

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**Casa abierta al tiempo**

**Composición química proximal y evaluación de la  
capacidad antioxidante del chile de agua (*Capsicum  
annuum L.*).**

T E S I S

para obtener el grado de

Maestra en Biotecnología

P R E S E N T A

Emma Gabriela Antonio Marcos

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Marzo 2010

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el Número de registro 0471-O”

México D.F. a 09 de Marzo del 2010

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
Composición química proximal y evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua  
(*Capsicum annuum* L.)  
que presentó  
Emma Gabriela Antonio Marcos

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa

Asesor: Dr. Jorge Soriano Santos

Asesora: Dra. María Eva Rodríguez Huevo

Jurado:

Presidente: (Nombre, firma)

Dr. Jorge Soriano Santos

Secretario (Nombre y firma)

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Vocal: (Nombre y firma)

Dra. María Eva Rodríguez Huevo

Vocal: (Nombre y firma)

Dr. Ramón Soriano Robles

## AGRADECIMIENTOS

## RESUMEN

México se sitúa como uno de los países con mayor biodiversidad en todo el mundo, una de sus características es contar con flora y fauna endémica. Por lo que respecta a la flora endémica aún faltan muchos estudios para conocer su distribución y abundancia, así como sus propiedades alimenticias, tal es el caso del chile de agua (*Capsicum annuum* L.). En este trabajo se determinó su composición química proximal, y se evaluó su capacidad antioxidante. Las muestras analizadas de chile de agua fueron tres: en fresco, secado al natural (al sol) y secado en túnel. Para la evaluación del análisis químico proximal se utilizaron los métodos oficiales aprobados por la A.O.A.C. Todas las muestras se procesaron en base seca, los resultados mostraron que la humedad, el contenido graso fue mayor en la muestra en fresco y secado en túnel; el contenido de ceniza y de carbohidratos fue igual para las tres muestras; el contenido proteico fue diferente en todas las muestras y el contenido de fibra cruda fue mayor en las muestras en seco. Los resultados en base seca (BS) fueron: Humedad  $6.171 \pm 0.049$ ,  $6.17 \pm 0.057$ ,  $4.36 \pm 0.331$ ; Ceniza  $7.12 \pm 0.143$ ,  $6.77 \pm 0.059$ ,  $7.09 \pm 0.303$ ; Proteína  $18.29 \pm 0.115$ ,  $17.53 \pm 0.234$ ,  $16.72 \pm 0.154$ ; contenido graso  $1.13 \pm 0.015$ ,  $1.18 \pm 0.032$ ,  $2.57 \pm 0.154$ ; fibra cruda  $32.67 \pm 1.921$ ,  $28.14 \pm 0.948$ ,  $25.99 \pm 1.043$ ; carbohidratos 67.29, 68.35, 69.29 en fresco, secado en túnel y al natural, respectivamente.

Se determinó el contenido total de compuestos fenólicos en los extractos del chile de agua en fresco y seco por el método de Folin-Ciocalteu dando como resultado que el contenido de fenoles totales depende del estado del chile (en fresco y seco) y del tipo de disolvente usado para hacer la extracción (agua y mezclas agua – metanol. Los extractos de chile de agua en fresco tienen mayor contenido de polifenoles totales que en seco. Los datos obtenidos fueron:  $1,243.16 \pm 10.71$ ,  $786.37 \pm 70.47$ ,  $568.98 \pm 25.47$  en fresco, secado en túnel y al natural, respectivamente.

Se evaluó la capacidad antioxidante del chile de agua con dos técnicas químicas DPPH y decoloración del ABTS; y una enzimática ABTS/lacasa utilizando dos fuentes de lacasa DeniLite IIS y *Rhus vernicifera*. Los extractos para la evaluación antioxidante se hicieron en fresco con metanol al 100% y en las muestra secas (natural y túnel) se uso una mezcla de metanol-agua (50:50). El valor de la capacidad antioxidante de la muestra en fresco por el método DPPH es  $87.67 \pm 0.59$ , para las muestras en secado en túnel y natural se obtuvieron

los siguientes valores  $86.54 \pm 0.62$  y  $66.54 \pm 2.44$  respectivamente. Para el método de decoloración del ABTS se obtuvieron  $56.95 \pm 4.65$ ,  $57.5 \pm 7.04$  y  $45.35 \pm 2.22$ , en fresco, secado túnel y natural respectivamente. Para ambos métodos se evaluó también el contenido medio de la inhibición de los respectivos radicales ( $IC_{50}$ ). En las evaluaciones con el sistema ABTS/lacasa se obtuvieron los siguientes valores en el caso de la lacasa DeniLite IIS 281.52, 116.89 y 99.32 y para la lacasa *Rhus vernicifera* se obtuvieron los valores: 855.99, 281.7 y 49.74 en fresco, secado túnel y natural, para ambas en base seca respectivamente. Por lo tanto, la actividad antioxidante en el chile de agua es mayor en las muestras en fresco que en las muestras de chile secado en túnel y secado al natural.

De acuerdo a este estudio, se puede afirmar que los valores obtenidos por medio del análisis químico proximal del chile de agua, fueron similares a otras variedades de *C. annuum* reportadas. La principal diferencia del chile de agua respecto a otras variedades de *C. annuum*, es el contenido de humedad que tiene el chile de agua en fresco, ya que su media es mayor a la media reportada para otros chiles. En los diferentes métodos de evaluación de capacidad antioxidante que se realizaron para el chile de agua se tiene una tendencia mayor en las muestras de chile de agua en fresco, seguida de los chiles en secado en túnel y finalmente secado natural. Al igual que otras variedades de *C. annuum*, el chile de agua presenta actividad antioxidante, debido a los compuestos químicos que contiene en general el género *Capsicum*, tales como: capsaicinoides, compuestos fenólicos, pigmentos (carotenoides) y vitaminas (A, B, C y E). Este estudio demuestra que al chile de agua originario de los Valles Centrales de Oaxaca se le puede considerar como un alimento que puede aportar grandes beneficios a la salud de quien o quienes lo consuman debido a que posee una gran actividad antioxidante similar a otras variedades de *Capsicum* y a otras hortalizas.

ABSTRACT

Mexico is one of countries with greater biodiversity in the world; one of its features is the presence of endemic flora and fauna. With respect to the endemic flora still lacks many studies to know their distribution and abundance, as well as their nutritional properties, this is the case of “chile de agua” (*Capsicum annuum* L.). In this work, proximate chemical composition was determined and antioxidant capacity was evaluated. Three samples of “chile de agua” were analyzed: fresh, natural drying (sunlight) and artificial drying (air tunnel). Proximal chemical analysis of the three types of samples was carried out based on official methods approved by the AOAC. All samples were processed on a dry basis, the results showed that moisture and fat content was higher in the fresh and artificial dried samples, ash and carbohydrate content was the same for all samples, protein content was different in all samples and crude fiber content was higher in dry samples than fresh sample. The results in dry base (BS) were: Humidity  $6171 \pm 0049$   $6.17 \pm 0.057$ ,  $4.36 \pm 0.331$ ; ash  $7.12 \pm 0.143$ ,  $6.77 \pm 0.059$ ,  $7.09 \pm 0.303$ ; Protein  $18.29 \pm 0.115$ ,  $17.53 \pm 0.234$ ,  $16.72 \pm 0.154$ ; fat  $1.13 \pm 0.015$ ,  $1.18 \pm 0.032$ ,  $2.57 \pm 0.154$ ; crude fiber  $32.67 \pm 1.921$ ,  $28.14 \pm 0.948$ ,  $25.99 \pm 1.043$ ; carbohydrates 67.29, 68.35, 69.29 to fresh, artificial and natural dried, respectively.

Phenolic compounds of fresh and dry extracts of “chile de agua” was determined by the Folin-Ciocalteu method which gives evidence that total phenol content depends on the state of chili (fresh and dry) and the type of solvent used for extraction (water and mixtures of water – methanol). Extracts of fresh “chile de agua” have higher total polyphenol content than dry samples. Polyphenol content in samples were  $1,243.16 \pm 10.71$ ,  $786.37 \pm 70.47$ ,  $568.98 \pm 25.47$  to fresh, artificial and natural dried, respectively.

Antioxidant capacity of “chile de agua” was evaluated with two chemical techniques DPPH and ABTS bleaching, and one enzymatic system ABTS / laccase; for this last technique two sources of laccase *Rhus Vernicifera* and DeniLite IIS were used. Methanol 100% was used for extracts preparation of fresh sample and a mixture of methanol-water (50:50) was used for extracts preparation of drying samples. DPPH method for antioxidant capacity of fresh sample gave  $87.67 \pm 0.59$  while natural and artificial dried values were  $86.54 \pm 0.62$  y  $66.54 \pm 2.44$ , respectively. ABTS method for antioxidant capacity yielded  $56.95 \pm 4.65$ ,  $57.5 \pm 7.04$  y  $45.35 \pm 2.22$  values to fresh, artificial and natural dried, respectively. Two sources of laccase *Rhus Vernicifera* and DeniLite IIS for enzymatic system ABTS / laccase

was evaluated to know radical inhibition ( $IC_{50}$ ). DeniLite IIS source of laccase gave 281.52, 116.89 and 99.32 values and for *Rhus Vernicifera* source of laccase were obtained 855.99, 281.7 and 49.74 to fresh, artificial and natural dried in dry basis, respectively. Therefore, the antioxidant activity of “chile de agua” is higher in fresh sample than in artificial natural drying samples.

Proximate chemical composition of “chile de agua” was similar to others *C. annuum* varieties according to others articles reported in the literature. The main difference of the “chile de agua” in relation to other varieties of *C. annuum*, is the moisture content for fresh samples, since its mean is greater than those reported for other varieties. Antioxidant capacity tests performed for “chile de agua” showed that there is a greater antioxidant capacity in fresh samples than natural and artificial drying samples. “Chile de agua” showed similar antioxidant activity as others *C. annuum* varieties, maybe to contain an range of chemical compounds such as capsaicinoids, phenolic compounds, pigments (carotenoids) and vitamins (A, B, C and E) which are conspicuous to *Capsicum* genus. This study shows that farmers of Central Valleys of state of Oaxaca produce a fruit (chile de agua) with a great nutritive valor, which can it considered as a food that can offer significant health benefits for consumers with antioxidant activity similar to other varieties of *Capsicum* and other vegetables.

## ÍNDICE GENERAL

### RESUMEN

### ABSTRACT

<b>1.-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1. Análisis proximal.....	2
2.1.1 Humedad. ....	3
2.1.2 Proteína cruda ....	3
2.1.3 Extracto etéreo o grasa.....	3
2.1.4 Materia mineral.....	3
2.1.5 Fibra cruda .....	3
2.2 Estrés oxidativo y daño celular.....	4
2.3 Especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO). ....	5
2.3.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) .....	7
2.4 Antioxidantes .....	9
2.4.1 Fuentes no enzimáticas de antioxidantes .....	9
2.4.1.1 Compuestos fenólicos.....	10
2.4.2 Mecanismo de acción de los antioxidantes. ....	11
2.5 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante .....	12
2.5.1 Ensayos de capacidad antioxidante.....	13
2.5.1.1 Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu (FC).....	14
2.5.1.2 Ensayo de la capacidad antioxidante del radical DPPH .....	15
2.5.1.3. Decoloración del catión radical ABTS .....	16
2.5.1.3.1 Propiedades fisicoquímicas del ABTS.....	17
2.5.1.4 Sistema ABTS/lacasa .....	18

2.5.1.4.1 Lacasa (EC 1.10.3.2) .....	19
2.5.1.4.1.2 Propiedades físico-químicas de la lacasa. ....	20
<b>3. Chile de agua (Capsicum annum).....</b>	<b>21</b>
3.1. Antecedentes del chile de agua (Capsicum annum).....	21
3.1.1 Producción mundial y nacional de chile (Capsicum) .....	22
3.1.2 Historia del chile (Capsicum) en el estado de Oaxaca. ....	24
3.2 Características estructurales y fisiológicas del chile (Capsicum).....	26
3.2.1 Características físicas del chile (Capsicum) .....	26
3.2.2 La composición química del género Capsicum.....	26
3.2.3 Característica de la planta del chile de agua (C. annum).....	28
3.3 Cultivo y productividad del chile de agua (C. annum).....	29
<b>4 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>5 HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>6 OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
6.1.1 Objetivo general: .....	33
6.1.2. Objetivos específicos: .....	33
<b>7 METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
7.1. Material vegetal. ....	34
7.2 Análisis químico bromatológico. ....	34
7.2.1 Preparación de las muestras. ....	35
7.2.2 Humedad.....	35
7.2.3 Ceniza.....	35
7.2.4 Proteína cruda .....	35
7.2.5 Extracto etéreo o graso	36
7.2.6 Fibra cruda	36
7.3 Extracción.	36

7.4 Cuantificación de fenoles totales. ....	37
7.5 Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH. ....	37
7.6 Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS. ....	38
7.7 Evaluación de la capacidad antioxidante por el sistema ABTS/lacasa. ....	39
7.7.1 Sistema ABTS/lacasa DeniLite IIS. ....	39
7.7.1.1 Preparación de los extractos del chile de agua.....	39
7.7.1.2 Solución lacasa DeniLite IIS ....	39
7.7.1.3 Curva estándar. ....	39
7.7.1.4 Evaluación de la capacidad antioxidante. ....	39
7.7.2 Sistema ABTS/lacasa Rhus vernicifera ....	40
7.7.2.1 Preparación de los extractos del chile de agua ....	40
7.7.2.2 Solución de lacasa Rhus vernicifera ....	40
7.7.2.3 Curva estándar. ....	40
7.7.2.4 Evaluación de la capacidad antioxidante ....	40
<b>8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>41</b>
8.1 Análisis proximal.....	41
8.1.1 Determinación de humedad. ....	41
8.1.2 Determinación de ceniza.....	41
8.1.3 Determinación de proteína. ....	41
8.1.4 Determinación de grasa. ....	42
8.1.5 Determinación de fibra cruda. ....	42
8.1.6 Comparación del análisis bromatológico del chile de agua (C. annum L.) con otras especies del género Capsicum. ....	43
8.2 Cuantificación de fenoles totales del chile de agua ....	44
8.3 Evaluación de la capacidad antioxidante DPPH. ....	46
8.3.1 Por ciento de inhibición del radical DPPH.....	46

8.3.2 IC50 del la evaluación del ensayo DPPH. ....	47
8.4 Evaluación de la capacidad antioxidante ABTS. ....	49
8.4.1 Por ciento de inhibición del radical ABTS.....	49
8.4.2 IC50 del la evaluación del ensayo ABTS. ....	50
8.5 Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua por el sistema ABTS/lacasa (DeniLite IIS).....	51
8.6 Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua en el sistema ABTS/lacasa (Rhus vercinifera).....	53
<b>9 CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>57</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

**Figura 1.** Desequilibrio entre las defensas antioxidantes del organismo y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

**Figura 2.** Distribución electrónica del oxígeno molecular o triplete y del oxígeno singlete.

**Figura 3.** Distribución electrónica del oxígeno en especies reactivas del oxígeno (ERO).

**Figura 4.** Fuentes y consecuencia de las especies reactivas de oxígeno (ERO)

**Figura 5.** Antioxidantes enzimáticos (endógenos) y no enzimáticos (exógenos).

**Figura 6.** Enzimas antioxidantes endógenas.

**Figura 7.** Reacciones básica de los antioxidantes.

**Figura 8.** Ensayos *in vitro* para medir la capacidad antioxidante.

**Figura 9.** El DPPH en su forma radical y no radical.

**Figura 10.** Radical DPPH y sal de ABTS.

**Figura 11.** Radical catiónico y dicatiónico del ABTS.

**Figura 12.** Ciclo catalítico de las lacasas.

**Figura 13.** Propiedades físicas y químicas de la lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (Lip).

**Figura 14.** Mapa 1. Muestra las ubicaciones de las cuevas de Guilá Naquitz y de Silvia en el Valle de Oaxaca y la ubicación del Valle de Tehuacán (Perry, L., Flannery, K.V. 2007).

**Figura 15.** Capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida).

**Figura 16.** Planta de chile de agua: tallos de forma cilíndrica, limbo de color verde, corola de color blanco, frutos verdes-amarillentos.

**Figura 17.** a) Frutos inmaduros                      b) Frutos maduros.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Productos alimenticios con alto contenido de antioxidantes fenólicos.

**Tabla 2.** Cuantificación de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico por cada 100g de muestra vegetal en fresco (Yi-Fang, C. et al. 2002) y en peso seco (Stratil, p. et al. 2006, Santas, J. et al. 2008).

**Tabla 3.** Principales estados productores de Chile. Fuente: Goycoolea, A. 2008.

**Tabla 4.** Bromatológico de algunas variedades de *Capsicum* (Azurdia, C. 2009, De, A. K. 2003).

**Tabla 5.** Contenido de humedad del Chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

**Tabla 6.** Porcentaje de ceniza del Chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

**Tabla 7.** Contenido proteico del Chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

**Tabla 8.** Contenido graso o extracto etéreo del Chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

**Tabla 9.** Contenido de fibra cruda del Chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

**Tabla 10.** Análisis bromatológico del Chile de agua fresco, secado natural y túnel, en base seca (BS).

**Tabla 11.** Contenido de polifenoles totales del Chile de agua fresco y seco en comparación con otras variedades de *Capsicum*.

**Tabla 12.** Contenido de polifenoles totales en base seca (BS) del Chile de agua (*Capsicum annuum*) fresco y seco en túnel y natural.

**Tabla 13.** Capacidad antioxidante determinada para el Chile de agua con el método de reducción DPPH, en comparación con Chile serrano verde y rojo.

**Tabla 14.** Valores de IC<sub>50</sub> del ensayo DPPH expresados en mg/L, para cada muestra.

**Tabla 15.** Valor IC<sub>50</sub> del extracto polifenólico del Chile de agua en comparación con el Chile serrano

**Tabla 16.** Valores de la Capacidad antioxidante evaluada con el método de reducción, ABTS para el Chile de agua y pimiento rojo.

**Tabla 17.** Valores de IC<sub>50</sub> del ensayo ABTS expresados en mg/L, para cada muestra.

**Tabla 18.** Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua por el sistema ABTS/lacasa (DeniLite IIS) en peso fresco (extracto diluido) y en peso seco (extracto sin diluir).

**Tabla 19.** Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua por el sistema ABTS/lacasa (*Rhus verticillifera*) en peso fresco (extracto diluido) y en peso seco (extracto sin diluir).

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

**Gráfica 1.** Producción mundial de chile, 2006.

**Gráfica 2.** Contenido total de polifenoles (mg/100g) de chile de agua. Se muestra el valor promedio de tres réplicas así como su  $\pm$ DS. (En base seca).

**Gráfica 3.** Capacidad antioxidante evaluada por el método de reducción del DPPH.

**Gráfica 4.** Por ciento de inhibición de DPPH obtenido a diferentes concentraciones de polifenoles (mg AGE/L).

**Gráfica 5.** Capacidad antioxidante de las muestras de chile de agua evaluadas por el método de reducción del ABTS.

**Gráfica 6.** Por ciento de inhibición del radical ABTS obtenido a diferentes concentraciones de polifenoles (mg AGE/L).

**Gráfica 7.** Curva estándar con lacasa DeniLite IIS a diferentes concentraciones de ácido gálico contra el tiempo lag.

**Gráfica 8.** Curva estándar con lacasa *Rhus vernicifera* a diferentes concentraciones de ácido gálico contra el tiempo

## 1.- INTRODUCCIÓN

Los estudios de composición química son el punto de partida para entender el proceso fisiológico de los alimentos. El método convencional de evaluación usado para determinar las sustancias nutritivas de origen vegetal o animal es llamado análisis proximal o análisis químico proximal. El propósito principal de un análisis proximal es determinar, en un alimento, el contenido de humedad, grasa, fibra, proteína y cenizas. Estos procedimientos químicos revelan también el valor nutritivo de un producto y como puede ser combinado de la mejor forma con otras materias primas para alcanzar el nivel deseado de los distintos componentes de una dieta. Es también un excelente procedimiento para realizar control de calidad y determinar si los productos terminados alcanzan los estándares establecidos por los productores y consumidores (Tejada H.I. 1992).

El mundo de los “antioxidantes” es un tema de moda en la sociedad actual ya que los medios de publicidad se han encargado de darle una gran cobertura de los beneficios que aportan estos a la salud humana. Se han realizado estudios clínicos y epidemiológicos que ha establecido que hay una correlación proporcional entre el consumo de frutas y verduras y la prevención de enfermedades cardiovasculares, inflamaciones, cáncer y desordenes relacionados al envejecimiento (Verma, N. et al, 2008, Pérez-Jiménez J., 2008).

Como las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por las condiciones ambientales que las rodean tales como la radiación solar, estas pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes (Bafna AR y Mishra SH, 2005, Verma, N. et al, 2008 ). La naturaleza ofrece una gran oportunidad para el descubrimiento de nuevos compuestos naturales con diversas actividades, especialmente en aquellos lugares con una flora autóctona (Monge, A. et al, 2001). Como es el caso chile de agua (*Capsicum annuum* L), que es endémico de la región de Valles Centrales en el estado de Oaxaca.

Para evaluar la actividad antioxidante existen diferentes métodos (Huang et al. 2005), debido a que todavía no existe una homogenización en la metodología, entre los más utilizados se encuentran los siguientes métodos: decoloración del ABTS, capacidad de

absorción del radical oxígeno (ORAC), entre otros más. Para determinar el contenido de compuestos fenólicos se usa comúnmente el método de Folin-Ciocalteu. La mayoría de estos métodos generan desechos químicos lo que causa un problema ambiental, por lo cual sería deseable implementar métodos que no contaminen o que lo hagan de una manera moderada, como es el caso del sistema ABTS/lacasa.

## **2. ANTECEDENTES**

### ***2.1. Análisis proximal.***

El análisis de alimentos ha sido practicado por el hombre desde hace muchos años, a los cuales se les podría llamar análisis organolépticos. Sin embargo, el análisis cuantitativo de los componentes de un alimento probablemente se inició hasta 1975, en Inglaterra, cuando Pearson determinó las proporciones del agua del almidón, materia fibrosa, materia extractiva y cenizas en las papas, reconociendo también la presencia de grasas, ácidos y azúcares. Un gran avance tuvo lugar entre 1859-1861. Henneberg y sus colaboradores en la estación agrícola Weende, Alemania, elaboraron los métodos para análisis próximo o proximal de un alimento.

El análisis proximal solo da un estimado de un grupo de ciertos componentes como: materia volátil, humedad, cenizas, materia nitrogenada, etc. Por lo que se podría definir el análisis proximal como “un análisis químico mediante el cual se determina la composición de un alimento en términos de sus principales grupos de nutrientes”.

A pesar de las limitaciones que tiene el análisis proximal se ha utilizado por más de un siglo como el punto de partida de la evaluación de un alimento. El análisis proximal consta de las siguientes determinaciones: humedad, proteína cruda, materia mineral o cenizas, grasa cruda o extracto etéreo, fibra cruda y por diferencia a 100, extracto libre de nitrógeno (Tejada H.I. 1992).

### **2.1.1 Humedad.**

El agua en un ser vivo generalmente es un nutrimento esencial. Sin embargo el agua no contribuye al valor nutritivo de un alimento, excepto en condiciones especiales de aridez. Por el contrario diluye el contenido de los nutrientes sólidos y lo hace más susceptibles de sufrir fenómenos de descomposición por enzimas tisulares, bacterias u hongos.

### **2.1.2 Proteína cruda**

Los métodos de cuantificación de proteína se basan en medir el nitrógeno, ya que una de las características de las proteínas es que tienen nitrógeno en su estructura. Cuando la muestra tiene nitrógeno no proteico, por ejemplo de urea, el método de Kjeldahl puede sobreestimar el contenido de proteína.

### **2.1.3 Extracto etéreo o grasa**

Los aceites y las grasas se extraen de las muestras secas con disolventes orgánicos, hexano, éter de petróleo o etílico. Por este método se extraen también otras sustancias solubles como ceras y pigmentos. En el caso de forrajes verdes ricos en clorofila y pigmentos dicho método contabiliza el contenido de dichos pigmentos con el contenido de grasa.

### **2.1.4 Materia mineral**

Es la eliminación de la materia orgánica y el agua. Nutricionalmente carece de valor, ya que no especifica que elementos tiene y la cantidad en la que se encuentra. Sin embargo, es el punto de partida en la determinación de minerales específicos, además es parte del cálculo de la materia orgánica de un alimento.

### **2.1.5 Fibra cruda**

Es una mezcla heterogénea de glúcidos (celulosa y hemicelulosa) y otros materiales como lignina, esencialmente indigeribles por animales de estómagos simple. Realmente en

este método se digiere como el 80% de hemicelulosa, 20-50% de celulosa y de 50-90%, por lo cual se sobreestima el contenido de fibra cruda (Tejada H.I. 1992).

## **2.2 Estrés oxidativo y daño celular.**

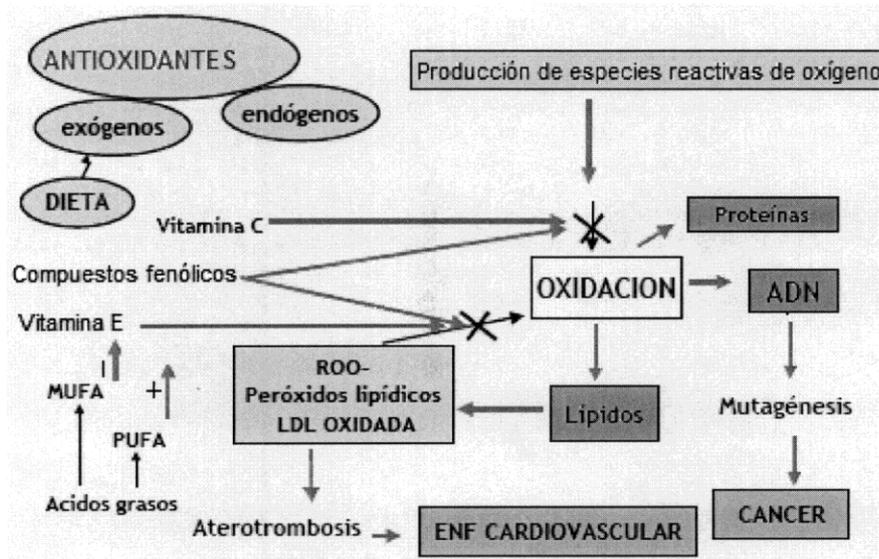
El estrés oxidativo es el desequilibrio que se produce en el organismo entre sustancias oxidantes, principalmente especies reactivas del oxígeno (ERO), y antioxidantes, puede producir daños celulares que desencadenen diversos procesos patológicos (figura 1).

El estrés oxidativo es determinado en el cuerpo midiendo la peroxidación lipídica (Nälsen *et al.*, 2006), de hecho, es la evidencia citada con más frecuencia para sustentar el efecto de las reacciones de radicales libres en una enfermedad (Gutteridge, 1995).

El estrés oxidativo causa daño en las biomoléculas como en: 1) proteínas, los oxidantes provocan cambios conformacionales, así como, daños a los aminoácidos terminales. 2) La oxidación de azúcares y polisacáridos por acción de radicales se lleva a cabo típicamente por abstracción de átomos hidrógeno (H) de múltiples sitios (Burkitt, 2004). 3) Los ácidos nucleicos pueden sufrir hidroxilación de bases nitrogenadas y rompimiento de hebras al interactuar con especies reactivas del oxígeno, dando lugar a mutaciones, carcinogénesis, pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, etc. 4) La peroxidación lipídica es provocada por el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el anión superóxido, este último, rompe los lípidos de la membrana plasmática provocando alteraciones que modifican su permeabilidad, lo que resulta en edema y muerte celular.

El daño a las células provocado por la acción de los radicales libres sobre las biomoléculas ha favorecido la aparición de diversas enfermedades como: varios tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el mal de Parkinson, envejecimiento prematuro, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, etc. (figura 1, Fuente modificada: Fitó C. Montserrat., 2003). De ahí el creciente interés de la ciencia y la industria farmacéutica por obtener sustancias de origen natural (Verma, N. et al, 2008)

encaminadas a la prevención y tratamiento de estas alteraciones producidas por los ERO. Entre estas sustancias destacan los compuestos fenólicos, con reconocidas propiedades antioxidantes (Yu-Tang, T. et al. 2009) y su posible papel en la prevención de estas enfermedades.



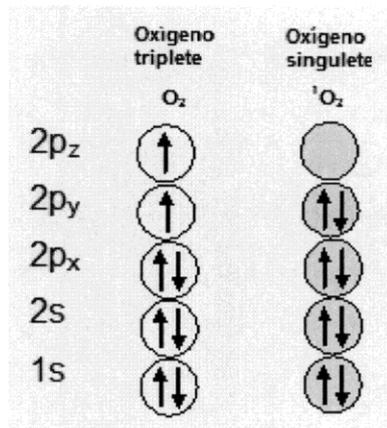
**Figura 1.** Desequilibrio entre las defensas antioxidantes del organismo y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Pero para un mejor entendimiento de lo que sucede cuando se genera estrés oxidativo, es necesario entender cuáles son las especies reactivas de oxígeno y cuáles son las moléculas que tienen propiedades antioxidantes.

### **2.3 Especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO).**

El oxígeno está presente en el aire en la forma de oxígeno diatómico ( $O_2$ ) ó dioxígeno. El porcentaje de oxígeno en el aire seco es de aproximadamente 21%. El oxígeno también está presente como parte de las moléculas de agua, por lo que lo hacen el elemento más abundante en el planeta (Gutteridge, 1995).

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable ( $O_2$ ), con los electrones que forman el enlace ( $p$ ), con dos electrones no apareados, con espines paralelos localizados en orbitales moleculares diferentes (Figura 2), es decir, en lo que se conoce como estado triplete, así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja.

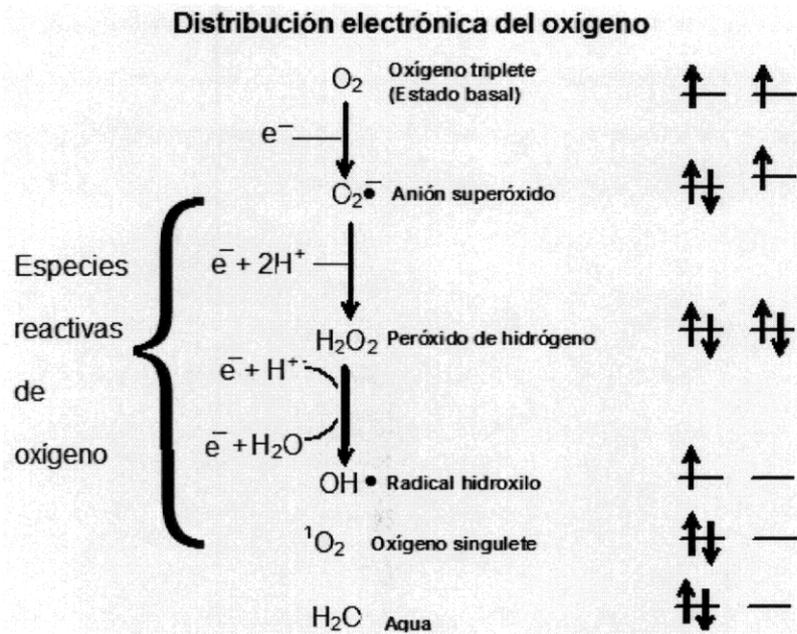


**Figura 2.** Distribución electrónica del oxígeno molecular o triplete y del oxígeno singlete.

Bajo condiciones normales, el oxígeno molecular es un gas incoloro, inodoro e insípido que se disuelve en agua en una relación de tres volúmenes de gas por cada cien volúmenes de líquido. El oxígeno al reaccionar forma especies parcialmente reducidas que presentan una elevada reactividad y una vida corta, a las cuales se les ha identificado con el nombre de especies reactivas del oxígeno ó ERO (Huang et al. 2005).

El término ERO (reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno) incluye a los radicales libres derivados del oxígeno y a otras especies que no son radicales pero que pueden participar en la formación de los mismos (Avello, M. y Suwalsky M., 2006). Las principales especies reactivas del oxígeno se aprecian en la figura 3.

Los radicales libres derivados del oxígeno se pueden generar a nivel intracelular o extracelular por modificación del sentido de rotación de sus electrones más externos, o por la adición sucesiva de electrones al oxígeno molecular, debido a mecanismos como la respiración y diversas reacciones de oxidación – reducción.



**Figura 3.** Distribución electrónica del oxígeno en especies reactivas del oxígeno (ERO).

Debido a su elevada energía y a su baja estabilidad, los radicales libres liberan parte de esa energía al reaccionar con otras moléculas. Muchas veces dichas reacciones generan más radicales libres, que al acumularse pueden provocar daño al ADN y a las membranas celulares, contribuyendo de esta manera a la aparición de diversas enfermedades (Huang et al. 2005).

### 2.3.1 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)

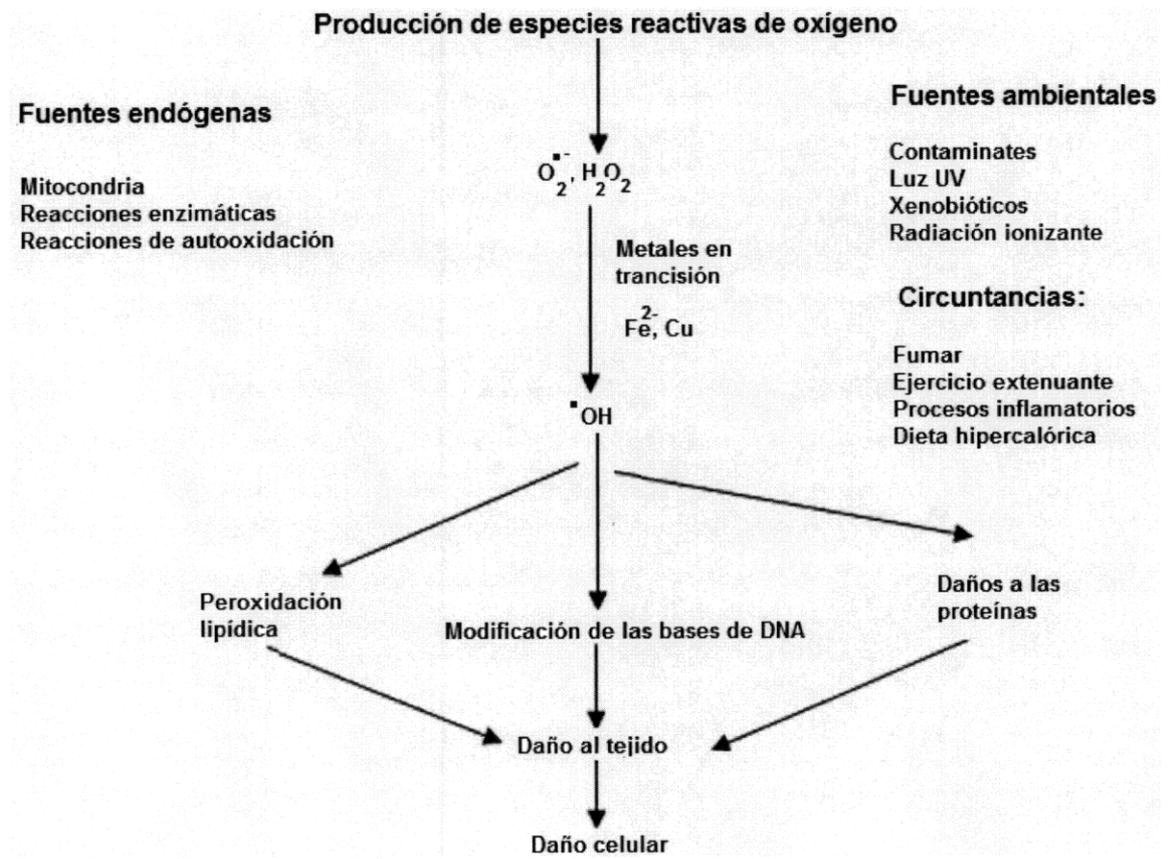
El término especies reactivas del oxígeno (ROS o ERO) se aplica colectivamente a las moléculas radicales y no radicales que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales (Avello, M. y Suwalsky M., 2006).

Existen numerosos sitios de oxidación en el organismo, sin embargo se han reconocido cuatro fuentes endógenas que parecen ser las más importantes en la producción de oxidantes a nivel celular. 1) Transporte de electrones en la mitocondria; como consecuencia del proceso normal de la respiración aerobia. 2) Células fagocíticas, que se encargan de la destrucción de bacterias o células infectadas con virus, al aplicar una descarga oxidativa de  $NO^{\bullet}$ ,  $O_2^{\bullet -}$ ,  $H_2O_2$  y  $HOCl$  (Avello, M. y Suwalsky M., 2006). 3)

Metabolismo peroxisomal de ácidos grasos, que degradar los ácidos grasos y otras moléculas producen  $H_2O_2$  como subproducto (Fitó C. Montserrat. 2003), 4) Reacciones del citocromo P-450, previene efectos tóxicos de químicos externos, pero generan subproductos oxidantes.

Los radicales libres se generan a nivel intracelular y extracelular. Entre las células relacionadas con la producción de radicales libres del oxígeno se tienen los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y las células endoteliales (Venereo, 2002).

La formación de radicales en el cuerpo ocurre mediante varios mecanismos que involucran factores endógenos y ambientales (Avello, M. y Suwalsky M., 2006). Aún cuando la formación de radicales libres ocurre como consecuencia de las reacciones endógenas mencionadas anteriormente, es importante recordar que los factores ambientales exógenos también promueven la formación de radicales (Figura 4).



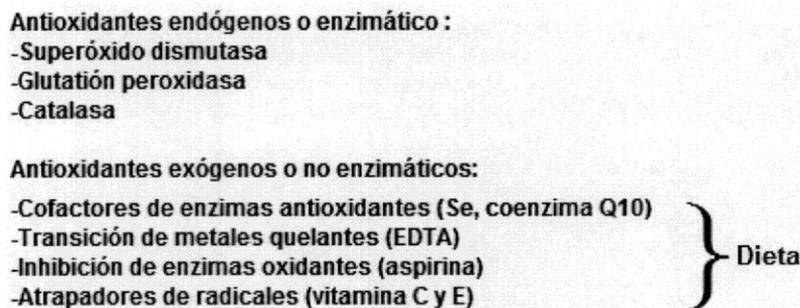
**Figura 4.** Fuentes y consecuencia de las especies reactivas de oxígeno (ERO)

## 2.4 Antioxidantes

Se puede definir a un antioxidante como la sustancia natural o sintética que previene o retarda los efectos ocasionados por los radicales libres. Los antioxidantes permiten que no se produzcan las especies reactivas de oxígeno, estos actúan principalmente en reacciones de terminación de cadena de radicales libres de forma que impiden las consecuencias de su actividad.

Los efectos de los radicales libres están controlados en el organismo humano mediante un amplio espectro de antioxidantes de origen endógeno (enzimas antioxidantes, albúmina, ácido úrico, etc) y exógenos (figura 5) a través de la dieta (vitamina E y C, pigmentos, selenio, compuestos fenólicos y flavonoides) se muestran algunos ejemplos de antioxidantes (Zamora, 2007; Avello, M. y Suwalsky M., 2006; Fitó C. Montserrat., 2003; García Bacallao L., 2001).

En las células vegetales existen antioxidantes hidrosolubles como liposolubles. Los principales antioxidantes de naturaleza hidrosoluble que controlan la homeostasis redox son el ácido ascórbico, el glutatión y diversos compuestos fenólicos y, los liposolubles son los tocoferoles y los carotenoides (Pérez Tortosa, 2008).



**Figura 5.** Antioxidantes enzimáticos (endógenos) y no enzimáticos (exógenos).

### 2.4.1 Fuentes no enzimáticas de antioxidantes

Los alimentos de origen vegetal en especial las frutas y los vegetales presentes en la dieta de acuerdo a estudios epidemiológicos realizados, pueden ejercer un efecto protector contra algunas enfermedades tales como el cáncer y trastornos cardiovasculares. Esta

propiedad se debe a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante como la vitamina C, E,  $\beta$ -caroteno, y una mezcla compleja de compuestos fenólicos (Padilla et al., 2008, Verma, N. et al, 2008, Zamora, 2007).

#### 2.4.1.1 Compuestos fenólicos.

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad como mecanismos de defensa ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc).

Los polifenoles en las plantas se encuentran generalmente como derivados glucosilados o sulfatados y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis catalizando el transporte de electrones (Tabla 1). Estos compuestos han sido reconocidos como potentes antioxidantes con propiedades citoprotectoras y antiinflamatorias (Yu-Tang, T. et al. 2009; Avello, M. y Suwalsky M., 2006). Por todo esto es importante consumir en la dieta diferentes vegetales, que contengan polifenoles (Tabla 2). Los polifenoles poseen partes hidrofílicas e hidrofóbicas que les permiten actuar contras las especies reactivas del oxígeno producidas tanto en medio acuoso, como en medio lipídico. Las propiedades antioxidantes de los polifenoles incluyen: neutralización directa (al actuar como agentes reductores) de  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{ROO}\bullet$ ,  $\text{ONOOH}$  y  $\text{HOCl}$ ; conservación de la actividad paraoxonasa sérica (PON), favoreciendo la hidrolización de LDL (lípidos de baja densidad)-oxidada (Gracia, 2007).

**Tabla 1.** Productos alimenticios con alto contenido de antioxidantes fenólicos.

Producto	Antioxidante
<b>Aceitunas</b>	Polifenoles
<b>Café</b>	Esteres fenólicos
<b>Cebollas</b>	Quercetina, camferol
<b>Cítricos y otras frutas</b>	Bioflavonoides, chalconas
<b>Frijol de soya</b>	Isoflavonas, ácidos fenólicos
<b>Pimientos</b>	Polifenoles
<b>Romero</b>	Ácido carnósico, ácido rosmárico
<b>Té verde, té negro</b>	Polifenoles, catequinas
<b>Vino tinto</b>	Ácidos fenólicos, polifenoles

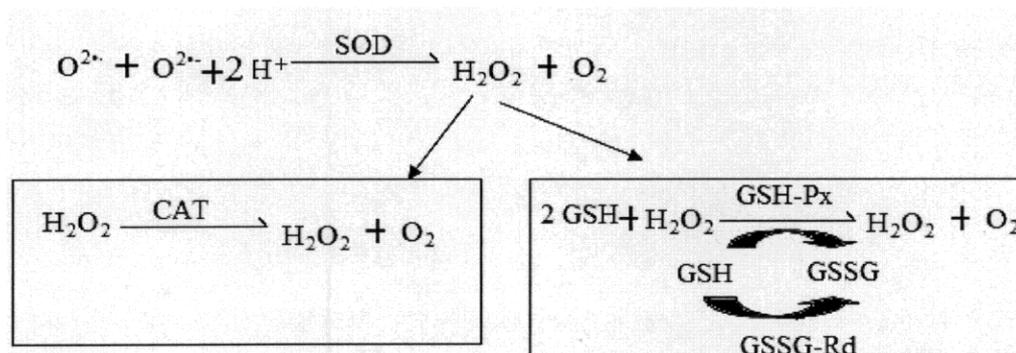
**Tabla 2.** Cuantificación de polifenoles totales en equivalentes de ácido gálico por cada 100g de muestra vegetal en fresco (Yi-Fang, C. et al. 2002) y en peso seco (<sup>a</sup>Stratil, p. et al. 2006, Santas, J. et al. 2008).

Vegetales	Polifenoles totales. (mg AGE/100g de muestra en peso fresco)	Polifenoles totales. (mg AGE/g de muestra en peso seco)
<b>Brócoli</b>	101.6 ±1.24	--
<b>Espinaca</b>	90.99±8.49	<b>15.5</b>
<b>Cebolla</b>	76.28±1.97	<sup>a</sup> <b>6.33±0.36</b>
<b>Zanahoria</b>	56.47±5.1	<b>9.9</b>
<b>Col</b>	54.63±7.02	<b>11</b>
<b>Papa</b>	38.79±5.93	<b>4.5</b>
<b>Pimiento rojo</b>	<b>65.87±5.55</b>	<b>12.6</b>

### 2.4.2 Mecanismo de acción de los antioxidantes.

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa combatiendo a los radicales libres mediante dos mecanismos:

- 1) Entre los componentes del sistema antioxidante endógeno destacan las enzimas antioxidantes. En la figura 6 están representadas las distintas vías metabólicas de acción de estas enzimas. Las reacciones de las enzimas endógenas que se muestran en la figura 6 son: SOD, supéroxido dismutasa; CAT, catalasa; GSH-Px, glutatión peroxidasa; GSSG-Rd, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado (sustratos: modificar); PON, paroxanasa (Fitó C. Montserrat. 2003).



GSH + peróxidos orgánicos -----> compuestos más hidrosolubles

PON: hidroliza los peróxidos de lípidos

**Figura 6.** Enzimas antioxidantes endógenas.

2) La cinética básica de los antioxidantes. La química y la cinética de inhibición de autoxidación de hidrocarburos. La autoxidación típica, inicia con compuestos azoicos, y la acción de sus inhibidores de incluir los siguientes elementos (suponiendo un antioxidante, dos radicales y oxígeno en exceso; R<sub>2</sub>N<sub>2</sub>=compuestos azoicos; LH= sustrato; AH=antioxidante) se muestra en la figura 7 (Huang et al 2005):

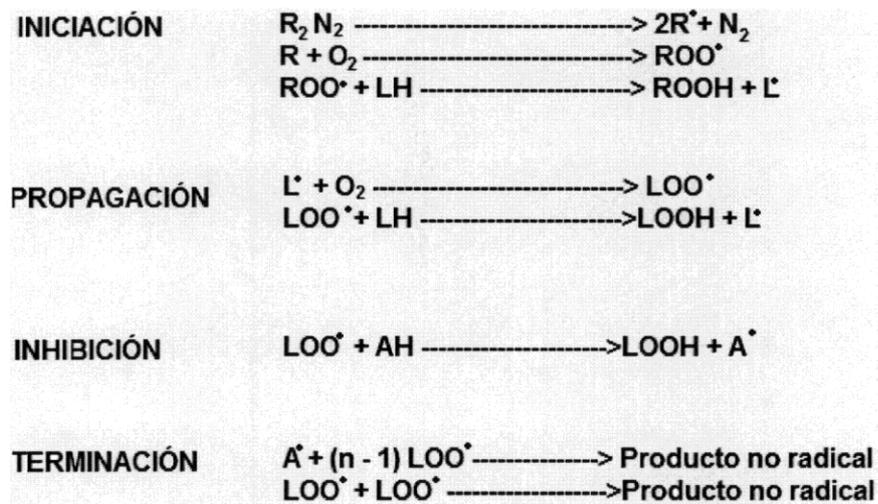


Figura 7. Reacciones básica de los antioxidantes.

## 2.5 Métodos para evaluar la capacidad antioxidante

Los nutriólogos y los médicos especialistas, así como, los investigadores en ciencias de la salud y de los alimentos les resulta de gran importancia conocer la capacidad antioxidante y los constituyentes de los alimentos que consumimos.

Examinando los trabajos científicos sobre los antioxidantes, se encontraron varios términos utilizados por los investigadores para definir la capacidad antioxidante. Los términos que se pueden encontrar incluyen “capacidad” total de antioxidante (o eficiencia, poder, parámetro, potencial, potencia y actividad). La “actividad” de productos químicos no tienen sentido sin el contexto de las reacciones con la presión, temperatura, reacción media, correcta y puntos de referencia. Debido a que los ensayos de actividad antioxidante son medidos por un individuo, refleja solo la reactividad química del ensayo en virtud de

las condiciones específicas que se aplican, no es apropiado generalizar los datos como indicadores de la “capacidad total de antioxidante” (Huang et al. 2005).

En general se pueden medir la capacidad antioxidante *in vivo* (incluyen métodos *ex vivo*) e *in vitro*. En este trabajo se usan los ensayos *in vitro*, ya que estos proporcionan buenos resultados y no son tan costosos como los métodos *in vivo*. Sobre la base de las reacciones químicas involucradas, los principales ensayos *in vitro* de capacidad antioxidante se pueden dividir en dos: (1) transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y (2) transferencia de electrones (ET). Los ensayos de base ET involucran una reacción redox, el oxidante (también como un testigo de control de la reacción) como un indicador de la reacción final. Los ensayos HAT y ET son basados en medir la capacidad de los radicales (u oxidantes), en lugar de la prevención de la muestra en la capacidad antioxidante (Apak, R. et al. 2007; Huang et al. 2005).

### 2.5.1 Ensayos de capacidad antioxidante.

En la figura 8 se muestran los principales métodos representativos de los ensayos de transferencia de hidrógeno (HAT) y ensayos de transferencia de electrones (ET) (Huang et al. 2005).

HAT: Ensayos que involucran reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno $ROO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROOH + A^{\bullet}$ $ROO^{\bullet} + LH \longrightarrow ROOH + \dot{L}$	ORAC (Capacidad de absorción del radical oxígeno) TRAP (Parámetro total de atrapamiento de radicales por antioxidantes) Blanqueamiento de crocina IOU (inhibición del consumo de oxígeno) Inhibición del ácido linoléico Inhibición de la oxidación de LDL
ET: Ensayos que involucran reacciones de transferencia de electrones $M(n)^+ + e(\text{de } AH) \longrightarrow AH^{\bullet} + M(n-1)$	TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox) FCR (Fenoles totales con el reactivo de Folin-Ciocalteu) DPPH (difetil-1-picrihidrazil)

**Figura 8.** Ensayos *in vitro* para medir la capacidad antioxidante.

Se analizarán con más detalle los siguientes ensayos:

### 2.5.1.1 Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu (FC).

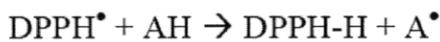
Esta prueba (FC) se ha utilizado para cuantificar los polifenoles totales de productos naturales durante muchos años. El mecanismo de la reacción se basa en una reacción calorimétrica de oxidación-reducción, la prueba de Folin-Ciocalteu (FC) mide la capacidad reductora de una muestra por lo que se le puede considerar como un método para evaluar la capacidad antioxidante. Este ensayo es simple, reproducible y por lo tanto conveniente para utilizarlo (Huang *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR) bajo condiciones alcalinas, en las que la disociación del protón fenólico, produce un anión fenóxido capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu. Por lo tanto el agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Hernández-Ruiz J. *et al.* 2001), que se detecta a una  $\lambda_{\max}$  de 765nm.

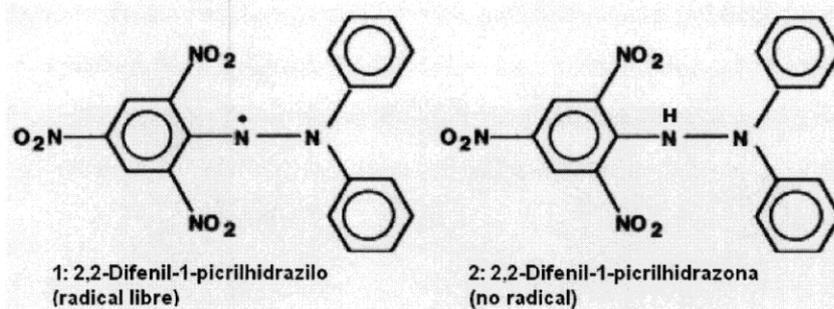
Algunas de las desventajas de este ensayo son: bajo condiciones ácidas, la reacción es lenta y carece de especificidad; el reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico para compuestos fenólicos y puede ser reducido por otros compuestos como el Cu (I) y la vitamina C (Huang *et al.*, 2005).

### 2.5.1.2 Ensayo de la capacidad antioxidante del radical DPPH

El radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Figuras 9 y 10) fue uno de los primeros radicales sintéticos utilizados para estudiar la relación estructura-actividad de los antioxidantes fenólicos. El método se basa, en el descenso de absorbancia a 517nm, asociado a la desaparición de la forma radical del DPPH, de los medios de reacción provocada por antioxidantes.



Cuando el DPPH está en forma de radical (1), se presenta un color violeta. Cuando una solución de DPPH es mezclada con una sustancia que puede donar a un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida (2) con la pérdida del color violeta aunque allí se esperara un color residual pálido amarillo del grupo picril todavía presente, esto se muestra en la figura 9 (Molyneux, P. 2004).



**Figura 9.** El DPPH en su forma radical y no radical.

Se considera que el punto final del ensayo se alcanza cuando la absorbancia se mantiene constante. Por lo tanto, el tiempo de ensayo puede variar desde unos minutos, hasta algunas horas dependiendo del tipo y de las concentraciones de los diferentes antioxidantes presentes en las muestras analizadas. Este método, con algunas modificaciones se ha utilizado para determinar la eficacia antirradical de multitud de compuestos aislados y productos y/o extractos de naturaleza y origen muy variado (vinos, jugos, compuestos polifenólicos, etc.) (Pérez Tortosa, 2008).

### 2.5.1.3. Decoloración del catión radical ABTS

El catión radical del 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato ( $ABTS^{+\cdot}$ )) se obtiene tras la reacción del ABTS (Fig. 10) con persulfato potásico, tras incubarlo a temperatura ambiente (25 °C) y en la oscuridad durante 16 h. Esto es factible debido a que el  $ABTS^{+\cdot}$  es un radical con una larga vida media.

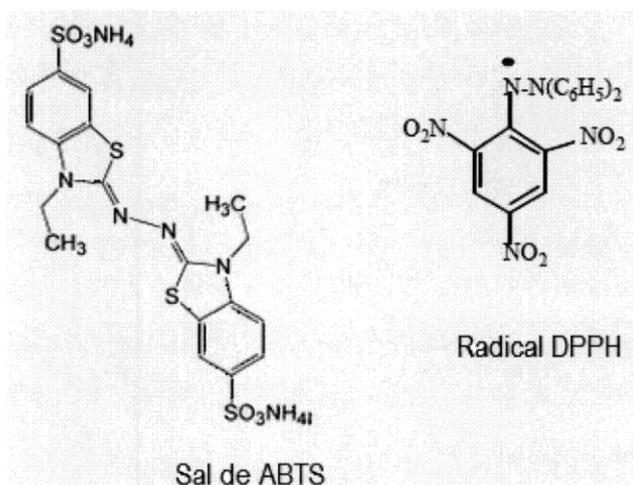
El ensayo de la actividad antioxidante utilizando este compuesto se basa en la decoloración de la disolución de  $ABTS^{+\cdot}$  determinada espectrofotométricamente a 734 nm, debida a la reducción del catión radical por los compuestos dadores de electrones presentes en las muestras ensayadas.

El tiempo de incubación de la solución de  $ABTS^{+\cdot}$  con la muestra se suele situar entre 1 y 7 min. Ya que los resultados obtenidos por algunos investigadores indican que la reacción con el radical  $ABTS^{+\cdot}$  no se completa hasta pasado 1 min.

Los resultados de este ensayo se suelen expresar en unidades TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C). Este último caso es el más habitual cuando se trata de análisis de alimentos.

Conociendo el coeficiente de extinción del  $ABTS^{++}$ , también es posible expresar el poder antioxidante como cantidad de  $ABTS^{++}$  reducido por unidad de masa de muestra.

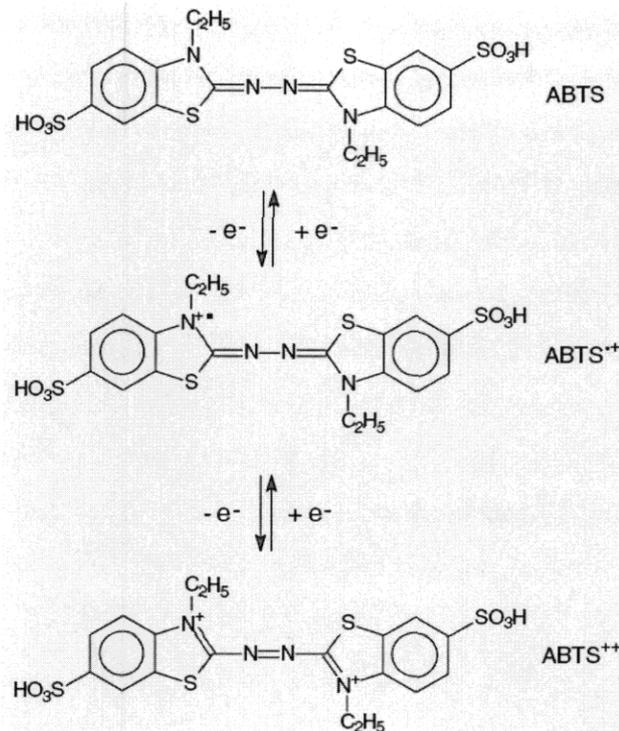
Entre los métodos utilizados para determinar la actividad de un antioxidante basados en la desactivación de radicales libres, el ensayo de decoloración del radical  $ABTS^{++}$  es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable. A pesar de esto, como método de punto final que es, los valores de actividad antioxidante determinados pueden depender del tiempo escogido para efectuar la medida (Pérez Tortosa, 2008, Pérez-Jiménez J., 2008).



**Figura 10.** Radical DPPH y sal de ABTS

### 2.5.1.3.1 Propiedades fisicoquímicas del ABTS.

El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical  $ABTS^{++}$  una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina, lacasa) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato de potasio o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl], pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm (Kuskoski, E.M. et al. 2004). El ABTS cuando se oxida por métodos químicos o enzimáticos (Figura 11) produce tanto al radical catiónico  $ABTS^{•+}$ , con una  $\lambda_{max}= 340nm$ , como al dicatión  $ABTS^{2+}$ , con una  $\lambda_{max}= 414nm$  (Childs, R.E. et al. 1975).



**Figura 11.** Radical catiónico y dicatiónico del ABTS.

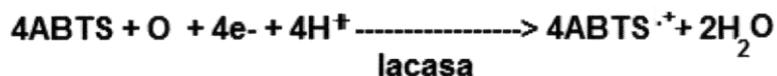
El radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como en el caso de las antocianinas, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además, este radical al ser generado químicamente (persulfato de potasio) puede ser validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser una alternativa mucho más viable económicamente al método original que utiliza metamioglobina (Re et al. 1999).

#### 2.5.1.4 Sistema ABTS/lacasa

El sistema ABTS/lacasa es un sistema catalítico redox que ha sido aplicado en procesos biotecnológicos como: la decoloración de mezclilla en la industria textil, bioblanqueo de pulpa de papel, remediación de suelos, etcétera. La característica principal de este sistema es la utilización del compuesto ABTS para la formación de un radical libre

ABTS<sup>•+</sup> (reduce) que actúa como un mediador entre la enzima y el sustrato, facilitando la acción de la enzima (Soriano-Santos et al. 2008).

El sistema ABTS/lacasa puede producir el radical ABTS<sup>•+</sup>, mediante una reacción de transferencia de un electrón en presencia de oxígeno atmosférico (O<sub>2</sub>), dicha reacción se aprecia en la siguiente reacción:



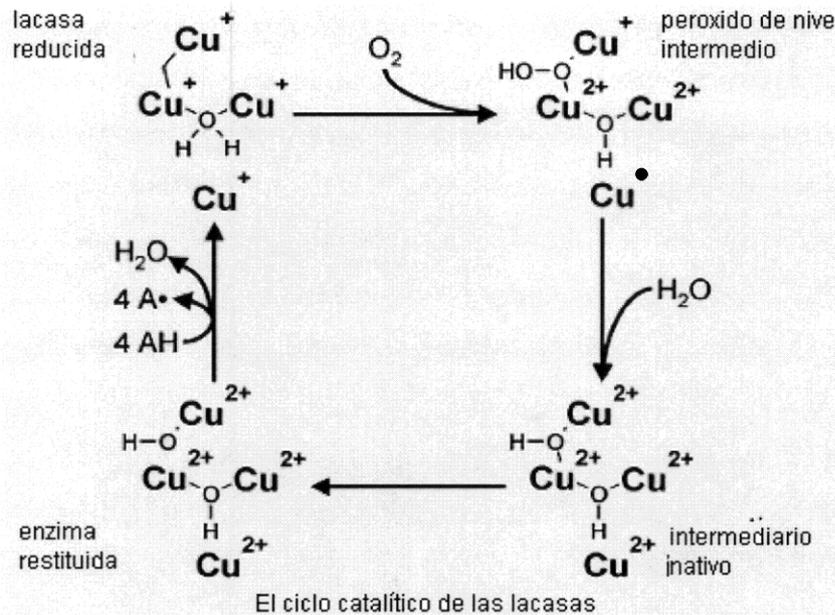
En este caso el ABTS no es un compuesto fenólico, pero la lacasa puede oxidarlo cambiando de un color amarillo hasta verdoso. El interés que se tiene en el sistema ABTS/lacasa es poder evaluar la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos. En este sistema la lacasa forma el radical ABTS, el cual es reducido por los compuestos fenólicos.

El uso del sistema ABTS/lacasa como sustituto de diversos procesos químicos tradicionales, permite reducir la contaminación provocada por el uso de compuestos de elevada toxicidad, que producen una gran cantidad de subproductos difíciles de eliminar.

#### **2.5.1.4.1 Lacasa (EC 1.10.3.2)**

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son enzimas del grupo de las “oxidazas azules”, que contienen átomos de cobre en su estructura. Han sido caracterizadas como enzimas de baja especificidad de sustrato, el interés en esta enzima es que reducen el oxígeno molecular a agua y son capaces de oxidar diferentes compuestos tanto fenólicos como no fenólicos (Arana, A. et al, 2002; Brenda, 2009).

El proceso redox ocurre por la transferencia de electrones entre los cuatro átomos de cobre que forman el centro catalítico de la enzima. Dichos átomos son los que le confieren el color azul a las lacasas debido a la intensa absorción electrónica de los enlaces Cu-Cu que se muestra en la figura 12 (Kyriakides, I. et al. 2003).



**Figura 12.** Ciclo catalítico de las lacasas.

#### **2.5.1.4.1.2 Propiedades físico-químicas de la lacasa.**

Las lacasas poseen tres dominios muy similares en tamaño, todos importantes para la actividad catalítica. Generalmente la lacasas son más estables en pH alcalinos que en pH ácidos (figura 13: Kyriakides, I. et al; 2003), lo cual debe ser probablemente a la inhibición del grupo hidróxido sobre el proceso de auto-oxidación. Las lacasas pueden inactivarse por la pérdida del átomo de cobre o por condiciones de proteólisis o desnaturalización, entre otras. Las lacasas conservan su actividad en un rango de pH de 3 a 10 y en un rango de temperatura de 5 a 55°C. La formación de las lacasas amarillas marrones es el resultado del enlace de moléculas derivadas de la lignina a la proteína de la enzima. Esto sucede en fermentaciones en estado sólido, y no presenta el espectro típico de las oxidasas (Esperanza, N. et al, 2003).

### Comparación de propiedades de Mnp, Lip y lac

E.C.	MnP 1.11.1.13	LiP 1.11.1.14	Lac 1.10.3.2
	Mn(II): H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidoreductasa	diarilpropano O <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> oxidoreductasa	<i>p</i> -benzendiol: O <sub>2</sub> -oxidoreductasa
Grupo prostético	Hemo	Hemo	1 tipo 1-Cu, 1 tipo -2-Cu, 2 pares del tipo -3-Cu,
MW (kDa)	32 <sup>a</sup> –62.5 <sup>o</sup> (122 <sup>a</sup> )	38–47	59–110 (tetramero ≤ 390 <sup>c</sup> )
Glicosilación	N–	N–	N–
Isoformas	monómeros; hasta 11 <sup>d</sup>	monómeros; hasta 15	Varios mono-, di-, tetramero
<i>pI</i>	2.8 <sup>e</sup> –7.2 <sup>f</sup>	3.2–4.7	2.6–4.5
pH rango	2.6 <sup>g</sup> –4.5 <sup>h</sup>	2.0–5.0	2.0–8.5
E <sup>o</sup> (mV)	1510 <sup>i</sup>	1450 <sup>j</sup>	500–800 <sup>k</sup>
C–C enlace	si	si	no
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -regulado	si	si	no
Estabilidad	+++	+	+++
Mediadores nativos	Mn <sup>2+</sup> ; Mn <sup>3+</sup>	VA <sup>l</sup> , 2Cl-14DMB <sup>m</sup>	3-HAA <sup>n</sup>
Especificidad	Mn <sup>2+</sup>	En general aromáticos incl. no fenólicos	En general fenólicos
Mediadores secundarios y sintéticos	Tioles insaturados ácidos grasos	NO	ABTS <sup>o</sup> , HBT <sup>o</sup> , siringaldazina

**Figura 13.** Propiedades físicas y químicas de la lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (Lip).

## 3. Chile de agua (*Capsicum annuum*).

### 3.1. Antecedentes del chile de agua (*Capsicum annuum*).

El género *Capsicum* está ampliamente distribuido a nivel mundial y se le encuentra en una gran diversidad de formas, tamaños, colores y niveles de picor o pungencia. Este género es miembro de la familia de plantas solanáceas, fue así denominado en el siglo XVI por los herbarios europeos. Es considerada una de las primeras plantas domesticadas en Mesoamérica.

Algunos botánicos la relacionan con la palabra griega *kapto* que significa “morder” (Salazar-Olivo., 2004). En varias lenguas occidentales *Capsicum* lleva un nombre relacionado con la pimienta. En inglés se llama *chili pepper*; en francés, *piment enragé* o *poivre rouge*; en italiano *peperone* y *pimentão picante* en portugués. La palabra española “chile”, modificación de la náhuatl *chilli*, sigue siendo utilizada en México y América

Central. Los arahuacos, grupo cultural de la zona del Caribe, lo denominaban en el siglo XVI ají o axí.

Se conocen alrededor de 27 especies de las cuales se reconocen cinco especies cultivadas; *Capsicum annuum* L., *Capsicum frutescens* L., *Capsicum chinense* Jackuin, *Capsicum pendulum* Willdenow, y *Capsicum pubescens*. Casi todos los chiles cultivados en México pertenecen a la especie *annuum* (Loizzo, R, M. et al, 2008, Vázquez- Flota et al. 2007).

El género incluye a una gran variedad de plantas, y los nombres comunes son frecuentemente ambiguos.

México destaca a nivel mundial por tener la mayor variabilidad genética de *C. annuum*, que ha dado origen a un gran número de variedades o tipos de chiles, entre los que destacan el serrano, jalapeño, ancho, pasilla, guajillo y de árbol.

El chile de agua pertenece a la variedad genética *C. annuum* que se encuentra distribuido en la región de Valles Centrales del Estado de Oaxaca. De importancia económica, social y de consumo local en estas zonas (Velasco-Velasco et al., 1998).

### **3.1.1 Producción mundial y nacional de chile (*Capsicum*)**

Desde 1993, la producción mundial de chiles ha tenido un crecimiento del 48% de la superficie y duplicando los volúmenes de producción. Este aumento en la producción de chiles se debe a la creciente demanda de este producto en todas sus presentaciones (fresco, seco y procesado), tanto para consumo directo como para usos industriales.

De todo el mundo, China es el país que presenta una mayor participación en la producción de chiles. Su superficie sembrada actual es de 612,800 ha, con lo que representan un 36% de la superficie sembrada mundial, con una producción de 12'531,000 ton, esto es más de la mitad de la producción mundial de chiles al año.

México ocupa el segundo lugar en volumen de producción y el tercero en superficie cosechada, con 140,693 has y 1'853,610 ton, participando con el 8% del área y el 7% de la producción mundial en toneladas (Goycoolea, A. 2007). De acuerdo a la producción obtenida en tonelada les siguen, Turquía, Estados Unidos, España e Indonesia, representando juntos el 18% del volumen mundial de producción (Gráfica 1).

**Gráfica 1. Producción mundial de chile, 2006.**



Fuente: Goycoolea, A. 2008

El chile es una hortaliza que se cultiva en casi todo el país en los dos ciclos agrícolas y forma parte del grupo de los principales productos hortofrutícolas exportados. El 80% de la producción nacional se consume internamente. En la tabla 3 se presenta los principales estados productores de chile del país.

Como ya se ha mencionado el chile de agua (*C. annuum*) está distribuido en la región de Valles Centrales del estado de Oaxaca. El estado de Oaxaca ocupa el 12 lugar a nivel de producción nacional (tabla 3).

**Tabla 3.** Principales estados productores de chile. Fuente: Goycoolea, A. 2008

Principales estados productores de chile en México (Verde y seco) has.		Principales estados productores de chile en México (Verde y seco) has.	
Zacatecas	39,123	Tamaulipas	2,795
Chihuahua	20,230	Oaxaca	2,562
San Luis potosí	13,406	Puebla	2,296
Sinaloa	11,636	Hidalgo	2,204
Guanajuato	6,991	Baja California Sur	2,188
Durango	6,915	Quintana Roo	2,036
Campeche	6,113	Sonora	1,330
Jalisco	4,775	Aguascalientes	1,031
Veracruz	4,155	Yucatán	440
Michoacán	3,030	<b>TOTAL</b>	<b>142,891</b>

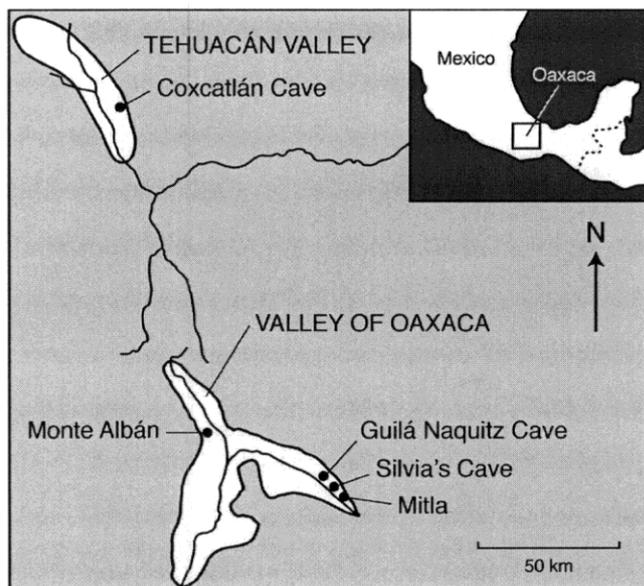
### 3.1.2 Historia del chile (*Capsicum*) en el estado de Oaxaca.

Los chiles han sido recogidos, cultivado y consumido en México por miles de años (Perry, L., Flannery, K.V., 2007, Lentz, D.L. et al. 2007). Los restos de chile silvestre (pimientos), se recuperaron de varios niveles de la cueva de Coxcatlán en el Valle de Tehuacán, son las primeras evidencias en México de lo que más tarde se convertiría en un importante vegetal domesticado. El análisis de los restos de chiles de toda la cueva reveló que la cosecha del chile silvestre comenzó hace aproximadamente unos 8.000 años, seguido del cultivo y la domesticación definitiva de los frutos picantes de *C. annuum* hace aproximadamente unos 6.000 años (Perry, L., Flannery, K.V. 2007).

El Valle de Oaxaca, puede haber sido el sitio en donde se le dio un uso temprano a la cosecha de chile. La cueva de Guilá Naquitz, dio sólo dos ejemplares identificados tentativamente como chiles que se deriva de hace aproximadamente 8.000 años.

Se encontraron hallazgo en Tehuacán, que se refuerza con datos recientes provenientes de la arqueología, fitogeografía, cariotipo y de análisis enzimáticos, todos los cuales han llevado a la conclusión de que *C. annuum* (la especie más común actualmente en México) es la especie de chile que se domesticó en las zonas altas de los estados del centro-este de México. Los datos modernos de la fitogeografía, apoyados por evidencias arqueológicas proporcionan datos de que diferentes variedades de chiles pueden florecer en varios entornos, incluidos la región de Mitla al oriente del Valle de Oaxaca, donde se localizan los sitios arqueológicos de las cuevas de Guilá Naquitz y de Silvia (figura 14).

Las cuevas de Guilá Naquitz y de Silvia están abrigadas por un acantilado volcánico seco, aproximadamente a unos 5 km al noroeste de Mitla, situada a una elevación de 1.900 m sobre el nivel del mar (figura 14). Durante el período de arcaico de la caza y la recolección e incipiente agricultura (8000-5000 AC), La cueva de Guilá Naquitz fue ocupada temporalmente por pequeño grupos familiares. Una vez que el maíz, frijol, calabaza, chiles, y los aguacates habían sido domesticados, aldeas agrícolas surgieron en todo el valle, y el uso de la cueva cambio. Desde este momento en el Valle de Oaxaca y el Valle de Tehuacán las cuevas se utilizan como pequeños campamentos de paso, para grupos de trabajadores que están lejos de su aldea, cazando ciervos o recolectando algunas plantas silvestres (Perry, L., Flannery, K.V. 2007).



**Figura 14.** Mapa 1. Muestra las ubicaciones de las cuevas de Guilá Naquitz y de Silvia en el Valle de Oaxaca y la ubicación del Valle de Tehuacán (Perry, L., Flannery, K.V. 2007).

Entre los años 600 y 1000 D.C, durante el período conocido en Oaxaca, como Monte Albán IIIb-IV, Mitla antigua era una ciudad importante asentada al margen del río del mismo nombre. Tan grande fue la población que sus necesidades agrícolas supera el ámbito de los aluviones del río Mitla. El cultivo parece haberse extendido a 4-5 km de la ciudad, e incluye las laderas y arroyos húmedos del pie de monte por debajo de las cuevas de Guilá Naquitz y de Silvia. Estas cuevas y otras cercas, se convirtieron en lugares convenientes para el campamento, para almacenar plantas. Finalmente, las plantas almacenadas se llevaban de vuelta a Mitla. Estas actividades continuaron en el periodo conocido como Monte Albán V (1000-1521 D.C).

En Oaxaca también se han registrado en códices la historia del chile. Entre los códices de la cultura Mixteca se encuentran: Códice Tecomaxtlahuaca (1578), códice Yanhuitlán (1545-1550) y el códice Sierra (1550-1564) (López-López, P., Castro-García, F.H. 2009).

## **3.2 Características estructurales y fisiológicas del chile (*Capsicum*).**

### **3.2.1 Características físicas del chile (*Capsicum*)**

Las especies de *Capsicum* son casi sin excepción plurianuales. La planta, de tallo leñoso, forma normalmente un arbusto de hasta 150 cm de altura; algunas variedades alcanzan tamaños superiores. Las flores son blancas o verdosas en la mayoría de las variedades, salvo en *C. pubescens*, en que tienen un color violáceo.

El fruto -técnicamente es una baya que varía en coloración y tamaño de acuerdo a la variedad; puede ser cúbico, cónico o esférico. De interior hueco, está dividido en dos o cuatro costillas verticales interiores que portan las semillas, de color amarillo pálido, salvo en *C. pubescens*, que las presenta negras-. Sin embargo, la mayor cantidad de semillas se aloja en la parte superior, junto al tallo. La carnosidad del pimiento también varía según la especie.

Cuando el fruto madura sus colores abarcan, según la especie, desde el blanco y el amarillo hasta el morado intenso, pasando por el naranja, el rojo brillante y el lavanda; el color verde en ocasiones es señal de inmadurez, aunque muchas especies se consumen también en ese estado. La forma de propagación es mediante semillas que se mantienen viables hasta por tres años si se conservan en un ambiente adecuado.

### **3.2.2 La composición química del género *Capsicum*.**

Los frutos *Capsicum* contienen pigmentos colorantes, principios picante (Capsaicinoides), resina, proteínas, celulosa, pentosanos, elementos minerales y muy poco aceite volátil, mientras que las semillas contienen aceite no volátil.

En el análisis químico proximal se tiene las propiedades macromoleculares de los lípidos, proteínas, minerales (ceniza), fibra cruda y por una diferencia el contenido de carbohidratos. También se analiza el contenido de humedad de los productos. En el caso particular del las variedades del género *Capsicum* se tiene una variación de las propiedades macromoleculares por los diferentes orígenes de las variedades. En la tabla 4 se puede observar la media del análisis químico proximal de algunas variedades de chiles.

**Tabla 4.** Bromatológico de algunas variedades de *Capsicum* (Azurdia, C. 2009, De, A. K. 2003)

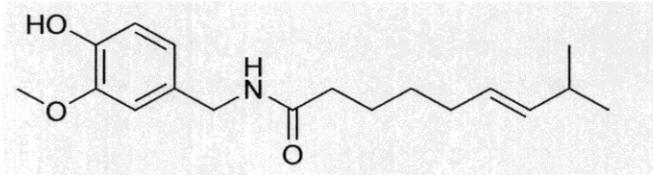
Variedad	de	Humedad	Ceniza	Proteína	Fibra	Grasa	Carbohidratos
<i>Capsicum</i>		(%)	(%)	(%)	cruda	(%)	(%)
					(%)		
Sambo ( <i>Capsicum annuum</i> )		82.97*	8	10.90	11.30		
Huistla ( <i>Capsicum annuum</i> )		73.98*	6.40	11.30	18.30		
Huerta ( <i>Capsicum annuum</i> )		71.23*	5.20	13.12	18.49		
Pimiento picante ( <i>Capsicum annuum</i> )		6.50**	7.20	14	15.50	14.10	58.20
Páprika ( <i>Capsicum annuum</i> )		7.90**	7.60	13.80	19	10.40	60.30
Pimiento rojo ( <i>Capsicum annuum</i> )		6.20**	8	16	26	15.50	54.30

\*en muestra en fresco, \*\* en muestra seca.

El ají y el pimentón pueden ser considerados como las posiciones en los extremos opuestos de un espectro de propiedades comunes. De chile pimiento a pimentón, hay una disminución constante del nivel de pungencia y un aumento en el contenido de pigmento. Los frutos de la mayoría de las especies *Capsicum* contienen cantidades significativas de vitaminas B, C, E y provitamina A (betacaroteno), cuando en estado fresco. Los tipos de *C. annuum* largo es una de las fuentes más ricas conocidas de la vitamina C, que pueden estar presentes hasta 340 mg/100 g en algunas variedades. Como se ha mencionado el ingrediente activo que le da la sensación a picor o pungencia en el chiles son los capsaicinoides.

Los capsaicinoides son amidas formadas por la unión de la vainillilamina con un ácido graso (figura 15) y aunque se conoce alrededor de 20 de estos compuestos, la capsaicina [(E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonenamida] y su análogo 6,7-dihidro, la dihidrocapsaicina, en conjunto llega a representar más del 90% del total de los capsaicinoides presentes en los frutos. 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 de valina o leucina. Las diferencias de estructura de los capsaicinoides (CAP's) residen en la naturaleza de la cadena lateral, que puede ser de 9 u 11 carbonos de largo, con un número variable de enlaces dobles colocados en diferentes posiciones (Vázquez- Flota et al. 2007).



**Figura 15.** Capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida).

Algunos investigadores proponen que la capsaicina (fig. 15) tiene propiedades antioxidantes (Maforimbo, 2002) que ayuda a combatir a la nitrosamina (agente causante de cáncer). La capsaicina (fig. 15) se puede utilizar como un analgésico (Salazar-Olivo, 2004).

### 3.2.3 Característica de la planta del chile de agua (*C. annum*)

Las plantas muestran un hábito de crecimiento erecto, con tallos de forma cilíndrico, de color verde. Las hojas son ovaladas, de color verde intermedio. El limbo (anatomía de la hoja) presenta en promedio 4.3cm de ancho y 10.1cm de longitud y el pecíolo (péndulo que sostiene a la hoja del tallo) presenta 5.3cm de longitud promedio.

Se registra una flor por cada rama (axila), en posición intermedia con anteras de color azul pálido y filamento blanco. La corola es de color blanco (fig. 16).

Los frutos del chile de agua son de forma triangular en posición erecta, de color verde-amarillento en estado inmaduro (fig. 16 y 17) y rojo cuando madura (fig. 17). La baya o fruto tiene de 14-16cm de largo en promedio. El pericarpio es grueso, la forma del fruto en unión con el pedicelo (rabillo) es cordado. Las semillas son de color amarillo, con una superficie áspera y de tamaño grande (López-López, P., Castro-García, F.H. 2009).



**Figura 16.** Planta de chile de agua: tallos de forma cilíndrica, limbo de color verde, corola de color blanco, frutos verdes-amarillentos.



**Figura 17. a)** Frutos inmaduros



**b)** Frutos maduros

### **3.3 Cultivo y productividad del chile de agua (*C. annuum*).**

El chile de agua se cultiva en diferentes municipios de la región de Valles Centrales del estado de Oaxaca en donde predomina la presencia de la etnia Zapoteca. Destacan los siguientes municipios Ejutla de Crespo, La Ciénega Zimatlán, Cuilapan de Guerrero, San Jerónimo Tlacoahuaya, Ocotlán de Morelos, San Pablo Villa de Mitla y algunos otros.

Geográficamente se ubican a los 16°59' LN y 96°35' LW y de 1,400 a 1,700 msnm (López-López, P., Castro-García, F.H. 2009).

El cultivo tradicional empieza con la germinación de la semilla en almácigos. La semilla de chile de agua germina aproximadamente en 2 meses o 2 meses y medio. Después de esto se traspasa al terreno arado con yuntas o con mulas. Luego de la siembra se deja pasar aproximadamente un mes y medio para utilizar de nuevo la yunta o mulas para desyerbar y remover la tierra, se repetía otra vez a los 15 días después. El riego se hace por bombo eléctrico. La cosecha del chile de agua se realiza aproximadamente después de 70 a 85 días, la floración del chilar dura entre 8 a 9 días, el fruto desde la floración tarda en crecer como en 15 días, y el chile se corta después de 20 días, tomando en cuenta la madurez y dureza del fruto. Se hacen entre seis y cinco cortes en los chilares (Ángeles, R., Pérez, A., Pérez-Pérez, J., