Contenido de fenoles totales en chile serrano	29
9	Potencial Antioxidante de extracto de chile serrano por DPPH	30
10	Potencial Antioxidante de extracto de chile serrano por ABTS	31
11	Contenido de capsaicina en chile serrano	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género <i>Capsicum</i>	9
2	Principales flavonoides presentes en el chile ( <i>Capsicum annum</i> )	12
3	Cromatograma HPLC de estándar de capsaicina	32
4	Cromatograma HPLC de extracto de chile serrano	33
5	Curva de calibración de taninos condensados	45
6	Curva de calibración Flavonoides	45
7	Curva de calibración fenoles totales	46
8	Curva de calibración DPPH	46
9	Curva de calibración ABTS	47
10	Curva de calibración estándar de capsaicina	47
11	Cromatograma de la curva de calibración ocupando estándar de capsaicina	48

## RESUMEN

En la actualidad, el chile es uno de los alimentos con mayor consumo en nuestro país debido a la gran variedad de formas en la que éste es cocinado siendo el condimento nacional por excelencia. Sin embargo, en los últimos años ha sido rechazado por ser irritante sin tomar en cuenta el efecto positivo de algunos de sus metabolitos presentes en este fruto que pueden aportar a la salud. Es necesario poner atención en las condiciones en las que el cultivo es desarrollado para obtener sus metabolitos. El objetivo de este trabajo fue comparar el contenido y capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de chile serrano (*Capsicum annum* L.) con condiciones diferentes de sistema de cultivo (monocultivo y policultivo) y manejo agronómico (químico, orgánico e integral) bajo condiciones de invernadero. La cuantificación de compuestos fenólicos mostró que el sistema de policultivo con fertilización química fue el que presentó una mayor concentración de taninos condensados y flavonoides ( $29.42 \pm 1.40$  mg equivalente de (+)-catequina y  $10.81 \pm 0.89$  mg equivalente de rutina/g de muestra, respectivamente). La evaluación de la capacidad antioxidante indicó un mayor potencial antioxidante con la fertilización química ( $485.66 \pm 13.06$  mmol y  $170.30 \pm 13.43$  mM) e integral ( $474.76 \pm 21.50$  mmol y  $171.16 \pm 16.82$  mM) en ambos casos equivalentes de Trolox/g de muestra para el método de DPPH y ABTS, respectivamente. Por otra parte se observó que la mezcla integral potencializa la concentración de capsaicinoides ( $4.53 \pm 0.61$  mg equivalentes de capsaicina/g muestra). Los resultados sugieren que el sistema de policultivo y la fertilización química e integral son los más adecuados para impulsar la síntesis de estos metabolitos en éste género.

## I. INTRODUCCIÓN

Se conocen como chiles los frutos de las plantas del género *Capsicum*. Este género, originario de la región andina, comprende cerca de 60 especies, cinco de las cuales han sido domesticadas: *C. annum* (L), *C. baccatum* (L), *C. chinense* (Jacq), *C. frutescens* (L) y *C. pubescens* (R & P). Se ha propuesto que estas especies, con sus más de 2000 cultivares, se derivaron a partir de entre tres y cinco especies silvestres. Uno de los principales atributos por lo que es chile es consumido es su sabor picante, es decir, su pungencia, originado por un grupo de aminas que surgen de la vainillina conocidas como capsaicinoides (CAP's). Las diferentes especies de *Capsicum* pueden variar, entre otras características en grado de picor, lo que se relaciona con su capacidad de acumular capsaicinoides.

Entre los cultivos hortícolas, el cultivo de chile es el más importante a nivel nacional. Actualmente, se produce chile verde en cada uno de los 32 estados que conforman la República Mexicana. Los principales estados productores son: Chihuahua, Sinaloa, Guanajuato, Zacatecas y Sonora; los cuales en conjunto cultivan el 50% de una superficie total nacional estimada de 120 mil hectáreas; obteniéndose el 60% de la producción nacional.

Una característica importante del mercado global de chile es que los principales países productores no son, a excepción de México y España, los más destacados exportadores, ya que éstos destinan casi la totalidad de su producción al mercado interno.

La principal característica de los diferentes tipos de chile, es que provoca sensaciones en el gusto que no pueden ser calificadas ni como dulces o saladas, sino simplemente como picantes atribuyéndosele esto a la concentración de CAP's.

El escozor en la boca, que modifica y a veces hasta predomina sobre otros sabores es lo que le da razón de ser a platillos tan típicos como el mole, la tinga, la salsa de los tacos y las indispensables enchiladas. El chile, además de ser uno de los

condimentos más usados en la preparación de alimentos mexicanos, se usa en medicina popular como rubefaciente, vesicante, estimulante y estomáquico.

Debido a este sabor tan peculiar, el cultivo se ha hecho universal, estando presente prácticamente en la totalidad de las zonas templadas y cálidas del mundo.

Sin embargo, no sólo es el sabor especial que confiere el chile a la comida que lo hace exclusivo, sino a sus demás componentes que se ha visto, actúan como antioxidantes naturales. La capacidad antioxidante se ha relacionado con la posible prevención de enfermedades cardiovasculares, algunos cánceres, cataratas e incluso disfunción cerebral e inmune. La potencia antioxidante de estas sustancias está profundamente relacionada con su estructura, su concentración y las clases de compuestos presentes en los alimentos como es el caso del chile, ya que existe la posibilidad de sinergismo o antagonismo entre los diferentes componentes. Estos compuestos, al presentarse en concentraciones relativamente bajas en relación con el sustrato oxidable, son capaces de evitar o disminuir la oxidación del sustrato, por lo que combaten así el estrés oxidativo que se da en determinadas circunstancias en el organismo provocado por una disminución de las sustancias antioxidantes del mismo o un aumento de la síntesis de los radicales reactivos endógenos.

Por lo que aun siendo el oxígeno esencial para la vida, plantea una paradoja para los organismos aerobios; constituye lo que se conoce como el "soporte de la vida", pero también es el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como "estrés oxidativo". El desbalance en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y la defensa antioxidante provoca el estrés oxidativo que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales dan por resultado el deterioro y muerte celular, provocado por una peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN o degradación proteica.

Así que el objetivo de este trabajo fue dar una alternativa para una mayor ingesta de compuestos antioxidantes que son constituyentes de un alimento típico mexicano como es el chile serrano cultivado bajo las mejores condiciones y poder así evitar diversas enfermedades crónico-degenerativas.

## **II. ANTECEDENTES**

### II.1. Sistemas de cultivo

En nuestros días, los sistemas de monocultivo han dominado el enfoque agronómico mundial debido a su estructura simple, que permite aparentemente controlar los factores limitantes, maximizar rendimientos y obtener productos uniformes para el mercado. Estas características han relegado al olvido a uno de los sistemas agrícolas tradicionales más característicos en el cual se siembra más de un cultivo en la misma parcela, denominado policultivo o de cultivos intercalados, en este los rendimientos son múltiples y las interacciones complejas.

El sistema de policultivo tiene varias ventajas, en primer lugar, aunque el cultivo de varias especies a la vez restringe el espacio disponible para cada una y puede elevar la intensidad de la competencia entre plantas, también deja menos suelo descubierto a la erosión y expuesto al viento o la lluvia. En segundo lugar, la mezcla de especies ofrece condiciones para que la interacción entre los cultivos sea positiva: como es el caso de la mezcla frijol-maíz, en la cual el primero sirve como mejorador del suelo por su relación simbiótica con microorganismos fijadores de nitrógeno.

El policultivo también proporciona una variedad de recursos que favorecen una diversidad de microhábitats, ocupados por diferentes especies de insectos, los cuales ayudan a regular las poblaciones de plagas y a reducir el daño que provocan (Florescano, 2004).

En sistemas de policultivo, la variación en las dimensiones verticales también son consideradas, debido a que un cultivo generalmente crearía estratos de condiciones variables para otros cultivos.

Dada la dificultad que significa crear condiciones absolutamente uniformes en los campos agrícola, especialmente en agroecosistemas con recursos limitados o tradicionales de pequeña escala, los agricultores frecuentemente siembran diversas especies en policultivo o una variedad de mezclas de cultivos, con la idea de que una combinación diversa de cultivos funcionarán mejor en un ambiente variable

(Gliessman, 2002). Cuando dos o más poblaciones de cultivo diferentes son plantadas juntas para formar un policultivo, y los rendimientos de las poblaciones combinadas son mayores que las de los cultivos plantados en forma separada, es muy probable que el incremento en el rendimiento sea el resultado de la complementariedad de las características de las poblaciones de cada miembro. Para que los sistemas de policultivo sean exitosos, cada especie debe tener un nicho en alguna forma diferente. Por lo tanto, es esencial el conocimiento completo de las características del nicho de cada especie (Gliessman, 2002).

Dentro de los alimentos que se siembran en México, tanto al aire libre como en invernadero se encuentra el chile en sus diversas especies.

#### II.1.1 Sistema de invernadero

Nuestro entorno geográfico así como el desarrollo económico alcanzado en las últimas décadas nos dirigen hacia una agricultura cada vez más industrializada.

Es por eso, que para satisfacer a las demandas de la población surge el cultivo en invernadero, siendo este el que se realiza en estructuras productivas capaces de crear un microclima favorable para el desarrollo de las plantas. En las estructuras con esta finalidad se debe poder regular y controlar su nivel hidrotérmico, es decir, temperatura y humedad, así como la radiación solar a lo largo del día.

De este modo, los objetivos del cultivo en invernadero son, el aumentar la producción, mejorar la calidad y la precocidad de algunos de ellos en relación a su producción en el exterior, así como producir plantas con exigencias climáticas diferentes a las existentes en el ambiente natural donde se desea desarrollarlas.

El cultivo en invernadero ha introducido nuevas técnicas asociadas como los son el riego por goteo, hidroponía, biotecnología, entre otros. Las finalidades básicas del cultivo en invernadero son: proporcionar protección de las bajas temperaturas y en ocasiones de las temperaturas excesivas, protección frente a los vientos fuertes, disminuir el consumo de agua y mejorar el ambiente protegiendo a la planta de plagas y enfermedades (Alpi y Tognoni, 1991).

El invernadero es la construcción usada en agricultura para esta finalidad con un costo relativamente poco elevado, tanto de implantación como de consumo de energía convencional. Su funcionamiento corresponde al de una máquina térmica a partir del efecto invernadero (Elias, 2001).

## II.2. Chile

### II.2.1 Situación botánica

Todas las formas de pimiento, chile o ají utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*. El nombre científico deriva del griego: según unos autores del kapso (picar), según otros de kapsakes (cápsula). Este género se incluye en la extensa familia de las Solanáceas.

Actualmente se considera que esta familia está formada por unos 90 géneros, los cuales se encuentran divididos entre 2 subfamilias: Solanoideae y Cestroideae. La diferencia entre estas dos subfamilias se basa en diferentes modelos de desarrollo del embrión. En Solanoideae el embrión está enrollado y es de un diámetro más o menos uniforme. En las Cestroideae el embrión es típicamente recto o ligeramente curvado. Además, un gran número de diferencias morfológicas, químicas y citogenéticas acompaña esta división básica. *Capsicum* pertenece a la tribu más grande de la subfamilia Solanoideae, la familia Solaneae (Nuez y col., 2003).

### II.2.2 Morfología del chile serrano (*Capsicum annum* L.)

Altura de 30 a 80 cm. El tallo es erguido, ramoso y liso. Las hojas son simples, alternas, generalmente aovadas, enteras, lisas, lustrosas, breve o largamente pecioladas, de 5 a 12 cm de largo. El fruto, también llamado chile, es una planta indehiscente erguida o péndula, incompletamente bilocular o trilocular, de forma y tamaño variable, dulce o picante, rojo o anaranjado cuando maduro y verde, blanco o purpúreo cuando inmaduro; contiene numerosas semillas reniformes pequeñas, las cuales, junto con las placentas (venas) que las unen a la pared del fruto,

contienen en mayor proporción la oleorresina o sustancia picante llamada capsicina (Infoagro, 2010).

