



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE FRUTOS DE CHILE
HABANERO (*Capsicum chinense* Cv. chocolate) Y SU RELACIÓN CON LOS
PRINCIPALES COMPUESTOS ACTIVOS**

T E S I S

que presenta:

RAFAEL AYALA PONCE

**COMO REQUISITO PARA OBTENER
EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTOR DE TESIS:

**Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas
RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**FEBRERO DE 2018
MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO**



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia. Forma parte del Proyecto de Investigación apoyado por la CIC/UMSNH (2016-2017).

DEDICATORIA

Dedico con mucho cariño este trabajo de tesis a mis queridos padres, quienes me dieron todo su apoyo incondicional para que yo pudiera concluir mi formación profesional; a mis tíos y mis primos que me abrieron las puertas de su hogar; y a todo el resto de mi familia que colaboraron y me acompañaron.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis padres quienes con inmenso esfuerzo me han permitido llegar hacia todas mis metas, ya que son ellos los responsables de que yo goce del apoyo necesario para alcanzarlas. Y ésta es sin duda alguna una de las más importantes de mi vida, culminar mi educación profesional.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Químico Farmacobiología, por darme la oportunidad de formarme como profesional en sus instalaciones. A mis profesores de carrera por compartir sus conocimientos e inculcar el deseo de formación y autosuperación educativa constante.

Agradezco gustosamente al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por la oportunidad de permitir realizar la tesis bajo su dirección, por todo el apoyo y aprendizaje que ello implicó, es un placer y un honor haber sido acreedor de formar parte de su laboratorio.

A mis profesores revisores y miembros del comité sinodal (Dra. María Carmen Bartolomé Camacho, Dr. Alfredo Saavedra Molina, Dra. Berenice Yahuaca Juárez, M.C. Rafael Torres Martínez y M.C. Alejandra Hernández García), muchas gracias, por darme parte de su valioso tiempo, para revisar y rectificar correspondientemente mi tesis.

También quiero agradecer afectuosamente al laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, por permitirme realizar tanto el servicio social como el trabajo de tesis, y a la M.C. Alejandra Hernández García, quien también es responsable de mi crecimiento educativo durante este periodo de trabajo.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mis amigos y compañeros, tanto del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, compañeros de generación e independientes a la carrera, quienes con consejos y sonrisas hicieron más ameno e interesante la travesía para llegar a esta meta.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>ii</i>
RESUMEN	<i>iv</i>
ABSTRACT	<i>v</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. ALIMENTOS FUNCIONALES	4
2.1.1. Antioxidantes de origen vegetal	5
2.1.2. Compuestos antioxidantes en frutos	9
2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LOS FRUTOS DE CHILE (<i>Capsicum spp</i>)	11
2.2.1. Capsaicinoides	13
2.2.2. Compuestos fenólicos y derivados	14
2.2.3. Vitamina C	15
2.2.4. Carotenoides	16
2.3. MÉTODOS DE MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	17
2.3.1. Método de DPPH	17
2.3.2. Método de ABTS	18
2.4. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS POR MÉTODOS COLORIMÉTRICOS	19
2.5. CHILE HABANERO	21
2.5.1. Chile habanero cultivar chocolate	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. OBJETIVO GENERAL	26

	Página
5.1.1. Objetivos específicos	26
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1. MATERIAL BIOLÓGICO	28
7.1.1. Frutos de chile habanero Cv. chocolate	28
7.1.2. Frutos de tres cultivares comerciales de chile habanero	28
7.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS	30
7.3. DETERMINACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	30
7.3.1. Método DPPH	30
7.3.2. Método ABTS	31
7.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS TOTALES	32
7.5. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES	33
7.6. DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES	34
7.7. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO	35
7.8. DETERMINACIÓN DE CAPSAICINA	36
7.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
8.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS DE CHILE HABANERO Cv. CHOCOLATE	39
8.2. CONTENIDO DE COMPUESTOS ACTIVOS DE CHILE HABANERO Cv. CHOCOLATE	42
8.2.1. Ácidos fenólicos totales	42
8.2.2. Flavonoides totales	44
8.2.3. Ácido ascórbico	46
8.2.4. Carotenoides	47
8.2.5. Capsaicina	49

	Página
8.3. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE CHILE HABANERO Cv. CHOCOLATE Y TRES VARIEDADES COMERCIALES (AMARILLO, NARANJA Y ROJO)	51
8.3.1. Actividad DPPH	52
8.3.2. Actividad ABTS	52
9. CONCLUSIONES	55
10. LITERATURA CITADA	56

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Propiedades funcionales de algunas frutas y hortalizas (Servicio de Salud del Departamento de California, de los Estados Unidos, 2002).	6
Cuadro 2. Vitaminas con actividad antioxidante y sus fuentes alimentarias (tomado de Marcia Avello <i>et al.</i> , 2006).	8
Cuadro 3. Ejemplo de variedades de chiles (<i>Capsicum</i> spp) cultivadas y consumidas en México (tomado de Aguirre-Hernández y Muñoz-Ocotero, 2015).	13

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Reacción de óxido-reducción del radical DPPH frente a un agente antioxidante (López <i>et al.</i> , 2007).	17
Figura 2. Reacción utilizada para el método ABTS, donde se indica el cambio de absorbancia o pérdida de color, al reaccionar con un antioxidante.	19
Figura 3. Plantas de chile habanero (<i>C. chinense</i>) en cultivo en invernadero (A) y frutos de chile habanero Cv. chocolate (B).	22
Figura 4. Frutos de chile habanero Cv. chocolate en estadio inmaduro (A), intermedio (B) y maduro (C).	29
Figura 5. Frutos maduros de chile habanero de las variedades comerciales rojo, chocolate, naranja y amarillo.	29
Figura 6. Curva de calibración de ácido gálico $\mu\text{moles/mg}$ peso fresco ($\lambda=725$ nm).	32
Figura 7. Curva de calibración de quercetina $\mu\text{moles/mg}$ peso fresco ($\lambda=415$ nm).	34
Figura 8. Curva de calibración de ácido ascórbico $\mu\text{moles/mg}$ peso fresco ($\lambda=264$ nm).	36
Figura 9. Curva de calibración de capsaicina $\mu\text{moles/mg}$ peso fresco ($\lambda=286$ nm).	37
Figura 10. Porcentajes de actividad antioxidante por DPPH (A) y ABTS (B) en los extractos metanólico, de acetato de etilo y hexánico, de los frutos de estadio inmaduro, intermedio y maduro de chile habanero Cv. chocolate. BHT (Butil Hidroxitolueno).	40
Figura 11. Contenido de ácidos fenólicos totales en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestran los equivalentes en μmoles de ácido gálico/g de peso fresco ($n=3$). $p<0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	43

	Página
Figura 12. Contenido de flavonoides totales en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestran los equivalentes en μ moles equivalentes de quercetina/g de peso fresco (n=3). $p < 0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	45
Figura 13. Contenido de ácido ascórbico en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestra el contenido en μ moles de ácido ascórbico/g de peso fresco (n=3). $p < 0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	47
Figura 14. Contenido de carotenoides totales en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestra el contenido en μ g de carotenoides totales/g de peso fresco (n=3). $p < 0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	49
Figura 15. Contenido de capsaicina en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestra el contenido en μ moles de capsaicina/g de peso fresco (n=3). $p < 0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.	50
Figura 16. Porcentajes de actividad antioxidante por DPPH (A) y ABTS (B) en los extractos metanólico, de acetato de etilo y hexánico, de los frutos maduros de chile habanero Cv. chocolate y las variedades comerciales amarillo, naranja y rojo. BHT (Butil Hidroxitolueno).	53

RAFAEL AYALA PONCE. 2017. Determinación de la actividad antioxidante de frutos de chile habanero (*Capsicum chinense* Cv. chocolate) y su relación con los principales compuestos activos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México (Director de Tesis. Dr. Rafael Salgado Garciglia), 68 p.

RESUMEN

México cuenta con una gran variedad de frutos comestibles a los que se les atribuyen propiedades antioxidantes, un ejemplo de éstos, son los chiles, frutos de las plantas que pertenecen al género *Capsicum*, que presenta diferentes especies y una gran diversidad de variedades o cultivares, entre ellos al chile habanero (*Capsicum chinense*), que tiene como principal característica el ser uno de los más picosos del mundo. La capacidad antioxidante se ha relacionado con el tipo de compuestos bioactivos presentes, con la etapa de madurez de los frutos y con los diversos genotipos. Para estudiar esta relación, en la presente investigación se evaluó la actividad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS de diversos extractos (metanólico, acetato de etilo y hexánico) de frutos de Chile habanero Cv. chocolate en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) y se correlacionó con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina, determinados por métodos espectrofotométricos. Los resultados mostraron desde una moderada hasta una alta actividad antioxidante en los frutos, la cual dependió del estadio, del tipo de extracto y según el método de determinación empleado. Con el método DPPH se observó la mayor actividad en los frutos en los tres estadios (inmaduro, intermedio y maduro) con 91.63%, 81.29% y 87.3%, respectivamente; la actividad antioxidante más alta determinada por ABTS también fue en los extractos metanólicos, observando un 58.35% y 60.9% en los frutos de los estadios intermedio y maduro, respectivamente. Al compararse los porcentajes de la actividad antioxidante de frutos maduros de chile habanero Cv. chocolate con los de los cultivares comerciales amarillo, naranja y rojo los extractos metanólico y de acetato de etilo fueron similares entre ellos (84.03%-90.3%), con un menor porcentaje en frutos del cultivar rojo (66.64%), determinado por DPPH. Los porcentajes de actividad antioxidante por ABTS estuvieron en un intervalo de 56.45%-60.93% en un orden de rojo > chocolate > amarillo > naranja. En conclusión, se determinó que la actividad antioxidante del extracto metanólico de fruto de chile habanero Cv. chocolate fue dependiente principalmente del contenido de ácidos fenólicos y flavonoides. En los otros extractos, esta actividad se relaciona mayormente con el contenido de ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina.

Palabras clave: Antioxidantes, *Capsicum chinense*, chile habanero, frutos, compuestos bioactivos.

RAFAEL AYALA PONCE. 2017. Antioxidant activity determination of *Capsicum chinense* Cv. chocolate (habanero chili pepper) and its relationship with the main active compounds. B.S. Thesis, Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México (Thesis Director, Dr. Rafael Salgado Garciglia), 68 p.

ABSTRACT

Mexico has a wide variety of edible fruits which are attributed antioxidant properties, an example of these are chilies, fruits of plants belonging to the genus *Capsicum*, presents a great diversity of varieties and different species or cultivars, including habanero chili pepper (*Capsicum chinense*), that has as main characteristic as one of the hottest in the world. The antioxidant capacity has been associated with the type of bioactive compounds present, the fruits maturity stage and different genotypes. To study this relationship, this research evaluated the antioxidant capacity by DPPH and ABTS methods from different extracts (methanol, ethyl acetate and hexane) of chili pepper habanero Cv. chocolate fruit at three stages of maturity (immature, intermediate and mature) and correlated with the content of phenolic acids, flavonoids, carotenoids, ascorbic acid and capsaicin, determined by spectrophotometric methods. The results showed a moderate to high antioxidant capacity in the fruits, which depended on the maturity etape, the type of summary and according to the method of determination used. With the method DPPH was observed increased activity in fruits in three stages of maturity (immature, intermediate and mature) with 91.63%, 81.29% and 87.3%, respectively; the highest antioxidant activity determined by ABTS was also in the methanol extracts, noting a 58.35% and 60.9% in the fruits of the intermediate and mature stages, respectively. When the percentages of the antioxidant activity were comparing of mature fruits of habanero Cv. chocolate with the of commercial cultivars Yellow, Orange and Red, methanolic extracts and ethyl acetate were similar among them (84.03-90.3%), with a lower percentage in the cultivar red fruits (66.64%), as determined by DPPH. Antioxidant activity by ABTS percentages were in the range of 56.45%-60.93% on an order of red > chocolate > yellow > orange. In conclusion, the antioxidant activity of methanol extract of chili pepper habanero Cv. chocolate fruits was dependent mainly on the content of phenolic acids and flavonoids. In other extracts, this activity is mostly related to the content of ascorbic acid, carotenoids and capsaicin.

Keywords: Antioxidants, *Capsicum chinense*, habanero chili pepper, fruits, bioactive compounds.

1. INTRODUCCIÓN

Un grupo de compuestos bioactivos benéficos encontrados en los alimentos son los antioxidantes, los que tienen un gran beneficio para la salud ya que disminuyen el estrés oxidante, neutralizando o capturando los radicales libres. A esta actividad antioxidante se le atribuyen efectos positivos en enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, la hipertensión y el cáncer (Moskovitz *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007). Algunos extractos vegetales con una alta actividad antioxidante han mostrado ejercer fuerte actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos (Li *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008).

Entre los compuestos antioxidantes, los más representativos son los ácidos simples como el ácido cítrico y el ácido ascórbico (vitamina C) y los del tipo fenólico, dentro de los que se encuentran los ácidos fenólicos y los polifenoles como los taninos y los flavonoides, sin dejar de mencionar a otro tipo de compuestos como los carotenoides (Porrás-Loiza y López-Malo, 2009). Muchos de éstos se asocian a frutos comestibles como jitomate, chile, berenjena, guayaba, cítricos, uva y principalmente a las fresas, cerezas, zarzamoras, entre otros.

Entre los metabolitos secundarios, los compuestos fenólicos (como fenoles y flavonoides) se caracterizan por tener actividad antimicrobiana. El efecto de estos compuestos se ha observado principalmente en hongos causantes de problemas de salud en humanos, como *Candida* spp. Por otra parte, los carotenoides como la capsantina y la capsorrubina, que son componentes claves asociados a la coloración roja del género *Capsicum*, pueden presentar efecto antibacteriano y antifúngico (Brito-Argáez *et al.*, 2009).

México cuenta con una gran variedad de frutos comestibles a los que se les atribuyen estas propiedades, un ejemplo de éstos, son los chiles, frutos de las plantas que pertenecen al género *Capsicum*, que presenta diferentes especies y una gran diversidad de variedades o cultivares, entre ellos al chile habanero (*Capsicum*

chinense), que tiene como principal característica el ser uno de los más picosos del mundo (Latournerie *et al.*, 2002). En 1912, el químico Wilbur Scoville desarrolló la escala Scoville que mide el grado de picor de un pimiento. Scoville asignó un valor de cero a los pimientos dulces, que no pican (Caterina *et al.*, 1997). En el otro extremo de la escala ubicó a la capsaicina a la que le dio un valor de dieciséis millones como la sustancia más picante (Reyes-Escogido *et al.*, 2011).

Los frutos de *C. chinense* presentan propiedades antioxidantes, proporcionadas por compuestos como el ácido clorogénico y el ácido cafeico, a los que también se le atribuyen un efecto citotóxico por inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon (Jayaprakasam *et al.*, 2006).

Otros compuestos involucrados en la actividad antioxidante son los capsaicinoides como la capsaicina y la D-hidrocapsaicina, que son considerados como antioxidantes y además son los responsables de la pungencia del chile. Por otra parte, posee propiedades antimicrobianas, las que se explican por la presencia de los capsaicinoides, aunque no son los únicos compuestos responsables de esta actividad, ya que los del tipo fenólico y los carotenoides también se reportan como antimicrobianos (Cichewicz y Thorpe, 1996; Pietarinen *et al.*, 2006).

Estrada *et al.* (2000), además reportan que la cantidad de compuestos fenólicos y capsaicinoides cambian durante la maduración de los frutos de *Capsicum* en un orden inverso, en frutos maduros hay un incremento de los capsaicinoides pero con una disminución del contenido de fenoles totales.

En los frutos de chile se han cuantificado diversos compuestos como fenoles, flavonoides, ácido ascórbico, capsaicina y carotenos, utilizando desde procedimientos simples cualitativos hasta muy sofisticados que identifican y cuantifican cada uno de los metabolitos de interés. Dentro de éstos, los métodos de análisis colorimétricos apoyados por técnicas de espectrofotometría son prácticos y

económicos, son utilizados para cuantificar el contenido total de cada uno de ellos Harborne, 1998; Makkar, 1999).

Aunque se ha determinado la actividad antioxidante de diferentes especies de chile, la relación de esta propiedad con el tipo de compuestos bioactivos, así como la madurez de los frutos, no se ha documentado para las diferentes variedades de chile habanero (*C. chinense*), en particular para el chile habanero chocolate (*Capsicum chinense* Jacquin Cv. chocolate), objetivo principal de la presente investigación.

Para estudiar la relación entre la actividad antioxidante y la madurez de los frutos del chile habanero Cv. chocolate con el contenido de diferentes principios activos como los ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenos y capsaicina, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antioxidante de diversos extractos de frutos de chile habanero Cv. chocolate en tres estadios de maduración y correlacionar con el contenido de los compuestos bioactivos, los que fueron cuantificados por métodos espectrofotométricos.

2. ANTECEDENTES

2.1. ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales son aquellos que proveen beneficios a la salud más allá de su función nutricional, por lo que se les denomina también alimentos saludables. El término alimento funcional fue acuñado en Japón en la década de 1980 y tal concepto se refiere a aquellos alimentos que contienen compuestos con funciones saludables. Los alimentos son considerados funcionales, si además de su efecto nutricional, favorece una o más funciones fisiológicas en el cuerpo humano, mejorando la condición física general y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. Un aspecto esencial es que la cantidad y la forma de consumo debe ser la habitual en la dieta, por lo que el alimento funcional es ante todo un alimento y no un fármaco (Bigliardi *et al.*, 2013).

Este tipo de alimentos pueden ser los alimentos naturales, a los que se le han adicionado, removido o modificado algún componente o a los que se les ha modificado la biodisponibilidad de alguno de ellos. Un claro ejemplo de alimento funcional es la leche deslactosada en la cual la lactosa ha sido removida mediante su conversión enzimática a glucosa y galactosa permitiendo el consumo de leche a personas intolerantes a lactosa (Siró *et al.*, 2008); así como también los tomates cuyo contenido en licopeno reduce el riesgo del cáncer de próstata; muchos pescados en los que su contenido en ácidos omega-3 reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares; y las frutas y verduras, cuyos flavonoides neutralizan los radicales libres oxidantes (Pérez, 2006).

No obstante, los alimentos funcionales pueden contribuir a la prevención y tratamiento de enfermedades denominándoseles nutraceuticos, que son nutrientes asociados con deficiencias en la dieta, su consumo se ha relacionado con la prevención y/o tratamiento, en algunos casos de ciertas enfermedades y como complemento de fármacos. Los alimentos nutraceuticos previenen enfermedades

crónicas degenerativas, como las de origen cardiovascular, diabetes, diferentes tipos de cáncer y las relacionadas con el sistema inmune (Pérez, 2006).

Entre los alimentos considerados como funcionales por sus beneficios potenciales en nutrición y salud, están la cebolla y el ajo, utilizados como condimentos o especias que aportan flavonoides, compuestos polifenólicos con propiedades antioxidantes y compuestos organoazufrados, cuyo consumo se asocia con la disminución de riesgos de enfermedad cardiovascular y con efectos anticancerígenos (Nagournay, 1998).

Otros ejemplos son el frijol y el yogurt, el primero presenta un alto contenido de proteínas, almidones de velocidad de digestión intermedia, un alto contenido de fibra dietética, fitatos, taninos y oligosacáridos no digeribles, con beneficios a la salud comprobados científicamente; y el yogur, un alimento con buen valor nutritivo por su alto aporte de calcio, proteínas de buena calidad, alto contenido de riboflavina y aporte de probióticos, que le otorgan el sello de alimento funcional (Guzmán-Maldonado *et al.*, 1998). El chocolate, el aguacate y diversos vegetales como el tomate, la zanahoria, el brócoli y las frutillas como fresa, zarzamora y arándano, son considerados funcionales por los diversos compuestos que contienen.

En el Cuadro 1 se muestran algunos grupos de frutos y hortalizas con propiedades funcionales, a los que se les ha encontrado un efecto positivo entre el consumo y el reforzamiento del sistema inmunológico, así como por sus beneficios en diferentes enfermedades crónico degenerativas como la diabetes, cardiovasculares y cáncer. Mayormente los compuestos responsables poseen una alta actividad antioxidante.

2.1.1. Antioxidantes de origen vegetal

Los antioxidantes son especies moleculares activadas, dotadas de un electrón desapareado en un nivel energético superior lo que les da una alta reactividad (Morrison *et al.*, 1990). Cuando la producción de sustancias altamente reactivas

supera los mecanismos antioxidantes pueden ocasionar numerosas enfermedades como cáncer, diabetes y alteraciones cardiovasculares (Beckman *et al.*, 1990). Los antioxidantes en las plantas cumplen importantes funciones de protección y estabilización frente a las especies reactivas de oxígeno (Tun *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Propiedades funcionales de algunas frutas y hortalizas (Servicio de Salud del Departamento de California, de los Estados Unidos, 2002).

GRUPO	PROPIEDADES FUNCIONALES
Frutas Cítricas	Reducen el riesgo de cáncer causado por carcinógenos químicos y la agregación de plaquetas (formación de coágulos), factor que propicia los ataques cardiacos y las embolias. Previene la pérdida de la vista.
Melones y bayas (además de los melones y múltiples bayas, dentro de este grupo están incluidos el kiwi, pepino, calabacita y calabaza).	Refuerzan el sistema inmunológico y reducen el colesterol en sangre.
Uvas (especialmente las variedades rojas y púrpura).	Ayudan a resistir los efectos de los carcinógenos, protegen de alteraciones al ADN y previenen la agregación de plaquetas.
Familia Cruciferae (incluye brócoli, col, coliflor, coles de Bruselas, berza o col rizada, colinabo, berro y hoja de mostaza).	Protege de alteraciones al ADN, reducen el riesgo de algunos tipos de cáncer y refuerzan la habilidad del organismo para combatir el cáncer.
Hortalizas y Frutas Anaranjadas o de Color Amarillo intenso. Hortalizas de Hoja Verde.	Previenen cáncer, arteriosclerosis, coágulos y pérdida de la vista.
Jitomate y Berenjena	Evitan la formación de carcinógenos y protegen a las células de su acción. Destruyen especies reactivas como los radicales libres.
Cebolla, Ajo, Poro y Cebollines	Ayudan a que el organismo produzca menos colesterol, destruyen carcinógenos, controlan células cancerosas y eliminan otros químicos tóxicos.
Otras Frutas y Hortalizas (alcachofa, durazno, nectarina, ciruela, cereza, pera, manzana, mango, plátano y aguacate).	Proporcionan folato, potasio y otros nutrientes que reducen el riesgo de cáncer y otras enfermedades del corazón. Las grasas monoinsaturadas del aguacate, aceite de oliva y nueces pueden proteger de afecciones cardiovasculares.

La actividad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres (Thornalley y Vasak, 1985; Greenwald, 1990; Palamanda y Kehrer, 1992). Estos mecanismos son adecuados para la corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con actividad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen principalmente, la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides (Kinsella *et al.*, 1993).

El ácido ascórbico o vitamina C, es una importante vitamina hidrosoluble presente en diferentes frutos como los cítricos, además de ser un importante antioxidante actúa como cofactor de enzimas que componen el metabolismo humano (Wahyuni *et al.*, 2013). También previene enfermedades crónicas y relacionadas con el envejecimiento, incluyendo padecimientos del corazón, colesterol alto, cataratas, presión alta y cáncer (Segura *et al.*, 2013) (Cuadro 2).

Otros antioxidantes con altos beneficios a la salud es la vitamina E, que se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, cacahuete y algunas verduras y frutas; y los carotenoides, compuestos coloreados tales como los betacarotenos, presentes en verduras y frutas amarillas y anaranjadas, y en verduras verdes oscuras. A este grupo también pertenecen los licopenos en el tomate, las luteínas y xantinas en verduras de hojas verdes como el brócoli y las betacriptoxantinas en frutas cítricas (Greenwald, 1990; Palamanda y Kehrer, 1992) (Cuadro 2).

Los polifenoles además de tener una acción antioxidante son también anticoagulantes, antimicrobianos, inmunoestimulantes y reguladores de la presión arterial y de la glucemia (Palencia, 1999). Estos compuestos neutralizan los radicales libres mediante diversos mecanismos entre los que destaca la producción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa entre otras, para prevenir el daño oxidante y así reducir el riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, entre otras (López,

2003). Un consumo elevado de compuestos fenólicos se ha asociado con efectos positivos para la salud, sobre todo por sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos exhiben un rango amplio de propiedades fisiológicas, como antialérgicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, cardioprotectores, vasodilatadores y anticancerígenos (Naczki *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Vitaminas con actividad antioxidante y sus fuentes alimentarias (tomado de Marcia Avello *et al.*, 2006).

VITAMINA	FUENTE ALIMENTARIA
Vitamina E	<p>Fuentes más importantes: Aceites vegetales, aceites de semillas prensadas en frío, germen de trigo y de maíz, almendras, avellanas, girasol, frijol de soya, nuez y cacahuate.</p> <p>Otras fuentes significativas: Papas, pimentón, aguacate, apio, col y algunas frutas.</p>
Vitamina C	<p>Frutas: Limón, lima, naranja, guayaba, mango, kiwi, fresa, papaya, mora y piña.</p> <p>Verduras: Tomate, verduras de hojas verdes (espinacas, perejil, hojas de rábano), col, coliflor, brócoli, pimentón y lechuga.</p>
Carotenoides	<p>Betacaroteno: Verduras y frutas amarillas y anaranjadas, y verduras verde oscuro.</p> <p>Alfacaroteno: Zanahoria</p> <p>Licopeno: Tomate</p> <p>Luteína y zexantina: Verduras de hoja verde oscuro, brócoli</p>

Dichos compuestos pueden tener un mecanismo de acción complementario, como la estimulación del sistema inmune, reducción de la agregación plaquetaria, modulación de la síntesis de colesterol y del metabolismo hormonal, reducción de la presión sanguínea, efectos antioxidantes, antibacterianos y antivirales (USDA, 1999; Fernández *et al.*, 2004).

Una de las fuentes más importantes de antioxidantes son las hierbas y especias (Yanishlieva *et al.*, 2006), por su contenido de terpenos (Sacchetti *et al.* 2005) y otros compuestos pueden causar un efecto sinérgico con los antioxidantes, como los ácidos fenólicos y flavonoides. Srinivasan (2005) reporta que las especias y las hierbas, así como las plantas aromáticas y medicinales, contienen principios activos con actividad antioxidante y que tienen efectos fisiológicos para los seres humanos (influencia hipolipidémica, potencial antidiabético, efecto antiinflamatorio, acción digestiva estimulante y antimutagénico).

Además, existen diversas fuentes de antioxidantes naturales, entre las que se encuentran las frutas y verduras, así como sus productos de procesado (Robards *et al.*, 1999; Collins y Harrington, 2003). También todos los granos (Decker *et al.*, 2002) y cereales (Shahidi y Neczk, 1995), son considerados como fuente de antioxidantes. Entre otros productos de origen vegetal con actividad antioxidante, el aceite de oliva es un clásico ejemplo (Uccella, 2001) por contener ácidos grasos poliinsaturados y vitamina E.

2.1.2. Compuestos antioxidantes en frutos

El consumo de frutas ha sido asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas. La protección que las frutas brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, han sido atribuidas a su alto contenido de varios antioxidantes (Beckman *et al.*, 1990; Tun *et al.*, 2001).

Todas las frutas frescas son fuente de vitamina C (ácido ascórbico), pero algunas de ellas son particularmente ricas como la guayaba (*Psidium guajava*) y el arándano (*Vaccinium macrocarpon*). Los cítricos como la naranja, toronja, contienen vitamina C (García-Bacallao *et al.*, 2001).

Las vitaminas A y E, también las contienen algunos frutos, aunque la primera generalmente solo se obtiene por sus precursores los β -carotenos. La zanahoria (*Daucus sativa*), la calabaza (*Curcubita maxima*) y otros frutos coloreados contienen β -carotenos, precursores de la vitamina A (García-Bacallao *et al.*, 2001). Entre las plantas que son fuente de estas vitaminas están la *Musa paradisiaca* (plátano burro), que contiene una mezcla compleja de polihidroxifenoles y taninos que inhiben la peroxidación lipídica en el modelo de homogeneizado de cerebro de ratas (García-Bacallao *et al.*, 2001).

Las principales funciones de los compuestos fenólicos en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a diferentes tipos de estrés causados por agentes abióticos (radiación, sequía, sustancias químicas) y bióticos (ataque por patógenos), siendo secretados como mecanismo de defensa (Cohen y Kennedy, 2010). En general son sintetizados por la vía del ácido shikímico o la vía del ácido malónico.

Entre los compuestos fenólicos naturales se encuentran los fenoles monocíclicos, o ácidos fenólicos, los flavonoides, los fenilpropanoides, las quinonas fenólicas y las coumarinas. Los compuestos fenólicos están presentes en una gran diversidad de chiles, tanto en formas libres como unidas. Aquellos que presentan enlaces tipo β -glucósidos, pueden sobrevivir la digestión estomacal, logrando alcanzar el colon, lugar donde son liberados y ejercen su efecto benéfico (Oboh y Rocha, 2008). Los que contribuyen a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, así como actividad contra alergias, inflamación, hipertensión, artritis, entre otros, se encuentra el resveratrol, ácido gálico y quercetina (Yao *et al.*, 2007).

El consumo regular de vino tinto y el jugo de uva con un alto contenido de flavonoides, ayuda a disminuir el riesgo de enfermedades como aterosclerosis coronaria y esto es atribuida a sus propiedades antioxidantes. La uva negra contiene resveratrol para protegerse así misma de hongos, también contiene altos niveles de

otros antioxidantes que evitan el deterioro del fruto. El resveratrol y otros antioxidantes evitan el daño producido por el colesterol en las arterias (Demrow y Slane, 1994).

Al β -caroteno, se le encuentra abundantemente en frutas como la naranja (*Citrus sinensis*), el mango (*Mangifera indica*) y las variedades amarillas de papaya (*Carica papaya*) como la 'Cera' y la 'Maradol Amarilla'; mayormente se le relaciona con el color de la zanahoria (*Daucus carota*). Sin embargo, otro caroteno abundante en frutos es el licopeno, con una alta actividad antioxidante y anticancerígeno. La fuente más importante de licopeno es el jitomate (*Solanum lycopersicum*) pero se le encuentra también en otros productos hortifrutícolas como la sandía (*Citrullus lanatus*), el p \acute rsimo (*Diospyrus kaki*), la calabaza (*Cucurbita pepo*) y las variedades rojas de papaya, toronja (*Citrus paradisi*), pomelo (*Citrus pomelo*), chile (*Capsicum annuum* var. *annuum*) y berenjena (*Solanum melongena*) (Nguyen y Schwartz, 1999; Pelayo-Zaldívar, 2003).

2.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LOS FRUTOS DE CHILE (*Capsicum* spp)

Los chiles, frutos de *Capsicum* spp., son ampliamente consumidos en el mundo en forma de alimentos y como aditivos en la industria alimentaria. Las especies de *Capsicum* han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento de diversas enfermedades o malestares como artritis, reumatismo, malestares estomacales, problemas dermatológicos, entre otras. Forman parte esencial en la medicina tradicional de diversas regiones como la India, América y China (Rodríguez, 2013).

Para México, las especies vegetales del género *Capsicum* han sido caracterizados por su alto consumo, que en conjunto se les considera una excelente fuente de compuestos bioactivos como vitaminas, polisacáridos, saponinas, capsaicinoides, carotenos, compuestos fenólicos y terpenoides, que les confieren diversos tipos de color, sabor y aroma (Menichini *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Por otra parte, se menciona la importancia del chiltepín (*Capsicum annuum* var.

glabriusculum), ya que en estudios recientes se observó una relación entre el contenido de giberelinas con un aumento del contenido de compuestos bioactivos como saponinas, compuestos fenólicos y carotenoides presentes en sus frutos. Adicionalmente factores como la variedad, el tipo de cultivar, el estado de madurez, las condiciones de cultivo y la manipulación pos-cosecha pueden afectar este contenido de compuestos y por lo tanto la actividad biológica en los frutos de las especies de *Capsicum* (Rodríguez, 2013).

Las propiedades medicinales de las especies de *Capsicum* están relacionadas con la presencia de los capsaicinoides, compuestos fenólicos y carotenoides, entre otros, presentes en los frutos. Diversos estudios han demostrado que especies de *Capsicum* contienen también las vitaminas C, A y E, con propiedades antioxidantes. Estos compuestos están presentes en diferentes especies, variedades o cultivares de chile, ejemplo de ellos son el chile serrano, poblano y jalapeño, los que varían según los estadios de maduración (Oboh *et al.*, 2008; Henao *et al.*, 2009).

Todos los chiles son del género *Capsicum* de la familia Solanaceae. El género *Capsicum* se conforma por 31 especies, pero sólo cinco han sido domesticadas: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annum*. Esta última es la más importante, pues agrupa la mayor diversidad de chiles, cultivados o silvestres. El fruto, en donde se encuentran las semillas, es una baya hueca carnosa o semi-cartilaginosa, puede alcanzar distintos tamaños, desde poco menos de 1 cm hasta 30 cm de largo, y su forma va de lo redondo a lo alargado, en colores que oscilan de distintos tonos de amarillo y verde en estado inmaduro, a rojo y hasta café al madurar (Aguirre-Hernández y Muñoz-Ocotero, 2015). En el Cuadro 3 se especifican algunos de estos tipos de chile de las cuatro especies cultivadas en México.

El consumo de chile se debe principalmente a su sabor pungente o picante, causado por la presencia de capsaicinoides. Las diferentes especies de *Capsicum* pueden variar en grado de pungencia, lo que se relaciona con la capacidad de acumular capsaicinoides, que se mide en unidades Scoville (SHU). Los pimientos morrones

tienen 0 unidades mientras que los chiles habaneros tienen entre 100,000 a 350,000 unidades. El chile habanero (*Capsicum chinense*) es considerado el de mayor pungencia, sin embargo, algunas variedades de *Capsicum* pueden alcanzar niveles similares, como es el caso del Chiltepín (Montoya-Ballesteros *et al.* 2010).

Cuadro 3. Ejemplo de variedades de chiles (*Capsicum* spp.) cultivadas y consumidas en México.

ESPECIE	VARIEDADES/CULTIVARES/HÍBRIDOS
<i>Capsicum annuum</i>	Jalapeño, Serrano, Poblano, Chile de árbol, Chilaca, Mirasol, Güero, Pimiento morrón, Piquín.
<i>Capsicum chinense</i>	Habanero
<i>Capsicum frutescens</i>	Tabasco, Ozuluamero o Chilpaya, Amashito, Chilpayita.
<i>Capsicum pubescens</i>	Manzano, Perón.

México es el país de mayor producción de chile en el mundo, alrededor del 90% de chile que se consume a nivel mundial es de origen mexicano. Otros países productores son China, Indonesia, Turquía, España, Estados Unidos y Nigeria (SAGARPA, 2012).

2.2.1. Capsaicinoides

Los principales capsaicinoides son capsaicina, dihidrocapsaicina, norcapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina, los cuales se diferencian por la longitud de sus cadenas alifáticas (Lambert y Sum, 2006). De estos

compuestos, la capsaicina (N-((4-hidroxi-3-metoxifenil)metil)-8-metil(6-nonenamida) y la dihidrocapsaicina (N-((4-hidroxi-3-metoxi-fenil)metil)-8-metilnonanamida), aportan más de 90% del total de la pungencia. Los capsaicinoides se sintetizan y acumulan en el tejido de la placenta. Su estructura química consiste en un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso. La porción fenólica es la vainillilamina, que se forma a partir de la fenilalanina por medio de la ruta de los fenilpropanoides; el ácido graso se forma a partir de aminoácidos de cadena lateral ramificada, ya sea valina o leucina (Manirakiza *et al.* 2003).

Los capsaicinoides presentan diferentes actividades biológicas con efectos benéficos para la salud humana, entre las que destacan la protección del sistema cardiovascular (Govindarajan y Sathyanarayana, 1991), la capacidad anti-inflamatoria (Anogianaki *et al.*, 2006) y el efecto anticancerígeno (Choi *et al.*, 2006; Reyes-Escogido *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha reportado la actividad antioxidante de los capsaicinoides en diferentes tipos de chile, las evidencias experimentales reportan que esta actividad antioxidante se debe a que actúan como donadores de hidrógeno (Materska y Perucka, 2005; Guil-Guerrero *et al.*, 2006; Álvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

2.2.2. Compuestos fenólicos y derivados

El contenido de compuestos como derivados hidroxicinámicos, glucósidos de quercetina y luteolina, se encuentran en mayor cantidad en los frutos inmaduros de chile, por lo que la disminución de los compuestos fenólicos pudiera ser debido también a la cantidad de semillas encontradas en cada especie, ya que han probado ser ricas en los compuestos anteriormente mencionados, así como en compuestos antioxidantes. Estos compuestos también contribuyen al soporte celular, si hubiera una infección en el fruto, los compuestos fenólicos incrementan (Oboh *et al.*, 2008; Henao *et al.*, 2009).

