



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ingeniería en Biosistemas

EFECTO DEL CAPSIATO EN ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE INTERÉS FITOPATOLÓGICO Y MÉDICO

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

Kenia Castillo Vázquez

Dirigido por:

Ramón Gerardo Guevara González

SINODALES

Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

_____.
Firma

Ana Angélica Feregrino Pérez

Secretario

_____.
Firma

Enrique Rico García

Vocal

_____.
Firma

Rosalía Virginia Ocampo Velázquez

Suplente

_____.
Firma

Pablo Luis Godínez Mendoza

Suplente

_____.
Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2023
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto del capsiato en actividades biológicas de
interés fitopatológico y médico.

por

Kenia Castillo Vázquez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGMAC-227276

RESUMEN

Debido a la resistencia antimicrobiana que es causada por el uso indebido de antibióticos sintéticos en áreas médicas, agrícolas y ganaderas es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para abastecer la demanda de antibióticos. Extractos vegetales, como el del chile, poseen efectos inhibitorios sobre el crecimiento microbiano debido a sus compuestos naturales, siendo en el chile los capsaicinoides y capsinoides, entre los que se encuentran la capsaicina y el capsiato respectivamente, las moléculas responsables de actuar en diferentes actividades biológicas. La capsaicina es la causante del picor (pungencia) de los chiles mientras que el capsiato es el análogo a ésta que, debido cambios estructurales en la molécula, es 1000 veces menos pungente. Se ha comprobado que ambas moléculas actúan de forma similar. Sin embargo, la ausencia de pungencia le confiere ventaja al capsiato en aplicaciones clínicas. Ensayos antimicrobianos en medio líquido fueron realizados contra bacterias Gram positivas (*B. cereus*, *E. faecalis* y *S. aureus*), Gram negativas (*E. coli*, *Salmonella spp* y *Pseudomonas spp*), hongos (*Fusarium oxysporum*) y oomicetos (*Phytophthora capsici*) haciendo uso de oleorresina de chile rico en capsiato en concentraciones del 0.1, 0.5 y 1% (w/v) como agente antimicrobiano obteniendo mejores efectos con la mayor concentración (1%) para *E. faecalis*, *Salmonella spp* y *Fusarium oxysporum* y un efecto inhibitorio contra *Phytophthora capsici* eficaz para las tres concentraciones, sin tener efecto para las bacterias *B. cereus*, *E. coli* y *Pseudomonas spp*.

SUMMARY

Due to antimicrobial resistance caused by the improper use of synthetic antibiotics in medical, agricultural, and livestock areas, it is necessary to search new alternatives to supply the antibiotics demand. Vegetable extracts, such as chili oleoresin, have inhibitory effects on microbial growth due to their natural compounds, being these the capsaicinoids and capsinoids in chili, among which are capsaicin and capsiate, respectively, the molecules responsible for acting in different biological activities. Capsaicin is responsible for the pungency or hotness of chilies, while capsiate is the analog to this capsaicinoid which, due structural changes in the molecule, is 1000 times less pungent. Both have been found to act similarly. However, the absence of pungency gives capsiate an advantage in clinical applications. Antimicrobial assays in liquid medium were performed against Gram positive bacteria (*B. cereus*, *E. faecalis* and *S. aureus*), Gram negative (*E. coli*, *Salmonella spp* and *Pseudomonas spp*) and fungi (*Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici*) using capsiate-rich chili oleoresin in concentrations of 0.1, 0.5 and 1% (w/v) as an antimicrobial agent obtaining better effects with the highest concentration for *E. faecalis*, *Salmonella spp* and *Fusarium oxysporum* and an inhibitory effect against *Phytophthora capsici* effective for all the three concentrations without effect for *B. cereus*, *E. coli* and *Pseudomonas spp*.

Esta tesis es dedicada a Mariana y Daniel Carrillo Castillo, mis sobrinos, que me ayudaron a superar una etapa difícil en mi vida, sin siquiera tener conciencia del bien que me hacía estar con ellos día con día y continuarán haciéndolo a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar he de agradecer a la Universidad Autónoma de Querétaro y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por darme la oportunidad y los recursos para poder cursar la Maestría en Ciencias en Ingeniería en Biosistemas en la misma institución.

Al sínodo evaluador de tesis: Dr. Ramón Gerardo Guevara González, Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez, Dr. Enrique Rico García, Dra. Rosalía Ocampo Velázquez y Mto. Pablo Luis Godínez Mendoza. En especial al Dr. Ramón, por aceptarme en su grupo de trabajo y asesorarme a lo largo del programa y a la Dra. Feregrino, por apoyarme en la parte experimental dándome lugar en su laboratorio.

A mis compañeros y amigos Eliud Escudero, Luz Gutiérrez, Itzia Palacios, Montserrat Ramírez, Leslie Rosas y Jhasua Rubio por formar el mejor grupo escolar en el que he estado, haciendo que los 2 años en los que estuvimos juntos pasaran en un abrir y cerrar de ojos, por el apoyo, los ánimos y los consejos que me dieron y por la amistad que me han brindado.

A mis grandes amigas, Mairany Chávez y Luisa Zenteno, por estar incondicionalmente desde hace más de 10 años apoyándome y estando de la mano en mis logros, malas rachas y aventuras.

Y, por supuesto, a toda mi familia que con sus palabras siempre me alientan a ser mejor día a día. Sobre todo le agradezco a mi mamá Ivonne Vázquez, a mi papá Edmundo Castillo, a mis hermanos Katia e Iván Castillo, por estar siempre para mí en mis logros y fracasos, alentándome, apoyándome, preocupándose y regañándome. Y a mis sobrinos Mariana y Daniel Carrillo, por darle más felicidad y unión a esta familia y por haberme dado la fuerza, junto con su mamá, Katia, para salir de una mala situación y empezar el proceso para iniciar y concluir esta maestría.

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. HIPÓTESIS.....	11
I.2. OBJETIVOS.....	11
I.2.1. Objetivo general.....	11
I.2.2. Objetivos particulares.....	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
II.1. EL CHILE.....	12
II.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL CHILE.....	12
II.2.1. Compuestos fenólicos.....	12
II.2.2. Carotenoides.....	13
II.2.3. Capsaicinoides.....	13
II.2.4. Capsinoides.....	14
II.3. MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	14
II.3.1. Destilación.....	14
II.3.2. Extracción por solventes.....	15
II.3.3. Métodos emergentes.....	15
II.4. BIOSÍNTESIS DE CAPSINOIDES Y CAPSAICINOIDES.....	16
II.5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE CAPSINOIDES Y CAPSAICINOIDES.....	18
II.6. IMPORTANCIA MÉDICA Y FITOPATOLÓGICA.....	19
II.7. MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA MÉDICA.....	21
II.7.1. <i>Bacillus cereus</i>.....	21

II.7.2.	<i>Escherichia coli</i>	21
II.7.3.	<i>Enterococcus faecalis</i>	22
II.7.4.	<i>Pseudomonas spp.</i>	22
II.7.5.	<i>Salmonella spp.</i>	23
II.7.6.	<i>Staphylococcus aureus</i>	23
II.8.	MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA FITOPATOLÓGICA	24
II.8.1.	<i>Fusarium oxysporum</i>	24
II.8.2.	<i>Phytophthora capsici</i>	24
III.	METODOLOGÍA	25
III.1.	PRODUCCIÓN DE CHILE RICO EN CAPSIATO (<i>CAPSICUM ANNUUM</i> L. 509-45-1) A NIVEL INVERNADERO.	25
III.1.1.	Material biológico	25
III.1.2.	Germinación	25
III.1.3.	Trasplante	26
III.1.4.	Labores culturales	26
III.1.5.	Cosecha	27
III.2.	PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE CHILE RICO EN CAPSIATO Y RICO EN CAPSAICINA	28
III.2.1.	Material biológico	28
III.2.2.	Extracción	29
III.2.3.	Recuperación	29
III.3.	EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO CONTRA PATÓGENOS Y FITOPATÓGENOS DEL EXTRACTO DE CHILE RICO EN CAPSIATO.	30
III.3.1.	Material biológico	30
III.3.2.	Activación de microorganismos	30
III.3.3.	Ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano en medio líquido	30
III.3.4.	Ensayo de inhibición de crecimiento fúngico en medio líquido	31
III.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	32
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33

IV.1. PRODUCCIÓN DE CHILE RICO EN CAPSIATO (<i>CAPSICUM ANNUUM</i> L. 509-45-1) A NIVEL INVERNADERO.....	33
IV.2. PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE CHILE RICO EN CAPSIATO Y RICO EN CAPSAICINA	33
IV.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO CONTRA PATÓGENOS Y FITOPATÓGENOS DEL EXTRACTO DE CHILE RICO EN CAPSIATO.....	33
IV.3.1. <i>B. cereus</i>	33
IV.3.2. <i>E. coli</i>	34
IV.3.3. <i>E. faecalis</i>.....	35
IV.3.4. <i>Pseudomonas spp.</i>.....	36
IV.3.5. <i>Salmonella spp.</i>	37
IV.3.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	37
IV.3.7. <i>Fusarium oxysporum</i>	38
IV.3.8. <i>Phytophthora capsici</i>	39
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. PERSPECTIVAS	42
LITERATURA CITADA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comprensión actual de la biosíntesis de vanillilamina en la ruta biosintética de capsaicinoides (García, 2017).....	17
Figura 2. Semillas de accesión 509-45-1 de <i>Capsicum annuum</i> L.....	25
Figura 3. Germinación de <i>Capsicum annuum</i> L. 509-45-1.....	26
Figura 4. Trasplante de <i>Capsicum annuum</i> L. 509-45-1.....	26
Figura 5. A. Distribución de <i>Capsicum annuum</i> L. 509-45-1 dentro del invernadero. B. Labores culturales (tutoreo).....	27
Figura 6. Cosecha de <i>Capsicum annuum</i> L. 509-45-1.	28
Figura 7. A. Polvo de <i>Capsicum annuum</i> L. 509-45-1. B. Polvo de chile habanero	28
Figura 8. A. Extracción Soxhlet de <i>Capsicum annuum</i> L. B. Extracción de solventes (hexano) por rotovaporación.	29
Figura 9. Ensayo de inhibición en medio líquido.....	31
Figura 10. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>B. cereus</i>	34
Figura 11. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. coli</i>	34
Figura 12. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>E. faecalis</i>	35
Figura 13. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>Pseudomonas</i> spp..	36
Figura 14. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>Salmonella</i> spp.. .	37
Figura 15. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>Staphylococcus</i> ...	38
Figura 17. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra <i>Phytophthora capsici</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto inhibitorio de extractos de chiles contra diferentes patógenos	6
Tabla 2. Microorganismos y su importancia médica o fitopatológica.....	25
Tabla 3. Nutrición para <i>Capsicum annuum</i> L. 509-45-1	27
Tabla 4. Resumen de resultados.	40

I. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum*) es un cultivo vegetal de importancia mundial, produciéndose aproximadamente 24 millones de toneladas mundialmente, siendo una de las siete especies mayormente cultivadas en el mundo (Latournerie et al, 2015). México se encuentra en cuarto lugar a nivel global como productor de chile, habiendo producido 2.5 millones de toneladas en el 2021 (FAO, 2022) y es altamente utilizado como especia o condimento. Sin embargo, debido a su alto contenido de compuestos bioactivos, su importancia en la industria farmacéutica va en aumento (Batiha et al, 2020)

Los compuestos bioactivos característicos del chile son los capsaicinoides; éstos son los responsables de la pungencia del fruto pero también de las actividades biológicas del mismo. La molécula representativa de este grupo es la capsaicina pues es la más abundante en el fruto (Gammoudi et al, 2021). Por otro lado, el capsiato es una molécula análoga a la capsaicina que, aunque en la mayoría de las especies y variedades se presenta mínimamente, en *Capsicum annuum* L., variedad conocida como pimiento, es la molécula que predomina sobre las otras; el grupo al que pertenece es al de los capsinoides (Singh et al, 2009). La diferencia entre estas moléculas radica en la presencia de una amida en la capsaicina y por el contrario, una cetona en el capsiato. Este cambio estructural en el capsiato no genera cambios en las actividades biológicas pero sí provoca una reducción en la pungencia del fruto, siendo 1000 veces menos pungente que la capsaicina (Fayos et al, 2019).

Debido a la mínima presencia de capsiato en la mayoría de los chiles, se han realizado investigaciones sobre la molécula más abundante: la capsaicina. Se ha comprobado que la capsaicina y la familia de los capsaicinoides poseen actividad antimicrobiana (Akyuz et al, 2018; Veloso et al, 2013), antiinflamatoria (Shang et al, 2017; Wang et al, 2017), antiobesidad (Bort et al, 2019; Fan et al, 2019), antidiabética (Sharopov et al, 2018) y anticancerígena (Zhu et al, 2019; Bao et al, 2019). La mayoría de las actividades biológicas antes mencionadas se llevan a cabo por la activación del TRPV1 (Receptor de Potencial Transitorio V1) que actúa como detector de estímulos dolorosos producidos por sustancias picantes y altas temperaturas desencadenando la producción de sustancias o activación de otros receptores; antes se creía que estos canales estaban presentes únicamente en el sistema

nervioso pero se ha demostrado que pueden encontrarse en algunos tipos de músculo, células epiteliales e inmunes y en adipocitos (Shuba, 2021; Bujak et al, 2019). A pesar de la falta de pungencia del capsiato, se ha demostrado que, al igual que la capsaicina, éste activa los receptores TRPV1, causando los mismos efectos en ciertas actividades biológicas que la capsaicina (Lieder et al, 2019).

Lo anterior lo podemos demostrar en las patentes relacionadas a la capsaicina y el capsiato, ya que la mayoría se basan en actividades antiinflamatorias y metabólicas. Además, predominan aquellas que tienen que ver con la capsaicina.

Mientras que para la capsaicina encontramos más de 3,900 patentes en el buscador Google Patents siendo US4186851A la primer patente publicada en 1978 en Estados Unidos, para el capsiato sólo existen 709 patentes; la más antigua es la patente japonesa del año 1998 JPH11246478A. La patente de capsaicina (US4186851A) es un arma de defensa personal no letal que contiene una mezcla de alcohol isoprofílico con pimienta y oleorresina de capsaicina que se disparará simultáneamente con un haz de luz de alta intensidad. Por otro lado, la de capsiato (JPH11246478A) es un método para obtener el “nuevo material similar a un capsaicinoide que tiene un enlace éster” (capsiato) y fórmulas para usarse como aditivo alimentario o ingrediente farmacéutico.

Para el capsiato existe una accesión para producir capsiato de forma natural, la accesión 509-45-1, un pimiento de fruto pequeño que contiene alto contenido de capsinoides generada por la USDA en 2013. Se generó seleccionando 120 cultivares de *Capsicum annuum* de las cuales una (PI 645509 de frutos pequeños y picantes) contenía bajas concentraciones de capsinoides. Luego se cultivaron 100 plantas PI 645509 obteniendo una planta con bajas concentraciones de capsinoides pero cantidades no detectables de capsaicinoides; esta planta se autopolinizó y se cultivaron 100 plantas de su progenie repitiendo el proceso hasta obtener la accesión 509-45-1 que contenían más de 1000 ug/g de capsinoides y capsinoides no detectables (Jarret et al, 2014).