### II.2.3 Composición química

En México existen una gran variedad de chiles, unos son verdosos y otros son rojizos y estos son imprescindibles para dar sabor a cualquier platillo y es, sin duda, el condimento nacional por excelencia. En el Cuadro 1, se muestran sus componentes.

La equivalencia para el chile serrano en 100 gramos, comprende un contenido de 35 calorías, derivadas de 7.2 gramos de carbohidratos, 2.3 gramos de proteínas y 0.4 gramos de grasa (Goldberg, 2002).

Uno de los atributos por el cual es consumido el chile, es debido especialmente a su sabor picante, ocasionado por compuesto conocidos como capsaicinoides (CAP's), un grupo de amidas ácidas derivadas de la vainillilamina, que se sintetizan y acumulan en el tejido de la placenta. Las diferentes especies de *Capsicum* pueden variar en grado de picor, lo que se relaciona con su capacidad de acumular CAP's.

Debido a su localización en el tejido de la placenta, los CAP's tienen un papel en la protección química de las semillas. No obstante, las aves son insensibles a los CAP's, lo que ha permitido la dispersión de las semillas silvestres. Independientemente de su función en la naturaleza, los CAP's tienen diversas aplicaciones en diferentes industrias, como la de los alimentos o en la elaboración de pinturas, y la capsicina con 98% de pureza alcanza valores cercanos a 3000 dólares (Vázquez y col., 2007).

Cuadro 1. Principales componentes de chile por cada 100 gramos.

Compuesto	Cantidad
Agua	91%
Carbohidratos	5.1 g
Proteínas	1.3 g
Grasas	0.3 g
Fibra	1.4
Vitamina A	1000 UI
Vitamina B1	0.03 g
Vitamina B2	0.05 g
Vitamina B5	0.20 g
Vitamina B12	0.45 g
Vitamina C	120 mg
Azufre	17 mg
Calcio	9 mg
Cobre	0.10 mg
Fósforo	23 mg
Magnesio	11 mg
Manganeso	0.26 mg
Potasio	234 mg
Sodio	58 mg
Yodo	0.001 mg

Fuente (Goldberg, 2002).

#### II.2.4 Metabolismo de los capsaicinoides

Se conocen más de 20 diferentes CAP's cuya estructura química consiste en un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso. La porción fenólica es la vainillilamina, que se forma a partir de la fenilalanina por medio de la ruta de los fenilpropanoides. El ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina. Las diferencias estructurales de los diversos CAP's residen precisamente en la naturaleza de la cadena lateral, que puede ser de 9 u 11 carbonos de largo, con un número variable de enlaces dobles colocados en diferentes posiciones. En la Figura 1 se muestra la ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides a partir de la fenilalanina en el género *Capsicum* donde intervienen varias enzimas propias del género y especie. La capsaicina [(E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonenamida] y la dihidrocapsaicina (su análogo 6,7-dihidro) representan más de 90% del contenido total de los CAP's presentes en los chiles. No es claro si las diferencias en los CAP's se deben a modificaciones que sufre la cadena de ácido graso antes o después de su unión con la vainillilamina (Vázquez y col. 2007).

Los capsaicinoides también poseen propiedades analgésicas, anti-inflamatorias, antioxidantes e incluso anticancerígenas al inhibir el crecimiento dependiente de andrógenos en células transformadoras de seno, colon, adenocarcinoma gástrico y de próstata (Djamgoz e Isbilen, 2006; Mori y col., 2010).

El chile habanero (*C. chinense*) es considerado el de mayor picor; sin embargo, algunas variedades de *C. annuum* pueden alcanzar niveles similares, en función de las condiciones en que se cultiven (Vázquez y col., 2007).

#### II.3. Compuestos antioxidantes

Los antioxidantes naturales se encuentran presentes en prácticamente todas las plantas, microorganismos, hongos e incluso en los tejidos animales (Yanishlieva-Maslarova y Gordon, 2001).

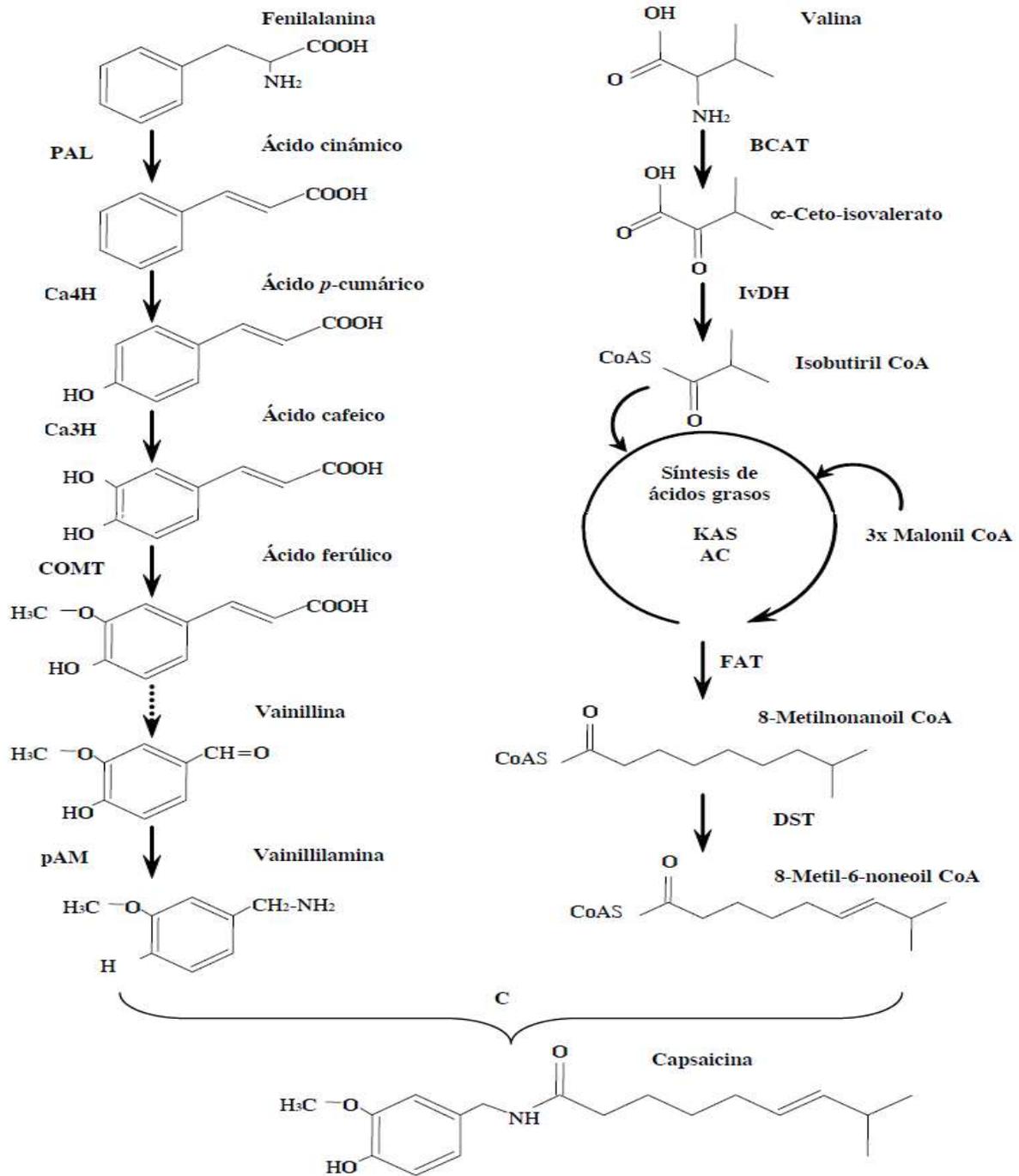


Figura 1. Ruta propuesta para la biosíntesis de los capsaicinoides en el género *Capsicum*. PAL, fenilalanina amonio liasa; Ca4H, ácido cinámico 4 hidroxilasa; Ca3H, cumarato 3 hidroxilasa; COMT, ácido caféico O-metiltransferasa; pAMT, presunta aminotransferasa de la vainillina, BCAT, aminotrasferasa de los aminoácidos ramificados; IvDHaisovalerato deshidrogenasa; Kas β-cetoacil sintasa; ACL, proteína acarreadora de grupos acilo; FAT, tioesterasa; DST desaturasa; CS capsaicinoide sintasa (Vázquez y col. 2007).

Los antioxidantes engloban un grupo de sustancias que presentan estructuras químicas y mecanismos de acción muy variados. Estos pueden inhibir o retardar la oxidación de dos formas: captando radicales libres, en cuyo caso se denominan antioxidantes primarios, o por mecanismos que no estén relacionados con la captación de radicales libres, en cuyo caso se conocen como antioxidantes secundarios.

Los antioxidantes secundarios operan a través de cierto número de mecanismos, incluyendo su unión a metales pesados, captación del oxígeno, conversión de hidroperóxidos a especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación del oxígeno singulete (Gordon, 2001).

Diversos estudios indican que el exceso de radicales libres puede dar lugar a la inducción de importantes cambios fisiológicos, que por lo general desembocan en el desarrollo de ciertas enfermedades. Para contrarrestar estos efectos nocivos, el organismo suele disponer de moléculas ricas en electrones que, al donarlos, ejercen un efecto antioxidante. Sin embargo, cuando los sistemas antioxidantes defensivos del organismo se ven superados por la actividad dañina de los radicales, aparece un estrés oxidativo, iniciador de ciertas situaciones patológicas con una mayor o menor trascendencia sobre la salud. Cada vez es más contundente la información que pone de manifiesto la presencia de componentes químicos con la capacidad de realizar funciones antioxidantes en los alimentos de origen vegetal una vez que han sido absorbidos dentro del organismo, por lo que su consumo podría significar el desempeño de un papel crítico frente al desarrollo de algunas enfermedades degenerativas, reduciendo o retrasando la posibilidad de padecerlas (Bello, 2005).

### II.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios producidos por los vegetales, que presentan en su estructura química la presencia de anillos

aromáticos con grupos hidroxilo los responsables de su actividad antioxidante (Cano y col., 2002).

En general, son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la vía del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (o por las dos, en el caso de los flavonoides). Entre los compuestos fenólicos naturales se encuentran los fenoles monocíclicos, los flavonoides, los fenilpropanoides, las quinonas fenólicas y las coumarinas. Las sustancias poliméricas de las plantas como los lignanos y taninos son polifenólicos (Valencia y Robles-Sardin, 2005).

### II.3.1.2 Flavonoides

Los flavonoides se encuentran extensamente en el reino vegetal y están presentes en casi todas las partes de la planta y pueden comúnmente poseer actividad antioxidante. La estructura básica de un flavonoide consiste en dos anillos aromáticos unidos por una cadena alifática de tres carbonos (C6 -C3-C6), los cuales se condensan en forma de pirano, o menos comúnmente, en un anillo furano (Pratt, 1972).

Los flavonoides son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. Se han identificado más de 5 mil flavonoides diferentes; son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidante, como los rayos UV, la contaminación ambiental, sustancias presentes en los alimentos, etc. (Martínez-Flores y col. 2002)

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Aherne y O'Brien, 2002).

Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-

inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (Geleijnse y col. 2002; Yang y col. 2000).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones (Saskia y col. 1998; Brasseur, 1989).

El pericarpio del chile es particularmente rico en flavonoides, los compuestos de mayor importancia en éste son una flavona (luteolina) y un flavonol (quercetina), de los cuales se muestra su estructura en la Figura 2, además a esta clase de flavonoides se le confieren propiedades benéficas que ayudan a combatir enfermedades crónicas degenerativas tales como: obesidad, diabetes, cardiovasculares y cáncer (Howard y Wildman, 2007).