Estudios recientes realizados por Materska y Perucka (2005) en el pericarpio de cuatro cultivares de *C. annuum*, encontraron que la fracción de flavonoides y ácidos fenólicos presentes en estos cultivares, participan de manera importante en la actividad antioxidante de los frutos. No obstante, es importante considerar que los efectos de estos compuestos pueden variar de acuerdo al tipo de cultivar, estado de madurez, condiciones de cultivo y manipulación poscosecha, afectando la actividad antioxidante y antimicrobiana presente en los frutos (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

Trabajos realizados por Butcher *et al.* (2012), demostraron la presencia de una variación en el contenido de flavonoides y capsaicinoides en frutos de seis cultivares de chile habanero al crecerlos en ambientes específicos. Esto abre la posibilidad de emplear las variaciones de estos compuestos en programas de mejoramiento de estos cultivares de chile habanero u otras especies de *Capsicum*.

2.2.3. Vitamina C

Segura *et al.* (2013), estudiaron siete genotipos de chile habanero y determinaron que éstos contienen ácido ascórbico más alto que muchas verduras: por ejemplo, el consumo de 100 g de peso fresco de estos chiles proporciona 100% - 200% de la asignación dietética recomendada de ácido ascórbico. El contenido de ácido ascórbico en los siete genotipos de chile habanero estudiados varió de 187.24 a 281.73 mg/100 g de muestra. El alto contenido de ácido ascórbico de los frutos de *Capsicum* es una de sus principales cualidades nutricionales. Factores como el genotipo, el medio ambiente y la madurez del fruto afectan los niveles de ácido ascórbico y otros compuestos nutricionales (Segura *et al.*, 2013).

También se han reportado niveles altos de ácido ascórbico para frutos de chile como el Serrano en conserva (584 mg de ácido ascórbico/100 g de peso seco), Serrano fresco (1385 mg de ácido ascórbico/100 g de peso seco), Jalapeño en conserva (794 mg de ácido ascórbico/100 g de peso seco), Chipotle (694 mg de ácido ascórbico/100

g de peso seco) y pimientos Jalapeño frescos de tres regiones de cultivo en el estado de Chihuahua, México (Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

2.2.4. Carotenoides

Los carotenoides de mayor importancia en las plantas son el β -caroteno, la luteína y la xantofila. De las especies de carotenos asociadas a los chiles (*Capsicum* spp.) se encuentran tanto el α - como el β -caroteno como precursores de la vitamina A, además de la violaxantina, capsantina, capsorubina, y capsantina 5,6-epóxido (Wall *et al.*, 2001).

Hervert-Hernández *et al.* (2010) encontraron que durante la digestión *in vitro* de frutos de chile de árbol, chipotle, morita y guajillo, la presencia de β -caroteno y zeaxantina, representan los principales compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes. Similares resultados fueron registrados por Collera-Zuñiga *et al.* (2005), quienes al evaluar la composición de carotenoides de tres variedades comerciales de *C. annuum* (ancho, guajillo y mulato) encontraron que los principales carotenoides fueron β -caroteno y β -cryptoxantina, los cuales son precursores de la vitamina A.

Estudios recientes muestran la presencia de una variación existente entre *Capsicum chinense*, *C. annuum*, y *C. frutescens*, relacionada a la coloración roja, los que presentan los más altos niveles de β -caroteno. En contraste, los cultivares Serrano, Tabasco y Jalapeño presentan altos valores de capsantina y ausencia de β -caroteno (Giuffrida *et al.*, 2013). Esto, es indicativo de que la especie de *Capsicum* influye sobre la presencia y concentración de un compuesto bioactivo específico en los frutos de *Capsicum*.

2.3. MÉTODOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *in vitro*

Los métodos de evaluación de moléculas antioxidantes pueden ser directos e indirectos. Con estos últimos se estudia la capacidad de los antioxidantes para atrapar algunos radicales libres, no asociados con la degradación real oxidativa, entre los más utilizados por ser prácticos y precisos, está el uso de compuestos como indicadores del estado de óxido-reducción como el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y el ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (Roginsky y Lissi, 2005, Miguel, 2010).

2.3.1. Método de DPPH

Este método se basa en que el radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Esta medición permite observar una primera fase rápida, seguida posteriormente por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta. Una solución de DPPH presenta color violeta, y mediante la reacción con el agente antioxidante, ésta se torna de color amarillo (Figura 1).

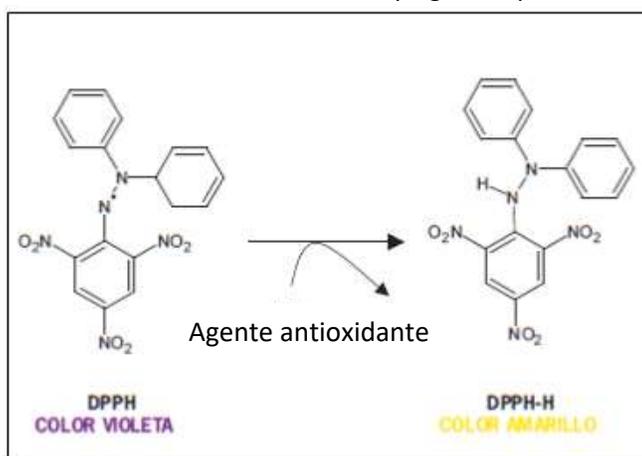


Figura 1. Reacción de óxido-reducción del radical DPPH frente a un agente antioxidante (López *et al.*, 2007).

La reacción antes descrita, entre el DPPH y un antioxidante, se representa de la siguiente manera:



Por las condiciones de ensayo en que se mide la actividad antioxidante puede describirse por la siguiente ecuación:

$$\frac{d[\text{DPPH}]}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{DPPH}]_t$$

La determinación de la concentración de compuestos antioxidantes utilizando la técnica del DPPH ha sido descrita hace más de cincuenta años, pero se ha observado que los autores no utilizan la misma concentración del DPPH, en los medios de reacción y ello no permite realizar una evaluación precisa, considerando especialmente que los resultados experimentales se expresan como el valor IC₅₀, es decir, la concentración de la muestra problema que produce una inhibición del 50% del radical libre DPPH. En este sentido, puede considerarse que el valor IC₅₀ es dependiente de la concentración del DPPH, así como, de la naturaleza del compuesto antioxidante (Nenadis *et al.*, 2007).

2.3.2. Método de ABTS

El método de ABTS involucra un compuesto coloreado de naturaleza radical (radical ABTS·+), con el fin de simular especies reactivas de oxígeno y nitrógeno; de esta manera la presencia del antioxidante conduce a la desaparición de este radical coloreado (Figura 2). El radical ABTS·+ debe ser generado mediante reacciones químicas (dióxido de manganeso, persulfato de sodio) o enzimáticos (peroxidasa, mioglobina). Dicho radical tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y orgánicos. El radical ABTS·+ es el más indicado para evaluar la actividad antioxidante de compuestos coloreados, como en el caso de antocianinas o derivados fenólicos, por presentar una absorbencia máxima próxima a la región infrarroja (754 nm), reduciendo así las posibilidades de interferencia de compuestos coloreados que absorben en la región visible o de compuestos resultantes de

reacciones secundarias. El radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, ha sido validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente a otros métodos de evaluación de actividad antioxidante (Kuskoski *et al.*, 2004).

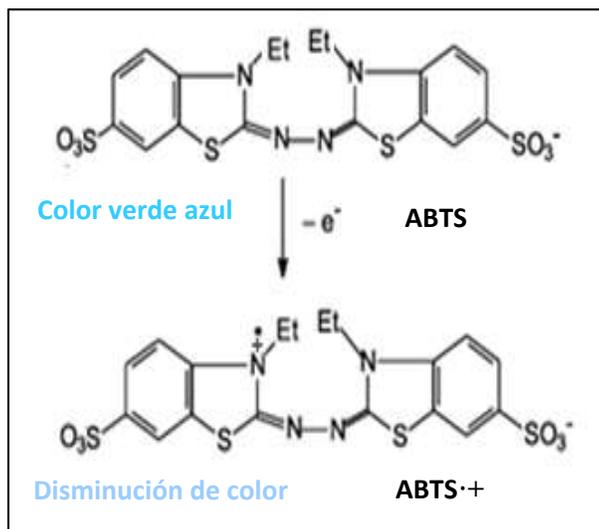


Figura 2. Reacción utilizada para el método ABTS, donde se indica el cambio de absorbancia o pérdida de color, al reaccionar con un antioxidante.

2.4. CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS POR MÉTODOS COLORIMÉTRICOS

Existen numerosos métodos para cuantificar el contenido de los metabolitos secundarios de interés en la nutrición, en diferentes partes de las plantas, en particular de los frutos. No obstante, cada técnica analítica presenta limitaciones intrínsecas, por lo que no son aplicables de manera general en todos los casos. El grupo de metabolitos que más se ha cuantificado en el campo de la nutrición animal son los compuestos fenólicos, como producto de su amplia distribución en las plantas de interés agrícola (Mueller-Harvey, 2001).

Los métodos colorimétricos de Folin-Dennis y Folin-Ciocalteu (propuestos en los trabajos realizados por estos autores entre los años 1912 y 1927), que se basan en la reducción del ácido fosfomolibdico hasta óxidos azules de molibdeno con estados de oxidación inferiores a $7+$, se han convertido en técnicas universales en la determinación de fenoles totales (Singleton *et al.*, 1999; Mueller-Harvey, 2001).

Con el desarrollo vertiginoso de la química analítica ha sido validado un gran grupo de procedimientos modernos, que abarcan desde las más simples técnicas hasta la utilización de los instrumentos más sofisticados (Harborne, 1998; Makkar, 1999).

Según la recopilación realizada por Schofield *et al.* (2001), los métodos para la cuantificación de compuestos fenólicos se pueden clasificar en: 1) colorimétricos, 2) cromatográficos, 3) gravimétricos, 4) de inhibición enzimática, 5) por precipitación, y 6) toxicológicos.

Las lecturas mediante el desarrollo de color son las más empleadas mundialmente, porque requieren menor complejidad de instrumentos y son más accesibles. El método de azul de Prusia es muy utilizado por presentar buena correlación con la actividad biológica. Aunque mediante este reactivo reaccionan todos los fenoles, las transformaciones dependen mucho de las condiciones del análisis y pueden interferir otros agentes reductores. La cuantificación de diferentes estructuras hidroxiladas mediante el procedimiento de tiólisis y el empleo de floroglucinol, requieren de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y son excelentes para determinaciones estructurales. Los ensayos enzimáticos precisan de manera adicional otras técnicas biológicas y la susceptibilidad de la enzima puede ser variable (Adams y Harbertson, 1999), por lo que estas técnicas por sí solas no permiten llegar a conclusiones sólidas (Hagerman, 1998; Fickel *et al.*, 1999).

Los procedimientos que emplean HPLC son factibles para las determinaciones de estructuras complejas (Hedqvist *et al.*, 2000), pero algunos solo son aplicables para taninos condensados de 7 a 8 unidades, y en ocasiones se observan uniones irreversibles con la matriz utilizada (Hammerstone *et al.*, 1999; Labarbe *et al.*, 1999; Lazarus *et al.*, 1999).

Otros métodos significativamente importantes son el empleo de la rodanina para la cuantificación de taninos hidrolizables del tipo galotaninos (Mueller-Harvey, 2001), el

empleo de KIO_3 en las determinaciones de galos y elagitaninos (Willis y Allen, 1998), las determinaciones de peso molecular (Guyot *et al.*, 1997) y el apoyo que propicia la cromatografía de fase normal (Cheynier *et al.*, 1999) y de fase reversa en las separaciones cuantitativas de las diferentes especies fenólicas (Waterhouse *et al.*, 1998).

Los procedimientos analíticos más factibles para la determinación de cumarinas y flavonoides se basan en las propiedades estructurales de estos compuestos de tener patrones conformacionales rígidos, que les permiten una absorción muy intensa en el espectro ultravioleta, después de separaciones y fraccionamientos previos que evitan un gran número de interferencias analíticas (Mochiutti, 1995; Méndez, 1996; Gutiérrez *et al.*, 2000); no obstante, se debe conocer aproximadamente las estructuras que se cuantificarán con vistas a realizar una óptima selección del patrón en el análisis (Mueller-Harvey, 2001).

Otros metabolitos secundarios, como los triterpenos y esteroides, se determinan fundamentalmente por diversos métodos cromatográficos (AOAC, 1990) o mediante la extensión de la prueba cualitativa de Liebermann y Buchard, basado en la formación de compuestos coloreados, como producto de la reacción en medio ácido del anhídrido acético con el doble enlace presente en los anillos B y C de los esteroides y triterpenos, respectivamente; estas instauraciones resultan típicas en ambas agrupaciones (Galindo *et al.*, 1989).

2.5. CHILE HABANERO

El chile habanero pertenece a la División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Solanales y Familia Solanaceae, Género *Capsicum* y Especie *C. chinense* Jacq. (1776). Es una planta de ciclo anual, que puede alcanzar hasta 12 meses de vida, dependiendo del manejo agronómico. Su altura es variable: puede oscilar de 75 a 120 centímetros en condiciones de invernadero. Su tallo es grueso, erecto y robusto; con un crecimiento semideterminado. Las hojas son simples, lisas, alternas y de forma lanceolada, de tamaño variable, lo mismo que su color, el cual puede

presentar diferentes tonos de verde, dependiendo de la variedad. Tiene una raíz principal de tipo pivotante, que profundiza de 0.40 a 1.20 metros, con un sistema radicular bien desarrollado, cuyo tamaño depende de la edad de la planta, las características del suelo y las prácticas de manejo que se le proporcionen; puede alcanzar longitudes mayores a los 2 metros (Figura 3A). La floración inicia cuando la planta empieza a ramificarse. Las flores se presentan solitarias o en grupos de dos o más en cada una de las axilas, y son blancas. Su tamaño varía entre 1.5 y 2.5 centímetros de diámetro de la corola. El número de sépalos y pétalos es variable, de cinco a siete, aun dentro de la misma especie, lo mismo que la longitud del pedúnculo floral (Ruiz-Lau, 2011).



Figura 3. Plantas de chile habanero (*C. chinense*) en cultivo en invernadero (A) y frutos de chile habanero Cv. chocolate (B).

Se sabe que el chile habanero contiene compuestos como el ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles (vitamina E), carotenoides (provitamina A), compuestos fenólicos, flavonoides y minerales, además de sus constituyentes característicos los capsaicinoides (Segura *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que los chiles habaneros tienen mayor contenido de compuestos fenólicos que el presente en fresa, tomates o algunos pimientos, con una interesante fuente de compuestos antimicrobianos y antifúngicos (Castro-Concha *et al.*, 2014).

La característica de todos los tipos de habanero es su intenso aroma a frutas maduras. Existen muchas variedades que difieren principalmente en su color y forma. En Yucatán, se cultiva especialmente el habanero naranja y también la variante del habanero rojo. En la isla de Jamaica se cultiva principalmente las variedades del Scotch Bonnet. Otras variedades más recientes en cuanto a su cultivo son: el Dulce Amarillo, Burkina Yellow, Habanero Manzano, Habanero Peach Red y el Habanero Morado o chocolate.

2.5.1. Chile habanero cultivar chocolate

Hay muy pocos chiles que son más picantes que el habanero chocolate (también llamado de Congo Negro), sus valores de pungencia alcanzan los 150,000 a 325,000 SH. Esta variante del habanero debe su nombre a su color chocolate y es más de 50 veces más picante que un Jalapeño. Los chiles son de cerca de 5 cm de largo y 2.5 cm en diámetro (Figura 3B), prefiere altas temperaturas para su crecimiento y presente altos rendimientos. Cuando es inmaduro presenta color verde, cuando madura se torna color chocolate, percibido como café brillante casi morado. El habanero Cv. chocolate tiene un sabor único, por lo que, en el Caribe, esta variante se utiliza para la elaboración de salsas de barbacoa y marinadas (Segura *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Los frutos de chile (*Capsicum* spp) además de ser considerados imprescindibles para el sabor de cualquier platillo en México, son importantes para la dieta por contener diversos compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenos y capsaicinoides, los que presentan actividad antioxidante. El consumo de los frutos de chile, de sus extractos o compuestos activos, potencialmente puede llevar a un control o contrarrestar enfermedades crónico degenerativas como la diabetes y el cáncer, entre otras.

Por lo anterior, es importante generar investigaciones que proporcionen información de la cantidad de estos compuestos bioactivos en los diferentes cultivares y en sus estadios de madurez, puesto que puede variar la presencia y cantidad de los mismos en cada cultivar de chile.

En particular, los estudios en chile habanero cultivar chocolate son escasos, por lo que surge la necesidad de determinar la actividad antioxidante y relacionar ésta con el contenido de sus compuestos bioactivos.

4. HIPÓTESIS

Existe una relación de la actividad antioxidante con el contenido de los compuestos activos de los extractos de frutos de chile habanero cultivar chocolate.