Otra forma de obtener capsiato es haciendo reaccionar 100 partes de alcohol vanilílico con ácidos grasos, pudiendo ser ácido cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, ácido linoleico, alfa linolénico gamma linolénico o araquidónico, en una

relación molar 1:2 a 1:5 adicionando de 3 a 20 partes en peso de lipasa inmovilizada (Novozym 435, Lipozyme TL IM o Lipozyme RM IM) manteniendo en agitación (400-600 rpm) a 40-60 °C, como lo exponen en la patente surcoreana KR101359334B1 en el 2012.

Existen también métodos para extraer y purificar capsinoides del fruto, como el expuesto en la patente de la WIPO WO2020086426A1 del 2018, en donde cosecha, deshidratan y muelen el chile accesión 509-45-1 para luego extraer 1 g de chile en 10 mL de solventes polares (hexano, cloroformo, diclorometano, etil acetato, metanol, heptano, iso-octano, acetona, butanol y acetonitrilo) y por último evaporar los solventes con una corriente de N₂. Siendo el hexano el solvente que mayor pureza y concentración produjo.

En 2015, Sur corea expidió una patente (KR20150020635A) de la composición para prevenir o tratar la resistencia a insulina y la diabetes tipo 2 usando capsiato como ingrediente activo. Se trata de un alimento que contiene en porcentaje de energía 40% de carbohidratos (almidón), 20% de proteínas (caseína) y 40% de aceite vegetal hidrogenado suplementado con capsiato al 0.025% concluyendo que el capsiato mejora el metabolismo de la glucosa en el hígado en ratas diabéticas, reduce el almacenamiento de triglicéridos y mejora la resistencia a la insulina hepática al aumentar la señalización de la insulina hepática.

En la base de datos PANTESCOPE de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) se encontraron más de 2,500 patentes usando “capsaicin” como término de búsqueda siendo la patente GB371196 la primer patente publicada en 1932; esta patente inglesa es un método para prevenir envenenamiento accidental que utiliza a la capsaicina para mezclarla con sustancias venenosas y así sentir la pungencia y detectar que el alimento puede producir envenenamiento. Es hasta 1982 que se publica una patente relacionada con alguna actividad biológica (analgesia); la patente estadounidense US4313958 hace uso de la capsaicina para proponer un método para producir analgesia. Las patentes de mayor relevancia son aquellas que hablan del procesamiento de la capsaicina para mejorar su actividad al consumirse y las más recientes se enfocan en actividades biológicas como el efecto gastroprotectivo, analgésico y también existe una patente que usa la capsaicina como agente insecticida (NL2029710).

Al hacer uso de la palabra “capsiate” como término de búsqueda en PANTESCOPE se encontraron sólo 39 patentes siendo en 2007 la publicación de la patente japonesa JP2007291014 en donde exponen una composición comestible para tratar la falta de mucosa gástrica. Las patentes más relevantes son composiciones farmacéuticas antidiabéticas (KR1020140036371), antialérgicas (KR1020150139326 y US20150342919), antiinflamatorias (KR1020090048290) entre otras. Además, existe una patente japonesa (JP2008019193) que expone un agente anti *Helicobacter pylori* que comprende al menos un compuesto capsinoide.

A razón de la falta de patentes relacionadas a la actividad antimicrobiana de estos compuestos, se enumerarán investigaciones científicas que avalan que los capsaicinoides y capsinoides poseen actividad antimicrobiana mediante el intercalamiento entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Salazar, 2016 y Vargas, 2014).

De frutos de pimiento (Casimir et al, 2018) extrajeron capsaicina mediante ósmosis inversa. Primero maceraron la materia fresca con etanol al 70% para obtener extracto crudo filtrando el macerado. Después microfiltraron por una membrana de cerámica para clarificar el extracto. Por concentraron el extracto mediante ósmosis inversa con una membrana de polímero compuesto de tipo SW 30-2540 de Polymem. Posteriormente, con este extracto, midieron la actividad antimicrobiana mediante un ensayo de microdilución en microplacas de 96 pocillos frente a 6 microorganismos; 3 bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *P. vulgaris* y *E. coli*) y 3 bacterias Gram positivas (*E. faecalis*, *B. subtilis* y *S. aureus*). Se encontró que ambos grupos de microorganismos fueron afectados con el extracto obtenido, viéndose mayormente afectadas las bacterias Gram negativas, pues se requirieron volúmenes de 10 a 16 µg/ml (10 µg/ml para *P. aeruginosa*, 15 µg/ml para *P. vulgaris* y 16 µg/ml para *E. coli*) para inhibir el crecimiento de éstas. Mientras que para las bacterias Gram positivas se necesitaron volúmenes de hasta 20 µg/ml (15 µg/ml para *E. faecalis*, 20 µg/ml para *B. subtilis* y 20 µg/ml para *S. aureus*).

Goci et al (2021) probaron un extracto de frutos de *Capsicum annuum* como antimicrobiano contra 3 levaduras (*Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*) y 4 bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*). Para obtener el extracto, secaron y pulverizaron los frutos para luego macerarlo con etanol al 98%

por 24hr. Este extracto lo filtraron y resuspendieron en acetonitrilo. Al igual que en el estudio anterior, realizaron un ensayo de microdilución para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada microorganismo. Se obtuvieron concentraciones mínimas bajas para lograr inhibición (3.968 µg/ml para *Candida tropicalis*, 7.937 µg/ml para *Candida albicans*, >10 µg/ml para *Candida parapsilosis*, 7.937 µg/ml para *Escherichia coli*, 7.937 µg/ml para *Bacillus cereus*, 6.229 µg/ml para *Salmonella typhi* y >10 µg/ml para *Staphylococcus aureus*). Sin embargo, en el mismo estudio, se descubrió que en una formulación de capsaicin con Carbopol se reduce esta concentración aproximadamente a la mitad para las levaduras (1.984 µg/ml para *Candida tropicalis*, 3.149 µg/ml para *Candida albicans* y 3.149 µg/ml para *Candida parapsilosis*) y mucho menos de la mitad para las bacterias (0.992 µg/ml para *Escherichia coli*, 1.984 µg/ml para *Bacillus cereus*, 1.984 µg/ml para *Salmonella typhi* y 3.968 µg/ml para *Staphylococcus aureus*).

Para medir la actividad antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, (Naseer, 2021), esterilizaron la superficie de *Capsicum annum* L. con etanol y luego de haberse secado, las homogenizaron en un mortero y filtraron con una manta, considerando este extracto como el 100%. Luego este extracto lo diluyeron en agua destilada para llegar a concentraciones de 75 y 50 %. Luego, mediante el método de difusión en pozo de agar midieron los diámetros de la zona de inhibición (halos), dando como resultado mejor inhibición contra *Streptococcus pyogenes* al 100% de concentración del extracto (18 mm) pero en concentraciones del 75 y 50 % obtuvieron mejores resultados para *Staphylococcus aureus* (16 y 12 mm respectivamente).

Sawant et al (2021) midieron el efecto inhibitorio contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con extracto de *Capsicum annum* en polvo diluido en Dimetil Sulfóxido (DMSO) en volúmenes específicos para lograr concentraciones del 100 y 50%. Como se esperaba, los extractos al 100 % tuvieron mejores resultados que los del 50%, siendo estos 32, 40 y 40 mm respectivamente para el 100 % y 31, 36 y 36 mm para el 50%.

Para cada 10 g de chile previamente secado y molido, Das et al (2018) añadieron 60 ml de acetonitrilo para filtrarlo y resuspender el sobrenadante con otros 60 ml de acetonitrilo repitiendo el procedimiento por 3 veces. Por último lo filtraron para evaporar el acetonitrilo

y lo resuspendieron en agua destilada y así obtuvieron un extracto de frutos de *Capsicum chinense* var. Noga y var. Roja a diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 75%) respectivamente. Luego, mediante el método de difusión en disco midieron el efecto inhibitorio contra los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se mostró una mayor inhibición contra *Staphylococcus aureus* por parte de la variante Noga, mientras que para la variante Roja, una mayor inhibición contra *Escherichia coli*.

Vaklová et al (2021) probaron extractos de diferentes variedades de chile (Aji Amarillo (*C. baccatum* L.), Fidalgo Roxa (*C. chinense*), Cherry Chocolate (*C. annuum*), Rocoto Orange (*C. pubescens*), and Peruvian Purple (*C. frutescens*) contra 3 bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica* y *Yersinia enterocolítica*), 3 Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*) y 3 levaduras (*Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis*). Para obtener el extracto se realizó una extracción acelerada por solvente utilizando un sistema Dionex ASE 200 y etanol al 80%. El extracto de *C. pubescens* mostró mayor inhibición contra *P. aeruginosa* y *Salmonella entérica* (4.33 y 5.27 mm respectivamente); el extracto de *C. annuum* mostró mayor inhibición contra *Y. enterocolítica* y *E. faecalis*; *C. baccatum* L tuvo zonas de inhibición de 4.67, 6.33 y 5.33 mm para *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *C. tropicalis* respectivamente, siendo las inhibiciones más altas; para *C. albicans*, *C. krusei*, *C. chinense* tuvo las zonas más grandes de inhibición siendo estas 4.67 y 4.33 mm respectivamente; mientras que *C. frutescens* fue el de menor inhibición contra *Y. enterocolítica*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. krusei* y *C. tropicalis*.

En estudios recientes se encontró que la capsaicina inhibe fuertemente el crecimiento de *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B y *M. luteus* (Agarwal et al, 2017).

Tabla 1. Efecto inhibitorio de extractos de chiles contra diferentes patógenos

Especie/variedad	Tipo de extracción	Microorganismo	CMI (µg/ml)	Zona de inhibición (mm)	Referencia
<i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> (pimiento)	Ósmosis inversa	<i>Enterococcus faecalis</i>	15.00	-	Casimir et al, 2018
		<i>Bacillus subtilis</i>	20.00	-	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	20.00	-	

		<i>Pseudomonas vulgaris</i>	10.00	-	
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.00	-	
		<i>Escherichia coli</i>	15.00	-	
<i>Capsicum annuum</i> spp.	Maceración (EtOH 98%)	<i>Candida tropicalis</i>	3.97	-	Goci et al, 2021
		<i>Candida albicans</i>	7.94	-	
		<i>Candida parapsilosis</i>	>10.00	-	
		<i>Escherichia coli</i>	7.94	-	
		<i>Bacillus cereus</i>	7.94	-	
		<i>Salmonella typhi</i>	6.29	-	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	>10.00	-	
<i>Capsicum annuum</i> L.	Homogenización (dH ₂ O) 100%	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	22.00	Naseer et al, 2021
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	24.00	
	Homogenización (dH ₂ O) 75%	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	20.00	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	22.00	
	Homogenización (dH ₂ O) 50%	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	12.00	
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	21.00	
<i>Capsicum annuum</i> spp.	Homogenización (DMSO) 100%	<i>Escherichia coli</i>	-	32.00	Sawant et al, 2021
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	40.00	
		<i>Bacillus subtilis</i>	-	40.00	
	Homogenización (DMSO) 50%	<i>Escherichia coli</i>	-	31.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	36.00	
		<i>Bacillus subtilis</i>	-	36.00	
<i>Capsicum chinense</i> Var. Roja Bhut	Agitación (Acetonitrilo) 75%	<i>Escherichia coli</i>	-	12.00	Das et al, 2018
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10.00	
	Agitación (Acetonitrilo) 50%	<i>Escherichia coli</i>	-	10.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	9.00	
	Agitación (Acetonitrilo) 25%	<i>Escherichia coli</i>	-	9.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	8.00	
	Agitación (Acetonitrilo) 10%	<i>Escherichia coli</i>	-	0.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	0.00	
<i>Capsicum chinense</i> Var. Noga Bhut	Agitación (Acetonitrilo) 75%	<i>Escherichia coli</i>	-	10.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	11.00	

	Agitación (Acetonitrilo) 50%	<i>Escherichia coli</i>	-	9.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10.00	
	Agitación (Acetonitrilo) 25%	<i>Escherichia coli</i>	-	8.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	9.00	
	Agitación (Acetonitrilo) 10%	<i>Escherichia coli</i>	-	0.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	0.00	
<i>Capsicum baccatum</i> (ají amarillo)	Extracción acelerada por solvente (EtOH 80%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	3.33	Valková et al, 2021
		<i>Salmonella entérica</i>	-	3.33	
		<i>Yersinia enterocolítica</i>	-	3.00	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	3.67	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	4.67	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	6.33	
		<i>Candida albicans</i>	-	3.33	
		<i>Candida krusei</i>	-	3.33	
<i>Capsicum chinense</i> (fidalgo roxa)	Extracción acelerada por solvente (EtOH 80%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1.00	
		<i>Salmonella entérica</i>	-	2.33	
		<i>Yersinia enterocolítica</i>	-	2.33	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	1.33	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	2.67	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	4.33	
		<i>Candida albicans</i>	-	4.67	
		<i>Candida krusei</i>	-	4.33	
		<i>Candida tropicalis</i>	-	1.67	
<i>Capsicum annuum</i> (cherry chocolate)	Extracción acelerada por solvente (EtOH 80%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	2.67	
		<i>Salmonella entérica</i>	-	3.67	
		<i>Yersinia enterocolítica</i>	-	4.33	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	4.33	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	2.33	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	5.33	
		<i>Candida albicans</i>	-	2.33	

		<i>Candida krusei</i>	-	3.33	
		<i>Candida tropicalis</i>	-	4.67	
<i>Capsicum pubescens</i> (rocoto orange)	Extracción acelerada por solvente (EtOH 80%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	4.33	
		<i>Salmonella entérica</i>	-	5.27	
		<i>Yersinia enterocolítica</i>	-	2.67	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	4.00	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	2.67	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	0.00	
		<i>Candida albicans</i>	-	4.33	
		<i>Candida krusei</i>	-	2.67	
		<i>Candida tropicalis</i>	-	4.00	
<i>Capsicum frutescense</i> (peruvian purple)	Extracción acelerada por solvente (EtOH 80%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	3.67	
		<i>Salmonella entérica</i>	-	3.33	
		<i>Yersinia enterocolítica</i>	-	1.00	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	1.67	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	-	2.00	
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	4.57	
		<i>Candida albicans</i>	-	2.33	
		<i>Candida krusei</i>	-	2.67	
		<i>Candida tropicalis</i>	-	1.67	
-	Capsaicina pura (HiMedia Labs) en DMSO 500 µg/ml	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	15.33	Agarwal et al, 2017
		<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	15.33	
		<i>Proteus mirabilis</i>	-	0.00	
		<i>Micrococcus luteus</i>	-	18.00	
	Capsaicina pura (HiMedia Labs) en DMSO 100µg/ml	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	14.66	
		<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	14.66	
		<i>Proteus mirabilis</i>	-	0.00	
		<i>Micrococcus luteus</i>	-	17.33	
	Capsaicina pura (HiMedia Labs) en DMSO 50 µg/ml	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	13.33	
		<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	13.00	
<i>Proteus mirabilis</i>		-	0.00		

		<i>Micrococcus luteus</i>	-	15.66	
	Capsaicina pura (HiMedia Labs) en DMSO 10 µg/ml	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	14.33	
		<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	13.33	
		<i>Proteus mirabilis</i>	-	0.00	
		<i>Micrococcus luteus</i>	-	13.33	
	Capsaicina pura (HiMedia Labs) en DMSO 5 µg/ml	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-	12.66	
		<i>Salmonella paratyphi B</i>	-	12.33	
		<i>Proteus mirabilis</i>	-	0.00	
		<i>Micrococcus luteus</i>	-	15.66	

Entonces, extractos de chiles han mostrado capacidad inhibitoria contra diferentes tipos de patógenos como *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *C. tetani*, *C. sporogenes*, *S. pyogenes*, *E. aerogenes*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *S. typhimurium*, *H. pylori* y *S. paratyphi A* y *B*. Todos estos son patógenos de importancia médica, los cuales mayormente causan infecciones en el tracto digestivo. La mayoría de los estudios revisados se enfocan en la capsaicina, dejando de lado al capsiato pues, en la mayoría de las especies del chile, la concentración de este compuesto es mucho menor comparado con la capsaicina. Sin embargo, estudios han relevado que existe una mayor actividad antimicrobiana en chiles no pungentes que en aquellos pungentes o picosos, siendo el capsiato el posible compuesto que actúa como antimicrobiano.