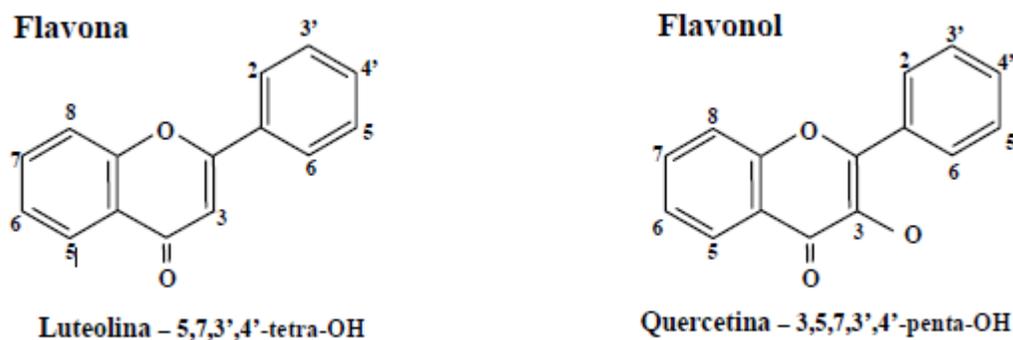


Figura 2. Principales flavonoides presentes en el chile (*Capsicum annum*) (Howard y Wildman, 2007).

### **III. HIPÓTESIS**

El manejo agronómico y sistema de cultivo (monocultivo y policultivo) influyen en la síntesis de metabolitos secundarios como son compuestos fenólicos y capsaicina presentes en el chile serrano (*Capsicum annuum* L.) cultivado bajo condiciones de invernadero.

## **IV. OBJETIVOS**

### IV.1. General

Cuantificar el contenido de compuesto fenólicos, capsaicina y su capacidad antioxidante en chile serrano (*capsicum annum* L.) bajo distinto manejo agronómico y sistema de cultivo.

### IV.2. Específicos

- ✓ Comparar el contenido de compuestos fenólicos presentes en chile serrano con diferente manejo agronómico y sistema de cultivo bajo condiciones de crecimiento controladas.
- ✓ Determinar la capacidad antioxidante de extracto metanólico de chile serrano con diferente manejo agronómico y sistema de cultivo bajo condiciones protegidas.
- ✓ Determinar el contenido de capsaicina del chile serrano bajo condiciones controladas.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Material biológico

Para la realización de esta tesis, se utilizó la variedad de chile serrano (*Capsicum annuum* L.), producida de semillas criollas proporcionadas por el banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), sembradas en un sistema de policultivo (maíz, chile, frijol y jitomate) y monocultivo bajo invernadero localizado en el campus de la Facultad de Ingeniería de la U.A.Q en el poblado de Amazcala perteneciente al municipio del Márquez en Querétaro. La temperatura media oscila entre los 18° y 24° C, con un clima predominante subtropical, templado semiseco.

Se incluyeron los frutos de chile serrano que se encontraban sembrados en una topología lineal. Los cuales se sometieron a diferentes manejos agronómicos (tratamiento de fertilización química, orgánico e integral) bajo diversos sistemas de cultivo (monocultivo y policultivo) en invernadero.

Los sistemas de cultivo (monocultivo y policultivo) se realizaron en un invernadero de estructura metálica tipo capilla de 12 naves con cubierta de polietileno, policarbonato y malla antiáfidos (protegiendo a las plantas de los insectos), con ventanas cenitales y laterales por nave. Las condiciones ambientales internas (temperatura y humedad relativa) del invernadero se mantuvieron monitoreadas con sensores mediante un registrador hasta concluir el desarrollo de los cultivares.

Características de las plántulas de chile serrano: Las plántulas de chile serrano al igual que el resto de las especies del policultivo y monocultivo se obtuvieron de semillas criollas proporcionadas por el INIFAP. Las plántulas de chile serrano para el estudio fueron producidas con éstas semillas en charolas de unicel con cavidades donde el sustrato empleado fue turba humedecida con agua (Cobos, 2009).

Especificaciones de la nutrición de los cultivares de chile: Para el desarrollo de los cultivares del policultivo, que incluye el chile serrano, se les aplicó tres tratamientos

de fertilización química, orgánica e integral. Para la nutrición del cultivo de monocultivo se utilizaron dos tratamientos de fertilización, el químico y el orgánico (Cobos, 2009).

La fertilización o nutrición química tuvo una aplicación inicial a los 28 días del trasplante y siembra directa en el invernadero y posteriormente la aplicación se llevó a cabo dos veces por semana. La dosificación se realizó mediante un sistema de fertirrigación. Se programaron 3 riegos por día (dos riegos de 5 min y uno de 10 min, aplicando 2 L de agua por planta) para cada parcela. La formulación de la nutrición química se obtiene con base a las compatibilidades de los fertilizantes químicos, consiguiendo la composición referida en el Cuadro 2.

La fuente de nutrición orgánica fue aplicada a los 28 días del trasplante y siembra directa en el invernadero y posteriormente las aplicaciones se realizaron dos veces por semana, el suministro de nutriente se llevó a cabo mediante fertirrigación. Se programaron tres riegos por día (dos riegos de 5 min y uno de 10 min, aplicando 2 L de agua por planta) (Cobos, 2009). En el Cuadro 3 se muestra la composición de la fuente orgánica.

El tratamiento de fertilización integral se obtuvo de fuentes orgánicas y químicas siguiendo las formulaciones del tratamiento orgánico y químico descrito anteriormente. La dosis aplicada se realizó dos veces por semana, intercalando tratamiento orgánico un día y otro día aparte sólo el tratamiento químico, como se muestra en el Cuadro 4.

#### V.1.2 Reactivos

Folin-Ciocalteu, Carbonato de sodio, ácido gálico, ácido clorhídrico, vainillina, (+)-catequina, 2-aminoetildifenilborato, metanol, hidroxitolueno butilado (BHT), ácido (+/-)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), Capsaicina 99% pureza (marca Sigma), acetonitrilo HPLC, agua HPLC, metanol HPLC, 2,2'-azinobis (ácido-6-sulfónico-3-etilbenzotiazolina (ABTS) de la marca JT Baker.

Cuadro 2: Formulación de la fuente de nutrición química.

---

Nutriente	Nomenclatura química	Concentración, ppm/200L de agua
Nitrógeno	N	190
Fósforo	P	35
Potasio	K	210
Calcio	Ca	150
Magnesio	Mg	45
Manganeso	Mn	0.5
Fierro	Fe	1
Zinc	Zn	0.5
Cobre	Cu	0.5
Boro	B	0.5
Azufre	S	70
Molibdeno	Mo	0.5

---

Fuente de nutrición química (Cobos, 2009).

Cuadro 3: Formulación de la fuente de nutrición orgánica.

---

Nutriente	Nomenclatura química	Concentración, ppm
Nitrógeno	N	2600
Fósforo	P	8300
Potasio	K	1700
Calcio	Ca	4269
Magnesio	Mg	1033
Manganeso	Mn	9.89
Fierro	Fe	119
Zinc	Zn	16.8
Cobre	Cu	78.5
Boro	B	3.15
Azufre	S	330
Ác. Húmico		3600

---

Fuente de nutrición orgánica (Cobos, 2009).

Cuadro 4: Formulación para el tratamiento de fertilización Integral

Fuente de nutrición orgánica.			Fuente de nutrición química		
Nutriente	Nomenclatura química	Concentración, ppm/2500L de agua	Nutriente	Nomenclatura química	Concentración, ppm/200L de agua
Nitrógeno total	N	2600	Nitrógeno	N	190
Fósforo total	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	8300	Fosforo	P	35
Potasio total	K <sub>2</sub> O	1700	Potasio	K	210
Calcio	Ca	4269	Calcio	Ca	150
Magnesio	Mg	1033	Magnesio	Mg	45
Manganeso	Mn	9.89	Manganeso	Mn	0.5
Fierro	Fe	119	Fierro	Fe	1
Zinc	Zn	16.8	Zinc	Zn	0.5
Cobre	Cu	78.5	Cobre	Cu	0.5
Boro	B	3.15	Boro	B	0.5
Azufre	S	330	Azufre	S	70
Ac. Húmico		3600	Molibdeno	Mo	0.5

Fuente de nutrición integral (Cobos, 2009).

## V.2 Métodos

### V.2.1 Recolección y procesamiento de material biológico

El material que se ocupó para el estudio fue recolectado directamente del invernadero donde se muestreó 1.5 kilogramos de chile serrano en un estado de

madurez adecuada, entendiéndolo éste como una coloración verde oscuro uniforme de cada tratamiento de fertilización (químico, orgánico e integral) y sistema agronómico (policultivo y monocultivo). Se cortó en rodajas sin incluir los pedúnculos. Se colocó en una liofilizadora marca LABCON modelo Freeze dry system para su conservación. Al finalizar el tiempo de liofilizado, se molió en un molino marca KRUPS modelo GX4100 y se guardó protegiéndolas de la luz y de la humedad hasta su uso.

## V.2.2 Cuantificación de compuestos antioxidantes

### V.2.2.1 Extracción metanólica

La extracción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cardador-Martínez y colaboradores (2002). Se colocaron 200 mg de muestra en un matraz de 50 mL y se adicionaron 10 mL de metanol. Se cubrió la muestra con papel aluminio y se agitó durante 24 h. Al término de la extracción se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, desechando la pastilla formada, quedando el sobrenadante.

### V.2.2.2 Determinación de taninos condensados

Para la cuantificación de taninos condensados se hizo de acuerdo a la metodología descrita por Feregrino-Pérez y colaboradores (2008) en microplaca. Se realizó una curva de calibración utilizando concentraciones de 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/ml de (+)-catequina. (La curva se realizó por triplicado, se sacó la media de absorbancia y determinamos la ecuación de la recta y la  $R^2$ ).

Se colocaron 50  $\mu$ L de cada concentración en la celda de 96 pozos por triplicado. Se adicionaron 200  $\mu$ L de la solución 1:1 de HCl 8%: Vainillina. Debe adicionarse de 50  $\mu$ L en 50  $\mu$ L a cada uno de los pozos y repetir la operación hasta completar los 250  $\mu$ L. Al blanco se le adicionaron 50  $\mu$ L de metanol más 200  $\mu$ L de HCl 4%. Para la muestra se tomaron 50  $\mu$ L del extracto metanólico (sobrenadante) y se colocaron en los pozos. En seguida, se adicionaron 200  $\mu$ L de la solución 1:1 de HCl 8%: vainillina 1%. Debe adicionarse de 50  $\mu$ L en 50  $\mu$ L a cada uno de los

pozos hasta completar los 200  $\mu\text{L}$ , protegiendo las muestras de luz y oxígeno. Posteriormente, se leyó la absorbancia con filtros de 492-540 nm en espectrofotómetro MULTISKAN ASCENT.

Se preparó un blanco al cual se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante (muestra y se le añadieron 200  $\mu\text{L}$  de HCl 4%). Se leyó en espectrofotómetro MULTISKAN ASCENT con filtros de 492 y 540 nm realizándolo por triplicado. Se compararon con la curva de calibración y se expresó como mg de (+)-catequina por gramo de muestra liofilizada.

#### V.2.2.3 Determinación de flavonoides

La determinación de los flavonoides totales se realizó siguiendo la metodología descrita por Oomah y colaboradores (2005). Se realizó una curva de calibración para la cual se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones (50, 25, 10, 2.5 y 1  $\mu\text{g/mL}$  de rutina) por triplicado. Se adicionaron 180  $\mu\text{L}$  de agua destilada, e incorporaron 20  $\mu\text{L}$  de solución 2-aminoetildifenil borato 1%. El blanco fue hecho con 230  $\mu\text{L}$  de metanol y 20  $\mu\text{L}$  de 2-aminoetildifenilborato 1%, se leyó en espectrofotómetro MULTISKAN ASCENT a una absorbancia de 404 nm.

Para la cuantificación de las muestras se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico de la muestra (sobrenadante), se adicionó 180  $\mu\text{L}$  de metanol, se adicionó 20  $\mu\text{L}$  de solución 2-aminoetildifenilborato al 1%, se leyó a una absorbancia de 404 nm en espectrofotómetro MULTISKAN ASCENT. Los resultados fueron interpolados a la curva del estándar y fueron expresados como mg equivalentes de rutina por gramo de muestra liofilizada. Las pruebas se realizaron por triplicado al igual que el blanco.

#### V.2.2.4 Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos se determinó mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu (Dewanto y col., 2002). En una microplaca de 96

pozos se colocaron 40  $\mu\text{L}$  del extracto metanólico y 460  $\mu\text{L}$  de agua destilada fueron oxidadas con 250  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu y la reacción fue neutralizada con 1250  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20%. La absorbancia producida por la coloración azul se midió a 760 nm en un espectrofotómetro marca Molecular Devices modelo Spectra Max 190 después de dos horas de reposo en la oscuridad usando ácido gálico como estándar. Los resultados se reportaron en mg de ácido gálico/100 g de extracto metanólico. Se realizó una curva de calibración en la cual se ocupó una solución  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y una solución de ácido gálico de 0.1 mg/mL.

### V.2.3 Determinación de capacidad antioxidante

#### V.2.3.1 Determinación de Capacidad antioxidante por DPPH

El método original de Brand-Williams y colaboradores (1995) modificado por Fukumoto y Mazza (2000) adaptado para su uso en microplaca. Este método se basa en la disminución de la absorbancia del radical libre DPPH $\cdot$ ; ya que cuando sufre reducción por un antioxidante, esta absorción desaparece, lo que proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales por la donación de hidrógeno, esto es observado visualmente como la decoloración del color púrpura a amarillo.

##### V.2.3.1.1 Preparación de las muestras

Se pesaron 2.5 mg de Trolox (marca comercial de la vitamina E) y se disolvieron en 10 mL de metanol. De esa solución (A) se tomaron 0.8 mL y se le agregaron 0.2 mL más de metanol para obtener una concentración de 0.8 mM. Después, se tomaron 0.7 mL de la solución A y se agregaron 0.3 mL más de metanol para obtener una concentración de 0.7 mM y así sucesivamente desde 0.8 hasta 0.1 mM y se hizo una solución final de 0.05 mM (concentraciones del control positivo). En una placa multipozos (96 pozos, Corning, Nueva York, EUA) con capacidad para 300  $\mu\text{L}$  por pozo, se colocó el blanco (metanol puro), las soluciones control y las muestras de

acuerdo al diseño experimental mostrado en el Cuadro 5. El experimento se realizó por triplicado.

Para realizar el reactivo de DPPH, se pesó 0.0015 g de DPPH (difeníl-picrilhidrazilo) en un matraz aforado de 25 mL, se le adicionaron 20.5 mL de metanol grado reactivo, se aforó a 25 mL con metanol y se sonicó durante 10 minutos, se agregaron 200  $\mu$ L de este reactivo a la placa en menos de 1 minuto con la micropipeta multicanal; excepto en el blanco (agua HPLC); el reactivo se preparó inmediatamente después de colocar los 20  $\mu$ L del blanco y la muestra en los pozos, tapándolos con papel Parafilm para evitar su evaporación. La microplaca fue leída en MULTISKAN ASCENT bajo el programa establecido a 540 nm cada 10 minutos durante una hora y media (90 minutos). La placa se mantuvo cubierta y en la oscuridad a temperatura ambiente entre lecturas (Sánchez, 2007).

#### V.2.3.1.2 Cálculo de la capacidad antioxidante

La actividad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, usando la siguiente ecuación (Burda y Oleszek, 2001):

$$ARA = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})$$

Donde ARA= actividad antirradical,  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra a 520nm y  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

La capacidad antioxidante de equivalentes de trolox (TEAC) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$TEAC_{\text{muestra}} = A_{\text{muestra}} / (m * [\text{muestra}])$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra a 520 nm; m, es la pendiente de la curva de calibración; [muestra] es la concentración de cada muestra.

Cuadro 5. Diseño experimental DPPH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	H <sub>2</sub> O											
<b>B</b>	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH
<b>C</b>	T <sub>0.5</sub>	T <sub>0.5</sub>	T <sub>0.5</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>3</sub>
<b>D</b>	T <sub>4</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>05</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>7</sub>
<b>E</b>	T <sub>8</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>8</sub>	BHT 1000	BHT 1000	BHT 1000	BHT 100	BHT 100	BHT 100	BHT 50	BHT 50	BHT 50
<b>F</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>G</b>	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<b>H</b>	M	M	M	M	M	M						

20µL de muestra más 200µl de DPPH.

OH= Metanol (control negativo).

T= Trolox (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 800µM).

BHT<sub>1000</sub>= Butirato de hidroxitolueno (1000µM).

BHT<sub>100</sub>= Butirato de hidroxitolueno (100µM).

BHT<sub>50</sub>= Butirato de hidroxitolueno (50µM).

M= Muestras

DPPH= 2,2-difenilpicrilhidrazilo.

#### V.2.3.2 Determinación de capacidad antioxidante ABTS

El método fue desarrollado usando el 2,2'-azinobis (ácido-6-sulfónico-3-etilbenzotiazolina) (ABTS) ensayo descrito por Nenadis y colaboradores (2004) modificado para ser elaborado en microplaca de 96 pozos. Brevemente, una alícuota de 20 µL del extracto se mezcló con 230 µL de una solución de ABTS<sup>•+</sup> previamente preparada. El control contuvo todos los reactivos excepto el extracto. La absorbancia fue leída a 730 nm a 0 y 6 minutos en un espectrofotómetro marca

Molecular Devices modelo Spectra Max 190. Los resultados para la actividad antiradical del ABTS fueron expresados como el porcentaje de inhibición. El porcentaje de inhibición fue calculado de la curva de calibración del porcentaje de inhibición

#### V.2.4 Cuantificación de capsaicina por HPLC.

##### V.2.4.1 Extracción de capsaicinoides

Se basó en la técnica descrita por Contreras (1997) con algunas modificaciones. Se hizo una extracción por colecta. Para ello se tomó 1 g de muestra liofilizada y 10 mL de acetonitrilo grado HPLC en tubos de vidrio de 30 mL. Las muestras se incubaron por 1.5 horas en baño de agua a 60°C, agitándose cada 15 minutos con un vortex. El sobrenadante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se filtró al vacío a través de papel Whatman No. 4. Posteriormente se hizo otro filtrado a través de acrodiscos de nylon, con un diámetro de 17 mm y poro de 0.25 µm. Los extractos resultantes se colocaron en viales de vidrio ámbar y se mantuvieron en refrigeración hasta el momento del análisis.

##### V.2.4.2 Cuantificación de capsaicinoides

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). Se utilizó el equipo Water 510, con un detector de arreglo de diodos. Se utilizó una columna de C18 con partículas de 25 µm de diámetro (Water Spherisorb ODS), y un tamaño de 150 mm de longitud y 4.7 mm de diámetro. La fase móvil fue una solución metanol-agua, ambas grado HPLC, en una relación 73:27, se filtró al vacío a través de una membrana de 0.2 µm de poro y se desgasificó durante 20 min. El tiempo de análisis fue de diez minutos y la fase móvil con flujo isocrático de 1ml/min. Se inyectaron 10 µL de cada muestra.

Para identificar y cuantificar la capsaicina de las muestras, se utilizó un estándar externo. Se prepararon soluciones del compuesto puro 8-metil-N-vanillil-6-

nonenamida (Capsaicina 95% pureza), a concentraciones de 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 y 0.1 mg/mL en acetonitrilo grado HPLC para obtener una curva estándar. Se corrieron bajo las mismas condiciones de las muestras.

#### V.2.5 Análisis estadístico

Para todas las pruebas, se realizaron dos experimentos independientes con tres repeticiones. Se realizó una comparación de medias mediante el análisis estadístico de Tukey-Kramer.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Contenido de compuestos fenólicos

#### VI.1.1 Taninos condensados (TC)

En el Cuadro 6 se muestra el contenido de taninos condensados de las distintas muestras de chile serrano. El contenido se encuentra en el intervalo de 17.28 a 29.49 mg eq. (+)-catequina/g muestra.

La mayor concentración de taninos condensados se obtuvo en el sistema de policultivo ( $29.42 \pm 1.40$ ) en comparación del sistema de monocultivo ( $17.67 \pm 0.64$ ). Por otra parte se pudo observar que la fertilización química, es la que induce la mayor producción de estos compuestos para ambos sistemas de cultivo ( $29.49 \pm 1.40$  y  $18.21 \pm 0.5$  mg eq. (+)-catequina/g de muestra) policultivo y monocultivo, respectivamente.

Cuadro 6. Contenido de taninos condensados en chile serrano (*Capsicum annum* L.).

Muestra con	Taninos	Muestra con	Taninos
Sistema de policultivo	Condensados*	Sistema de monocultivo	Condensados*
Químico	$29.42 \pm 1.40^a$	Químico	$18.21 \pm 0.57^{bc}$
Orgánico	$19.53 \pm 0.81^b$	Orgánico	$17.67 \pm 0.64^c$
Integral	$17.28 \pm 0.25^c$		

Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  el error estándar.

\*Concentración de taninos condensados expresada como mg equivalentes de (+)-catequina/gramo de chile. Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

#### VI.1.2 Flavonoides

En el Cuadro 7 se muestra el contenido de flavonoides de las distintas muestras de chile serrano expresados como  $\mu\text{g}$  eq. de rutina por gramo de muestra liofilizada.

El contenido de flavonoides que oscila desde los 4.77 a los 10.81 mg eq. rutina/g de muestra. Los resultados indican que los compuestos flavonoides tienen la misma tendencia que los compuestos taninos condensados, de tal manera que el sistema de policultivo induce una mayor producción de dichos compuestos en comparación que el sistema de monocultivo. De igual manera ocurre con el manejo agronómico ya que la fertilización química es la que presenta el mayor contenido de flavonoides ( $10.81 \pm 0.89$  mg eq. rutina/g de muestra) seguida de la fertilización orgánica ( $5.73 \pm 0.65$  y  $0.47 \pm 0.97$  mg eq. rutina/g de muestra) para policultivo y monocultivo respectivamente.

**Cuadro 7. Contenido de flavonoides en chile serrano (*Capsicum annuum* L.).**

Sistema de policultivo	Flavonoides*	Sistema de monocultivo	Flavonoides*
Químico	$10.81 \pm 0.89^a$	Químico	$4.86 \pm 0.34^b$
Orgánico	$5.73 \pm 0.65^b$	Orgánico	$4.77 \pm 0.97^b$
Integral	$5.04 \pm 0.44^b$		

Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones  $\pm$  el error estándar.

\*Concentración de flavonoides expresada como  $\mu\text{g}$  equivalentes de rutina/gramo de chile.

Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### VI.1.3 Fenoles totales

En el Cuadro 8 se muestra el contenido de fenoles totales de las distintas muestras de chile serrano, en la cual los resultados se expresan como mg eq. de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra liofilizada.

A diferencia de los TC y flavonoides, los fenoles totales se encuentran en forma mayoritaria en la fertilización de tipo integral ( $4.60 \pm 0.80$  mg eq. ácido gálico/100 g muestra) seguido de la fertilización orgánica. Sin embargo, el sistema de cultivo no influye sobre la síntesis de estos compuestos.

Cuadro 8. Contenido de fenoles totales en chile serrano (*Capsicum annuum* L.).

Sistema de policultivo	Fenoles Totales*	Sistema de monocultivo	Fenoles Totales*
Químico	3.38 ± 0.94 <sup>b</sup>	Químico	2.45 ± 0.48 <sup>b</sup>
Orgánico	3.47 ± 0.24 <sup>b</sup>	Orgánico	3.49 ± 0.45 <sup>b</sup>
Integral	4.60 ± 0.80 <sup>a</sup>		

Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± el error estándar.

\*Concentración de fenoles totales expresada como mg equivalentes de ácido gálico/100 gramos de chile. Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

## VI.2 Capacidad antioxidante

### VI.2.1 Capacidad antioxidante por el método DPPH

En el Cuadro 9 se muestra el potencial antioxidante de extractos metanólicos de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) mediante el ensayo del DPPH.

Los extractos mostraron una actividad antirradical (ARA) entre  $80.12 \pm 4.98$  y  $90.77 \pm 6.96$ , siendo la fertilización de tipo orgánico la que presenta mayor actividad antirradical (90% y 88%) tanto para el sistema de monocultivo como de policultivo, respectivamente. El Butirato de hidroxitolueno (BHT) que es un antioxidante comercial utilizado en la industria alimenticia se tomó como referencia para poder hacer una comparación entre su ARA y la de los extractos.

La capacidad antioxidante expresada en TEAC, por su siglas en inglés (Cuadro 9). Se observa que el sistema de policultivo es el que tiene mayor capacidad antioxidante ( $485.66 \pm 13.06$ ) expresado en mmoles equivalentes de trolox en comparación al sistema de monocultivo ( $475.55 \pm 6.83$ ) en ambos casos con fertilización química.

### VI.2.2 Capacidad antioxidante por el método ABTS

En el Cuadro 10 se muestra la capacidad antioxidante de extractos metanólicos de chile serrano (*Capssicum annuum* L.) mediante el ensayo de ABTS.

Cuadro 9. Potencial Antioxidante de extractos metanólicos de chile serrano (*Capsicum annuum* L.) mediante el ensayo del DPPH.

Sistema policultivo	ARA (%)	TEAC*	Sistema monocultivo	ARA (%)	TEAC*
Químico	80.12 ± 13.43 <sup>b</sup>	485.66 ± 13.06 <sup>a</sup>	Químico	83.97 ± 19.44 <sup>ba</sup>	475.55 ± 6.83 <sup>ba</sup>
Orgánico	88.37 ± 19.44 <sup>ba</sup>	464.00 ± 7.80 <sup>ba</sup>	Orgánico	90.77 ± 31.81 <sup>a</sup>	457.70 ± 18.26 <sup>t</sup>
Integral	84.27 ± 16.82 <sup>ab</sup>	474.76 ± 21.50 <sup>ba</sup>			

Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± el error estándar.

\* mM equivalentes de trolox/g de muestra (TEAC).

Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

Los extractos mostraron un TEAC dentro del intervalo de  $112.61 \pm 19.44$  a  $171.16 \pm 16.82$ .

El sistema de policultivo es el que presentó una mayor inhibición comparado contra el sistema de monocultivo ( $43.93 \pm 3.41$  y  $35.73 \pm 2.61$  % de inhibición, respectivamente). Dentro del sistema de policultivo, existe una mínima diferencia pero no estadísticamente significativa entre el tipo de fertilización química con la orgánica ( $43.75 \pm 2.86$  y  $43.93 \pm 3.41$  % de inhibición, respectivamente). Dentro del sistema de monocultivo, la fertilización química presenta un menor porcentaje de inhibición ( $31.50 \pm 1.21$ ) que la fertilización orgánica ( $35.73 \pm 2.61$ ). Hablando de la concentración de mmolar equivalentes de trolox/gramo de muestra, el sistema de policultivo con fertilización integral, el que presenta un mayor contenido ( $171.16 \pm 16.82$  mM eq. trolox/g de muestra), seguido por el químico ( $170.30 \pm 13.43$  mM eq. trolox/g de muestra) y el orgánico ( $135.19 \pm 19.44$  mM eq. trolox/g de muestra), todos con sistema de policultivo y el que tuvo el menor contenido fue el tratado con fertilización química y sistema de monocultivo ( $112.61 \pm 19.44$  mM eq. trolox/g de muestra).

Cuadro 10. Potencial Antioxidante de extractos metanólicos de chile serrano (*Capssicum annuun* L.) mediante el ensayo de ABTS.

Sistema Policultivo	TEAC*	% INHIBICIÓN	Sistema Monocultivo	TEAC*	%INHIBICIÓN
Químico	170.30 ± 13.43 <sup>ab</sup>	43.75 ± 2.86 <sup>ab</sup>	Químico	112.61 ± 19.44 <sup>c</sup>	31.50 ± 1.21 <sup>c</sup>
Orgánico	135.19 ± 19.44 <sup>bc</sup>	36.29 ± 2.34 <sup>b</sup>	Orgánico	132.55 ± 31.81 <sup>c</sup>	35.73 ± 2.61 <sup>c</sup>
Integral	171.16 ± 16.82 <sup>a</sup>	43.93 ± 3.41 <sup>a</sup>			

Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± el error estándar.

\*mM equivalentes de Trolox/gramo de chile.

Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

### VI.3 Cuantificación de capsaicina

#### VI.3.1 Contenido de capsaicina

En el Cuadro 11 se muestra el contenido de capsaicina de las distintas muestras de chile serrano, en la cual se muestra la conversión de dicho alcaloide a Unidades Scoville de Picor (USP) por sus siglas en inglés, tomando como base la relación 1 mg de capsaicinoides totales equivale a 15,000 USP (Reilly y col., 2001). Los extractos mostraron un contenido de capsaicina que oscila entre los  $1.65 \pm 0.17$  a los  $4.53 \pm 0.61$  mg eq. capsaicina/g de muestra, siendo el sistema de policultivo el que presentó el mayor contenido de dicho compuesto ( $4.53 \pm 0.61$  mg eq. capsaicina/g de muestra) con manejo agronómico integral, en comparación con el sistema de monocultivo. En relación a este sistema, la fertilización orgánica presenta un contenido de ( $3.72 \pm 0.72$  mg eq. capsaicina/g de muestra) siendo éste el mayor contenido dentro del sistema de monocultivo. La fertilización química fue la que presentó el menor contenido en ambos sistemas ( $1.65 \pm 0.17$  y  $2.45 \pm 0.22$  mg eq. capsaicina/g de muestra) monocultivo y policultivo, respectivamente.

Cuadro 11. Contenido de capsaicina en chile serrano (*Capsicum annuum* L.)

Sistema Policultivo	Capsaicina*	USP**	Sistema Monocultivo	Capsaicina*	USP**
Químico	2.45 ± 0.22 <sup>bc</sup>	36815.55	Químico	1.65 ± 0.17 <sup>c</sup>	24867.59
Orgánico	3.57 ± 0.57 <sup>ab</sup>	53530.26	Orgánico	3.72 ± 0.72 <sup>ab</sup>	55853.20
Integral	4.53 ± 0.61 <sup>a</sup>	68053.91			

Los resultados representan el promedio de dos experimentos independientes con tres repeticiones ± el error estándar.

\*Concentración de capsaicina expresada como mg equivalentes de capsaicina/gramo de chile.

\*\* Unidades Scoville de Picor (1 mg de capsaicina = 15,000 USP)

Letras diferentes en las columnas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey,  $\alpha=0.05$ ).

En la Figura 3 se muestra el cromatograma del estándar de capsaicina con un tiempo de retención (TR) de 3.197, lo que concuerda con lo informado por Morán-Bañuelos y col., 2008).

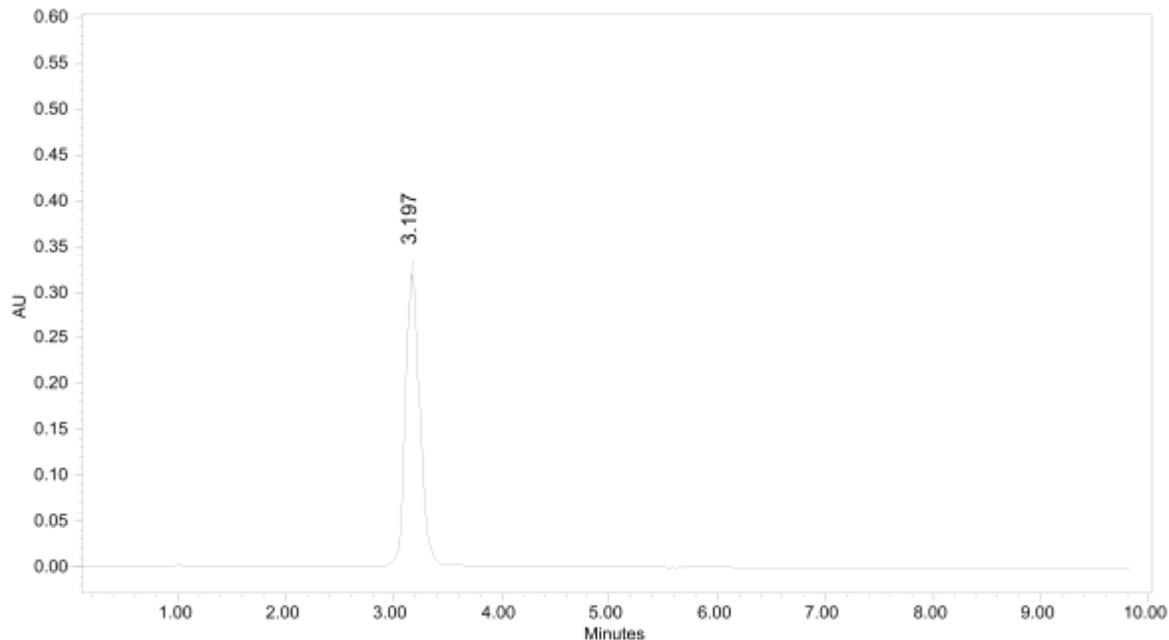


Figura 3. Cromatograma HPLC de estándar de capsaicina (Sigma Co.) concentración 0.6 mg capsacina/mL.

En la Figura 4 se muestra el cromatograma de las distintas muestras analizadas, en el cual, a una longitud de onda de 202 nm se observa el pico de mayor altura de nuestro interés con un tiempo de retención promedio de 3.364, el cual fue comparado e identificado con el obtenido a partir de la curva de calibración realizada con el estándar de capsaicina. Aunque este tiempo de retención está desplazado unas décimas de minuto, corresponde a la capsaicina debido a que el chile presenta otros compuestos, los cuales retrasa mínimamente el tiempo de retención de la capsaicina.

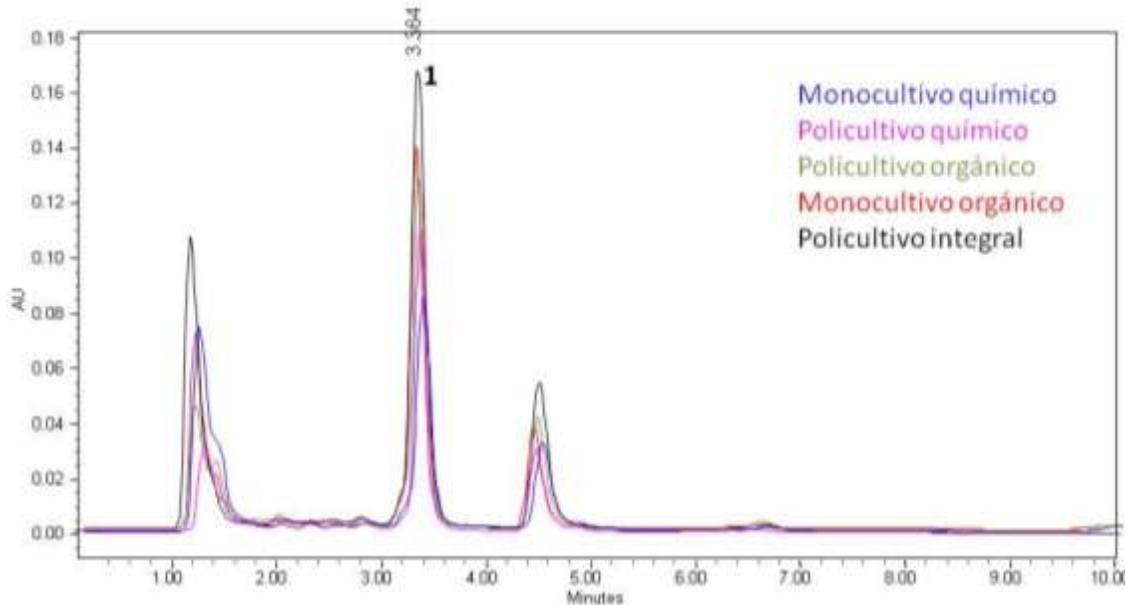


Figura 4. Cromatograma HPLC de extracto de chile serrano (*Capsicum annum* L.) (pico 1: capsaicina) a una longitud de onda de 202 nm.