5. OBJETIVOS

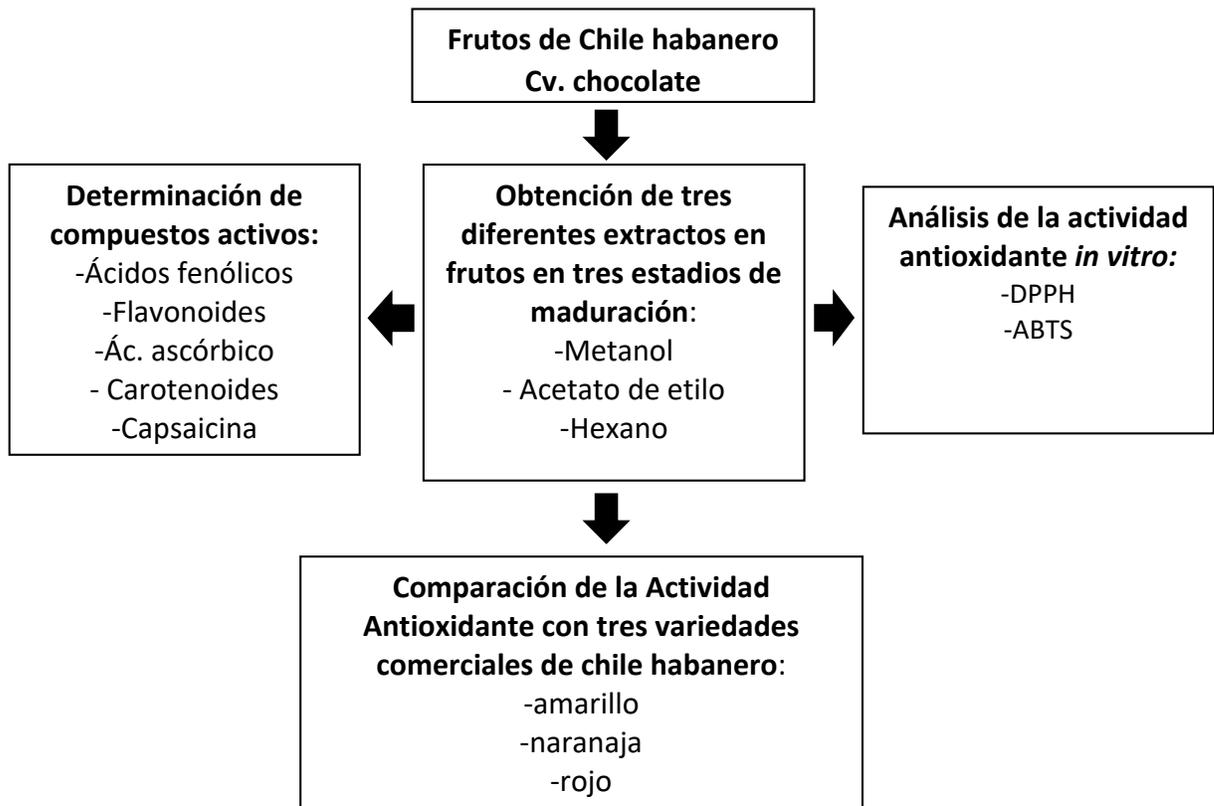
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la relación de la actividad antioxidante con los compuestos activos de extractos de frutos de chile habanero cultivar chocolate.

5.1.1. Objetivos Específicos

- 1) Determinar la actividad antioxidante de diversos extractos de frutos de chile habanero Cv. chocolate, en tres estadios de madurez.
- 2) Cuantificar los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos de frutos del chile habanero Cv. chocolate, en tres estadios de madurez.
- 3) Relacionar la actividad antioxidante con los compuestos bioactivos.
- 4) Comparar la actividad antioxidante de los extractos de frutos maduros de chile habanero Cv. chocolate con tres cultivares comerciales de chile habanero.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL BIOLÓGICO

7.1.1. Frutos de chile habanero Cv. chocolate

En esta investigación se utilizaron frutos de chile habanero Cv. chocolate, colectados en tres estadios, inmaduro (frutos de color verde, 30 días después de anthesis, dda), intermedio (frutos de color mixto verde y café, 45 dda) y maduro (frutos de color café chocolate, 60 dda) (Figura 4A, 4B, 4C), provenientes de plantas cultivadas en el invernadero del propio laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH.

Las plantas fueron cultivadas en un invernadero con condiciones semi-controladas de luz, temperatura y humedad relativa ambiental. La intensidad de luz fue regulada con malla sombra de 75%, obteniendo intervalos de temperaturas de 25-32°C durante el día y de 12-18°C durante la noche. La humedad relativa promedio durante la experimentación fue entre 60 y 70%. Éstas fueron cultivadas en macetas conteniendo como sustrato una mezcla de suelo orgánico comercial:agrolita (1:1).

El riego para todas las plantas se realizó cada tres días con agua corriente, sin dejar secar el sustrato, con fertilización mensual (1 g/maceta de Triple 17 Plus®).

7.1.2. Frutos de tres cultivares comerciales de chile habanero

Además del chile habanero Cv. chocolate, se utilizaron tres diferentes cultivares de chile habanero obtenidos de un invernadero de la Ciudad de Morelia, Michoacán. Solamente se determinó la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de frutos maduros de los cultivares amarillo, naranja y rojo (Figura 5).



Figura 4. Frutos de chile habanero Cv. chocolate en estadio inmaduro (A), intermedio (B) y maduro (C).



Figura 5. Frutos maduros de chile habanero de las variedades comerciales rojo, chocolate, naranja y amarillo.

7.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Los frutos de chile habanero fueron sometidos a extracción por maceración en frío, con tres diferentes solventes: metanol (MeOH), acetato de etilo (AcEt) y hexano (Hex). Previamente los frutos se mantuvieron en congelación a -20°C y en frío fueron triturados (licuadora) hasta obtener pequeños fragmentos. Por cada 10 g peso fresco se añadió 100 mL de solvente y después de 5 días, los extractos se filtraron (Papel filtro Whatman No. 1) y fueron llevados a sequedad en rotavapor a 45°C . Cada extracto se preparó en una concentración final de 10 mg/mL, éstos fueron mantenidos bajo refrigeración (4°C) hasta su análisis.

7.3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La determinación de las propiedades antioxidantes de los frutos de los tres estadios de chile habanero Cv. Chocolate se obtuvo inicialmente y finalmente de los frutos maduros de los tres cultivares comerciales. El análisis se realizó por los métodos de DPPH y ABTS.

7.3.1. Método DPPH

La actividad captadora de radicales libres DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) de los diferentes extractos de frutos de chile habanero Cv. chocolate y cultivares comerciales, se determinó con el reactivo DPPH [1mM] preparado en metanol como solución madre, utilizando una proporción de 2 mL de solución madre y 8 mL de metanol (solución de trabajo), verificando que la absorbancia de ésta fuera entre 0.8 y 1.3, utilizando el método descrito por Karamač *et al.*, (2005).

De esta solución, se utilizó 50 μL de solución problema (extracto) y 1 mL de reactivo DPPH (solución de trabajo), las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 min, determinando la absorbancia a 517 nm frente a metanol como blanco en espectrofotómetro (UV-Vis

VELAB-VE51000UV), utilizando metanol como solución blanco. El porcentaje de decoloración del DPPH de las muestras se calculó según la fórmula:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}} \times 100$$

7.3.2. Método ABTS

La medición de la actividad antioxidante de los diferentes extractos de chile habanero, se evaluó utilizando el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) descrito por Rufino *et al.* (2010), de la siguiente manera:

- Generación de ABTS por la interacción de ABTS (7.4 mM) y K₂S₂O₈ (2.6 mM), en una relación 1:1, durante 12 h con temperatura ambiente y completa oscuridad.
- La solución de trabajo se diluyó en el solvente (metanol) hasta alcanzar una lectura en el espectrofotómetro de 0.8 a 1.3 a una λ de 737 nm.
- La absorbancia se determinó a los 7 min a una λ de 737 nm, después de la adición de 950 μ L de solución ABTS y 50 μ L de muestra (cada extracto por separado). Como blanco se utilizó metanol.

La actividad antioxidante se estimó con el porcentaje de inhibición de la absorbancia de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}} \times 100$$

En ambos métodos de ensayo de actividad antioxidante fueron utilizados como control positivos, los antioxidantes BHT (butil hidroxitolueno, 1 mg/mL) y ácido ascórbico (0.1 mg/mL).

7.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS TOTALES

Mediante la técnica de Folin-Ciocalteu se determinó el contenido de ácidos fenólicos totales, que consistió en lo siguiente: en un tubo de ensayo se usaron 100 μL ($n=3$) de cada uno de los extractos de los diferentes cultivares de chile habanero; posteriormente se agregó 750 μL de la solución de Folin-Ciocalteu, preparada 1:10 con agua estéril. Con ayuda de un vortex, cada tubo fue mezclado durante 5 min, para después añadir 750 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 6% preparada con agua estéril; posteriormente se mezclaron y se dejaron reposar los tubos 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, para finalmente obtener las lecturas de absorbancia a 725 nm de cada tubo (Schwarz, 2001), en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV.

La curva de calibración fue preparada usando concentraciones de ácido gálico como estándar entre 0 y 2 μmoles , obteniendo las lecturas a 725 nm (Figura 6).

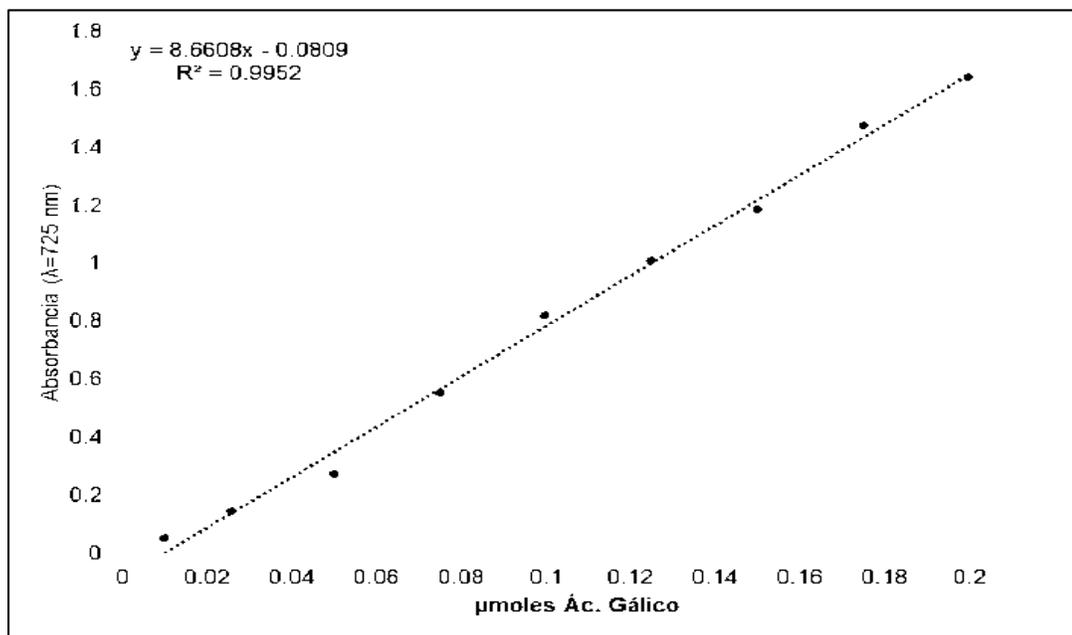


Figura 6. Curva de calibración de ácido gálico $\mu\text{moles/g}$ peso fresco ($\lambda=725$ nm).

El total de ácidos fenólicos se expresó en equivalentes de μ moles de ácido gálico por gramo de peso fresco (Schwarz, 2001), los cálculos fueron obtenidos por la siguiente ecuación:

$$X = \frac{Y}{0.86465} + 0.0809$$

Donde Y es la absorbancia obtenida de cada muestra y X los μ moles de ácido gálico/g peso fresco.

7.5. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES

Para la determinación de flavonoides totales se usaron 10 μ L de cada uno de los extractos de los frutos de chile habanero, a los cuales se les añadieron 490 μ L de metanol, sometiendo la mezcla a agitación en vortex, para posteriormente agregar 1 mL de metanol, 100 μ L de Cloruro de Aluminio ($AlCl_3$) al 10% y 100 μ L de 1 M de acetato de potasio (CH_3CO_2K). Finalmente, las muestras se sometieron a agitación severa en vortex y se dejaron reposar por 30 min en oscuridad, para obtener las lecturas de absorbancia a 415 nm (Kim *et al.*, 2003).

La cuantificación de flavonoides totales en cada una de las muestras de frutos de chile habanero, se obtuvo mediante una curva de calibración realizada con quercetina, con un rango de concentración de 0.1 a 1 μ moles. La solución de quercetina se preparó a una concentración inicial de 1 mM para de ésta, obtener las diferentes concentraciones de quercetina (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μ mol), realizando las lecturas a 415 nm (Figura 7). Los valores se presentan en equivalentes a μ moles de quercetina/mg peso fresco de cada muestra, que fueron obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$X = \frac{Y}{0.016} + 0.0114$$

Donde Y es la absorbancia obtenida de cada muestra y X los μ moles de quercetina/g peso fresco.

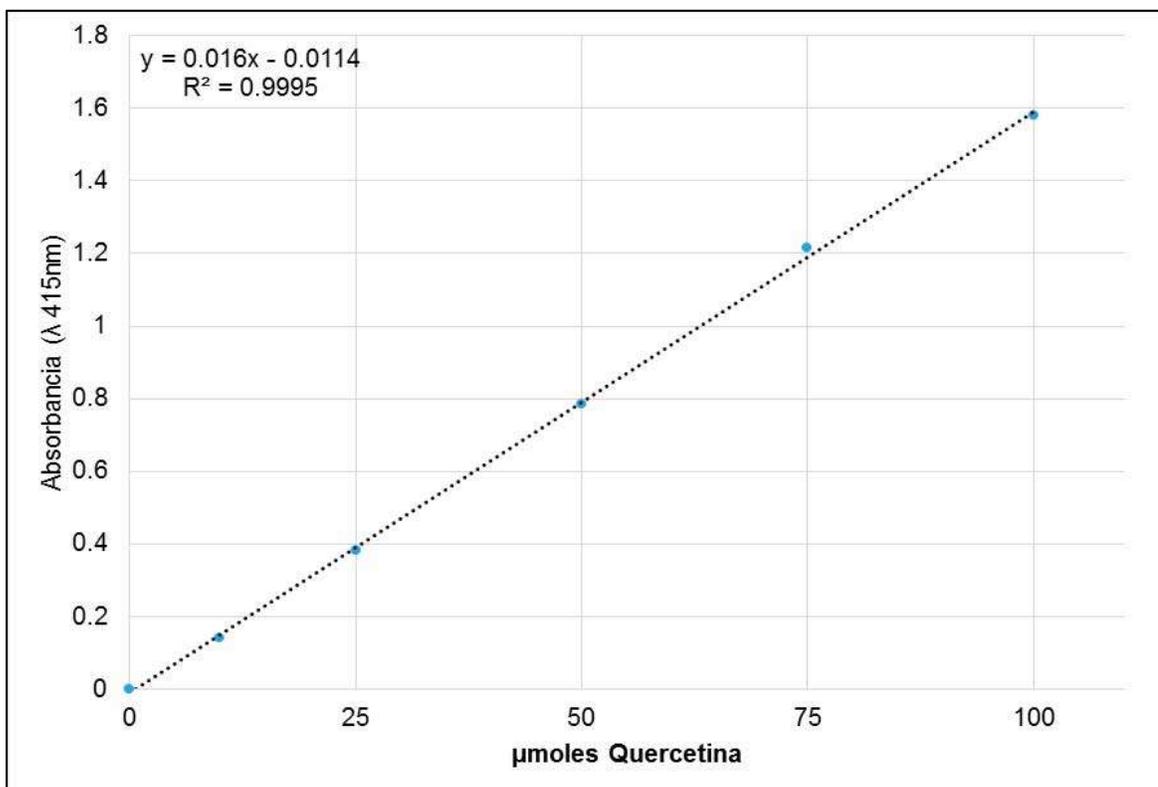


Figura 7. Curva de calibración de quercetina $\mu\text{moles/g}$ peso fresco ($\lambda=415$ nm).

7.6. DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES

Para determinar el contenido de carotenoides, primero se preparó una solución de Dimetilformamida/Carbonato de magnesio (DFM/ $MgCo_3$), según el método modificado de Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández (1989). Para ello, a 500 mL de Dimetilformamida se adicionaron 0.2 g de Carbonato de Magnesio, disolviendo completamente en frío y almacenar a 4°C. Posterior en tubos de ensayo de aproximadamente 5 mL (cubiertos con papel aluminio) se transfirieron 0.5 mL de cada una de las muestras (extractos o soluciones problemas), para después adicionar 1 mL de la solución de DFM/ $MgCo_3$. Las muestras fueron llevadas a agitación vigorosa en un vortex por 5 min y se les añadió 1 mL de hexano, para después, de nuevo agitarlas, dejando en reposo unos minutos. Una vez que las fases se separaron y fueron evidentes, se retiró la fase superior con una micropipeta, para

llegar a la fase ligeramente coloreada, por último se leyó cada una de las muestras en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV a una longitud de onda de 470 nm.

Para determinar el contenido de carotenoides totales por volumen de muestra, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{A * \lambda(470) * 10^6}{\epsilon (2000) * FD (1mL)}$$

Donde:

A = Lectura de Absorbancia obtenida

λ = Longitud de onda de la luteína

FD= Factor de dilución o volumen de muestra

ϵ = Coeficiente de extinción de luteína (2000)

7.7. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Se utilizó un método espectrofotométrico para cuantificar el analito ácido ascórbico, para este caso a diferencia de las demás determinaciones, se realizó de manera directa, sin utilizar un indicador o reactivo que diera resultado a una reacción colorimétrica, como en el caso de los ácidos fenólicos con el reactivo Folin-Ciocalteu. Antes de realizar las determinaciones de este analito en las muestras de interés, se procedió a estructurar una curva de calibración para obtener la concentración de ácido ascórbico, la cual cuenta con un rango de concentración de 0 a 1 μ M, realizando las lecturas a 264 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV (Figura 8). Para la determinación de ácido ascórbico en las muestras, se colocaron en un tubo de ensayo de 5 mL 100 μ L de la muestra problema, posterior se adicionaron 900 μ L del respectivo solvente de cada muestra (metanol, acetato de etilo o hexano), según correspondió, luego se agitó cada tubo en el vortex por unos segundos, y por último se llevó a lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 264 nm.