Se necesita entonces de estudios basado en el capsiato que afirmen ser el compuesto con capacidad inhibitoria que no posea los efectos secundarios, como la pungencia, que la capsaicina otorga.

I.1. HIPÓTESIS

El capsiato, siendo un compuesto análogo a la capsaicina, presenta actividades biológicas (antimicrobianas) significativas de interés médico y fitopatológico similares a la capsaicina.

I.2. OBJETIVOS

I.2.1. Objetivo general

Determinar si el capsiato reduce significativamente las unidades formadoras de colonia en patógenos de interés fitopatológico y médico sin causar efectos negativos colaterales.

I.2.2. Objetivos particulares

- Producir chile rico en capsiato (*Capsicum annuum* L. 509-45-1) a nivel invernadero.
- Producir extractos de chile rico en capsiato y rico en capsaicina.
- Evaluar efecto inhibitorio contra los microorganismos patógenos o fitopatógenos *E. coli*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* de extractos de chile rico en capsiato.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1. EL CHILE

Chile es el nombre común que se le da a una planta herbácea (*Capsicum spp.*) del género *Capsicum* perteneciente a la familia Solanaceae nativa del centro y Sudamérica (Rylski, 1985).

Existen más de 20 especies de chiles pero sólo 5 se encuentran domesticados (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pendulum* y *C. pubescens*) categorizados por las características de la flor y el fruto, teniendo flores blancas, amarillentas y violetas y frutos de diferentes tamaños, colores y sabores dependiendo de sus compuestos biológicos. De entre las 5 especies domesticadas, *Capsicum annuum* es la más importante económicamente y también la más distribuida a nivel mundial (Hernández et al, 2020).

Dependiendo del sector, el chile puede ser usado como alimento vegetal, especia, medicina herbal e incluso como ornamento; su principal uso se centra en el sector alimenticio debido a sus características sensoriales. Sin embargo, también pueden ser utilizados en la industria como fuente de nutrientes y metabolitos secundarios naturales debido a sus contenidos de compuestos bioactivos. El contenido de estos compuestos depende de la especie del chile, la etapa de maduración, el clima, las condiciones de almacenamiento, la parte del fruto de donde es extraído y las prácticas de procesamiento (Zunun et al, 2017).

II.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL CHILE

Los frutos de *C. annuum* son ricos en capsaicinoides y capsinoides, carotenoides, flavonoides, vitaminas y minerales (Batiha et al, 2020).

II.2.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos contribuyen al sabor y color del fruto y poseen capacidad antioxidante. Numerosos estudios indican una posible asociación entre la captación de ácidos fenólicos y flavonoides y la reducción del riesgo de diabetes, cáncer, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas (Salazar, 2016)

II.2.2. Carotenoides

Los carotenoides tienen excelentes propiedades antioxidantes debido a la presencia de un enlace doble conjugado, lo que le otorga la capacidad de proteger a las células contra radicales libres mediante la eliminación de ROS asociadas con un riesgo de desarrollar enfermedades degenerativas tales como el cáncer. Por lo tanto, el consumo de carotenoides mejora la función cognitiva y la salud cardiovascular, así como puede ayudar a prevenir algunos tipos de cáncer (Baenas et al, 2018).

II.2.3. Capsaicinoides

Los capsaicinoides son moléculas alcaloides responsables del picor, conocido como pungencia, y de algunas propiedades farmacológicas de los frutos del chile. Estas sustancias se acumulan en las células de la placenta con el fin de otorgar un mecanismo de defensa a organismos depredadores. Estos compuestos son resultado de una condensación enzimática de vanillilamina y cadenas de ácidos grasos de diferentes tamaños que son alargadas por una sintasa de ácidos grasos. La condensación es causada por la enzima capsaicina sintasa, que actúa específicamente sobre la longitud de la cadena de ácidos grasos, requiriendo Mg^{2+} , ATP y coenzima A; la vanillilamina, que es la porción fenólica formada a partir de fenilalanina como un producto en la vía del propanoide, y el ácido graso, que se forma a partir de los aminoácidos valina o leucina. La diferencia entre los capsaicinoides radica en la longitud de la cadena lateral, que varía de entre 9 y 11 carbonos con presencia de dobles enlaces (Vázquez et al, 2020)

Entre los capsaicinoides presentes en los chiles se encuentran la capsaicina, la dihidrocapsaicina, la norhidrocapsaicina, la norcapsaicina, la homocapsaicina, la homodihidrocapsaicina, la nornocapsaicina, la nornornocapsaicina y la noviamida. Siendo las primeras 2 las más abundantes en el fruto del chile, representando más del 80% (Baenas et al, 2018).

La capsaicina (trans-8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es el capsaicinoide presente en mayor concentración y en mayor variedad de chiles, caracterizada por su cristalinidad color blanquecino, alta volatilidad y pungencia, hidrofobicidad y alta solubilidad en alcohol, éter y cloroformo (Merritt et al, 2022)

II.2.4. Capsinoides

Los capsinoides se consideran como un grupo análogo a los capsaicinoides. Entre ellas se encuentran tres formas análogas a las de la capsaicina, dihidrocapsaicina y norhidrocapsaicina conocidas como capsiato, dihidrocapsiato y norhidrocapsiato respectivamente (Gupta et al, 2021). Estructuralmente difieren en la parte fenólica y su enlace, pues donde en los capsaicinoides precipitaba una vanillilamina formando un enlace de tipo amino con el ácido graso, en los capsinoides precipita un alcohol vanillílico formando un enlace éster (Baenas et al, 2018).

El capsiato es un isómero de la capsaicina diferenciándose con que en lugar del grupo amida presente en la capsaicina, en el capsiato se encuentra un éster, lo que confiere una pungencia 1000 veces menor que la de la capsaicina (Vázquez et al, 2020). Entonces, posee las mismas propiedades que la capsaicina, pero no presenta picor. La pungencia, que es la característica más relevante en la mayoría de los chiles, es la limitante para su uso o consumo, pues puede causar efectos secundarios tales como picor, ardor y escozor

II.3. MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Debido a que los metabolitos están presentes en la planta, ya sea en el fruto, en las hojas o incluso en las raíces de la misma, es necesario extraerlos de ella mediante procesos físico-químicos para obtener un aceite esencial.

II.3.1. Destilación

La destilación es el método tradicional más usado y este se basa en liberar los aceites esenciales mediante la ruptura de las estructuras de la planta haciendo uso del calor emitido por el agua hirviendo o vapor de agua. Dentro de este método existen 3 variantes: hidrodestilación, destilación al vapor y destilación agua/vapor, diferenciándose en el contacto entre el agua o vapor de agua y el material vegetal. En la hidrodestilación, la planta (o alguna de sus partes) es completamente sumergida en agua y puesta a hervir; en la destilación al vapor, la planta es colocada en un contenedor perforado por donde pasa vapor de agua proveniente de una caldera conectada por tuberías del mismo sistema mientras que en la hidrodifusión el vapor de agua se genera en el mismo contenedor en el que está dispuesto el

material vegetal. Al finalizar cualquier técnica de destilación, obtendremos por enfriamiento, aceite esencial y agua, los cuales luego pueden ser separados por decantación debido a la diferencia en sus densidades (Chemat, 2010)

La destilación al vapor resulta ser el método por el que se obtienen mayores rendimientos de aceite y el que menos susceptibilidad a la hidrólisis tiene; la hidrodestilación es el proceso más rápido pero el que produce menos rendimiento pero mayor susceptibilidad a la hidrólisis debido al contacto directo con el agua. Por último, la destilación agua/vapor presenta valores intermedios en el rendimiento (Reyes et al, 2014)

II.3.2. Extracción por solventes

Para la extracción se pueden utilizar distintos solventes orgánicos como etanol, metanol, hexano o acetona gracias a las características hidrófobas y no polares de los aceites esenciales. Estos solventes se mezclan con la materia vegetal calentándose a la temperatura de ebullición del mismo para extraer el aceite esencial que está mezclado con el solvente. Entonces, el solvente es evaporado obteniendo así una resina de la planta extraída (Tongnuanchan et al, 2014).

En la extracción Soxhlet, material vegetal en polvo es dispuesto en un cartucho de celulosa en una cámara de extracción que se coloca encima de un matraz recolector y debajo de un condensador. En el matraz se coloca el solvente que se calentará y mantendrá en reflujo condensándose en la cámara de extracción a cierto nivel para que sifonee nuevamente en el matraz. Esta es la técnica más sencilla y la más utilizada en los laboratorios (Reyes et al, 2014).

II.3.3. Métodos emergentes

Debido a que los anteriores métodos requieren tiempos de extracción y consumo de energía elevados, uso de solventes que pueden llegar a ser tóxicos y altas temperaturas que pueden dañar los componentes del extracto esencial, se han descubierto métodos que dañen menos al ambiente, como son las extracciones asistidas por microondas o ultrasonido y la extracción con fluidos supercríticos (Bora et al, 2020).

La extracción asistida por microondas, al igual que en las técnicas anteriores, hace el uso del calor para romper logra la extracción, la diferencia es que el calor es producido por radiación provocando cambios en la estructura celular mediante ondas electromagnéticas, logrando una extracción rápida pues el calentamiento ocurre al interior de la muestra vegetal de manera inmediata (Bousbia et al, 2009; Veggi et al, 2012) La extracción asistida por ultrasonido ocurre por la cavitación acústica, siendo esta la formación de micro burbujas al irradiar un líquido con ultrasonido; estas burbujas crecen y se mueven rápidamente hasta colapsar fuertemente por las altas presiones acústicas, generándose así ondas de choque contra alguna superficie sólida (la materia vegetal) erosionando y fragmentando la superficie de la misma hasta extraer el aceite esencial (Roohinejad et al, 2018).

La extracción con fluidos supercríticos (FS) se basa en, como dice su nombre, el uso de fluidos supercríticos, es decir, un fluido que puede difundir como un gas pero que puede disolver como un líquido debido a que se encuentran en condiciones de presión y temperatura superiores a su punto crítico y la densidad de éstos cambia al modificar estas condiciones. Para la extracción se inyecta el FS, generalmente CO₂ puesto que su temperatura y presión críticas son bajas (32°C y 7.4 MPa), es poco inflamable, explosivo o tóxico y a condiciones críticas tiene una polaridad similar a solventes adecuados para extraer sustancias oleosas. Luego, una vez que se genera una mezcla entre el extracto y el CO₂ (que actúa como solvente), se cambia la presión para que se logre separa el FS del extracto, pudiendo manipular la presión y temperatura para así lograr la separación de diferentes metabolitos en el mismo sistema (Yousefi et al, 2019).

II.4. BIOSÍNTESIS DE CAPSINOIDES Y CAPSAICINOIDES

Los capsaicinoides y capsinoides son biosintetizados en la placenta del fruto del chile como parte de un proceso de protección de la semilla. El contenido de estos compuestos depende de varios factores, incluida la disponibilidad de agua, luz, temperatura, condiciones climáticas, genotipo, técnicas de cultivo, aporte mineral, condiciones de crecimiento y etapa de madurez (Costa et al, 2022).

Para el chile, la temperatura óptima para germinación oscila entre los 20 y 25°C; el desarrollo óptimo de la planta se consigue a una temperatura diurna entre 20-25°C y nocturna

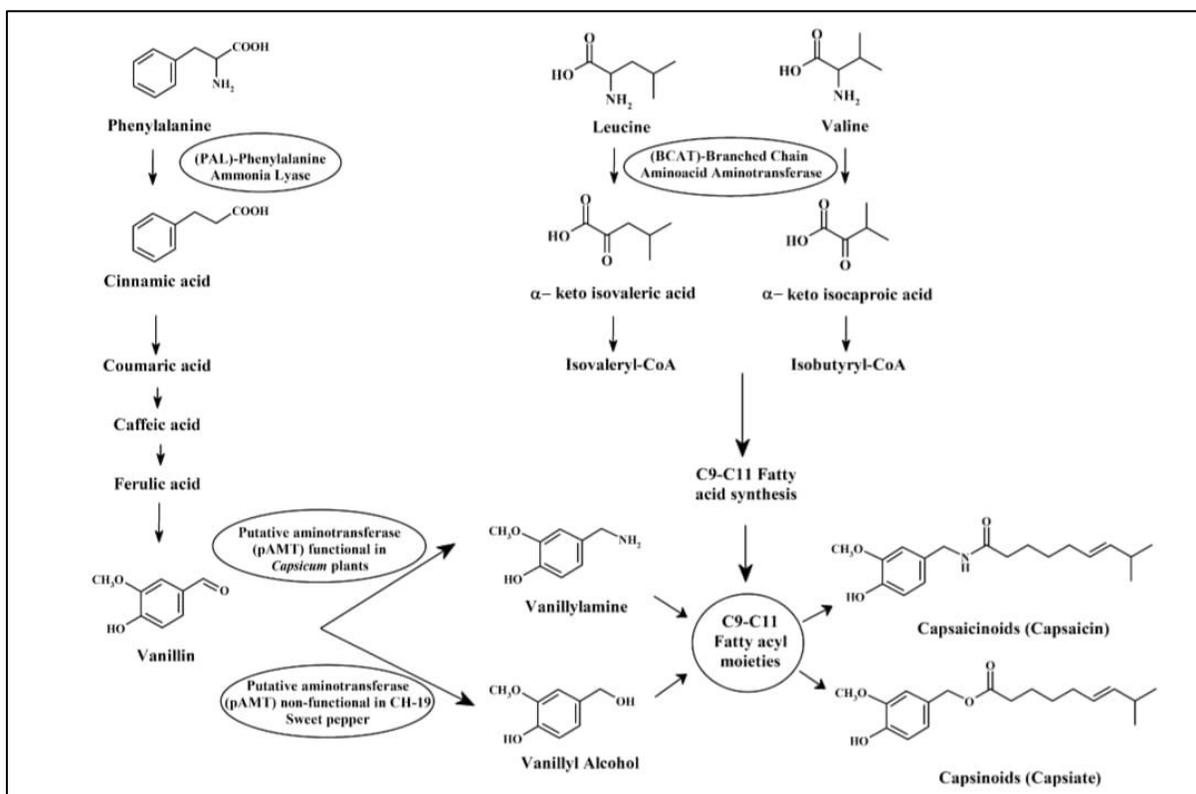


Figura 1. Comprensión actual de la biosíntesis de vanillilamina en la ruta biosintética de capsainoides (García, 2017).

de 16 a 18°C. Además, la flor cuaja en fruto a una temperatura máxima de 30°C y mínima de 18°C. En cuanto a la humedad relativa, su óptima va del 50-70%, adaptándose bien a ambientes confinados. Se requiere de buena luminosidad en los primeros estados de desarrollo de la planta y durante la floración pero los frutos requieren una buena cobertura. Por último, los suelos franco-arenosos, profundos, con un contenido en materia orgánica del 3 al 4%, bien drenados y con un pH de 6.5 a 7 son los más adecuados para el cultivo de *Capsicum annuum* L (Ropokis et al, 2019).

Los capsainoides y capsinoides son producidos, en última instancia, por la enzima capsain-sintasa (codificada por el gen Pun1) mediante la condensación de un compuesto aromático, derivado de la vanillina, con un ácido graso. La vanillina es convertida a vanillilamina y alcohol vanillina por acción de una aminotransferasa putativa (codificada por el gen de la pAMT), lo que consecuentemente es utilizado para la producción de capsainoides y capsinoides respectivamente. Entonces, estos dos genes son los fundamentales para la producción de capsainoides y capsinoides (Vázquez et al, 2020)

La presencia de estos genes adjudica picor. Sin embargo, se han identificado 3 alelos de Pun1 que confieren la característica no pungente: Pun11, Pun12 y Pun13. El primero se ha identificado únicamente en la especie *C. annuum* L. Los otros dos se han encontrado en diversas especies, pero éstos no llegan a traducirse a proteínas (Stewart et al., 2005). Por otro lado, se han encontrado 14 alelos de pAMT, presentándose en *C. annuum* L. el alelo pAMT3 (Jang et al, 2021).

Los genotipos no picosos de *C. annuum* L. son homocigotos para el alelo Pun11. Luego, el cruce entre genotipos picosos y no picosos producirá la variabilidad en la concentración de capsaicinoides y capsinoides en el fruto (Vázquez et al, 2007).

II.5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE CAPSINOIDES Y CAPSAICINOIDES

Estudios han demostrado que al igual que la capsaicina, el capsiato aplicado localmente en la piel, promueve una respuesta analgésica debido a la desensibilización de las neuronas sensoriales causada por el agotamiento de la sustancia P, neuropéptido liberado al entrar en contacto la capsaicina con el receptor TRPV1 (Receptor de Potencial Transitorio de Vaniloide subtipo I que se expresa principalmente en las neuronas sensoriales (Baenas et al, 2018).

La capsaicina también reduce el tejido adiposo al mejorar la energía y el metabolismo de los lípidos en respuesta a la activación del sistema nervioso simpático (Gupta et al., 2021) por acción del receptor TRVP1 en unión a la capsaicina, generando una señalización que finaliza con la expresión de la termogenina (UCP1), proteína responsable de la termogénesis (Shibata, 2022). En adición, la capsaicina incrementa la oxidación de los lípidos, aumenta el gasto energético y disminuye el apetito (Gupta et al., 2021).

Estudios demuestran que la activación de TRPV1 interfiere en la secreción de insulina por alteraciones en las células beta. Así como que las neuronas que expresan TRPV1 regulan la resistencia a la insulina (Zsombok et al, 2016).

Estudios han revelado que el norhidrocapsiato aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual desencadena la fragmentación del DNA nuclear

resultando en apoptosis. Por otro lado, el capsaiato es un inhibidor específico de la proteína tirosina-quinasa; exhibe una potente actividad contra la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento endotelial vascular y la permeabilidad vascular (Gupta et al., 2021).

Se ha informado que la capsaicina a bajas concentraciones protege la mucosa gástrica contra la ulceración por etanol mediante la vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo mucoso gástrico mediado por la liberación de óxido nítrico y péptido relacionado con el gen del calcio (CGRP) por las células portadoras de TRPV1 (Gupta et al., 2021).

Estudios contra *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli*, *Penicillium* spp., *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, indican que existe una actividad antimicrobiana por acción de extractos de chiles y puede deberse a la presencia de capsaicina en conjunto con otros compuestos bioactivos propios del chile existiendo una relación entre éstos y el estado de madurez del fruto (Wang et al, 2022). Además, estudios demuestran que los extractos de *Capsicum* poseen propiedades antifúngicas sobre *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., y *Rhizopus* spp (Hernández et al, 2022).

II.6. IMPORTANCIA MÉDICA Y FITOPATOLÓGICA

Los antimicrobianos son medicamentos usados para combatir enfermedades en seres humanos, animales y plantas. La resistencia a los antimicrobianos (RAM) ocurre cuando los microorganismos mutan y dejan de responder a los medicamentos debido a que se vuelven resistentes a éstos. Esto provoca infecciones que no pueden tratarse con los antimicrobianos que existen en el mercado impactando económicamente debido a la incapacidad del paciente y las personas que lo cuidan, se prolongan las estancias hospitalarias y se requiere el uso de medicamentos más caros y una atención intensiva (OMS, 2020).

Actualmente, 6 de 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico se clasificaron como innovador, es decir, que existe una escasez de antimicrobianos. Debido a esto infecciones bacterianas comunes han sido más difíciles de combatir. Por ejemplo, microorganismos que causan infecciones en la comunidad y en pacientes ingresados en hospitales que pueden resultar mortales como *E. coli*, *K. pneumoniae* o *Staphylococcus aureus* presentan resistencia al ciprofloxacino, fluoroquinolonas, antibióticos carbapenémicos, cefalosporinas, meticilina e incluso a la colistina, tratamiento de último recurso para infecciones causadas por estos

microorganismos. Además, la resistencia a las sulfamidas, las penicilinas, las tetraciclinas y los macrólidos ha progresado rápidamente (OMS, 2021).

La fitopatología (*Phyton* = planta, *phatos* = dolencia, *logos* = estudio) es la ciencia que estudia las enfermedades de las plantas y su combate. González (1976) define a una planta enferma como «*planta cuyo desarrollo fisiológico y morfológico se han alterado desfavorablemente y en forma progresiva por un agente extraño, hasta tal punto que se producen manifestaciones visibles de tal alteración*». La mayoría de las enfermedades de las plantas son causadas por patógenos, llámense bacterias, hongos o virus.

La importancia de las enfermedades de las plantas figura en que, además de reducir el rendimiento, la calidad y la durabilidad de los cultivos y productos cosechados aumentando así los costos de producción y compra-venta, ponen en riesgo la salud humana pues ciertos microorganismos son capaces de producir sustancias como resultado de su metabolismo secundario llegando a ser perjudiciales para la salud aún a bajas concentraciones, tales como las micotoxinas producidas por hongos fitopatógenos (Quintero et al, 2019; Berger et al, 2007).

A nivel mundial, se pierde hasta un 40 por ciento anualmente de los cultivos que producen alimento debido a plagas y enfermedades de las plantas. Esto provoca pérdidas económicas en el sector agrícola, siendo esta la actividad económica principal de las comunidades rurales pobres. Además hace que millones de personas padezcan hambre y complica la seguridad alimentaria (SENASICA, 2020).

Algunos efectos negativos que puede causar el consumo de alimentos contaminados son: afectaciones en el crecimiento debido a una baja eficiencia alimentaria causada por interferencias en sistemas enzimáticos digestivos por las micotoxinas. Además, es común llamar a las micotoxinas como "asesinos silenciosos", ya que su consumo es dado en dosis muy pequeñas que no producen efectos negativos, pero con el tiempo y su acumulación, puede ocasionar diversos tipos de enfermedades según la micotoxina que se consuma (Requena et al, 2005).

II.7. MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA MÉDICA

II.7.1. *Bacillus cereus*

B. cereus es una bacteria Gram Positiva aerobia o anaerobia facultativa productora de esporas y toxinas que producen infecciones gastrointestinales como la cereulida y las enterotoxinas. La primera es una toxina emética resistente al calor, los ácidos y enzimas digestivas que causa náuseas y vómito a la media hora de haber consumido un alimento contaminado desapareciendo después de 6 a 24 hora necesitando al menos 10³-10⁵ *B. cereus* por gramo de alimento para producir una concentración de cereulida que provoque enfermedad pero puede ser sólo la toxina la que cause enfermedad y no la bacteria. Las enterotoxinas (hemolisina tripartita BL (Hbl), enterotoxina no hemolítica (Nhe) y citotoxina K de una sola proteína (CytK)) producen diarrea y calambres intestinales después de aproximadamente 8 a 16 horas después del consumo del alimento contaminado. Contrario a las toxinas eméticas, las enterotoxinas son sensibles al calor, ácidos o enzimas digestivas, por lo cual la enfermedad se da por haber consumido el microorganismo que posteriormente generará estas enterotoxinas una vez adherido a la pared intestinal (Jovanovic et al, 2021; Dietrich et al, 2021).

Además, *B. cereus* produce enzimas como fosfolipasas, proteasas y hemolisinas que causan infecciones no gastrointestinales como endoftalmitis, panoftalmitis y queratitits, que son infecciones oculares, pero también puede causar septicemia, meningitis, endocarditis, osteomielitis e infecciones de heridas quirúrgicas y traumáticas. Por último, produce betalactamasas lo cual la hace resistente a los antibióticos betalactámicos (Drobniewski, 1993).

II.7.2. *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria Gram negativa anaerobia facultativa que, naturalmente, forma parte de nuestra microbiota. Sin embargo, existen cepas patogénicas que pueden causar enfermedades intestinales (IPEC del inglés Intestinal pathogenic *E. coli*) y extraintestinales (ExPEC) (de Mello et al, 2020; Geurtsen et al, 2022). Estas últimas se clasifican además en Uropatogénica (UPEC), Meningítica en recién nacidos (NMEC) y la asociada a la septicemia (SEPEC) y pueden ocasionar bacteriemia (presencia de bacterias en el torrente sanguíneo) y

sepsis (respuesta inmunitaria anómala frente a la infección) que darán lugar a daños en los tejidos, insuficiencia orgánica y hasta la muerte en algunas ocasiones (Sarowska et al, 2019).

Esta bacteria es la causa más común de bacteriemia, dejando atrás a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, patógenos que también causan esta condición y, de entre todas las cepas de *E. coli*, la UPEC es la fuente principal causal. Actualmente existe un mayor riesgo de padecer bacteriemia y claro, de morir, debido a la resistencia a los fármacos existente y falta de nuevas alternativas (Bonten et al, 2020).

II.7.3. *Enterococcus faecalis*

E. faecalis es una bacteria anaerobia facultativa Gram positiva que se encuentra comúnmente en la cavidad oral, el tracto digestivo y en la vagina debido a que se adaptan bien a los ambientes con bajo oxígeno pero altos nutrientes, como los son las zonas antes mencionadas (Alghamdi et al, 2020).

Las *Enterococcus* son la tercera causa de las infecciones intrahospitalarias y septicemia siendo responsables de la muerte del 25 al 50% de pacientes hospitalizados. De estas infecciones ocasionadas por este género de bacterias, del 85 al 90% son causadas por *E. faecalis* (Jabbari et al, 2019). En tratamientos odontológicos, *E. faecalis* también es causante del 90% de infecciones endodónticas que, además, son mayormente asintomáticas (Alghamdi et al, 2020). Además, estudios han demostrado que la disbiosis intestinal (desequilibrio en la microbiota) debido a esta bacteria promueve el cáncer de hígado en pacientes con enfermedades hepáticas (Iida et al, 2021).

II.7.4. *Pseudomonas spp.*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria aerobia Gram negativa que se puede encontrar, además de en los tejidos de los mamíferos, en el suelo y las plantas, capaz de adaptarse a los cambios ambientales y desarrollar resistencia a los antibióticos rápidamente debido a que producen proteasas y elastasas que degradan a ciertas proteínas inmunoreguladoras y producen varios factores de virulencia (Tuon et al, 2022).

Es considerada la causa de infecciones en general en quinto lugar a nivel mundial pero la segunda responsable de neumonía nosocomial (infección que se produce en el

hospital) sobretodo en personas con enfermedades como asma o fibrosis quística. Debido a las características antes mencionadas, se ha aumentado la gravedad en las enfermedades bronco-respiratorias, así como se ha complicado el tratamiento a dichas patologías aumentando el índice de morbilidad y pudiendo llevar al paciente enfermo a una vida más corta (García et al, 2020; Malhotra et al, 2019; Paz et al, 2019).

II.7.5. *Salmonella* spp.

Salmonella es una bacteria Gram negativa que posee un flagelo que le aporta movilidad y vive en el tracto gastrointestinal de diversos animales como humanos, gatos, perros, aves, reptiles pero también en productos comestibles como huevos, carne, vegetales y agua. Los serotipos que frecuentemente causan salmonelosis son *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis*; la primera casusa la llamada tifoidea y produce fiebre, dolor de cabeza, malestar y tos en algunos casos (Ehuwa et al, 2021; Loredana et al, 20201).

Anualmente, más de 2 billones de personas en el mundo sufren enfermedades diarreicas, siendo la *Salmonella* una de las principales causantes de éstas, las cuales se denominan salmonelosis, provocando así 93 millones de casos de gastroenteritis y 155 mil muertes anuales. Sin embargo, debido a la resistencia a los antibióticos, expertos pronostican la muerte de 10 millones de personas en el mundo para el 2050 causada por patógenos resistentes (Castro et al, 2020).

II.7.6. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un bacteria Gram positiva; se clasifica como coco se agrupa en racimos y puede producir pigmento amarillo, de ahí su nombre (*Staphylo* significa racimo de uvas en griego y *aururm* oro en latín). Como la mayoría de las bacterias antes mencionadas, ésta forma parte de la microbiota natural de los humanos pero pueden causar infecciones en el lugar donde se alojen, por ejemplo la piel, la zona nasofaríngea y los tejidos blandos como músculos, tendones y vasos sanguíneos, aunque también las infecciones pueden ser a consecuencia de consumir algún alimento contaminado (Pasachova et al, 2019).

Las infecciones por *S. aureus* son preocupantes debido a la resistencia contra diversos antibióticos incluida la meticilina (antibiótico de alta importancia clínica). Las cepas resistentes a este fármaco se les cataloga como MRSA (por sus siglas en inglés Methicillin-

Resistant *Staphylococcus aureus*) y se dice que es una súper bacteria porque, además, es resistente a penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol, lincomicina, aminoglucósidos, tetraciclinas, macrólidos, quinofalonas, sulfonamidas y rifampicina. La tasa de mortalidad de una infección por MRSA supera de del SIDA, Parkinson e incluso el asesinato (Cheung et al, 2021; Guo et al, 2020).