## VII. DISCUSIÓN

### VII.1 Compuestos antioxidantes

#### VII.1.1 Contenido de taninos condensados

Las especies del género *Capsicum* son consideradas una buena fuente de compuestos antioxidantes; entre los que podemos encontrar fenoles, flavonoides y taninos condensados (Soriano del Castillo, 2006). En relación a estos últimos tanto el manejo agronómico como el sistema de cultivo influyen en su contenido como se pudo observar en nuestros resultados, donde el mayor contenido de taninos condensados fue el que tuvo un manejo agronómico químico y un sistema de policultivo (Cuadro 6) de  $29.42 \pm 1.40$  mg eq. de (+)-catequina/g de muestra. Cabe mencionar que este tipo de cultivo con su manejo agronómico tiene una diferencia significativa a todas las demás muestras, lo que sugiere que en el sistema de policultivo con nutrición química proporcione los nutrientes necesarios para sintetizar estos tipos de metabolitos secundarios. Por otra parte, el sistema de monocultivo, no presentó una diferencia significativa entre el manejo agronómico químico y orgánico, así como tampoco el sistema de policultivo con manejo integral.

En un estudio realizado por Álvarez-Parrilla (2011), reportó un contenido de taninos condensados en chile serrano de  $4.41 \pm 0.13$  mg eq. de (+)-catequina/g de muestra, con tipo de fertilización ordinaria, entendiendo como ordinaria a la fertilización química, valor por debajo a los reportados en el presente trabajo (Cuadro 3), sin embargo, el método utilizado en ese reporte fue de acuerdo a descrito por Menichini y colaboradores (2009) utilizando  $\text{NaNO}_2$  y  $\text{NaOH}$  para su cuantificación. Esta diferencia puede ser atribuida al sistema de cultivo que se manejó en nuestras muestras analizadas las cuales fueron bajo un sistema de policultivo, es decir, las condiciones ambientales de su contorno. Las diferencias pueden ser también atribuidas por el método de extracción metanólica de los compuestos fenólicos, debido a que los reportados por Álvarez-Parrilla y col. (2011), el tiempo de extracción reportado es de 30 minutos, mientras que los del presente estudio su tiempo de extracción fue de 24 h.

### VII.1.2 Contenido de flavonoides

La función de los flavonoides dentro del mundo vegetal es la de atraer a los polinizadores hacia las flores o los animales que comen los frutos, entre ellos los humanos, con la intención de que puedan dispersar mejor las semillas (Nuez y col., 2003). Igualmente, la producción de flavonoides en las especies vegetales también puede ser debido a la respuesta adaptativa a la intensa radiación ultravioleta, protegiendo así de los efectos nocivos de los rayos solares y dado que los humanos lo consumen, adquieren ciertas propiedades de los flavonoides, tales como antioxidantes, anticancerígenas, entre otras. Cabe destacar que hasta donde se ha revisado son escasos los estudios referentes al de flavonoides, por lo que estos resultados serían una fuente importante de información al respecto. De los extractos metanólicos de chile serrano (*Capsicum annum* L) el que presentó un mayor contenido de flavonoides (Cuadro 7), fue el que tuvo un sistema de policultivo con manejo agronómico químico ( $10812.50 \pm 890.92$   $\mu\text{g}$  eq. rutina/g de muestra), mientras que el sistema de monocultivo con fertilización orgánica presentó el menor contenido de flavonoides ( $4770.83 \pm 968.58$   $\mu\text{g}$  eq. rutina/g de muestra), Marín y colaboradores (2008) reportan mayor contenido de flavonoides en chile dulce (*Capsicum annum* L. cv. Quito) ( $22.2$   $\mu\text{g}$  eq rutina/g muestra); cabe mencionar que estos autores no mencionan la metodología del cultivo por lo que se desconoce el tipo de fertilización utilizada, así como el sistema de cultivo. Lo que sugiere una buena disposición de nutrientes en nuestro sistema de cultivo y manejo agronómico para la síntesis de estos metabolitos, atribuyendo a esto las diferencias entre los resultados.

### VII.1.3 Contenido de fenoles totales

Los fenoles totales son componentes importantes en la dieta humana, existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su relación en la prevención de enfermedades crónico-degenerativas como: obesidad, diabetes, cardiovasculares y cáncer (Pérez Gastell y Pérez de Alejo, 2000). Relación que se atribuye a la presencia de compuestos bioactivos como son los compuestos

fenólicos (Marín, 2008), además de ser responsables del buen funcionamiento de las plantas, dentro de ellas el chile, incluso pueden actuar también como señalizadores químicos, indicando a los insectos qué planta es apropiada para su alimentación (Gracia, 2007). De los extractos metanólicos de las muestras de chile evaluadas (cuadro 8), el sistema de policultivo con un manejo agronómico integral fue el que presentó un mayor contenido de fenoles totales ( $4.60 \pm 0.80$  mg eq. de ácido gálico por/100 g de muestra), y con diferencia estadísticamente significativa a los demás, mientras que éstos últimos no mostraron diferencia significativa entre sí. El que presentó el menor contenido de fenoles totales fue el monocultivo con fertilización química  $2.45 \pm 0.48$  (mg eq. de ácido gálico por cada 100 gramos de muestra). Álvarez-Padilla y colaboradores (2011) reporta un contenido de fenoles totales de  $1032 \pm 95$  mg eq. de ácido gálico por/100 g de muestra, en chile jalapeño, el es superior a los reportados en este trabajo. De la misma manera, Hervert-Hernández y colaboradores en 2010 reportan un contenido de 966.6  $\pm$  21.2 de polifenoles hidrolizables en chile chipotle (mg/100 g de muestra seca). La diferencia que se reporta entre los resultados del presente trabajo y los reportados en la bibliografía pueden ser atribuidos por su contenido de clorofila en las muestras evaluadas en el presente trabajo.

## VII.2 Capacidad antioxidante

### VII.2.1 Capacidad antioxidante por DPPH

La evaluación de la capacidad antioxidante, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de los radicales libres, por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de los extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación; teniendo así que de los extractos metanólicos de las muestras de chile, el que presentó mayor porcentaje de actividad antirradical (ARA, Cuadro 9) de  $90.77 \pm 31.81$  fue el monocultivo orgánico, tomando en cuenta que es el que mostró el menor contenido de flavonoides ( $4770.83 \pm 968.58$   $\mu$ g equivalentes de rutina/g de muestra) por lo que sugiere que este extracto tenga otros compuestos fenólicos que contribuyen sumando o de manera sinérgica con esta ARA. Álvarez-

Parrilla y colaboradores (2011) reportan la capacidad antioxidante como equivalentes de trolox (TEAC) de extracto metanólico de chile serrano de  $4103 \pm 296 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de muestra, cantidad menor a las aquí reportadas que van en un intervalo de  $4577.07 \pm 182.69$  a  $4856.61 \pm 130.65 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de muestra. La diferencia sugiere que el contenido de compuestos fenólicos es importante para la capacidad antioxidante y que éstos son dependientes del tratamiento agronómico.

#### VII.2.2 Determinación de capacidad antioxidante por ABTS

No existe un único compuesto antioxidante responsable mayoritariamente de la capacidad antioxidante del chile, sino que ésta se explica por el conjunto de todos ellos, dependiendo del número y localización de los grupos hidroxilo en la estructura de estos compuestos antioxidantes. La capacidad antioxidante de los vegetales incluyendo al chile, puede ser influenciada igualmente por factores genéticos, así como por el ambiente. Asumiendo esto, los resultados para los extractos metanólicos de las muestras evaluadas (Cuadro 10), es de  $112.61 \pm 19.4$  de ARA para el monocultivo químico, muestra que para el policultivo integral fue de  $171.16 \pm 16.82 \text{ mM}$  equivalentes de trolox/g con un porcentaje de inhibición del radical ABTS de  $43.93 \pm 3.41$ ; Datos que sugieren que tanto los taninos condensados como los flavonoides contribuyen en este resultado, seguido por fenoles totales, debido a que la muestra bajo un sistema de policultivo con fertilización química, presenta el mayor contenido de flavonoides y de taninos condensados así como también ocupa el segundo lugar de fenoles totales de todas las muestras. Por el lado contrario, el tratamiento de fertilización química con sistema de monocultivo, es el que presentó los menores valores de compuestos antioxidantes (TC, flavonoides, fenoles totales, incluso capsaicina) teniendo en consecuencia una baja capacidad antioxidante con dicho manejo agronómico y sistema de cultivo. Álvarez-Parrilla y col. (2011) y Hervert-Hernández y col. (2010) reportan  $4787 \pm 625 \mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$  de chile serrano y  $44.4 \pm 0.6 \mu\text{mol TE}/\text{g}$  de chile chipotle, respectivamente. Resultados superiores a los reportados en este trabajo

(Cuadro 10). Materska, 2005 ha sugerido que la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos está relacionada al número y posición de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos, esterificación o en su forma libre de los compuestos analizados, y los sustituyentes metoxi en la posición orto al OH. Incluso también se le atribuye a otros compuestos presentes en el chile como los carotenoides y la capsaicina.

### VII.3 Contenido de capsaicina

Se dice que los chiles pueden producir alteraciones en el tracto digestivo y que su consumo puede aumentar la probabilidad de desarrollar cáncer gástrico, sin embargo, es mucho mayor la cantidad de estudios que demuestran que algunos componentes de los chiles, principalmente la capsaicina tiene efecto inhibitorio sobre células cancerígenas (Kim y Moon, 2004; Hirán y col., 2008). Entre las propiedades biológicas de los chiles destaca su actividad antioxidante, capacidad de inhibición del crecimiento de células cancerígenas, y algunas otras como antiinflamatorias y analgésicas de las variedades picantes, como es el caso del chile serrano, por la presencia de capsaicina (Kaefer y Milner, 2007). En los extractos de capsaicinoides de las muestras analizadas (Cuadro 11), los de sistema de policultivo con manejo agronómico integral fue el que mostró un mayor contenido de capsaicina ( $4.53 \pm 0.61$ ) siendo estadísticamente diferente al monocultivo químico (Tukey,  $\alpha=0.05$ ), la cual presentó el menor contenido de capsaicina ( $1.65 \pm 0.17$ ) y no presenta una diferencia significativa en comparación con el policultivo químico pero entre muestras si existe diferencia significativa. Álvarez-Parrilla y colaboradores (2011) reporta un contenido de  $1.60 \pm 0.06$  miligramos de capsaicina por gramo de chile serrano, resultado aún menor que el reportado en el presente trabajo con el de mínimo contenido. Otros autores (Topuz, 2007; Harrison, 1985) reportan valores semejantes a Álvarez-Parrilla para chile serrano, jalapeño y otras variedades. Cabe destacar que ninguno de los autores anteriores reporta el método de cultivo de las especies estudiadas para su cuantificación de capsaicina, lo que pone de manifiesto la aportación original de estos datos.

## **VIII. CONCLUSIONES**

El sistema de policultivo fue el que tuvo más influencia en la producción de compuestos fenólicos y capsaicina, y también mayor capacidad antioxidante. Respecto al manejo agronómico del chile serrano, la fertilización química fue la que aumentó en mayor cantidad estos compuestos antioxidante, seguida por la fertilización integral, en la cual, se observó también la mayor concentración de capsaicina sugiriendo que también aporta capacidad para atrapar radicales libres lo que lo hace un compuesto antioxidante. El sistema de monocultivo no contribuyó de una buena forma a la producción de estos compuestos disminuyendo así la capacidad antioxidante del chile. En general, el chile serrano da un buen aporte de compuestos antioxidantes para la prevención de algunas enfermedades crónico-degenerativas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

**Aherne, S.A., O'Brien, N.M. 2002.** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. Vol:18:75-81

**Alpi, A., Tognoni, F. 1991.** Cultivo en invernadero. 3ra. edición. Mundi-Prensa. España:129-136.

**Alvarez-Parrilla, E., De la Rosa, L. A., Amarowicz, R., Shahidi, F. 2011.** Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 59:163-173.

**Bello, J. 2005.** La alimentación Básica. Editorial día de santos. España: 304-305.

**Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss Technol*. Vol. 28: 25-30.

**Brasseur, T. 1989.** Propriétés anti-inflammatoires de flavonoides. *Journal of Pharmacology*. Vol. 44 : 235-241

**Burda, S., Oleszek, W. 2001.** Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 49: 2774-2779.

**Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., Arnao, M. B. 2002.** On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS assay. *Redox Report* .Vol. 7: 103-109.

**Cardador-Martínez, A., Loarca-Piña, G., Oomah, B.D. 2002.** Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50:6975-6980.

**Cobos, L.S. 2009.** Nutrición y manejo de la sanidad en policultivo (*Capsicum annum*, *Lycopersicon esculentum*, *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris*) bajo condiciones de invernadero. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de Licenciatura.

**Contreras, M. 1997.** Estudio de la producción y degradación de los capsaicinoides en 3 variedades de chile (*Capsicum annum* y *Capsicum chinense*). Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestría en ciencia y Tecnología de Alimentos: 65-68.

- Dewanto, V., Wu X., Adom, K. K.- Lui, R. H. 2002.** Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. Vol. 50: 3010-3014.
- Djamgoz, M. B. A., Isbilen, B. 2006.** Dietary compounds as anti-cancer agents: a preliminary evaluation of ion channels and membrane excitability as possible target mechanisms. *Turkish Biochemistry*. Vol. 31: 57-68.
- Elias, F., Castellvi, F. 2001.** *Agrometeorología*. 2da. edición. Mundi-Prensa. España: 391-393.
- Feregrino-Pérez, A.A, Berumen, L.C., García-Alcocer, G. Guevara-González, R.G., Ramos-Gomez, M., Reynoso-Camacho, R., Acosta-Gallegos, J.A., Loarca-Piña, G. 2008.** Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56: 8737-8744.
- Firuzi, O., Lacanna, R., Petrucci, G., Marrosu, W., and Saso, L. 2005.** Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltametry. *Biochimistry Biophys. Acta*. 1721: 174-184.
- Florescano, E. 2004.** *El Patrimonio Nacional de México*. 1ra. ed. Biblioteca Mexicana. México: 211-213.
- Fukumoto, L. R., Mazza, G. 2000.** Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistr*. Vol. 48: 3597-3604.
- Geleijnse, J.M., Launer, L.J., Van der Kuip, D.A., Hofman, A., Witteman, J.C. 2002.** Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction. *Journal Clinical Nutrition*. Vol. 75:880-886.
- Gliessman, S. R. 2002.** *Agroecología, Procesos Ecológicos en Agricultura Sostenible*. 1ra. ed. EUA: 116, 193.
- Goldberg, A. 2002.** <http://www.obesidad.net/spanish2002/default.htm>
- Gordon, M.H. 2001.** *El desarrollo del enranciamiento oxidativo en los alimentos*. Acribia, Zaragoza: 7-21.
- Gracia, M.A. 2007.** Cuantiifación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *Verano de la ciencia, Universidad Autónoma de Querétaro*: 21.

- Harrison, M. K., Harris, N. D. 1985.** Effects of processing treatments on recovery of capsaicin in Jalapeño peppers. *Journal of Food Science*. Vo. 50: 1764-1765.
- Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S. G., Goni, I. 2010.** Bioactive compounds of four hot peppers varieties (*Capsicum annuum* L.) antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 58: 3399-3406.
- Hirán, S., Aguilar-Rincón, V., Castillo-González, F. 2008.** Capsaicinoids in chilli pepper landraces of Puebla, Mexico. *Agrociencia*. Vol 42: 212-221.
- Howard, L.R., Wildman, R. 2007.** Isoflavones: source and metabolism. *Handbook of nutraceuticals and functional foods*. Boca Raton. EUA: 165–191.
- Infoagro, Información de agricultura. 2010.**  
<http://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm>
- Kaefer, C., and Milner, J. 2007.** The role of herbs and spices in cancer prevention. *Journal of Nutritional Biochemistry*. Vol. 19: 347-361.
- Kim, S., Moon, A. 2004.** Capsaicin-Induced Apoptosis of H-Ras-Transformed Human Breast Epithelial Cells in Rac-dependen via ROS Generation. *Archives of Pharmacal Research*. Vol. 27 (8): 845-849.
- Marín, A., Gil, M. I., Flores, P., Selma, V. 2008.** Microbial Quality and Bioactive Constituents of Sweet peppers from Sustainable Production Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 56: 11334-11341.
- Martínez-Flórez, J., González-Gallego, J.M. Tuñon, J. 2002.** Los flavonoide: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*. Vol 6:271-278.
- Materska, M., Perucka, I. 2005.** Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53:1750-1756.
- Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., De Cindio, B., Houghton, P. J. 2009.** The influence of fruit ripening in the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. Cv Habanero. *Food Chemistry*. Vol. 114:553-560.

**Morán-Bañuelos, S. H., Aguilar-Rincón V. H., Corona-Torres T., Castillo-González F., Soto Hernández R. M., San Miguel-Chávez R. 2008.** Capsaicinoides en chiles nativos de Puebla, México. *Agrociencia*. Vol. 42: 807-816.

**Mori, A., Derito, C.M., Song, W., Dong, M. 2010.** Cellular Antioxidant Activity of Common Vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 58: 621-662.

**Nenadis, N., Wang, L.F., Tsimidou, M., Zhang, H.Y. 2004.** Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS\_ assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 52: 4669–74.

**Nuez, F., Ortega, G., Costa, J. 2003.** El cultivo de Pimientos, Chiles y Ajies. 2da. ed., Mundi-Prensa, España: 15-16, 50-51.

**Oomah, B.D., Cardador, A., Loarca, G. 2005.** Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food Agriculture*. Vol. 85: 935-942.

**Pratt, D.E. 1972.** Water-Soluble antioxidant activity in soybeans. *Journal of Food Science*. Vol. 37: 322–323.

**Pérez-Gastell, M.I., Pérez de Alejo, J.L. 2000.** Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana Medica Militar*. Vol. 29, pp. 192-198.

**Reilly, C. A., Croush, D.J., Yost, G. S. 2001.** Quantitative analysis of capsaicinoids in fresh peppers, oleoresin *Capsicum* and pepper spray pproducts. *Journal Forensic Science*. Vol. 46(3): 502-509.

**Sánchez, J. M. 2007.** Evaluación del potencial antioxidante y actividad antimutagénica de pigmentos de maíces criollos (*Zea mays* L.) cultivados en el estado de Querétaro. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de licenciatura en químico farmacéutico biólogo: 48:50.

**Saskia, A. B. E., Van Accer, Bast, A. A. 1998.** Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. *Flavonoids in health and Disease*. Ed. Marcel Dekker. New York: 221-225.

**SIACON. 2010.** Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta para Windows.[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=181&Itemid=426](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=181&Itemid=426).

**Soriano del Castillo, J. M. 2006.** Nutrición Básica Humana. 1ra. ed. Editorial puv. España: pp.126-133.

**Topuz, A., Ozdemir, F., 2007.** Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L.) grown in Turkey. Journal of Food Composition Anal. Vol. 20: 596-602.

**Valencia, M.E., Robles-Sardin, A.E. 2005.** El valor nutr imental y protector de las frutas y verduras en la dieta humana. Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados. Logiprint Digital. México: 1-14.

**Vázquez, F., Miranda, M., Monforte, M., Gutiérrez, G., Velázquez, C., Nieto, Y. 2007.** La Biosíntesis de Capsaicinoides, El Principio Picante del Chile. Revista Fitotecnia Mexicana. Vol. 30: 353-360.

**Yang, K., Lamprecht, S.A., Liu, Y. 2000.** Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. Carcinogenesis. Vol.21:1655-1660.

**Yanishlieva-Maslarova, N., Gordon, M. 2001.** Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas. Acribia, Zaragoza: 119-137.

## X. ANEXOS

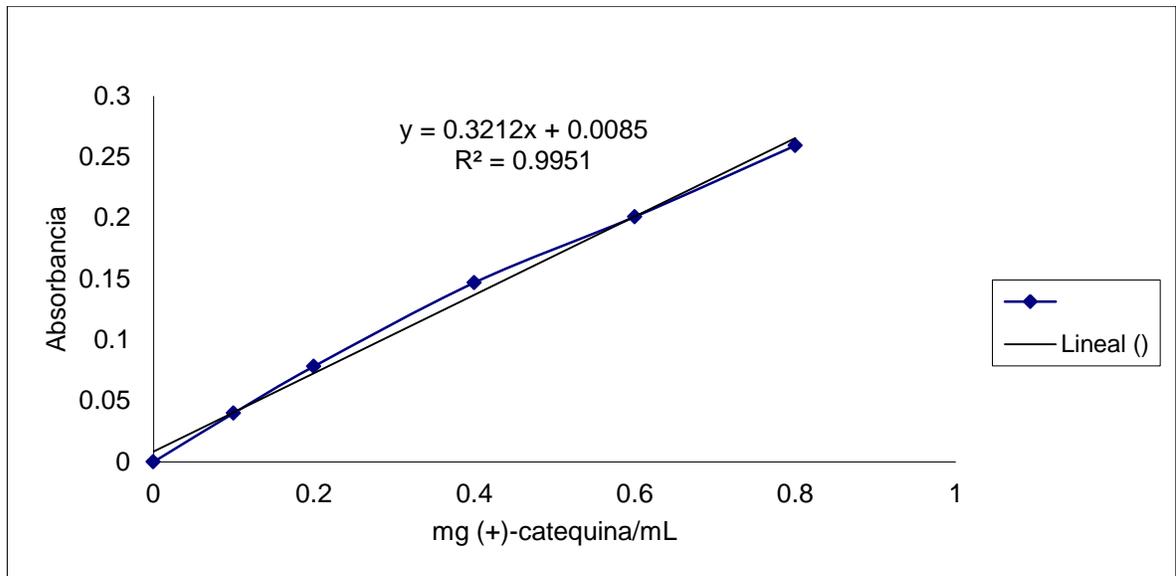


Figura 5. Curva de calibración de taninos condensados (TC).

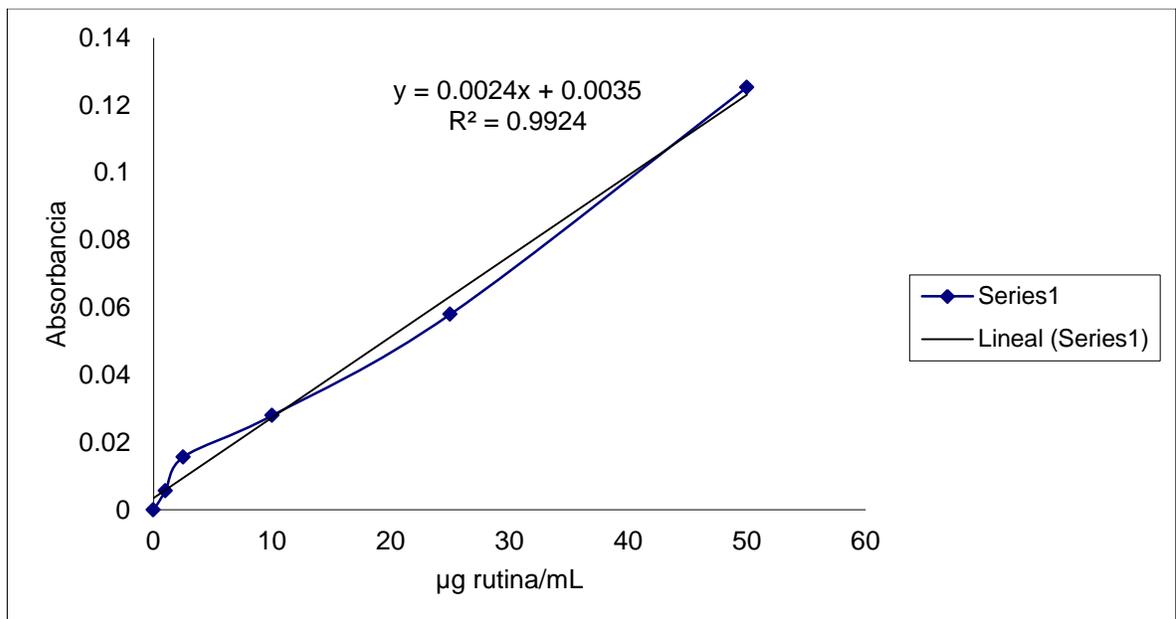


Figura 6. Curva de calibración Flavonoides

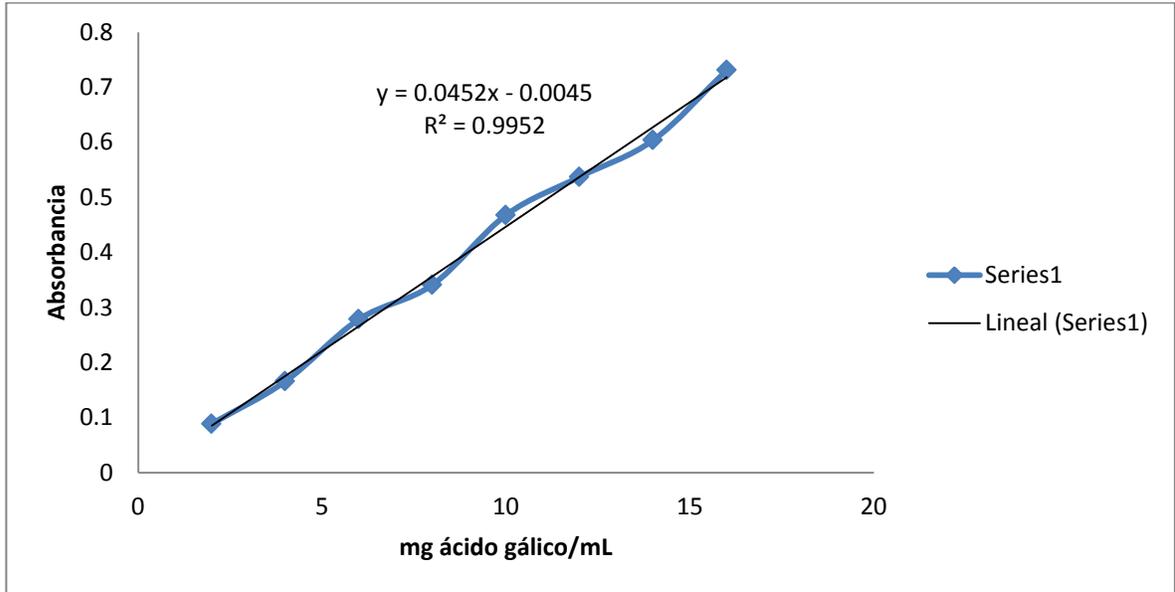


Figura 7. Curva de calibración fenoles totales.

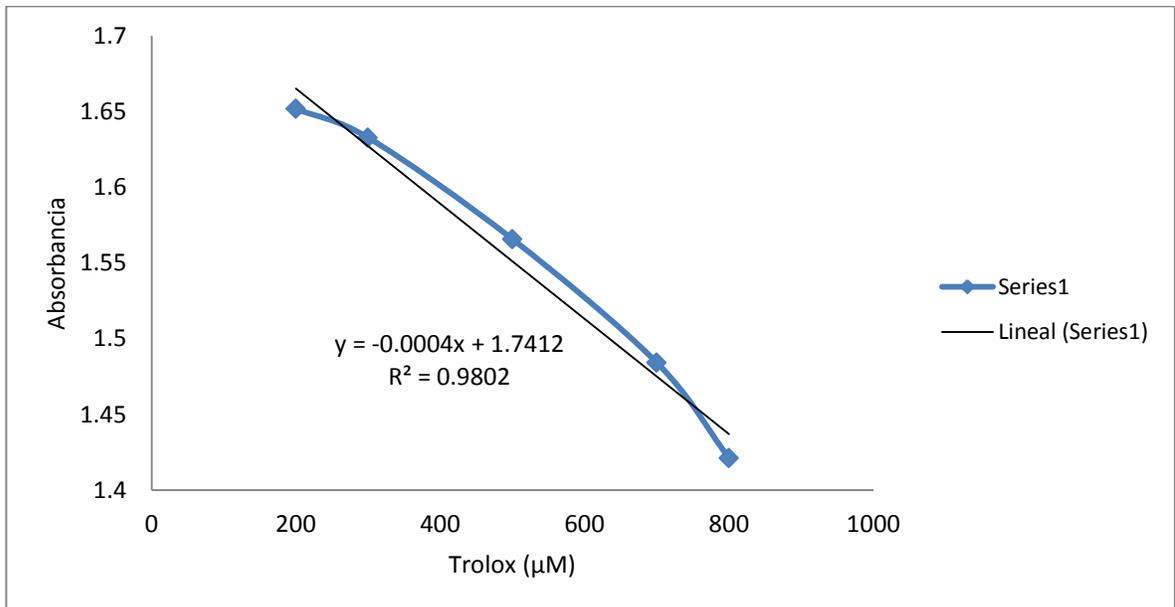


Figura 8. Curva de calibración DPPH.

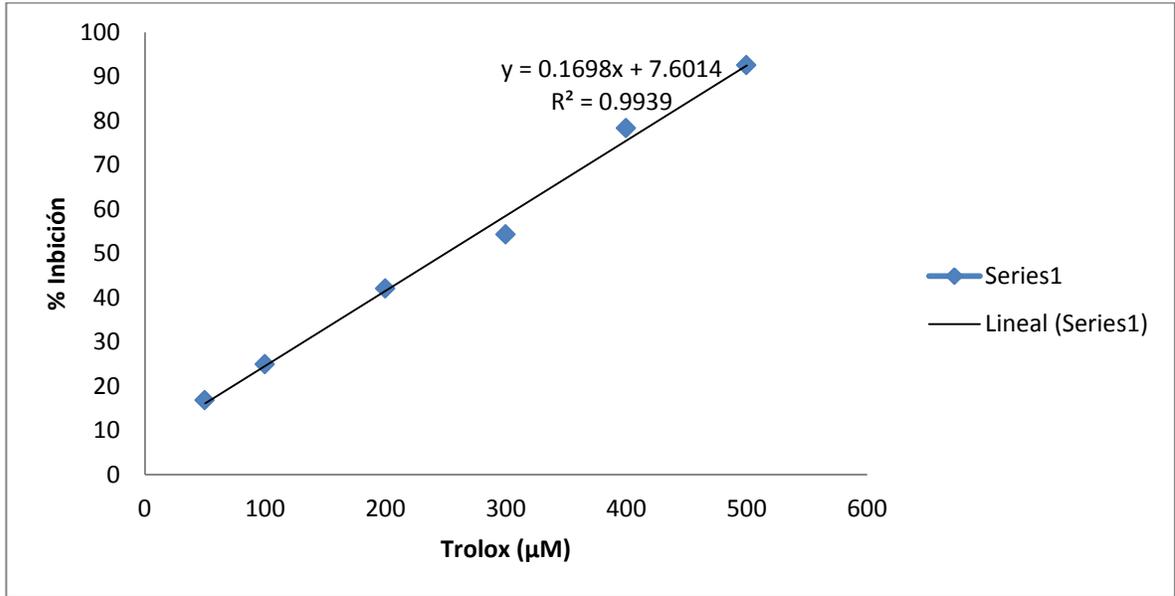


Figura 9. Curva de calibración ABTS.

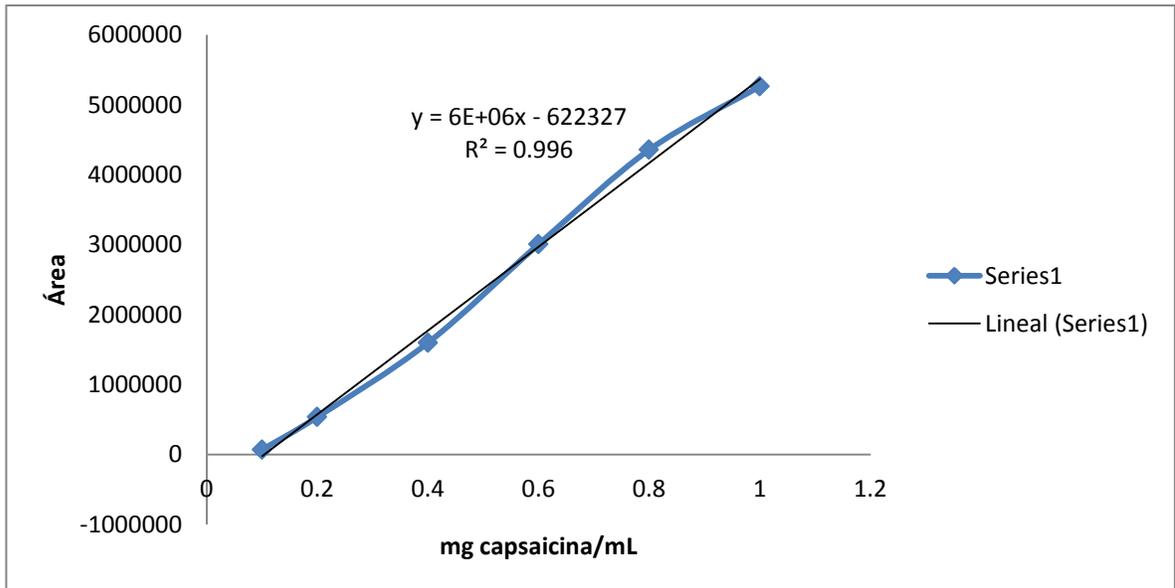


Figura 10. Curva de calibración estándar de capsaicina.

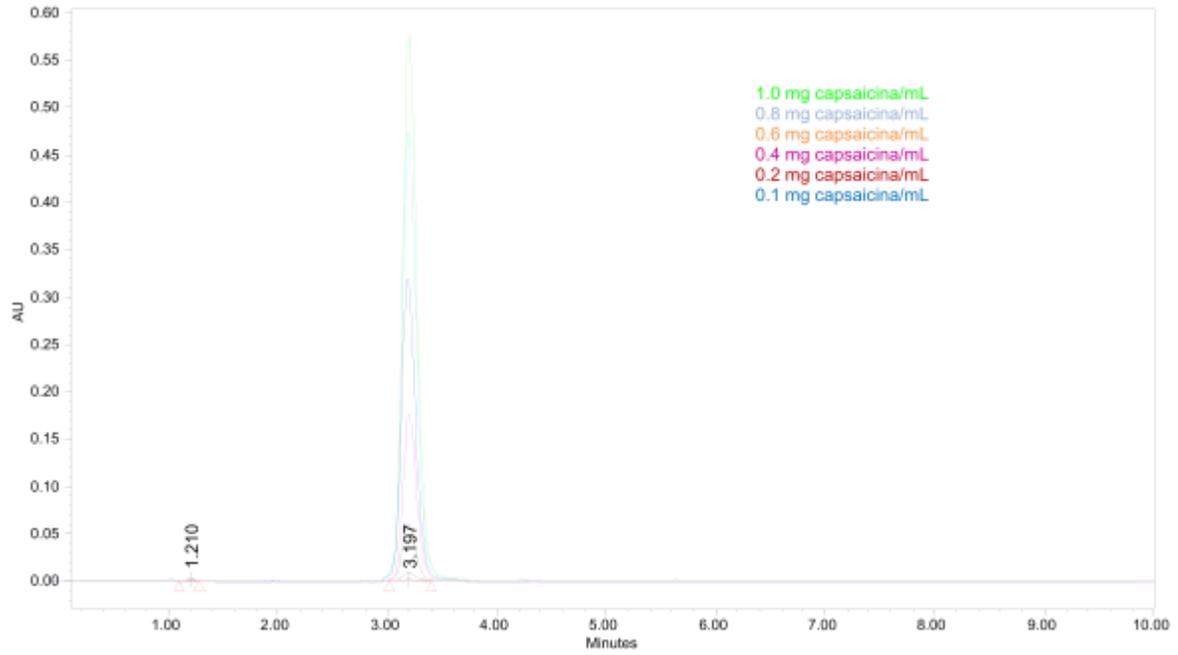


Figura 11. Cromatograma de la curva de calibración ocupando estándar de capsaicina (Sigma Co.).