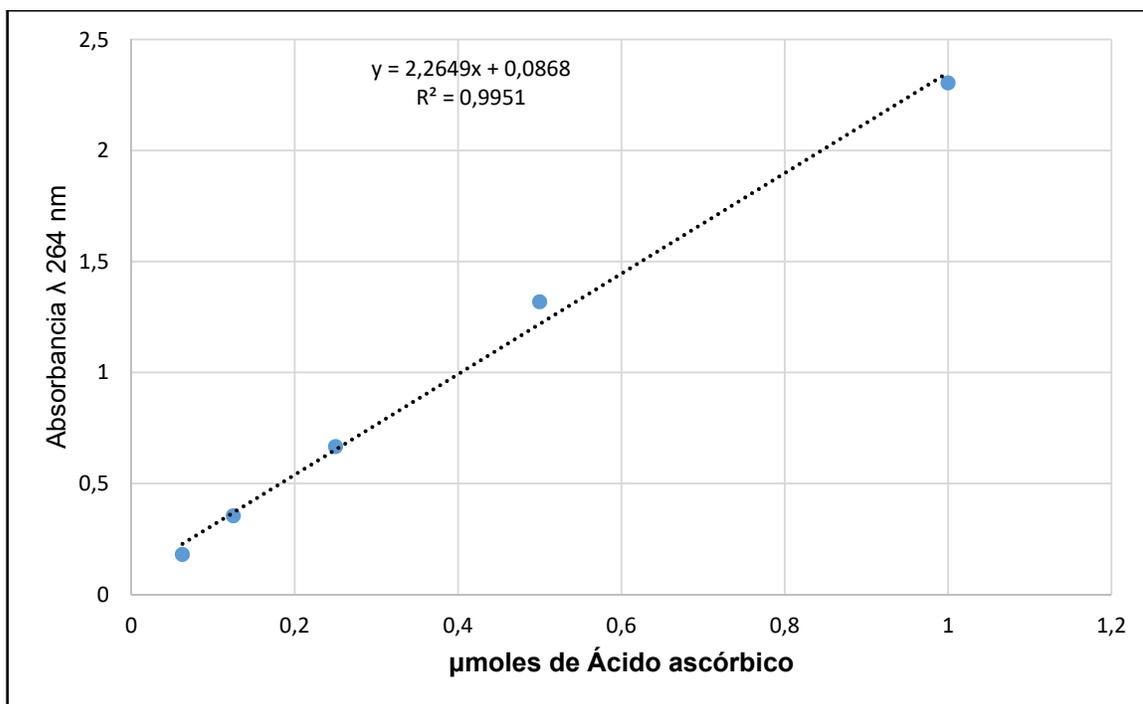


Figura 8. Curva de calibración de ácido ascórbico μmoles/g peso fresco (λ=264 nm).

Los resultados se expresaron en equivalentes a μmoles de ácido ascórbico/mg de peso fresco de cada muestra que fueron obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$X = \frac{Y}{2.2649} - 0.0868$$

Donde Y es la absorbancia obtenida de cada muestra y X los μmoles de ácido ascórbico/g peso fresco.

7.8. DETERMINACIÓN DE CAPSAICINA

Se empleó el método reportado por Xu *et al.* (2007) para la cuantificación de capsaicina por análisis espectrofotométrico. Su cuantificación se obtuvo de manera directa, obteniendo la concentración mediante una curva de calibración realizada con

capsaicina, con un rango de concentración de 0 a 1.25 μ moles, realizando las lecturas a 286 nm en un espectrofotómetro UV-Vis VELAB-VE51000UV (Figura 9).

Los valores se presentan en equivalentes a μ moles de capsaicina/g peso fresco de cada muestra, que fueron obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$X = \frac{Y}{1.6186} - 0.0929$$

Donde Y es la absorbancia obtenida de cada muestra y X los μ moles de capsaicina/g peso fresco.

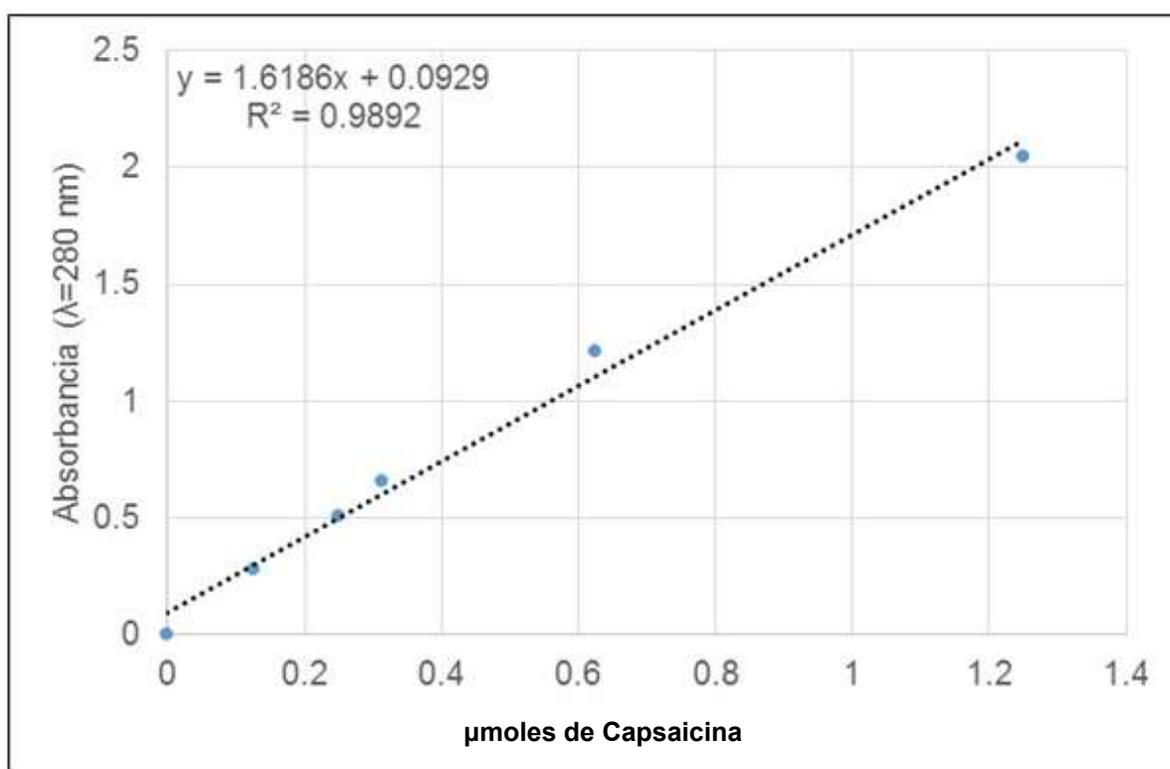


Figura 9. Curva de calibración de capsaicina μ moles/g peso fresco ($\lambda=286$ nm).

7.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se llevaron a cabo con 3 réplicas ($n=3$). Cada tipo de fruto fue tomado como réplica y los datos se presentan como promedio (media) más desviación estándar, analizados por ANOVA ($p<0.05$) y diferencia de medias por Tukey-Kramer, utilizando el programa JMP8.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la actividad antioxidante por DPPH y por ABTS de los diferentes extractos de los frutos inmaduro, intermedio y maduro de chile habanero Cv. chocolate, fue analizado en una concentración de 0.5 mg/mL calculada a partir del total de los extraíbles de cada extracto.

El DPPH y ABTS son radicales libres sintéticos estables, que han sido ampliamente utilizados como una herramienta para estimar la actividad de atrapamiento de radicales libres de compuestos antioxidantes. Los compuestos candidatos como antioxidantes, al interaccionar con el DPPH y ABTS, transfieren electrones o átomos de hidrógeno al DPPH y ABTS, neutralizando así al radical libre (Archana *et al.*, 2005). En la presente investigación fue determinante conocer la influencia del estadio de maduración sobre la actividad antioxidante de cada uno de los diferentes extractos, esto último con el fin de relacionar dicha actividad con el tipo de compuestos presentes.

8.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS DE CHILE HABANERO Cv. CHOCOLATE

Los valores de la actividad captadora de radicales libres tanto por DPPH como por ABTS varió entre los diferentes estadios de los frutos de chile habanero Cv. chocolate y fue dependiente del tipo de extracto (Figura 10). Por el método de DPPH se observaron los más altos porcentajes de actividad, alcanzando un 91.63% en el extracto metanólico de los frutos del estadio inmaduro, aunque no hubo diferencias significativas con los valores del estadio intermedio (81.29%) y maduro (87.3%), con una actividad antioxidante similar al ejercido por el antioxidante sintético BHT (85.5%) y por encima del producido por el ácido ascórbico (78.8%) (Figura 10A). Sin embargo, también los extractos de acetato de etilo de los frutos inmaduros y maduros mostraron similar actividad antioxidante con 81.56% y 84%, respectivamente. Los extractos hexánicos de los frutos en los tres estadios mostraron los porcentajes de actividad antioxidante más bajos, con valores menores al 44% (Figura 10A).

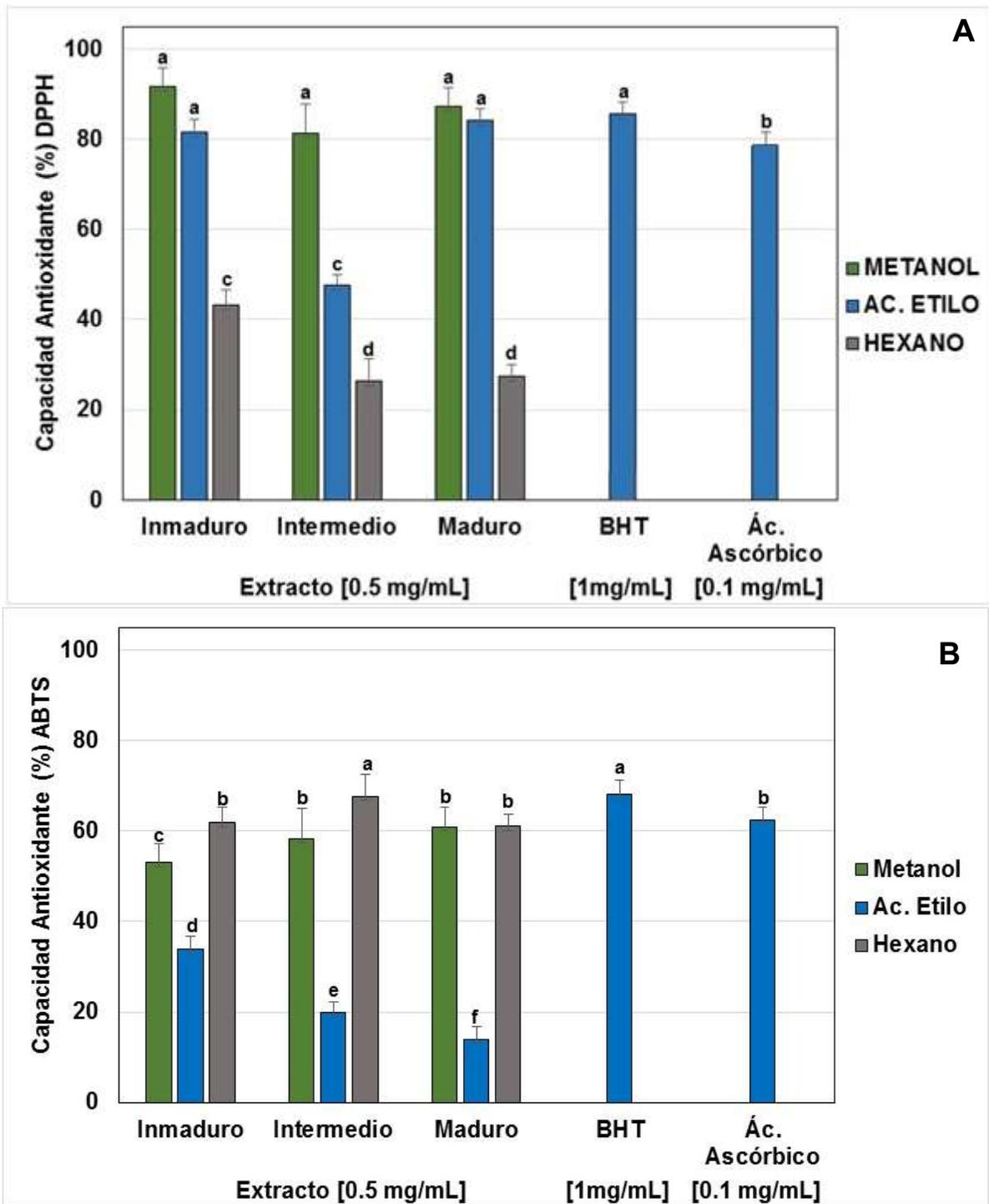


Figura 10. Porcentajes de actividad antioxidante por DPPH (A) y ABTS (B) en los extractos metanólico, de acetato de etilo y hexánico, de los frutos de estadio inmaduro, intermedio y maduro de chile habanero Cv. chocolate. BHT (Butil Hidroxitolueno).

Estos mismos extractos derivados de los frutos de chile habanero Cv. chocolate en sus tres estadios, mostraron una menor actividad antioxidante con el método ABTS a 0.5 mg/mL, observando un máximo de 67.67%, un valor sin diferencia significativa con el presentado por el BHT (68.2%) (Figura 10B). Con este método, los extractos hexánicos fueron los que produjeron una mayor actividad antioxidante, independientemente del estadio de maduración del fruto, con valores similares a los de los extractos metanólicos de los estadios intermedio y maduro con 58.35% y 60.9%, respectivamente (Figura 10B). La actividad antioxidante medidas por ABTS fue menor en los extractos de acetato de etilo con valores menores al 34%.

Con estos resultados es claro que la actividad antioxidante de los extractos de fruto de chile habanero Cv. chocolate, fue dependiente del estadio de maduración del fruto y de la naturaleza química del extracto. Con ambos ensayos de medición de la actividad antioxidante se determinó que se extrajo una considerable actividad con los tres tipos de solventes, y los frutos de los estadios inmaduro y maduro son los de mayor actividad antioxidante. Con el método DPPH resultó más activo el extracto metanólico y con el ABTS, el hexánico.

Lo anterior explica que los componentes químicos de ambos extractos son responsables ya sea por actuar como reductor (método ABTS) o como óxido-reductor (método DPPH). Los metabolitos de estos extractos tienen actividad antioxidante ya que condujeron a la desaparición del radical $ABTS^{\cdot+}$ (Kuskoski *et al.*, 2004), o bien a la reacción de óxido-reducción del radical DPPH (López *et al.*, 2007).

En diversos estudios se ha observado que los extractos etanólicos o metanólicos de frutos rojos como *Lycium barbarum* (baya tibetana), *Myrtus communis* (arrayán), *Morus alba* (mora), *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa), ejercen una actividad antioxidante superior al 80% por DPPH, dependiendo de la concentración, siendo entre 0.1 y 1 mg/mL cuando se alcanzan estos valores de actividad (Hidalgo y Almajano, 2017). En estos mismos frutos, los valores de la actividad antioxidante

determinados por ABTS son similares o incluso menores, como se observaron para los frutos de chile habanero Cv. chocolate.

En forma general, los frutos de *Capsicum* spp muestran también una alta actividad antioxidante por ambos métodos (DPPH y ABTS) pero depende del sistema de extracción, de la especie y del estadio de maduración. En *C. frutescens* var. sina y *C. annuum* var. goudion, los porcentajes de actividad antioxidante por DPPH fueron en un intervalo de 96.95 % a 98.64 % tanto en frutos inmaduros (verdes) como maduros (rojos); resultados similares fueron reportados para el método ABTS aunque con valores más bajos (77.73 %-93.11 %), a una concentración de 100 mg/mL (Shaimaa *et al.*, 2016). Estos valores concuerdan también con lo reportado por Tripathi y Mishra (2009), que encontraron una actividad antioxidante por DPPH del 96.78 % en pimiento rojo en polvo. Es importante resaltar que la actividad antioxidante mostrada por el chile habanero Cv. chocolate se obtuvo a una concentración de 0.5 mg/mL, muy por debajo de algunas concentraciones reportadas para otras especies de *Capsicum*.

8.2. CONTENIDO DE COMPUESTOS ACTIVOS DE CHILE HABANERO Cv. CHOCOLATE

Con el propósito de relacionar la actividad antioxidante con los compuestos activos de los frutos de chile habanero Cv. chocolate, se determinó el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides, carotenos, ácido ascórbico y capsaicina.

8.2.1. Ácidos fenólicos totales

El contenido de ácidos fenólicos totales mostró una variación dependiente de cada extracto, observando un mayor contenido en el extracto metanólico, alcanzando valores entre 181 y 190 μ moles de equivalentes de ácido gálico (EqAG)/g de peso fresco en los tres estadios de maduración, no habiendo diferencias significativas entre éstos (Figura 11). Los compuestos fenólicos se encontraron en cantidades bajas en los extractos de acetato de etilo y hexano, en los tres estadios de

maduración, con un máximo de 16.5 μmoles de EqAG/g de peso fresco en el extracto de acetato de etilo de los frutos maduros de chile habanero Cv. chocolate (Figura 11).

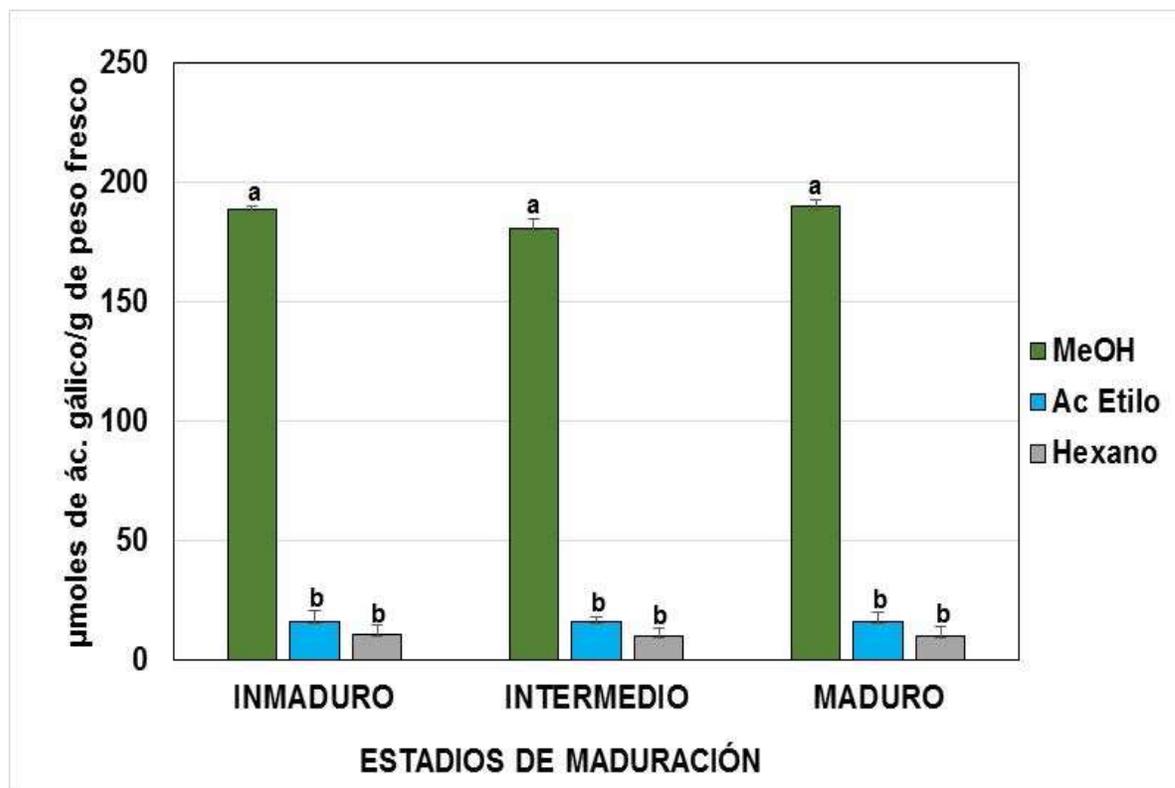


Figura 11. Contenido de ácidos fenólicos totales en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestran los equivalentes en μmoles de ácido gálico/g de peso fresco ($n=3$). $p<0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

El valor más alto de ácidos fenólicos totales en esta variedad de chile, supera a lo reportado para otras variedades de chiles (*Capsicum*), ya que para *Capsicum annuum* var. Jalapeño se ha obtenido 159.23 μmoles de EqAG/g de peso fresco (Medina-Juárez *et al.*, 2012); en chiles pimientos (*C. annuum* verde y rojo Cv. Almuden), el contenido de ácidos fenólicos es bajo, de 6.9 μmoles EqAG/g y 7.1

$\mu\text{moles EqAG/g}$ (Lutz *et al.*, 2015); igualmente, estos niveles de ácidos fenólicos han sido reportado para chile campana (*C. annuum* var. Bell) que presenta 1.291 μmol de EqAG/g de peso fresco (Rahim y Mat, 2012).