II.8. MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA FITOPATOLÓGICA

II.8.1. *Fusarium oxysporum*

Es uno de los 10 hongos fitopatógenos más relevantes en cuanto a riesgo para la salud alimentaria, pues provoca la marchitez de distintos cultivos según la cepa. Éste ataca una gran variedad de plantas de importancia agrícola. Su mecanismo de acción es ocasionar marchitamientos, para, seguido, matar a la planta (Dean et al, 2012).

Además, *Fusarium oxysporum* produce una micotoxina de nombre fumonicina que causa lesiones en las raíces de algunas plantas. En humanos puede llegar a causar infecciones en la córnea si existe contacto ocular con dicho microorganismo, así como infecciones en las uñas e infecciones sistémicas en pacientes inmunocomprometidos (Nelson et al, 1994).

II.8.2. *Phytophthora capsici*

México es el segundo productor de chile verde a nivel mundial. Sin embargo, este cultivo es afectado por diferentes patógenos como *Phytophthora capsici*. Este provoca enfermedades en el chile y limitan el crecimiento de la planta, el rendimiento y la calidad del fruto. La enfermedad causada por *P. capsici* es conocida como pudrición basal del tallo y puede causar pérdidas en la producción que van del 26 al 90%. Esto ha provocado contaminación en el suelo y, por lo tanto, necesidad de trasladar el cultivo a un nuevo terreno (López et al, 2019).

Las enfermedades presentadas anteriormente eran tratadas con fungicidas comerciales de manera eficaz. Sin embargo, el mal uso de estos ha generado que los microorganismos se vuelvan más resistentes. Además, se ha encontrado que algunos de estos pueden causar toxicidad, los resultados pueden variar según la especie y pueden ser muy costosos (Osorio et al, 2006).

Tabla 2. Microorganismos y su importancia médica o fitopatológica

Nombre	Tipo	Infección/enfermedad
<i>B. cereus</i>	Bacteria Gram Positiva	Gastrointestinal Ocular Sanguínea
<i>E. coli</i>	Bacteria Gram Negativa	Bacteriemia Gastrointestinal
<i>E. faecalis</i>	Bacteria Gram Positiva	Septicemia Endodóntica Cáncer hepático
<i>Pseudomonas</i> spp.	Gram Negativa	Bronco respiratoria neumonía nosocomial
<i>Salmonella</i> spp.	Gram Positiva	Gastrointestinales
<i>S. aureus</i>	Gram Positiva	Dérmica Bacteriemia
<i>F. oxysporum</i>	Hongo	Marchitez de cultivos
<i>P. capsici</i>	Hongo	Pudrición basal del tallo

III. METODOLOGÍA

III.1. PRODUCCIÓN DE CHILE RICO EN CAPSIATO (*CAPSICUM ANNUUM* L. 509-45-1) A NIVEL INVERNADERO.

III.1.1. Material biológico

Se usaron semillas de la accesión 509-45-1 de *Capsicum annuum* L. (pimiento productor de capsiato), provistas por el Dr. Robert L. Jarret de USDA/ARS/PGRU, USA.



Figura 2. Semillas de accesión 509-45-1 de *Capsicum annuum* L.

III.1.2. Germinación

Semillas de la accesión 509-45-1 de *Capsicum annuum* L. fueron remojadas por 24 hrs con agua potable para estimular la germinación. Posteriormente, estas semillas fueron

colocadas en charolas de polietileno expandido de 200 cavidades con 75% de sustrato peat moss premier de Sphagnumy marca Pro-Mix® humedecido con agua potable y cubiertas con 25% de vermiculita. Las charolas se cubrieron con bolsas plásticas negras para promover la germinación hasta la aparición de la primera radícula evitando así la pudrición o etiolación.



Figura 3. Germinación de *Capsicum annuum* L. 509-45-1.

III.1.3. Trasplante

Las plántulas fueron regadas por aspersión con 250-500 ml de agua potable manteniéndolas a temperatura ambiente hasta que ésta tuvo 4 hojas verdaderas. Entonces, 60 plántulas fueron trasplantadas a bolsas de cultivo con arenilla dándoles un único riego con promotor de desarrollo ROOTEX® al momento del trasplante.



Figura 4. Trasplante de *Capsicum annuum* L. 509-45-1.

III.1.4. Labores culturales

Cada bolsa de cultivo trasplantada fue colocada dentro de un invernadero a 30 cm de distancia entre cada una de ellas sobre 4 canaletas a lo largo del invernadero, es decir, 15 plantas por línea. El tubo liso de polietileno de mm de diámetro para el sistema de riego fue

perforado a la misma altura que las bolsas para colocar los goteros antidrenantes de flujo de 4 lph conectados a microtubos que a la vez estaban conectado a las estacas dispuestas en cada una de las bolsas. Debido a estas condiciones, los riegos fueron dados para que se diera un riego total de 2 litros de agua al día por planta con una nutrición como se muestra en la tabla 2 siguiendo siempre las buenas prácticas como lo estipula la Norma Oficial Mexicana NOM-003-STPS-1999.

Tabla 3. Nutrición para *Capsicum annuum* L. 509-45-1.

COMPUESTO	mg/L	Ác. fosfórico	20
MgSO ₄	202.845455	Ác. Nítrico	166.090909
Mg(NO ₃) ₂	210.954545	Fe	17
KH ₂ PO ₄	71.6	Mn	6.13636364
K ₂ SO ₄	53.5818182	Cu	0.45454545
KNO ₃	130.454545	Zn	1
Ca(NO ₃) ₂	327.545455	B	3.5
KCl	47.6363636	Mo	0.11363636



Figura 5. A. Distribución de *Capsicum annuum* L. 509-45-1 dentro del invernadero. B. Labores culturales (tutoreo).

III.1.5. Cosecha

Una vez que los chiles estuvieron maduros, medida que se tomó en base al cambio de color del fruto (verde a rojo), éstos fueron cosechados. Ocurrieron 3 ciclos de cosecha hasta

que se anuló el riego para detener el crecimiento de la planta. Una vez que se secaron las plantas se hizo una última cosecha del fruto que terminó de madurar en la planta. Los frutos una vez cosechados fueron lavados y deshidratados.



Figura 6. Cosecha de *Capsicum annuum* L. 509-45-1.

III.2. PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE CHILE RICO EN CAPSIATO Y RICO EN CAPSAICINA

III.2.1. Material biológico

En el caso del extracto rico en capsiato, al chile colectado de la producción se le dieron baños de sol por al menos 48 hrs para lograr su deshidratación. Posteriormente, el chile seco fue molido hasta obtener un polvo fino con ayuda de un GRINDER.

Para el extracto rico en capsaicina, polvo de chile habanero fue provisto por el Dr. Ramón Gerardo Guevara González de la Universidad Autónoma de Querétaro

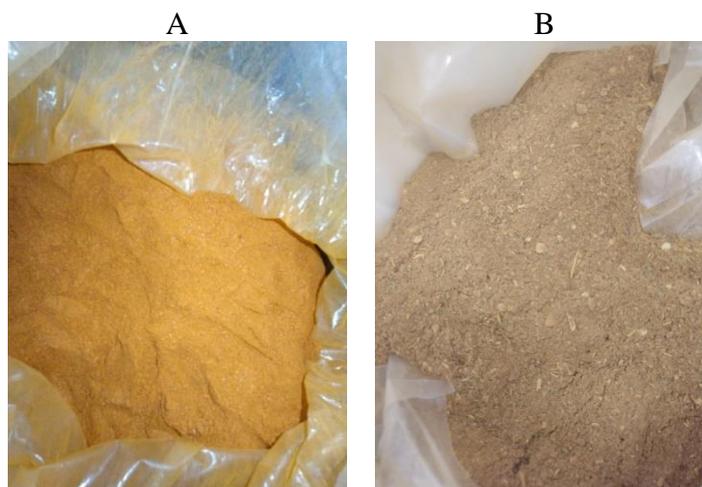


Figura 7. A. Polvo de *Capsicum annuum* L. 509-45-1. B. Polvo de chile habanero

III.2.2. Extracción

La extracción se realizó según Baldeón, et al. (2017) con algunas modificaciones: 25 g de polvo de chile fueron dispuestos en un cartucho hecho de papel filtro que más adelante se colocó en la cámara extractora de un sistema Soxhlet añadiendo 200 mL de hexano al matraz bola del mismo. El sistema se mantuvo a 45 °C por 6 hrs manteniendo siempre la temperatura del agua recirculada por el refrigerante a 4°C.

III.2.3. Recuperación

Al finalizar la extracción, se recuperó el hexano mediante rotoevaporación durante aproximadamente 25 min. De igual forma, la temperatura en el baño maría se mantuvo a 45-50 °C y la temperatura del refrigerante a 4°C La oleoresina obtenida se guardó a 4°C en frascos ámbar hasta su uso y el hexano recuperado se colocó en frascos ámbar destinados a guardar estos residuos hasta su pertinente desecho.

Algunos hexanos comerciales contienen ciclohexano, el cual es clasificado como residuo peligroso según la NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. Para su correcto manejo, transporte y almacenamiento se seguirá lo establecido en los apartados 6, 10 y 12 de la NOM-005-STPS-1998 (Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas) y el apartado 7 de la NOM-018-STPS-2015 (Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo).

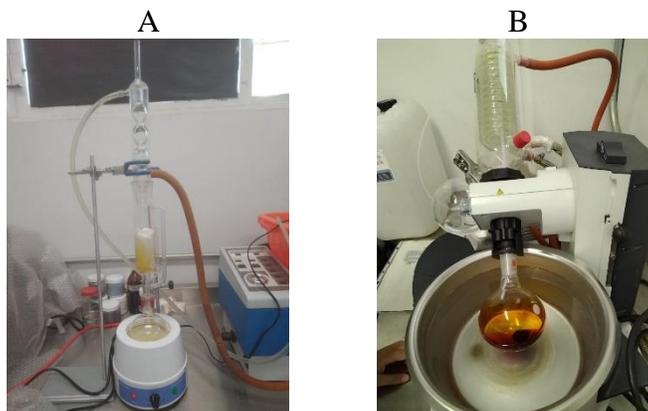


Figura 8. A. Extracción Soxhlet de *Capsicum annum* L. B. Extracción de solventes (hexano) por rota-evaporación.

III.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO CONTRA PATÓGENOS Y FITOPATÓGENOS DEL EXTRACTO DE CHILE RICO EN CAPSIATO.

III.3.1. Material biológico

Los microorganismos *E. coli*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* fueron provistos por la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez de Universidad Autónoma de Querétaro.

III.3.2. Activación de microorganismos

500µL de cada uno de los microorganismos se suspenderán en 100 mL de caldo LB para su activación manteniéndolos en incubación a 37°C. Una vez que la absorbancia en cada uno de los tubos correspondió a 0.08-0.1, usando medio LB como blanco (lo que corresponde a aproximadamente 1-2x10⁸ UFC, según el estándar de 0.5 de McFaraland), fueron usados para las pruebas correspondientes (Powers, 2022).

III.3.3. Ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano en medio líquido

El efecto antimicrobiano se evaluó mediante un ensayo de inhibición de crecimiento en medio líquido como lo describe Valencia et al. (2022) con algunas modificaciones. Se añadieron 50 µL de inóculo con carga bacteriana de aproximadamente 1-2x10⁸ UFC a tubos con 5 ml de caldo LB y los tratamientos de oleorresina de chile rico en capsiato (1%, 0.5% y 0.1%), así como los de oleorresina rica en capsaicina. Como control positivo se añadió Clindamicina (500 µg/ tubo) y como control negativo, caldo LB con los inóculos bacterianos; debido a que la oleorresina se diluye primero con etOH para lograr una concentración de 50%, se realiza un ensayo agregando 50 µL de etanol para descartar efectos generados por este disolvente. Luego, los tubos fueron incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se inocularon alícuotas de 20 µL en cajas de agar LB de cada tratamiento, se incubaron a 37°C por 12 horas y se realizó un conteo de colonias. El efecto inhibitorio fue medido en base a la diferencia de UFCs teniendo como referencia el crecimiento del control negativo.

III.3.4. Ensayo de inhibición de crecimiento fúngico en medio líquido

La actividad antifúngica se evaluó mediante un ensayo de inhibición de crecimiento en medio líquido como lo describen Tripti y Collen (2008) con algunas modificaciones. En frascos con 5 mL de caldo LB y los tratamientos de oleoresina de chile rico en capsiato (1%, 0.5% y 0.1%), así como los de oleoresina rica en capsaicina se les añadió 50 µl de inóculo con carga bacteriana de aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC, inoculando, además, dos tubos extra con *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* respectivamente, sin tratamiento, como control negativo y otros 2 añadiendo 50 µL de etanol para descartar efectos generados por este disolvente; los tubos fueron incubados a 37°C durante 5 días. Después de 6 días de incubación, el contenido del tubo fue homogenizado y filtrado con filtro Whatman del número 5. Posteriormente, los filtros con micelio impregnado fueron secados en un horno a 60°C, enfriados en un desecador y pesados a peso constante. El efecto inhibitorio fue medido en base a la diferencia de pesos.

Las cultivos utilizados, así como los utensilios en donde se contuvieron, transfirieron, inocularon y mezclaron cultivos de agentes biológico-infecciosos son considerados Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI) según la NOM-087-ECOL-SSA1-2002 (Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo). Para su correcto manejo, se seguirá lo establecido en la misma Norma Oficial Mexicana.



Figura 9. Ensayo de inhibición en medio líquido.

III.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, bajo un diseño completamente al azar. Los datos serán analizados por medio del programa R mediante ANOVA y Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. PRODUCCIÓN DE CHILE RICO EN CAPSIATO (*CAPSICUM ANNUUM* L. 509-45-1) A NIVEL INVERNADERO

Bajo las condiciones a las que se mantuvo el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L. 509-45-1), se obtuvo un total de 32.6 kg de chile en las 60 plantas cultivadas, obteniendo así un rendimiento de 546 g de chile por planta. En estudios anteriores se logró un rendimiento de 645 g de chile por planta modificando la nutrición de la misma una vez que apareció el primer brote aumentando las concentraciones de N, K y Ca. En esta investigación se obtuvo un rendimiento 100 g por planta menor, siendo la nutrición la causa que se pretende sea la que causó un rendimiento menor debido a que se aumentó ya que en esta investigación se mantuvo una misma nutrición todo el ciclo de cultivo, similar a la primera etapa usada en el estudio realizado por Vanesa (2022).

IV.2. PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS DE CHILE RICO EN CAPSIATO Y RICO EN CAPSAICINA

Mediante la extracción Soxhlet realizada a los polvos de chile, se obtuvieron 2 g de oleorresina para *Capsicum annuum* L. 509-45-1 y 1 g de oleorresina para habanero. Esto fue por cada 25 g de polvo de chile, por lo cual se obtuvo un rendimiento del 8.9% y 4.4% respectivamente.

IV.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO CONTRA PATÓGENOS Y FITOPATÓGENOS DEL EXTRACTO DE CHILE RICO EN CAPSIATO.

IV.3.1. Microorganismos de importancia médica

IV.3.1.1. *B. cereus*

Para el caso de *B. cereus* se mostraron diferencias significativas únicamente para los tratamientos de capsaicina al 1% y 0.5%, obteniendo una inhibición del 100 y 93% respectivamente pues no se observó ninguna UFC en el tratamiento de mayor concentración y un promedio de 5×10^7 UFC/ml en el otro. En contraste, en el control negativo tuvimos un crecimiento de 7.1×10^8 UFC/ml. El tratamiento que mostró peor inhibición (0%) fue el tratamiento de capsaiato al 0.1%. La CMI encontrada por Goci et al (2021) es de $7.937 \mu\text{L/mL}$,

con un rango de 5 a 10. En este estudio se usaron concentraciones de 1 a 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, encontrándonos dentro del rango para la capsaicina.

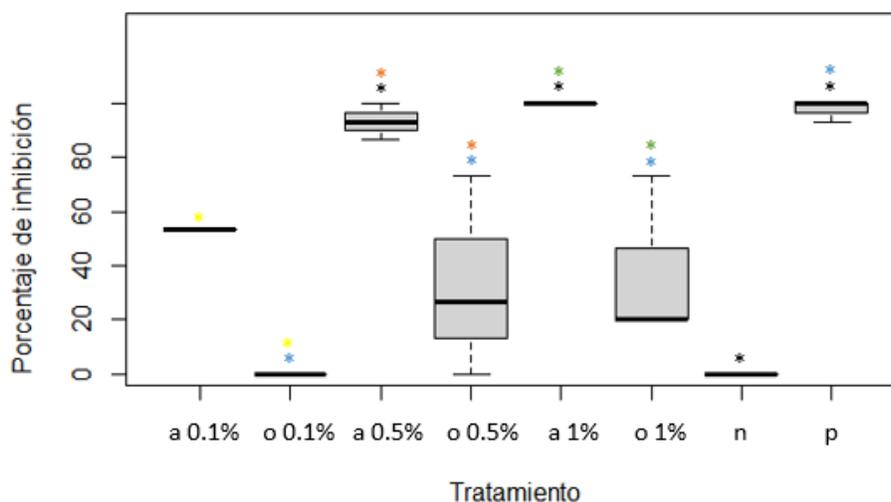


Figura 10. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra *B. cereus* respecto a los tratamientos (*a* es capsaicina, *o* es capsiato, *n* es el control negativo (etanol), *p* es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

IV.3.1.2. *E. coli*

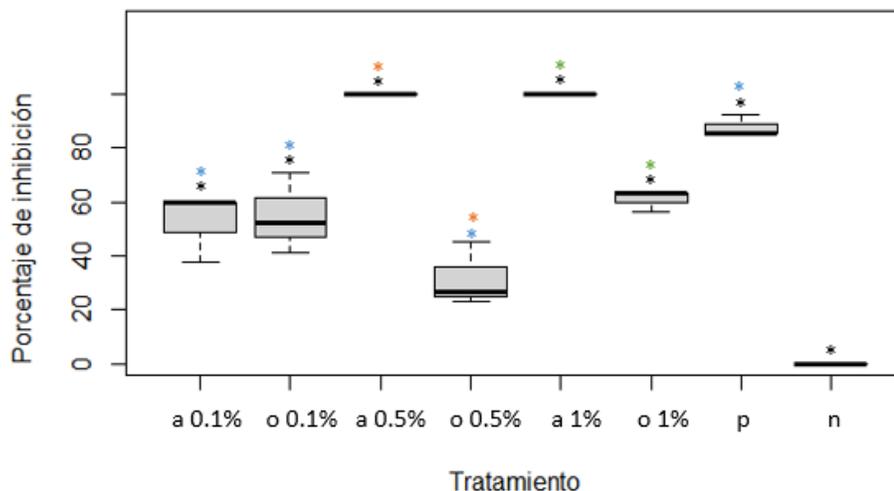


Figura 11. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* respecto a los tratamientos (*a* es capsaicina, *o* es capsiato, *n* es el control negativo (etanol), *p* es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

En el ensayo de inhibición para *E. coli* curiosamente el tratamiento de capsiato al 0.5% mostró una inhibición menor (32%), obteniendo un conteo de 1.5×10^8 UFC/ml sin provocar diferencia significativa respecto al control, que el tratamiento de capsiato al 0.1% (55%). A pesar de eso, todos los demás tratamientos (capsaicina al 1, 0.5 y 0.1% y capsiato

al 1 y 0.1%) mostraron diferencias significativas ($P=0.05$) logrando inhibiciones del 100% los tratamientos de capsaicina al 1 y 0.5% y de 52% y 61% para capsaicina al 0.1% y capsiato al 1% respectivamente. En el control negativo hubo un crecimiento de 1.4×10^9 UFC/ml.

Wang et al (2019) obtuvieron porcentajes de inhibición de 57.21 a 93.21% para *E. coli* con derivados de capsaicina, encontrándonos cerca de los valores reportados. A pesar de que no hay estudios reportados para el capsiato, los porcentajes obtenidos son bastante cercanos a los de la capsaicina y sus derivados.

IV.3.1.3. *E. faecalis*

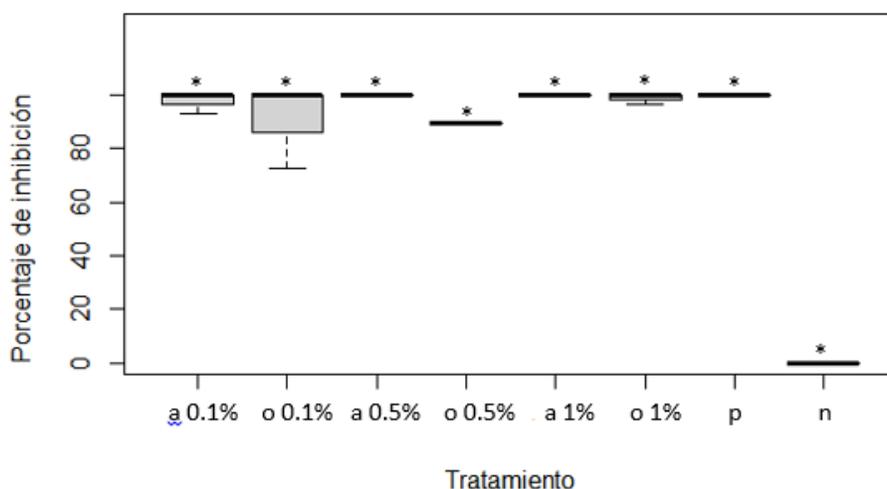


Figura 12. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. faecalis* respecto a los tratamientos (*a* es capsaicina, *o* es capsiato, *n* es el control negativo (etanol), *p* es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

Se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos respecto al control negativo con *E. faecalis* (Fig. 10C) logrando porcentajes de inhibición de 98 a 100% en los tratamientos de capsaicina y de 90 a 99% para capsiato. Se contaron 1.4×10^9 UFC en el control negativo mientras que en el tratamiento de capsiato al 0.1%, el de la menor inhibición (90%) hubo un crecimiento de 1.5×10^8 . Para este microorganismo no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. A pesar de que se ha requerido de una alta CMI de capsaicina (256mg/L) para inhibir *E. faecalis* en estudios anteriores (Oyedemi et al, 2019), derivados de ésta como la dihidrocapsaicina y la novivamida necesitaron sólo la mitad (128

mg/L) para lograr inhibición, en este trabajo también se logró la inhibición de este microorganismo, por lo cual obtuvimos resultados similares.

IV.3.1.4. *Pseudomonas spp.*

Todos los tratamientos mostraron efecto inhibitorio contra *Pseudomonas spp.* con diferencias significativas. Nuevamente, la capsaicina obtuvo mayor inhibición (de hasta 100% para la concentración más alta) que el capsiato. Sin embargo, la menor inhibición fue de un promedio de 50% para capsiato al 0.5%; realizando el conteo de colonias se registraron 1.1×10^9 UFC/ml mientras que para el control negativo fueron 2.2×10^9 UFC/ml. En los tratamientos de 0.1% hubo mayor inhibición para el capsiato (67%) que para la capsaicina (59%). Con una densidad de microorganismos de 7.5×10^8 y 9.1×10^8 UFC/ml respectivamente.

En estudios anteriores (Oyedemi et al, 2019) se necesitaron concentraciones altas tanto de capsaicina como de sus derivados (512 mg/L) para lograr inhibición contra *Pseudomonas aeruginosa*, similares resultados obtuvimos en este estudio, pues a pesar de que se mostraron diferencias significativas en todos los tratamientos, sólo las más altas lograron una inhibición del 100%.

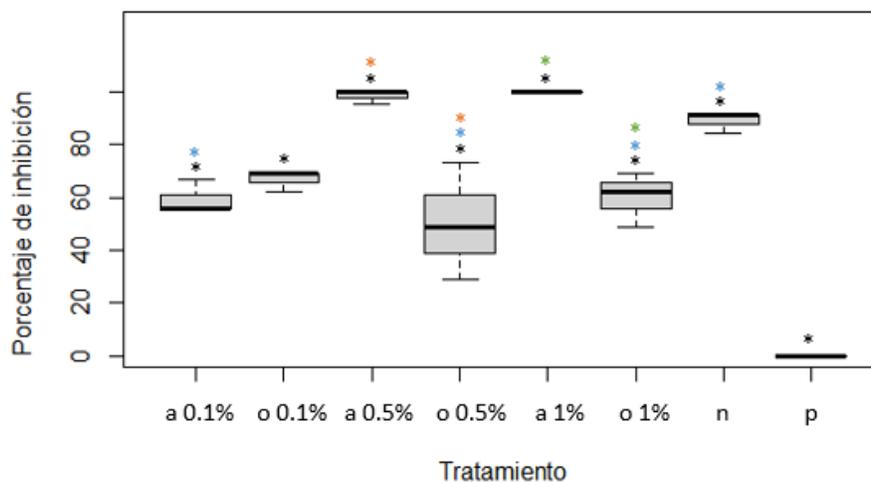


Figura 13. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra *Pseudomonas spp.* respecto a los tratamientos (*a* es capsaicina, *o* es capsiato, *n* es el control negativo (etanol), *p* es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

IV.3.1.5. *Salmonella* spp.

Se encontraron diferencias significativas para los tratamientos de mayor concentración de las dos oleorresinas con una inhibición del 81% con capsiato y 100% con capsaicina. Además, el tratamiento de capsaicina al 0.5% también logró una inhibición del 100%. A pesar de que no se encontró diferencia significativa para capsiato al 0.5 ni al 0.1%, se obtuvieron inhibiciones del 68 y 60 % respectivamente, siendo un efecto mayor que para la capsaicina al 0.1% con 36% de inhibición, contándose 1.2×10^9 UFC/ml de $2.25 \times 10^9 \times 10^9$ UFC/ml en el control negativo.

En los estudios realizados por Peeyananjarassri et al (2022) lograron inhibir al 100% el crecimiento de *Salmonella* spp con concentraciones altas de extractos de *Capsicum annuum* y *Capsicum frutescens*. En este estudio, de igual manera se logró inhibir al 100% el crecimiento de *Salmonella* spp en las concentraciones más altas de capsaicina y, aunque no se inhibió al 100% el crecimiento en el tratamiento más alto de capsiato, sí fue el que mayor efecto inhibitorio tuvo dentro de las 3 concentraciones que se probaron.

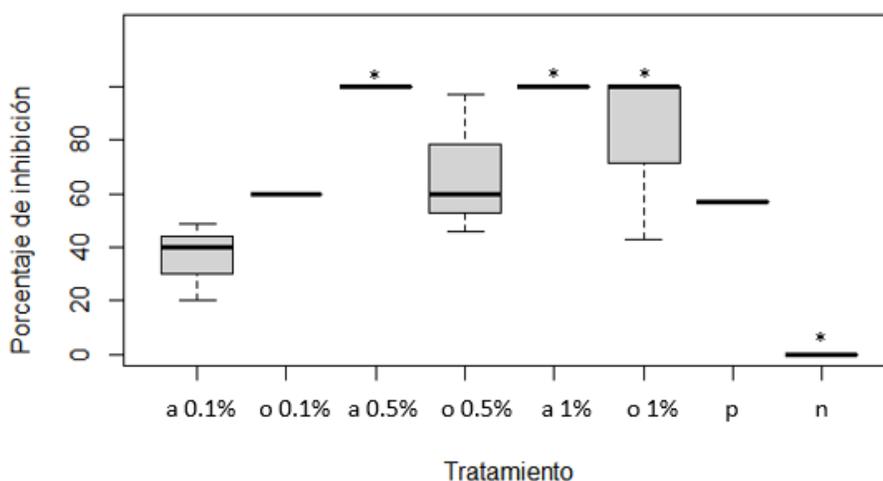


Figura 14. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra *Salmonella* spp. respecto a los tratamientos (a es capsaicina, o es capsiato, n es el control negativo (etanol), p es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

IV.3.1.6. *Staphylococcus aureus*

Para este microorganismo el capsiato no mostró ningún efecto inhibitorio. Por el contrario, los tratamientos de 1% y 0.5% inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* al 100 y 99% respectivamente. En estudios recientes (Wang et al, 2019) contra este

microorganismo, haciendo uso de derivados de capsaicina como agentes antimicrobianos, se han obtenido porcentajes de inhibición de 60.8 a 73.4%. En este estudio se logró inhibir por completo al microorganismo con la capsaicina, sin embargo no se logró inhibición alguna al usar capsaiato.

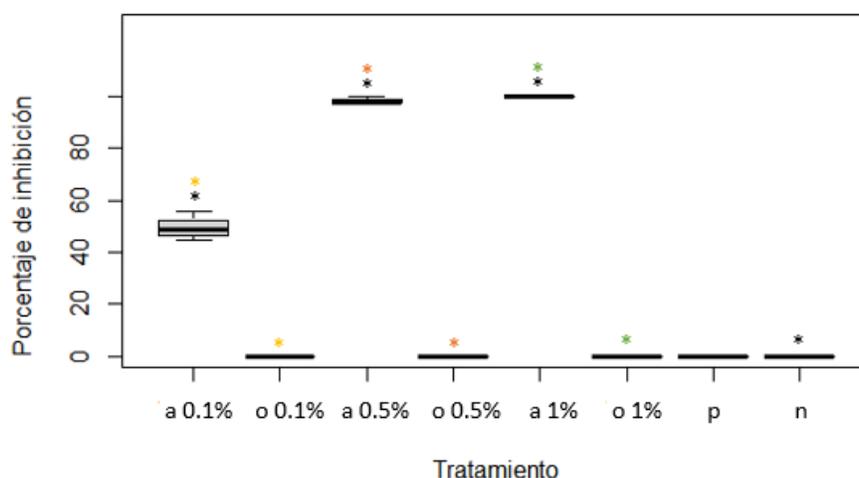


Figura 15. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra *Staphylococcus aureus* respecto a los tratamientos (*a* es capsaicina, *o* es capsaiato, *n* es el control negativo (etanol), *p* es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

IV.3.2. Microorganismos de importancia fitopatológica

IV.3.2.1. *Fusarium oxysporum*

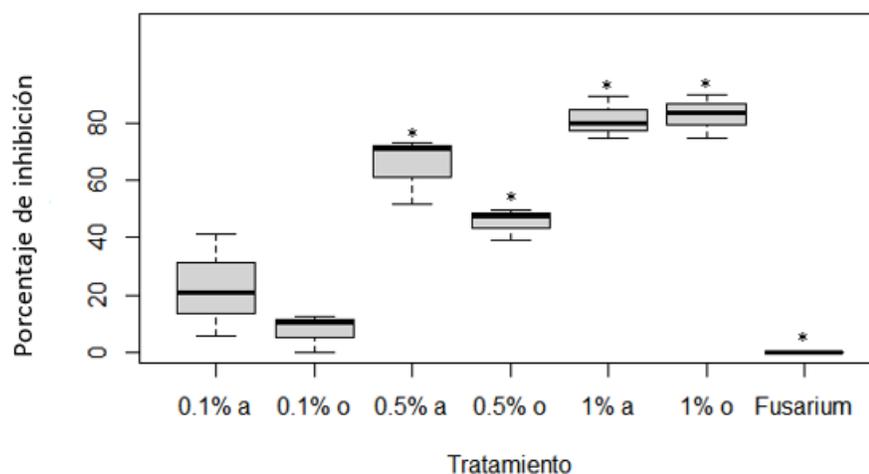


Figura 16. Porcentajes de inhibición de crecimiento fúngico contra *Fusarium oxysporum* respecto a los tratamientos (*a* es capsaicina, *o* es capsaiato, *n* es el control negativo (etanol), *p* es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

Se encontraron diferencias significativas en los tratamientos de 0.5 y 1% para ambas oleorresinas, es decir, que hubo un efecto inhibitorio contra el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* por parte tanto de la capsaicina como del capsiato llegando a obtener inhibiciones de hasta 82.7 y 81.3% para capsiato y capsaicina respectivamente. Estudios anteriores (Valencia et al, 2020) con el uso de capsaicina pura comercial se reportó inhibición de 85.2%, encontrándonos en valores muy cercanos a los reportados.

IV.3.2.2. *Phytophthora capsici*

Todos los tratamientos mostraron efecto inhibitorio contra *Phytophthora capsici*, mostrando diferencias significativas, logrando inhibiciones desde 79.6 hasta 87.8% para los tratamientos con capsiato y de 75.7 a 88.5% con capsaicina. Veloso et al (2013) reportaron inhibiciones de un máximo de 69.6%, existiendo variaciones en los resultados debido al método utilizado, sin embargo, son valores cercanos.

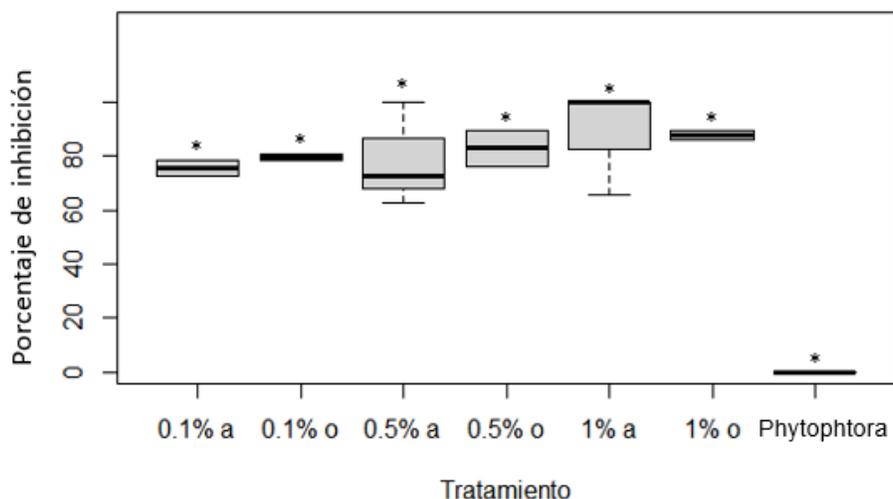


Figura 17. Porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano contra *Phytophthora capsici* respecto a los tratamientos (**a** es capsaicina, **o** es capsiato, **n** es el control negativo (etanol), **p** es el control positivo (Clindamicina) * indica diferencia significativa respecto al control negativo, * indica diferencia significativa respecto al control positivo).

Tabla 4. Resumen de resultados. (- inhibición menor de 30%, + inhibición del 30% al 50%, ++ inhibición del 50% al 75%, +++ inhibición mayor de 75%)

PATÓGENO / FITOPATÓGENO	INHIBICIÓN					
	capsiato			capsaicina		
	0.1%	0.5%	1%	0.1%	0.5%	1%
<i>B. cereus</i>	-	+	+	++	+++	+++
<i>E. coli</i>	++	+	++	++	+++	+++
<i>E. faecalis</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Pseudomonas spp.</i>	++	++	++	+	+++	+++
<i>Salmonella</i>	++	++	+++	+	+++	+++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	+++	+++
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	++	+++	-	++	+++
<i>Phytophthora capsici</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Poco se sabe del mecanismo de acción del capsiato como agente inhibitorio. Sin embargo, se ha demostrado que los capsaicinoides rompen la estructura del peptidoglucano a través de interacciones lipídicas aumentando la fluidez de la membrana celular pudiendo así entrar, junto con los capsaicinoides, iones que producen estrés osmótico y por lo tanto lisis celular (Akyuz et al, 2018; Romero et al, 2022). Además, los capsaicinoides ya dentro de la célula bacteriana generan toxicidad e interfieren con la expresión de genes de crecimiento y reproducción logrando inhibir el crecimiento bacteriano (Adasek et al, 2019).

Con respecto al capsiato, las mayores inhibiciones se lograron usando la concentración más alta (1%) para *Salmonella* spp. y todas las concentraciones para *E. coli*, ambas bacterias Gram positivas. Se ha reportado que este tipo de bacterias son más sensibles a los capsaicinoides que las bacterias Gram negativas (Wang et al, 2021; Molina et al, 1999) pudiendo deberse a la ausencia de la membrana lipídica externa que tienen las Gram (-) pues esta cubre al vulnerable peptidoglucano.

La poca o nula inhibición de *B. cereus* y *S. aureus*, también bacterias Gram positivas, puede deberse a que estas bacterias producen enzimas que las hace resistentes a diferentes tipos de antibióticos (Cheung et al, 2021; Guo et al, 2020; Drobniowski, 1993) y exista alguna que degrade al capsiato, como las bacterias *Actinoplanes utahensis* NRLL 12052, *Streptomyces mobaraensis* y algunas especies de *Bacillus* que se han aislado de kimchi coreano que producen enzimas que degradan a la capsaicina (Adams et al, 2020).

De manera similar, la inhibición en los hongos sugiere ser debido al daño en la estructura en la membrana pues un perfil de expresión génica (Kurita et al, 2002) demuestra que la capsaicina induce elementos de estrés osmótico y en genes para la síntesis de membrana y reprime genes de componentes ribosomales y de crecimiento celular. Además, los capsaicinoides se unen al Complejo I e interrumpen la producción de ATP en la mitocondria (Romero et al, 2022).

Nuevamente hay una sensibilidad mayor en los oomicetos que en los hongos debido a la fragilidad en la membrana de los primeros pues ésta está compuesta de ácidos grasos largos mientras que las de los hongos por esteroides (Veloso, 2013) es por eso que se lograron inhibiciones mayores a 75% para *P. capsici* a menor concentración de oleoresina mientras que se necesitaron concentraciones mayores para lograr inhibir *F. oxysporum* al 75%.

V. CONCLUSIONES

La oleorresina de chile rico en capsiato demostró efecto inhibitorio contra patógenos de interés médico (bacterias Gram positivas y Gram negativas) como *B. cereus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp y *S. aureus*, así como contra fitopatógenos (hongos) como *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* sobretodo en concentraciones al 1%. A pesar de que para *B. cereus*, *E. coli*, *Pseudomonas* spp, y *S. aureus*, existió diferencia significativa entre los tratamientos de capsaicina y capsiato, para *E. faecalis*, *Salmonella* spp, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* no hubo diferencias significativas entre oleorresinas, por lo cual se puede concluir que el capsiato tiene un efecto similar a la capsaicina en cuanto a agente inhibitorio del crecimiento microbiano se refiere contra algunos microorganismos. Hace falta estudiar el efecto de la oleorresina de chile rico en capsiato contra otros microorganismos de importancia médica y fitopatológica para afirmar su efecto in vito, así como también probar la oleorresina in vivo pues es nulo el conocimiento en este relevante tema.

VI. PERSPECTIVAS

Además de continuar la evaluación in vitro contra diversos microorganismos, al igual que ensayos in vivo, se espera que en un futuro se pueda evaluar una dosis que actúe como antimicrobiano en la industria farmacéutica, así como su uso en la agricultura y ganadería para control de enfermedades, promotor de crecimiento, aditivo, etc. Así, evitar el consumo de fármacos químicos comercialmente disponibles que, además de su poca efectividad actual, contaminan el medio ambiente. Adicionalmente, al chile, siendo ya un cultivo de importancia comercial en México, se le otorgaría un valor agregado.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, P., Das, C., Dias, O., & Shanbhag, T. (2017). Antimicrobial property of Capsaicin. *International Research Journal of Biological Sciences*, 6(7), 7-11.
- Akyuz, L., Kaya, M., Mujtaba, M., Ilk, S., Sargin, I., Salaberria, A., . . . Islek, C. (2018). Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 438-446. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.04.040
- Alghamdi, F., & Shakir, M. (2020). The Influence of Enterococcus faecalis as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus*, 12(3), 7. doi:10.7759/cureus.7257
- Baenas, N., Belović, M., Ilic, N., & Moreno, D. &. (2018). Industrial use of pepper (*Capsicum annum* L.) derived products: technological benefits and biological advantages. *Food Chemistry*, 872--885. doi:10.1016/j.foodchem.2018.09.047
- Baldeón, S., & Hernández, W. (2017).). Identificación de la capsaicina y la deshidrocapsaicina en el extracto de oleoresina obtenido a partir del ají panca (*Capsicum chinense*). *Ingeniería Industrial*, 3, 223-237. ISSN: 1025-9929
- Bao, Z., Dai, X., Wang, P., Tao, Y., & Chai, D. (2019). Capsaicin induces cytotoxicity in human osteosarcoma MG63 cells through TRPV1-dependent and -independent pathways. *Cell Cycle*, 18(12), 1379-1392. doi:10.1080/15384101.2019.16
- Batiha, G., Alqahtani, A., Ojo, O., Shaheen, H., Wasef, L., Elzeiny, M., . . . Jeandet, P. &. (2020). Biological Properties, Bioactive Constituents, and Pharmacokinetics of Some *Capsicum* spp. and Capsaicinoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 35. doi:10.3390/ijms21155179
- Berger, S., Sinha, ., & Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58(15-16), 4019-4026. doi:10.1093/jxb/erm298
- Bonten, M., Johnson, J., van der Biggelaar, A., Georgalis, L., Geurtsen, J., Ibarra, P., . . . Poolman, J. (2020). Epidemiology of *Escherichia coli* Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*, 72(7), 1211-1219. doi:10.1093/cid/ciaa210
- Bora, H., Kamle, M., Mahato, D., Tiwari, P., & Kumar, P. (2020). Citrus Essential Oils (CEOs) and Their Applications in Food: An Overview. *Plants*, 9(3), 25. doi:10.3390/plants9030357
- Bort, A., Sánchez, B., Mateos, P., Díaz, I., & Rodríguez, N. (2019). Capsaicin Targets Lipogenesis in HepG2 Cells Through AMPK Activation, AKT Inhibition and PPARs Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 18. doi:10.3390/ijms20071660
- Bousbia, N., Vian, M., Ferhat, M., Meklati, B., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 409-413. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.06.034
- Bujak, J., Kosmala, D., Szopa, I., Majchrzak, K., & Bednarczyk, P. (2019). Inflammation, Cancer and Immunity—Implication of TRPV1 Channel. *Frontiers in Oncology*, 9, 16. doi:10.3389/fonc.2019.01087
- Cantor, B. (1978). *Estados Unidos Patente n° US4186851A*.

- Cantrell, C., & Jarret, R. (2018). *Estados Unidos Patente n° WO2020086426A1*.
- Casimir, O., Martin, D., Philippe, E., Augustin, A., & Parfait, K. (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Capsicum annuum* var. *annuum* concentrated extract obtained by reverse osmosis. *GSC Biological and Pharmaceutical Science*, 3(5), 116-125. doi:10.30574/gscbps.2018.5.2.0123
- Castro, R., Herrera, M., Rodríguez, R., & Rondón, I. (2020). Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. *Veterinary World*, 13(10), 2070-2084. doi:10.14202/vetworld.2020.2070-2084
- Chemat, F. (2010). Techniques for oil extraction. En M. Sawamura, *Citrus Essential Oils Flavor and Fragrance* (págs. 9-36S). Canadá: John Wiley & Sons, Inc.
- Cheung, C., Bae, J., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. doi:10.1080/21505594.2021.1878688
- Costa, J., Sepúlveda, M., Gallardo, V., Cayún, Y., Santander, C., Ruíz, A., . . . Santos, C. (2022). Antifungal Potential of Capsaicinoids and Capsinoids from the *Capsicum* Genus for the Safeguarding of Agrifood Production: Advantages and Limitations for Environmental Health. *Microrganisms*, 10(12), 22. doi:10.3390/microorganisms10122387
- Das, J., Deka, M., & Gogoi, K. (2018). Antimicrobial Activity of Chilli Extracts (*Capsicum chinense*) Against Food Borne Pathogens *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Research and Analytical Reviews (IJRAR)*, 5(4), 717-720.
- de Mello, Fernandes, F., Silva, R., & Tardelli, T. (2020). Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 11. doi:10.3389/fcimb.2020.00339
- Dean, R., Van, J., Pretorius, Z., Hammond, K., Di Pietro, A., Spanu, P., . . . Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414-430. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783x
- Dietrich, R., Jessberg, N., Ehling, M., Märtlbauer, E., & Granum, P. (2021). The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*, 13(2), 48. doi:10.3390/toxins13020098
- Drobniewski, F. (1993). *Bacillus cereus* and Related Species. *Microbiology Reviews*, 6(4), 324-337. doi:10.1128/cmr.6.4.324
- Ehuwa, O., Jaiswal, A., & Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods*, 10(5), 16. doi:10.3390/foods10050907
- Fan, L., Xu, H., Yang, R., Zang, Y., Chen, J., & Qin, H. (2019). Combination of Capsaicin and Capsiate Induces Browning in 3T3-L1 White Adipocytes via Activation of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ/β 3-Adrenergic Receptor Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(22), 6232-6240. doi:10.1021/acs.jafc.9b02191
- FAO. (2022). *FAOSAT*. Obtenido de https://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity
- Fayos, O., Savirón, M., Orduna, J., Barbero, G., Mallor, C., & Garcés, A. (2019). Quantitation of capsiate and dihydrocapsiate and tentative identification of minor capsinoids in pepper fruits (*Capsicum* spp.) by HPLC-ESI-MS/MS(QTOF). *Food Chemistry*, 270, 264-272. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.112
- Gammoudi, N., Mabrouk, M., Bouhemda, T., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2021). Modeling and optimization of capsaicin extracion from *Capsicum annuum* L. using response surface methodology (RSM), artificial neural network (ANN), and Simulink simulation. *Industrial Corps and Products*, 10. doi:10.1016/j.indcrop.2021.113869

- García, M., de la Rosa, D., Máiz, L., Girón, R., Blanco, M., Oliveira, C., . . . Martínez, M. (2020). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* Infection on Patients with Chronic Inflammatory Airway Diseases. *Journal of Clinical Medicine*, 9(12), 32. doi:10.3390/jcm9123800
- Geurtsen, J., de Been, M., Weerdendurg, E., Zomer, A., McNally, A., & Poolman, J. (2022). Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(6), 30. doi:10.1093/femsre/fuac031
- Goci, R., Haloci, E., Di Stefano, A., Chiavaroli, A., Angelini, P., Miha, A., . . . Marinelli, L. (2021). Evaluation of In Vitro Capsaicin Release and Antimicrobial Properties of Topical Pharmaceutical Formulation. *Biomolecules*, 11(3), 10. doi:10.3390/biom11030432
- González, L. (1976). *Introducción a la Fitopatología*. Costa Rica: IICA.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 11. doi:10.3389/fcimb.2020.00107
- Gupta, R., Kapoor, B., Gulati, M., & Singh, S. &. (2021). The two faces of capsiate: Nutraceutical and therapeutic potential. *Trends Food Science & Technology*, 332-348. doi:10.1016/j.tifs.2021.02.012
- Hernández, C., Luque, A., Núñez, S., Cortez, M., Lizardi, J., Rosas, E., . . . Plascencia, M. (2022). Relationship between the Antifungal Activity of Chitosan–Capsaicin Nanoparticles and the Oxidative Stress Response on *Aspergillus parasiticus*. *Polymers*, 14(14). doi:10.3390/polym14142774
- Hernández, T. G. (2020). *Capsicum annum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22. doi:10.1111/1541-4337.12634
- Iida, N., Mizukoshi, E., Yamashita, T., Yutani, M., Seishima, J., Vang, Z., . . . Kaneko, S. (2021). Chronic liver disease enables gut *Enterococcus faecalis* colonization to promote liver carcinogenesis. *Nature Cancer*, 2, 1039-1054. doi:10.1038/s43018-021-00251-3
- Jabbari, S., Pormohammad, A., Hashemi, A., & Lak, P. (2019). Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2713-2725. doi:10.2147/IDR.S206084
- Jang, S., Park, M., Lee, D., Lim, J., Jung, J., & Kang, B. (2021). Breeding *Capsicum chinense* Lines with High Levels of Capsaicinoids and Capsinoids in the Fruit. *Agriculture*, 11(9), 819. doi:10.3390/agriculture11090819
- Jarret, R., Bolton, J., & Perkins, B. (2014). 509-45-1, a *Capsicum annum* Pepper Germplasm Containing High Concentrations of Capsinoids. *HortScience*, 49(1), 107-108. doi:doi.org/10.21273/HORTSCI.49.1.107
- Jovanovic, J., Ornelis, V., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *COMPREHENSIVE REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND FOOD SAFETY*, 20(4), 3719-3761. doi:10.1111/1541-4337.12785
- Kim, D., Kim, H., Kim, I., Hong, S., Choi, J., Park, S., & Jung, S. (2012). *Surcorea Patente n° KR101359334B1*.
- Kim, T., & Lee, Y. (2014). *República de Corea Patente n° KR1020150139326*.
- Kim, T., & Lee, Y. (2015). *Estados Unidos Patente n° US20150342919*.
- Kwon, D., Yang, H., & Park, S. (2015). *Surcorea Patente n° KR20150020635A*.

- Kwon, D., Yang, H., & Park, S. (2014). *República de Corea Patente n° KR1020140036371*.
- LaHann, T. (1980). *Estados Unidos Patente n° US4313958*.
- Latournerie, L., López, J., Castañón, G., Mijangos, J., Espadas, G., Pérez, A., & Ruíz, E. (2015). Evaluación agronómica de germoplasma de Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agroproductividad*, 8(1), 24-29. doi:2448-7546
- Lieder, B., Hans, J., Hentschel, F., Geissler, K., & Ley, J. (2019). Biological Evaluation of Natural and Synthesized Homovanillic Acid Esters as Inhibitors of Intestinal Fatty Acid Uptake in Differentiated Caco-2 Cells. *Molecules*, 24(19), 14. doi:10.3390/molecules24193599
- Lonza, A. (1932). *Reino Unido Patente n° GB371196*.
- López, J., Navarro, D., Qui, J., León, J., Saavedra, D., & García, S. (2019). Efecto del selenito e inulina en la interacción *Capsicum annuum* L. - *Phytophthora capsici* en invernadero. *Biotecnología Vegetal*, 19(1), 25-34. ISSN 2074-8647
- Loredana, G., & Ioan, M. (2021). Salmonella spp. infection - a continuous threat worldwide. *Germs*, 11(1), 88-96. doi:10.18683/germs.2021.1244
- Malhotra, S., Hayes, D., & Wozniak, D. (2019). Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2), 46. doi:10.1128/cmr.00138-18
- Merritt, J., Richbart, S., Moles, E., Cox, A., Brown, K., Miles, S., . . . Dasgupta, P. (2022). Anti-cancer activity of sustained release capsaicin formulations. *Pharmacology & Therapeutics*, 238. doi:10.1016/j.pharmthera.2022.108177
- Naseer, M., Asghar, A., Ameer, B., & Rehana, B. (2021). In vitro antimicrobial efficacy of some plant extracts against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* isolated from buffalo mastitic milk. *Buffalo Bulletin*, 40(1), 31-44. Obtenido de <https://kwojs.lib.ku.ac.th/index.php/BufBu/article/view/2540>
- Nelson, P., Dignani, M., & Anissie, E. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 479-504. doi:10.1128/cmr.7.4.479
- Okajima, K., Harada, N., & Fujicco, C. (2007). *Japón Patente n° JP2007291014*.
- OMS. (julio de 2020). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- OMS. (noviembre de 2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Osorio, E., Montoya, G., & Arango, G. (2006). Alkaloidal natural products with antiprotozoal activity. *VITAE*, 13(1), 61-84. ISSN 0121-4004
- Oyedemi, B., Kotsia, E., Stapleton, P., & Gibbson, S. (2019). Capsaicin and gingerol analogues inhibit the growth of efflux-multidrug resistant bacteria and R-plasmids conjugal transfer. *Journal of Ethnopharmacology*, 245, 9. doi:10.1016/j.jep.2019.111871
- Pasachova, J., Ramírez, S., & Muñoz, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalities, mechanisms of pathogenicity and cell colonization. *Nova*, 17(32), 25-38. ISSN 1794-2470
- Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., & Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 32(2), 180-189. doi:10.4067/S0716-10182019000200180

- Peeyananjarassri, S., Srisawat, P., & Duanjamrun, S. (2022). The Efficiency of Capsaicin in Chilli on Antibacterial Activity of Salmonella. *International Journal of Current Science Research and Review*, 5(8), 3206-3210. doi:10.47191/ijcsrr/V5-i8-49
- Quintero, L., Ríos, L., Quintana, D., & León, B. (2019). Sistema Experto para el diagnóstico presuntivo de enfermedades. *Revista Cubana de Ciencias Informáticas*, 13(1), 61-75. ISSN: 2227-1899
- Requena, F., Saume, E., & León, A. (2005). Micotoxinas: Riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23(4), 303-410. ISSN 0798-7269
- Reyes, F., Franco, A., Ramírez, N., Palou, E., & López, A. (2014). Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Engineering Reviews*, 7, 275-297. doi:10.1007/s12393-014-9099-2
- Roohinejad, S., Koubaa, M., Barba, F., Leong, S. K., Greiner, R., & Chemat, F. (2018). Extraction Methods of Essential Oils From Herbs and Spices. En M. Hashemi, A. Khaneghah, & A. Sant'Ana, *Essential Oils in Food Processing. Chemistry, Safety and Applications* (págs. 21-46). Oxford: John Wiley & Sons Ltd.
- Ropokis, A., Ntatsi, G., Kittas, C., Katsoulas, N., & Savvas, D. (2019). Effects of Temperature and Grafting on Yield, Nutrient Uptake, and Water Use Efficiency of a Hydroponic Sweet Pepper Crop. *Agronomy*, 9(2), 15. doi:10.3390/agronomy9020110
- Rylski, I. (1985). *Capsicum* (1ra Edición ed., Vol. 2). Boca Raton: CRC Press. doi:10.1201/9781351072540
- Sarowska, J., Futoma, B., Jama, A., Frej, M., Ksiazczyk, M., Bulga, G., & Choroszy, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogenes*, 11(10), 16. doi:10.1186/s13099-019-0290-0
- Sawant, D., Desphande, P., Vrushali, S., Manasi, P., Alpana, S., & Chinmai, G. (2021). Antimicrobial Activity of Spices Against Gram Positive and Gram Negative Organisms. *African Journal of Biological Sciences*, 3(3), 37-40. doi:10.33472/AFJBS.3.3.2021.37-40
- SENASICA. (abril de 2020). *SENASICA*. Obtenido de Gobierno de México: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/sanidad-vegetal?state=draft>
- Shang, K., Amna, T., Amina, M., Al-Misayeib, N., Al-Deyab, S., & Hwang, I. (2017). Influence of capsaicin on inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide in myoblast cells under in vitro environment. *Pharmacognosy Magazine*, 13(49), 26-32. doi:10.4103/0973-1296.203984
- Sharopov, B., Gulak, K., Philyppov, I., Sotkis, A., & Shuba, Y. (2018). TRPV1 alterations in urinary bladder dysfunction in a rat model of STZ-induced diabetes. *Life Sciences*, 193, 207-213. doi:10.1016/j.lfs.2017.10.042
- Shibata, S. (2022). Thermoreceptor TRPV1 regulates body weight and blood pressure in the absence of thermogenin. *Hypertension Research volume*, 45, 917-919. doi:10.1038/s41440-022-00867-7
- Shin, D., Kwon, Y., & Pyun, B. (2008). *República de Corea Patente n° KR1020090048290*.
- Shuba, Y. (2021). Beyond Neuronal Heat Sensing: Diversity of TRPV1 Heat-Capsaicin Receptor-Channel Functions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 17. doi:10.3389/fncel.2020.612480
- Singh, S., Jarret, R., Russo, V., Majetich, G., Shimkus, J., Bushway, R., & Perkins, B. (2009). Determination of capsinoids by HPLC-DAD in Capsicum Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 675-688. doi:10.1021/jf8040287
- Takahata, Y. (2008). *Japón Patente n° JP2008019193*.

- Tongnuachan, P., & Benjakul, S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*, 79(7), 1231-1249. doi:10.1111/1750-3841.12492
- Tripti, S., & Collen, C. (2008). In-vitro antifungal activity of chilli extracts in combination with *Lactobacillus casei* against common sapstain fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(4), 364-367. doi:10.1016/j.ibiod.2007.10.009
- Tuon, F., Ramos, L., Hansen, S., & Tasca, V. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*, 11(3), 19. doi:10.3390/pathogens11030300
- Vaklová, V., Dúranová, H., Ivanisová, E., Galocicová, L., Godociková, L., Borotová, P., . . . Kacániová, M. (2021). Antioxidant and antimicrobial activities of fruit extracts from different fresh chili peppers. *Acta Scientiarum Plonorum Technologia Alimentaria*, 20(4), 465-472. doi:10.17306/J.AFS.0977.
- Valencia, J., Solano, N., Feregrino, A., Rico, E., Rico, M., Torres, I., . . . Guevera, R. (2022). In vitro and in vivo antimicrobial activity of a synthetic capsaicinoid oleoresin against *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Clavibacter michiganensis* and *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology*, 104, 699-710. doi:https://doi.org/10.1007/s42161-022-01076-4
- Vázquez, F., Miranda, M., Monnforte, M., Gutiérrez, G., Velázquez, C., & Nieto, Y. (2007). Biosynthesis of capsaicinoids, the pungent principle of peppers. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 30(4), 353-360.
- Vázquez, M., Fayos, O., González, A., Espada, E., Ferreriro, M., Palma, M., & Garcés, A. &. (2020). Changes in Capsiate Content in Four Chili Pepper Genotypes (*Capsicum* spp.) at Different Ripening Stages. *AGronomy*, 14. doi:10.3390/agronomy10091337
- Veggi, P., Martinez, J., & Meireles, M. (2012). Fundamentals of Microwave Extraction. En F. C. Chemat, *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds*. (págs. 15-52). Boston: Springer. doi:10.1007/978-1-4614-4830-3_2
- Veloso, J., Prego, C., Varela, M., Caballeira, R., Bernal, A., Merino, F., & Díaz, J. (2013). Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper. *Plant Biology*, 16(1), 177-185. doi:10.1111/j.1438-8677.2012.00717.x
- Wan, H., Yao, Z., Gao, C., Wang, R., Cheng, Y., Ruan, M., . . . Ye, Q. (2023). *Países Bajos Patente n° NL2029710*.
- Wang, J., Tian, W., Wang, S., Wei, W., Wu, D., Wang, H., . . . Li, Y. (2017). Anti-inflammatory and retinal protective effects of capsaicin on ischaemia-induced injuries through the release of endogenous somatostatin. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(7), 803-814. doi:10.1111/1440-1681.12769
- Wang, X., Fu, L., Wang, Y., He, M., Zhao, L., & Liao, X. (2022). Extraction, purification, bioactivity and. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(19), 28. doi:10.1080/10408398.2021.1884840
- Wang, X., Yu, L., Li, F., Zhang, G., Zhou, W., & Jiang, X. (2019). Synthesis of amide derivatives containing capsaicin and their. *Journal of Food Biochemistry*, 43(12), 9. doi:10.1111/jfbc.13061
- Yazawa, S., Watanabe, T., Fushiki, T., Furuhashi, K., Imai, M., Setoguchi, H., & Hashizume, S. (1998). *Japón Patente n° JPH11246478A*.
- Yousefi, M., Rahimi, M., Pourmortazavi, S., Wysokowski, M., Jesionowski, T., Ehrlich, H., & Mirsadeghi, S. (2019). Supercritical fluid extraction of essential oils. *Trends in Analytical Chemistry*, 118, 182-193. doi:10.1016/j.trac.2019.05.038

- Zhu, M., Yu, X., Zheng, Z., Huang, J., Yang, X., & Shi, H. (2019). Capsaicin suppressed activity of prostate cancer stem cells by inhibition of Wnt/ β -catenin pathway. *Phytotherapy Research*, 34(4), 817-824. doi:10.1002/ptr.6563
- Zsombok, A., & Derbenev, A. (2016). TRP Channels as Therapeutic Targets in Diabetes and Obesity. *Pharmaceuticals*, 9(3), 16. doi:10.3390/ph9030050
- Zunun, A., Guevara, T., Jimenez, S., Feregrino, A., & Gautier, F. &. (2017). Effect of foliar application of salicylic acid, hydrogen peroxide and a xyloglucan oligosaccharide on capsiate content and gene expression associated with capsinoids synthesis in *Capsicum annum* L. *Journal of Bioscience*, 245-250. doi:10.1007/s12038-017-9682-9