Teixeira-Souza *et al.* (2015) han reportado una estrecha relación entre el contenido de ácidos fenólicos y las variedades comerciales de *Capsicum*. El orden del contenido de éstos en semillas es habanero > malagueta > cayenne > pimiento rojo > pimiento campana; y para pulpa, el mayor contenido se ha observado en chile malagueta, mientras que los más bajos en chile campana.

El alto contenido de ácidos fenólicos totales observado en el extracto metanólico de los frutos de chile habanero Cv. chocolate en los tres estadios, coincide con la alta actividad antioxidante obtenida por los métodos DPPH y ABTS, que concuerda con lo reportado por Hidalgo y Almajano (2017), que este tipo de compuestos son uno de los principales antioxidantes de los frutos y algunas plantas medicinales.

8.2.2. Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales determinados en equivalentes de quercetina (EqQ) en los diferentes extractos de los frutos de chile habanero Cv. chocolate en tres estadios, mostró una variación similar al observado para los compuestos fenólicos, ya que el mayor contenido se obtuvo en los extractos metanólicos de los tres estadios de los frutos, con un máximo de 94.2 μmoles de EqQ/g de peso fresco en el estadio inmaduro, disminuyendo con la maduración con 56.9 μmoles de EqQ/g de peso fresco en frutos de maduración intermedia y 67.4 μmoles de EqQ/g de peso fresco de frutos maduros (Figura 12), sin diferencia significativa entre estos dos últimos valores. Respecto al contenido de flavonoides totales en los extractos de acetato de etilo y hexánico, fue bajo en un intervalo entre 8.84 y 3.03 μmoles de EqQ/g de peso fresco. El alto contenido de flavonoides totales en los extractos metanólicos de los frutos de chile habanero Cv. chocolate coincide con el mayor

contenido de ácidos fenólicos totales y con la mayor actividad antioxidante, principalmente con DPPH.

Estos valores de flavonoides son considerablemente más altos que los reportados para otras especies o variedades de *Capsicum*. Howard *et al.* (2000) mostraron contenidos de 5.69 a 28.35 $\mu\text{moles de EqQ/g}$ de peso fresco en variedades similares de *Capsicum annuum*. Materska y Perucka (2005) observaron diferentes cantidades de flavonoides entre los pimientos rojos y verdes, estas variaciones, tanto de flavonoides como de ácidos fenólicos están asociadas con las etapas de maduración, tipo del cultivar, así como las condiciones de crecimiento. También esta relación directa se ha observado con los valores de la actividad antioxidante (Howard *et al.*, 2000).

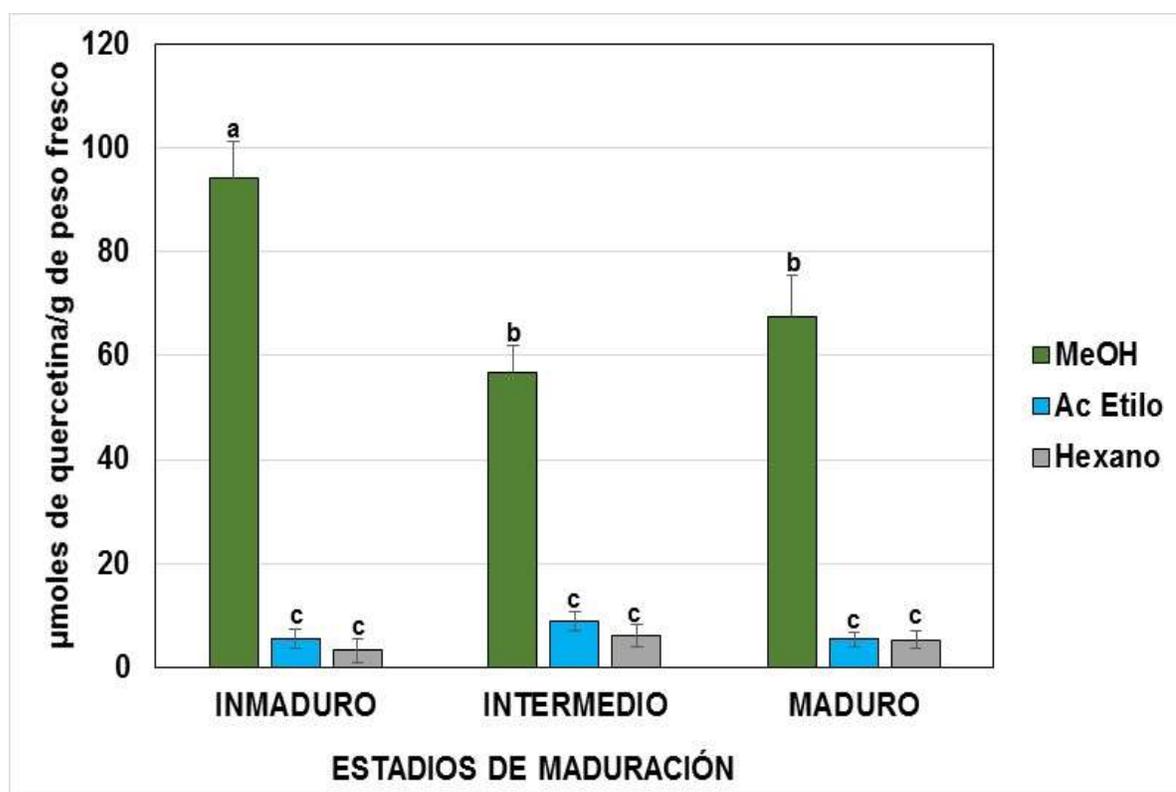


Figura 12. Contenido de flavonoides totales en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestran los equivalentes en $\mu\text{moles equivalentes de quercetina/g}$ de peso fresco ($n=3$). $p<0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

8.2.3. Ácido ascórbico

Los frutos del género *Capsicum* son considerados como los de más alto contenido de ácido ascórbico (Lee y Kader, 2000). Se han reportado diversos niveles de esta vitamina, Bae *et al.* (2014) reporta un contenido entre 782 y 2305.3 mg/g de ácido ascórbico (peso fresco) que equivale a 4.2 – 13.2 μ moles/g peso fresco, pero esta concentración depende de la etapa de madurez del fruto. Un contenido similar ha sido encontrado en los frutos de Jalapeño y Serrano, con una menor concentración en frutos maduros, debido a la degradación del ácido ascórbico (Chuah *et al.*, 2008; Álvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

Con la determinación del ácido ascórbico en los frutos de chile habanero Cv. chocolate, se observaron estas variaciones, ya que el contenido dependió de la etapa de madurez, así como del tipo de extracto; el mayor contenido de ácido ascórbico se obtuvo con acetato de etilo, con la mayor cantidad en los frutos inmaduros, con 4.56 μ moles de ácido ascórbico/g de peso fresco (con alta diferencia significativa), seguidos de 3.75 (fruto intermedio con extracto acetato de etilo), 3.27 (fruto inmaduro con extracto metanólico) y 3.11 (fruto maduro con extracto Hexánico) μ moles de ácido ascórbico/g de peso fresco, sin diferencias significativas entre estos tres últimos valores (Figura 13).

De los demás extractos, solo el metanólico de frutos inmaduros mostró el contenido más alto de ácido ascórbico con 3.27 μ moles de ácido ascórbico/g de peso fresco sin diferencia significativa con los de acetato de etilo de los frutos en la etapa intermedio y maduro (Figura 13). Estos valores de ácido ascórbico intervienen también en que sea mayor la actividad antioxidante por DPPH en los frutos inmaduros de los extractos metanólicos, seguidos de los obtenidos con acetato de etilo (Figura 10A).

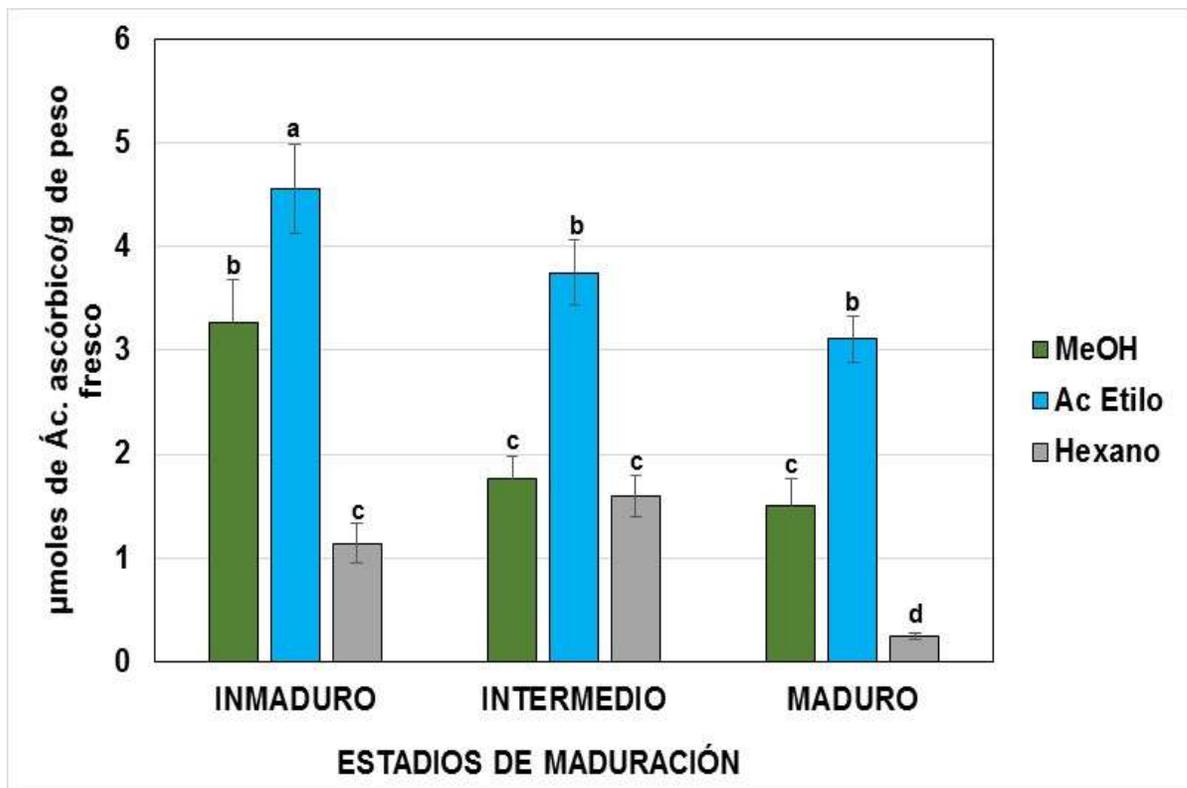


Figura 13. Contenido de ácido ascórbico en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestra el contenido en μmoles de ácido ascórbico/g de peso fresco ($n=3$). $p < 0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

8.2.4. Carotenoides

Los frutos de *Capsicum* se han utilizado en forma de concentrados, oleorresinas y como especias en colorantes alimenticios, ya que los frutos presentan carotenoides, como ceto-carotenoides, capsantina, capsorubina contribuyendo a la coloración roja del fruto, mientras que β -caroteno, zeaxantina, luteína y β -criptoxantina son responsables del color amarillo-naranja (Philip *et al.*, 1971). El conocer el contenido de carotenoides en los frutos de *Capsicum* spp es de gran importancia debido a las propiedades antioxidantes que se les atribuye y poder recomendar su consumo.

Los extractos de los frutos de chile habanero Cv. chocolate, obtenidos con acetato de etilo, fueron en los que se encontró un mayor contenido de carotenoides, principalmente en los frutos de estadio intermedio y maduros, con 713.46 y 723.6 μg de carotenoides/g peso fresco, valores que no mostraron diferencias significativas con los de estos estadios obtenidos con hexano (Figura 14). Estos compuestos podrían ser los responsables de la actividad antioxidante encontrada en estos extractos y estadios tanto por DPPH como por ABTS (Figura 10).

Los reportes del contenido de carotenoides en diversas especies o variedades comerciales de *Capsicum*, determinan que lo encontrado en este cultivar es relativamente bajo, presumiblemente al color rojo oscuro (chocolate) que presenta. Los frutos maduros del chile pimiento Cv. MA1 contienen hasta 12.61 mg de carotenoides/g de peso fresco (Hornero-Méndez *et al.*, 2002); en chile habanero Cv. Jaguar se han encontrado cantidades de 17 a 23 mg de carotenoides/g de fruto (Ramírez *et al.*, 2016); y Lee *et al.* (2005) reportaron 0.237 mg/g peso fresco de carotenoides en frutos de plantas de chile habanero Cv. Fidel, cultivadas en invernadero. El contenido total de carotenoides en los frutos de *Capsicum* varían de acuerdo al tipo de cultivar (Almeda *et al.*, 1991).

Lee *et al.* (2005) manifestaron que la diferencia en los días a madurez que tuvieron cada tipo de chile al momento de la cosecha, así como las diferentes condiciones ambientales en las que se desarrollaron (humedad relativa y temperatura nocturnas) podrían haber influido en las diferencias encontradas en la acumulación de carotenoides. De igual manera, García *et al.* (2007) encontraron diferencias en la concentración de algunos carotenoides (capsorubina, capsantina, zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno), al evaluar cinco variedades de chile tipo bola (paprika roja).

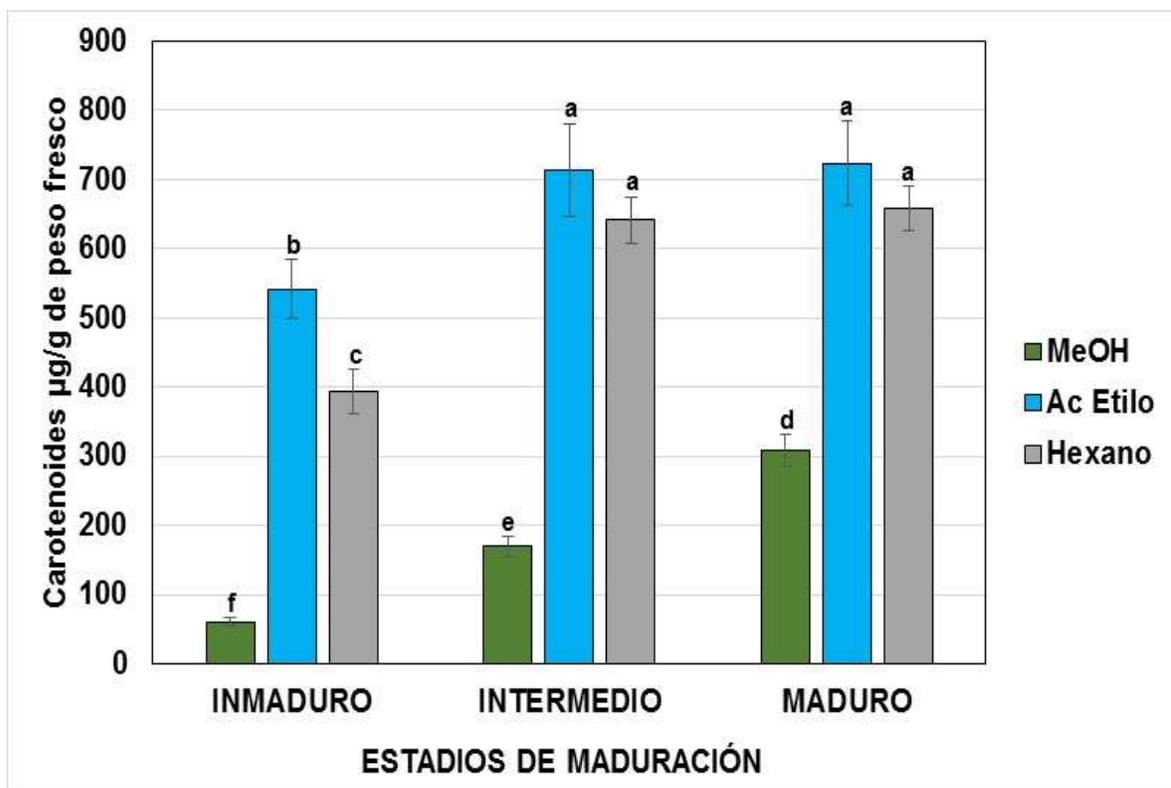


Figura 14. Contenido de carotenoides totales en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestra el contenido en μg de carotenoides totales/g de peso fresco ($n=3$). $p < 0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

8.2.5. Capsaicina

El contenido de capsaicina determinado en los frutos de tres estadios de chile habanero Cv. chocolate varió según el solvente de extracción y el grado de madurez de los frutos, obteniendo una mayor cantidad cuando fueron extraídos con acetato de etilo. Con este sistema de extracción, los frutos maduros presentaron 22.033 μmoles de capsaicina/g de peso fresco, seguidos con los del estadio intermedio (16.19 μmoles) y con los del estadio inmaduro (14.48 μmoles), habiendo diferencias significativas entre ellos y con los demás tratamientos (Figura 15). Aunque el contenido de capsaicina fue mucho más bajo en los frutos extraídos con metanol, la producción se comportó de manera similar al extracto anterior, con una mayor

cantidad en frutos maduros; sin embargo, con la extracción hexánica, la cantidad extraíble fue mínima (menor a 1.945 μ moles) y constante en los tres estadios (Figura 16).

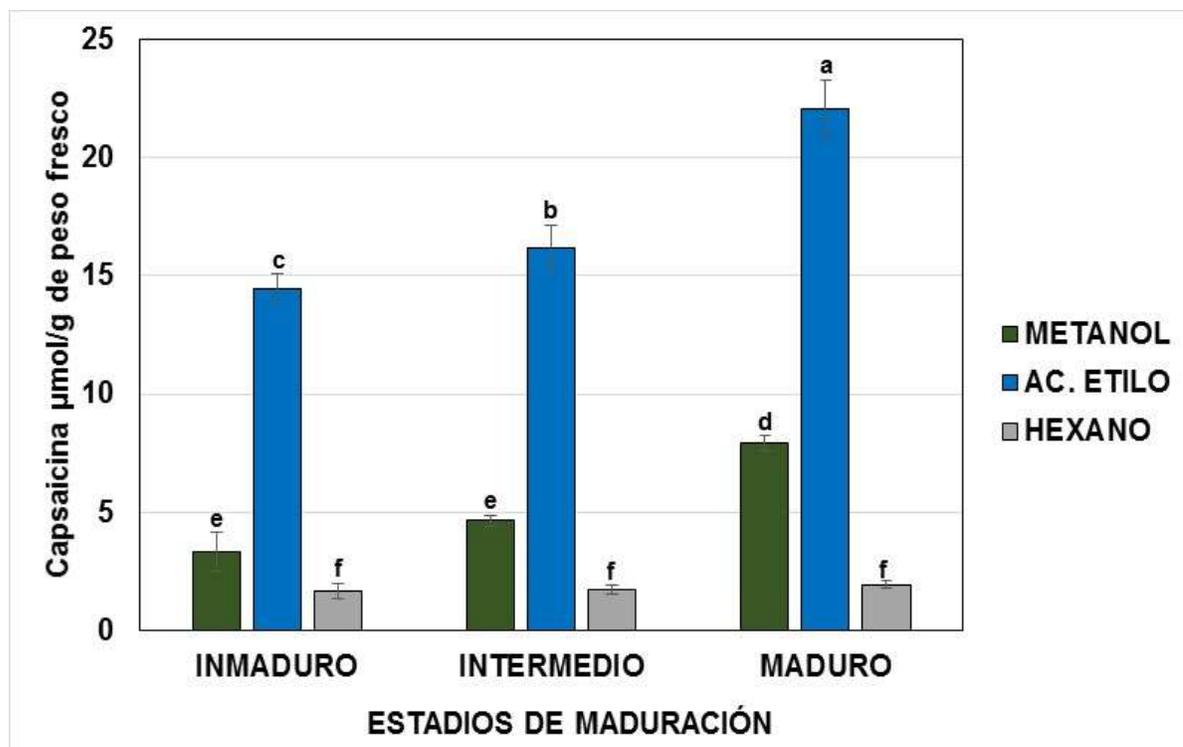


Figura 15. Contenido de capsaicina en tres estadios de maduración (inmaduro, intermedio y maduro) de frutos de chile habanero Cv. chocolate. Se muestra el contenido en μ moles de capsaicina/g de peso fresco ($n=3$). $p<0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

El contenido más alto obtenido en los frutos de chile habanero Cv. chocolate (22.033 μ moles de capsaicina/g de peso fresco), concuerda con lo reportado para esta especie y diferentes accesiones o variedades comerciales, que es entre 16 y 200 μ moles de capsaicina/g de peso fresco, que equivalen a 5 y 60 mg/g peso fresco (Canto-Flick *et al.*, 2008). En particular, 22.033 μ moles de capsaicina/g de peso fresco equivales a 6.73 mg de capsaicina/g peso fresco, comportándose como un cultivar con valores bajos de capsaicina, con una equivalencia a 3075 unidades

Scoville que lo ubica entre los chiles de moderada pungencia (Mathur *et al.*, 2000; Usman *et al.*, 2014).

Así como la variación en el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico y carotenoides, depende de la especie y la variedad comercial o bien debido a las condiciones y factores inherentes al cultivo, el contenido de capsaicina o capsaicinoides totales también presenta este fenómeno, como lo reporta Canto-Flick *et al.* (2008) al estudiar 18 accesiones de chile habanero y Usman *et al.* (2014) en 21 genotipos de *C. annuum*.

Frutos frescos de chile Cv. Jalapeño han mostrado una alta variabilidad en el contenido de capsaicinoides totales dependiendo del genotipo (1100-7260 µg/g peso seco) y del lugar de cultivo (742-3197 µg/g peso seco), quienes han demostrado la gran variabilidad en el contenido de fitoquímico debido a la variedad, madurez y a las condiciones previas y post cosecha (Rowland *et al.*, 1984; Topuz y Ozdemir, 2007; Alvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

En cuanto a la relación del contenido de capsaicina con la actividad antioxidante en este cultivar de chile habanero, es posible que la actividad antioxidante por DPPH observada por el extracto de acetato de etilo y en los estadios intermedio y maduro, en gran parte sea debido al alto contenido de capsaicina encontrado en éstos sumado con el encontrado en los extractos metanólicos (Figura 10).

8.3. COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE ENTRE CHILE HABANERO Cv. CHOCOLATE Y TRES VARIEDADES COMERCIALES (AMARILLO, NARANJA y ROJO)

Con el propósito de comparar la actividad antioxidante de los frutos maduros de chile habanero Cv. chocolate, se analizó la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de chiles maduros de las variedades comerciales amarillo, naranja y rojo.

8.3.1. Actividad DPPH

La actividad antioxidante determinada por el método de DPPH mostró similitud de los porcentajes obtenidos, en los extractos metanólico y de acetato de etilo en los estadios inmaduro e intermedio de chile habanero Cv. chocolate (87.3 y 84.03%, respectivamente) y la variedad comercial Naranja (84.03 y 85.91%, respectivamente) y con el porcentaje del extracto de acetato de etilo de la variedad comercial amarillo (90.3%), sin diferencias significativas entre estos valores y los observado por el BHT y el ácido ascórbico. La variedad comercial rojo presentó los porcentajes más bajos de la actividad antioxidante en todos los extractos, sin embargo en el metanólico se obtuvo un 66.64% (Figura 16A).

8.3.2. Actividad ABTS

Con el método ABTS, los extractos metanólicos de los frutos maduros del Chile habanero Cv. chocolate (60.93%), la actividad antioxidante fue estadísticamente igual que la presentada por las tres variedades comerciales amarillo (56.72%), naranja (56.45%) y rojo (62.64%), porcentajes similares al del BHT (68.2%) y al ácido ascórbico (62.4%) (Figura 16B). Los extractos de las tres variedades comerciales, obtenidos con hexano dieron una actividad antioxidante menor al que mostró el chile habanero Cv. chocolate; los obtenidos con acetato de etilo, que fueron los de menor porcentaje de actividad, no fueron estadísticamente diferentes entre todas las variedades comerciales (Figura 16B).

Con estos resultados se confirma la relación de los porcentajes de actividad antioxidante que existe entre los diferentes extractos, lo estadios y las variedades comerciales de *C. chinense*, con el contenido de los principios activos antioxidantes como los ácidos fenólicos, los flavonoides, el ácido ascórbico, los carotenoides y la capsaicina. La actividad medida por el método de DPPH fue mayor en los frutos de *C. chinense* con mayor contenido de estos principios activos en el estadio maduro de las variedades comerciales chocolate, naranja y amarillo, no así en el rojo (Figura

16A). Sin embargo, con el método ABTS no hubo diferencias significativas en todas las variedades comerciales, a excepción de los extractos de acetato de etilo (Figura 16B).

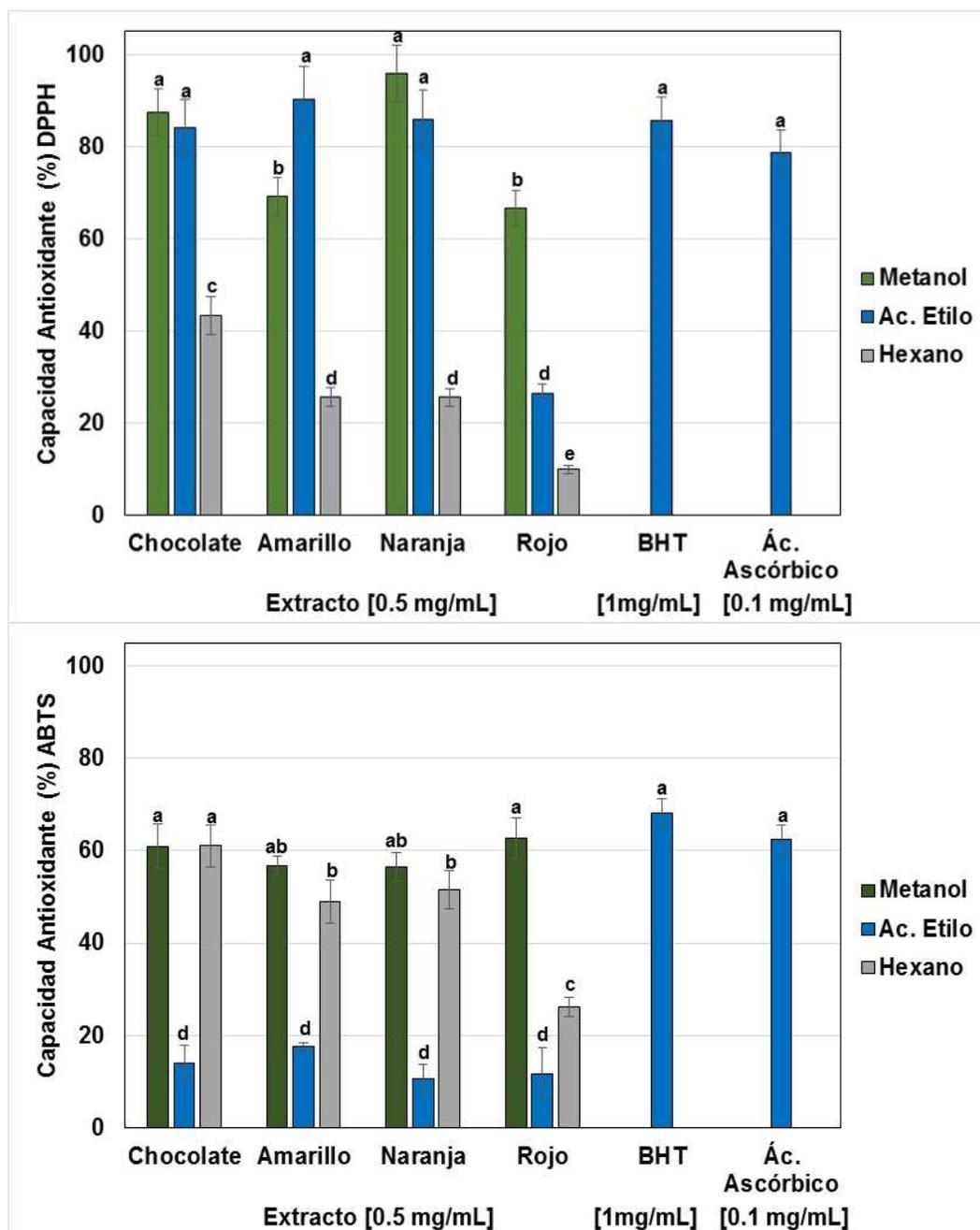


Figura 16. Porcentajes de actividad antioxidante por DPPH (A) y ABTS (B) en los extractos metanólico, de acetato de etilo y hexánico, de los frutos maduros de chile habanero Cv. chocolate y las variedades comerciales amarillo, naranja y rojo. BHT (Butil Hidroxitolueno) (n=3). $p < 0.05$, Tukey-Kramer, letras diferentes muestran diferencias significativas.

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo reportado por diferentes grupos de trabajo, en los que se confirma que el contenido de compuestos activos en *Capsicum*, depende de los genotipos (especies, variedades, cultivares y accesiones), de la etapa de maduración de los frutos y de los factores que intervienen en el cultivo (Howard *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Materska y Perucka, 2005; García *et al.*, 2007; Usman *et al.*, 2014; Hidalgo y Almajano, 2017). Esta variación de componentes activos, antioxidantes es determinante sobre la actividad antioxidante que ejercen (Howard *et al.*, 2000).

En este contexto, estos resultados son importantes para conocer qué estadio de los frutos de *C. chinense* Cv. chocolate es el mejor para la cosecha y consumo, ya que indica claramente su actividad antioxidante máxima, además porque puede hacerse una aproximación de saber qué tipo de compuesto es el más activo con esta propiedad.

9. CONCLUSIONES

Se observó desde una moderada hasta una alta actividad antioxidante en los frutos de chile habanero (*C. chinense* Cv. chocolate), la cual dependió del estadio, del tipo de extracto y según el método de determinación empleado. Con el método DPPH se observó la mayor actividad en los extractos metanólicos de los frutos en los tres estadios (inmaduro, intermedio y maduro) con 91.63%, 81.29% y 87.3%, respectivamente; la actividad antioxidante más alta determinada por ABTS también fue en este tipo de extracto, observando un 58.35% y 60.9% en los frutos de los estadios intermedio y maduro, respectivamente.

Con estos resultados es claro que la actividad antioxidante del extracto metanólico de fruto de chile habanero Cv. chocolate, fue dependiente principalmente del contenido de ácidos fenólicos y flavonoides. En los otros extractos, esta actividad se relaciona mayormente con el contenido de ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina.

La actividad antioxidante de *C. chinense* Cv. habanero fue similar a la mostrada por los cultivares comerciales amarillo y naranja, siendo el rojo el que presentó la actividad antioxidante más baja.

10. LITERATURA CITADA

Adams, D.O. y Harbertson J.F. (1999). Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wine. *American Journal Enology Viticulture*, 50:247-252.

Aguirre, H.E. y Muñoz O.V. (2015). El chile como alimento, *Ciencia*, 66(3):16-23.

Al-Shamma, A., Drake S.D., Guagliardi L.E., Mitscher L.A. y Swayze K.J. (1981). Antimicrobial alkaloids from *Boehmeria cylindrica*. *Phytochemistry*, 21(2): 485-487.

Almeda, L., Lopez-Roca J.M., Candela M.E. y Alcazar M.D. (1991). Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:1606-1609.

Alvarez-Parrilla, E., De la Rosa L.A., Amarowicz R. y Shahidi. F. (2011). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1):163-173.

Anogianaki, A., Negrev N.N., Shaik Y.B., Castellani M.L., Frydas S., Vecchiet J., Tete S., Salini V., De Amicis D., De Luttis M.A., Conti F., Caraffa A. y Cerrulli G. (2006). Capsaicin an irritant anti-inflammatory compound. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 2(6):1-4.

Archana, B., Nahasree D., Bratati De. (2005). In vitro study on antioxidant activity of *Syzygium Cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90:727-733.

Avello-Marcia, M.S. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494:161-172.

Bae, H., Jayaprakasha G.K., Crosby K., Yoo K.S., Leskovar D.I., Jifon J. y Patil B.S. (2014). Ascorbic acid, capsaicinoid, and flavonoid aglycone concentrations as a function of fruit maturity stage in greenhouse-grown peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33:195-202

Barreiro, P.M. (1998). Una hortaliza de México para el mundo. *Claridades agropecuarias*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 56:1-40.

Beckman, J.S, Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. y Freeman B.A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87:1620-1624.

Bigliardi, B. y Galati F. (2013). Innovation trends in the food industry. The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 31:118-129.

Brito-Argáez, L., Moguel S., Zamudio F., González E. e Islas F. (2009). Characterization of a *Capsicum chinense* seed peptide fraction with broad antibacterial activity. *Asian Journal of Biochemistry*, 4:77-87.

Butcher, J.D., Crosby K.M., Yoo K.S., Patil B.S., Ibrahim, A.M.H., Leskovar D.I. y Jifon J.L. (2012). Environmental and genotypic variation of capsaicinoid and flavonoid concentrations in Habanero (*Capsicum chinense*) peppers. *HortScience*, 47:574-579.

Calzada, J., Ciccio J.F. y Echandi G. (1980). Antimicrobial activity of the heliangolide chromolaenide and related sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 19:967-968.

Canto-Flick, A., Balam-Uc E., Bello-Bello J.J., Lecona-Guzmán C., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas S., Gómez-Uc E., López-Puc G. y Santana-Buzzy N. (2008). Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): hottest known cultivars. *Hortscience*, 43(5): 1344–1349.

Castro-Concha, L.A., Tuyub C.A., Moo M., Vázquez F.A. y Miranda M.L. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (habanero pepper) at different stages of ripening. *The scientific word journal*, January 2014-February 2014:1-5.

Caterina, M., Schumacher M., Tominaga M., Rosen T., Levine J. y Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389:816- 824.

Cerón, C.T., Munguía P.R., García S. y Santiesteban L.A. (2014). Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(2):215-221.

Cheyrier, V., Bouguet J.M., Le Roux E., Guyot S. y Rigaud J. (1999). Size separation of condensed tannins by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymol*, 299:178-184.

Cichewicz, R. H. y Thorpe P. A. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 52:61–70.

Choi, S.H.L., Bong-Soon S., Kozukue E., Kozukue N. Levin C. y Friedman M. (2006). Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers

and in pepper-containing foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:9024-9031.

Chuah, A.M., Lee Y.C., Yamaguchi T., Takamura H., Yin L.J. y Matoba T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of colored peppers. *Food Chemistry*, 111:20-28.

Cohen, S.D. y Kennedy J.A. (2010). Plant metabolism and the environment: Implications for managing phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50:620-643.

Collera-Zúñiga, O., Jiménez F.G. y Gordillo R.M. (2005). Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry*, 90:109-114.

Collins, A.R. y Harrington V. (2003). Antioxidants; not the only reason to eat fruit and vegetables. *Phytochemistry Reviews*, 1(2):167-174.

Decker, E., Beecher G., Slavin J., Miller I.I.E. y Marquart L. (2002). Whole grains as a source of extraction kinetics. *Phytochemical analysis*, 11(1):1-6.

Demrow P.R. y Slane J.D. (1994) Folts administration of wine grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*, 91:1182-1188.

Drago, S.M., Marisol L.L. y Sains E.T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Asociación Farmacéutica Mexicana. Distrito Federal México, 37(4):58-68.

Dwyer, J. (1996). Is there a need to change the American Diet? In: *Dietary Phytochemicals in Cancer Prevention and treatment*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 40(1):192-193.

Estrada, B., Bernal M.A., Diaz J., Pomar F. y Merino F. 2000. Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:6234–6239.

Fernández, R.V., Galiana L. y Sánchez M.C. (2004). Interna quality characterization of fresh tomato fruits. *Hort Science*, 39(2):339-345.

Fickel, J., Pitra C., Joest B.A. y Hofmann P.R. (1999). A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 122:225-229.

Fukumoto, L.R. y Mazza G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compound. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:3597-3604.

Galindo, W., Rosales M., Murgueitio E. y Larrahondo J. (1989). Sustancias antinutricionales en las hojas de árboles forrajeros. *Livestock Research for Rural Development*, 1(1):36-47.

Garcés-Claver, A., Arnedo A.S., Abadía J., Gil O. y Álvarez A. (2006). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54(25):9303-9311.

García, M.I., Lozano M., Montero de Espinoza V., Ayuso M.C., Bernalte M.J., Vidal-Aragón M.C. y Pérez M.M. (2007). Agronomic characteristics and carotenoids content of five bola-type paprika red pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 113:202-207.

García-Bacallao, L., García-Gómez L.V., Rojo-Domínguez D.M. y Sánchez-García E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(3):231-235.

Ghasemnezhad, M., Sherafati M. Y Payvast G.A. (2011). Variation in phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity of five colored bell pepper *Capsicum annuum* fruits at two different harvest times. *Journal of Functional Foods*, 3:44-49.

Giuffrida, D., Dugo P., Torre G., Bignardi C., Cavazza A., Corradini C. y Dugo G. (2013). Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. *Food Chemistry*, 140:794-802.

Govindarajan V.S. y Sathyanarayana M.N. (1991). *Capsicum*-production, technology, chemistry and quality. Part V. Impact on physiology, pharmacology, nutrition, and metabolism: structure, pungency, pain and desensitization sequences. *CRC Crit. Rev. International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 29:435-474.

Greenwald, R. (1990). Current approaches to the development of oxygen radical scavengers, in *Drugs of Today*, 26:299-307.

Guil-Guerrero, J.L., Martínez-Guirado C., Reboloso-Fuentes M.M. y Carrique-Pérez A. (2006). Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *European Food Research and Technology*, 224:1-9.

Gutiérrez, Y.I., Miranda M., Varona N. y Rodríguez A.T. (2000). Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (Quercetina) en *Psidium guajava* (L.). *Revista Cubana Farmarmacia*, 34(1):50-55.

Guyot S., Doco T., Bouguet J.M., Moutounet M. y Driliau J.F. (1997). Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry*, 44:351-357.

Guzmán-Maldonado, S.H. y Paredes-López O. (1998) Functional products of plants indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans, and botanicals. En: G. Mazza, ed. *Functional Foods. Biochemical and processing aspects*. Technomic Publishing Company Lancaster, USA, 293-328.

Hagerman, A.E. (1998). Tannin analysis [en línea]. Disponible en: <http://www.users.miamioh.edu/hagermae/tannin.pdf>

Hammerstone, J.F., Lazarus S.A., Mitchell A.E., Rucker R. y Schmitz H.H. (1999). Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:490-496.

Harborne, J. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman & Hall. London, UK. 200

Hornero, M.D., Costa G.J. y Minguéz-Mosquera M.I. (2002). Characterization of carotenoid high-producing *Capsicum annuum* cultivars selected for paprika production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(57):11-6.

Howard, L.R., Talcott S.T., Brenes C.H. y Villalon B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:1713-1720.

Hedqvist, H., Mueller-Harvey I., Reed J.D., Krueger C.G. y Murphy M. (2000). Characterization of tannins and in vitro protein digestibility of several *Lotus corniculatus* varieties. *Animal Feed Science and Technology*, 87:41-56.

Henao, M.L.A., Montoya P.A.Z., Cuadros Q.M.A., Henao D.C., Zapata P.A., López M.L., Castaño E., Serna L.A.M., Vanesa V.C., Loaiza M.C. y Davahiva G.B. (2009). Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 11(1):27-38.

Hernández-Ortega, M., Ortiz-Moreno A., Hernández-Navarro M.D., Chamorro-Cevallos G., Dorantes-Alvarez L. y Necochea-Mondragón H. (2012). Antioxidant, Antinociceptive, and anti-Inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 4(10):1-10.

Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi S.G. y Goñi I. (2010). Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:3399-3406.

Hidalgo, G.I. y Almajano M.P. (2017). Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Antioxidants*, 6(7):1-27.

Hufford, C.H., Sharma A.S. y Oguntimein B.O. (1980). Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(10):1180-1182.

Jayaprakasam, B., Vanisree M., Zhang Y., Dewitt D.L. y Nair M.G. (2006). Impact of alkyl esters of caffeic and ferulic acids on tumor cell proliferation, cyclooxygenase enzyme, and lipid peroxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:5375-5381.

Jurd, L., King A.D. y Mihara K. (1971). Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. *Phytochem*, 10:2965-2970.

Karamać, M., Kosińska, A. y Pegg, B.R. (2005). Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2):165-170.

Kim, D., Jeoung S. y Lee C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, (81) 321-326.

Kinsella, J.E., Frankel E., German B. y Kanner J. (1993). Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plants foods, *Food Technology*, 47:85-89.

Kumar, R., Singh S. y Singh O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35:377-391.

Kuskoski, E.M., Asuero A.G., Troncoso A.M., García-Padilla M.C. y Fett R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(4):691-693.

Labarbe, L., Cheynier V., Broussard F., Bouguet J.M. y Moutounet M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7):2719-2723.

Lambert, J. W. y Sum A. K. (2006). Molecular dynamics study of the properties of capsaicin in an 1-Octanol/Water System. *The Journal of Physical Chemistry*, 110:2351-2357.

Latournerie, M.L., Pérez G., Castañon S.A., Rodríguez L.M. y Ramirez P. (2002). Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annuum* L. y *Capsicum chinense* Jacq.) en Yaxcabá, Yucatán. Revista Fitotecnia Mexicana, 25:25-33.

Lazarus, S.A., Adamson G.E., Hammerstone J.F. y Schmitz H.H. (1999). High performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in food and beverages. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47:3693-3701.

Lee, J.J., Crosby K.M., Pike L.M., Yoo K.S. y Leskovar D.I. (2005). Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). Scientia Horticulturae, 106:341-352.

Lee, S.K. y Kader A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest Biology Technology, 20(3):207–220.

Lee, K.H., Ibuka T. y Wu R.Y. (1974). Beta unsubstituted cyclopentenone a structural requirement for antimicrobial and cytotoxic activities. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 22:2206-2208.

Lee, K.H., Ibuka T., Wu R.Y. y Geissman T.A. (1977). Structure-antimicrobial activity relationship among the sesquiterpene lactones and related compounds. Phytochemistry, 16:1177-1181.

Li, J., Ding S. y Ding X. (2005). Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube. Process Biochemistry, 48:3607-3613.

López, R.G. (2003). Chilli. La especia del Nuevo mundo. Ciencias. Universidad Autónoma de México Distrito Federal, México, 69:66-75.

López, V., Akerreta S., Casanova E., García-Mina J.M., Cavero R.Y. y Calvo M.I. (2007). *In vitro* antioxidant and anti-rhizopus activities of Lamiaceae herbal extracts. Plant Foods for Human Nutrition, 62:151-155.

Lourdes, G.B., Vicente G.G., Luis R.D., Delia M. y Elsa S.G. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 20(3):231-235.

Luo, X. y Peng J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. European journal, 660:1-7.

Lutz, M.,Hernández J. y Henríquez C. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. Journal of Food, 13(4):541-547.

Makkar, H.P.S. (1999). Quantification of tannins in trees foliage. A laboratory manual for the FAO/IAEA Coordinated Research Project on "Use of nuclear and related techniques to develop simple tannin assays for predicting and improving the safety and efficiency of feeding ruminants on tanniferous trees foliage". IAEA Working Document. IAEA, Vienna. p. 1-26.

Manirakiza, P., Covaci A., y Schepens P. (2003). Pungency principles in *Capsicum* –analytical determinations and toxicology. In: De, A. K. (ed) *Capsicum. The Genus Capsicum*. Taylor and Francis. London. pp: 71–86.

Marcia Avello, M.S. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494:161-172.

Materska, M. y Perucka I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1750-1756.

Mathur, R., Dangi R.S., Das S.C. y Malhotra R.C. (2000). The hottest chilli variety in India. *Current Science. India*, 79:287–288.

Medina-Juarez, L.A., Molina-Quyada D.M.A., Del Toro-Sanchez C.L., Gonzalez-Aguilar G.A. y Gamez-Meza N. (2012). Antioxidant activity of peppers (*Capsicum annuum* L) extracts and characterization of their phenolic constituents. *Interciencia*, 37:588–593.

Méndez, G. (1996). Estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar de *Cymbopogon citratus* (DC) stapf y sus extractos. (Tesis inédita de Maestría). IFAL. Ciudad de La Habana, Cuba. p. 36-8.

Menichini, F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo M.R., Conforti F., Statti G. De Cindio B., Houghton P.J. y Menichini F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, 114:553-560.

Miguel, M.G. (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 25:291-312.

Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández J. (1989). Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1):1-7.

Mitscher, L.A., Bathala M.S., Clark G.W. y Beal J.L. (1975). Antimicrobial agents from higher plants. The quaternary alkaloids of *Ptelea trifoliata*. *Lloydia*, 38(2):109-116.

Mochiutti, S. (1995). Comportamiento agronómico y calidad nutritiva de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. Bajo defoliación manual y pastoreo en el trópico húmedo. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. p. 144.

Montoya-Ballesteros, L.C., Gardea-Béjar A., Ayala-Chávez G.M., Martínez Núñez Y.Y. y Robles-Ozuna L.E. (2010). Capsaicinoides y color en chiltepín (*Capsicum annuum* var. *aviculare*). Efecto del proceso sobre salsas y encurtidos. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 9(2):197-207.

Moreno-Limón S., Guerra-Cantú J. A., Cárdenas-Ávila M. L., Núñez-González M.A., Gámez-González H. y Villarreal-Garza J.A. (2010). Determinación de carotenoides y clorofila en frutos de cuatro variedades de chile (*Capsicum* sp). XII congreso 52 nacional de ciencia y tecnología de alimentos. Jueves 27 y viernes 28 de mayo. Guanajuato, Gto. México.

Morrison, R.T. y Boyd R.N. (1990). Química orgánica. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco, México. 5ª edición. Pearson. pp. 325-329.

Mueller-Harvey, I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. Animal Feed Science and Technology, 91:3-20.

Moskovitz, J., Yim B.L. y Chock P.B. (2002). Free Radicals and Disease. Archives of Biochemistry and Biophysics, 397(2):354-359.

Naczk, M. y Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis, Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41:1523-1542.

Nagournay, R.A. (1998). Medicinal food or nutritious medicine? Journal of Medicinal Food, 1:13-28.

Nenadis, N., Lazaridou O. y Tsimidou M. (2007). Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:5452-5460.

Nguyen, M.L. y Schwartz S.J. (1999). Lycopene: chemical and biological properties. Food Technol, 53(1):38-45.

Núñez- López, H. (2013). Estudio del potencial bioactivo en partes no comestibles de plantas de chile (*Capsicum chinense*) asperjadas con peróxido de hidrógeno. Tesis profesional de licenciatura en ingeniería agroindustrial. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. México, p. 1-50.

Oboh, G. y Rocha J.B.T. (2008). Water extractable phytochemicals from *Capsicum pubescens* (tree pepper). Inhibit lipid peroxidation induced by different prooxidant agents in brain: *in vitro*. Eur Food Res Technol, 226:707-713.

Palamada, J. y Kehrer J. (1992). Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293:103-109.

Palencia, M.Y. (1999). Sustancias bioactivas en alimentos [en línea]. *Revista de la Universidad de Zaragoza, España*. Disponible en: www.unizar.es/med_naturista/bioactivos%20en%20alimentos.pdf

Pelayo, Z.C. (2003). Las frutas y hortalizas como alimentos funcionales. (Departamento de Biotecnología, División de CBS, UAM-I). http://www.infoalimentacion.com/documentos/las_frutas_y_hortalizas_como_alimentos_funcionales.asp.

Pérez, L.H. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(3):20-28.

Philip, T., Navar W.W. y Francis F.J. (1971). The nature of fatty acids and capsanthin esters paprika, *Journal of Food Science*, 36:98-102.

Pietarinen, S.P., Willfor S.M., Vikstrom F.A. y Holmbom B.R. (2006). Aspen knots, a rich source of flavonoids. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 26:245-258.

Porras-Loaiza, A. y López-Malo A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1):121-134.

Rahim, R.A. y Mat I. (2012) Phytochemical contents of *Capsicum frutescens* (Chili Padi), *Capsicum annuum* (Chili Pepper) and *Capsicum annuum* (Bell Peper) Aqueous Extracts. *International Conference on Biological and Life Sciences IPCBEE*, 40:164-167.

Rahman, K. (2003). Garlic and agin: new insights into an old remedy. *Ageing research. Reviews*, 2(1):57-93.

Ramírez, H., Mendoza-Castellanos J., Vázquez-Badillo M.E., Zermeño-González A. (2016). La prohexadiona de calcio (P-CA): una alternativa hormonal viable en chile habanero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(3):631-641.

Reyes-Escogido, M.L., Gonzalez-Mondragon E.G. y Vazquez-Tzompantzi E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, 16:1253-1270.

Robards, K., Prenler P.D., Tucker G., Swarsitang P. y Glover W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative Processes in fruit. *Food Chemistry*, 66(4):401-436.

Rodríguez, E., Towers G.H.N., Mitchel J.C. (1976). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15:1573-1580.

Rodríguez, M.A. (2013). Capacidad antioxidante de extractos de chile chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriosculum*) y su potencial en el biocontrol de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Universidad Autónoma de Baja California. Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California.

Roginsky, V. y Lissi E.A. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92:235-254.

Rowland, B.J., Villalom B. y Burns E.E. (1984). Capsaicin production in sweet bell and pungent jalapeño peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31:484-487.

Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S. y Pérez-Jiménez, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121:996-1002.

Ruiz-Lau, N., Lara F.M. y Estévez M.M. (2011). El chile Habanero: su origen y usos. *Ciencia*, julio-septiembre:70-77.

Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M. y Bruni R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91:621-632.

SAGARPA, (2012). México, potencia productora de chile. Boletín de Prensa. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/Boletines/Paginas/201208B058.aspx>.

Schofield, P., Mbugua D.M. y Pell A.N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91:21-40.

Schwarz, K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinonem M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L., y Tijburg L. (2001). Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*, (212):319-328.

Segura, M.R., Ramírez K.G., Moguel Y.O. y Betancur B.A. (2013). Polyphenoles, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of Habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruit. *Food nutrition sciences*, 4:47-54.

Shahidi, F. y Naczk M. (1995). Food Phenolics. Sources, chemistry, effects, applications. Technomic publishing. Co. Inc. Pensilvania. EE. UU. 105 p.

Shaimaa, G.A., Mahmoud M.S., Mohamed M.R. y Emam A.A. (2016). Phytochemical screening, antioxidant activities and *in vitro* anticancer potential of egyptian *Capsicum* spp. Biochem Pharmacol (Los Angeles), 5: 205

Singleton, V.L., Orthofer R. y Lamuela-Raventos R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol., 299:152-178.

Siró, L., Kápolna E., Kápolna B. y Lugasi A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance, a review. Appetite, 51:456-467.

Srinivasan, K. (2005). Spices as influencers of body metabolism: An overview of three decades of research. Food Research International, 38(1):77-86.

Teixeira-Souza, S.G., Haminiuk G.T.S, da Silva C.W.I., Ferreira-Zielinski A.A., Almeida-Gonçalves G., Bracht A. y Peralta R.M. (2015). A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and *in vitro* antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. J. Food Sci. Technol., 52(12): 8086-8094.

Teodoro, A.F., Alves R.B., Ribeiro L.B., Reis K. y Fonseca M.E. (2013). Vitamin C content in Habanero pepper accessions (*Capsicum chinense*). Horticultura Brasileira, 31:59-62.

Thornalley, P.J. y Vasak M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals, en Biochimica et Biophysica Acta, 827:36-44.

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

Towers, G.N.N. y Wat C.K. (1978). Biological activity of polyacetylenes. Revista Latinoamericana de Química, 9:162-170.

Tun, Dzul J.C. (2001). Chile Habanero. Características y tecnología de producción. SAGARPA, INIFAP, México. pp. 1-12.

Tripathi, S. y Mishra H.N. (2009). Nutritional changes in powdered red pepper upon *in vitro* infection of *Aspergillus flavus*. Brazilian Journal of Microbiology, 40:139-144.

Uccella, N. (2001). Olive biophenols: novel ethnic and technological approach. Trends in Food Science & technology, 11(9):328-339.

USDA. (1999). Nutrient data laboratory for standard reference. U.S. department of agriculture, agricultural research service. Beltsville human nutrition research center. NDLL bulletin board, 301:734-5078.

Usman, M.G., Rafii M.Y., Ismail M.R., Malek M.A. y Latif M.A. (2014). Capsaicin and dihydrocapsaicin determination in chili pepper genotypes using ultra-fast liquid chromatography. *Molecules*, 19(5):6474-88.

Valko, M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin T.D., Mazur M. y Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44-84.

Wahyuni, Y., Ballester A., Sudarmonowati E., Bino R.J. y Bovy A.G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in human diet. *Journal of natural products*, 76(4):783-793.

Waizel B.J. y Camacho R.M. (2011). El género *Capsicum* spp. (chile). Una versión panorámica. *Aleph zero*, 60:67-69.

Wall, M.M., Wadell C.A. y Bosland P.W. (2001). Variation in β - carotene and total carotenoid content in fruits of *Capsicum*. *Horticultural Science*, 36:746-749.

Waterhouse, A.L., Price S.F. y McCord J.D. (1998) Reversed-phase high-performance liquid chromatography methods for analysis of wine polyphenols. *Methods Enzymol*, 299:113-121.

Willis, R.B. y Allen P.R. (1998). Improved method for measuring hydrolysable tannins using potassium iodate. *Analyst*, 123:435-439.

Xu, X., Zhao Y. y Yan S. (2007). Optimization of Soxhlet extraction of capsaicinoids using orthogonal experiment. *Science Paper Online*, 1:1-7.

Yanishlieva, N.V., Marinova E. y Pokorný J. (2006): Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108:776–793.

Yao, P., Nussler A., Liu L., Hao L., Song F., Schirmeier A., y Nussler N. (2007). Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing hemo oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *Journal of Hepatology*, 47:253–61.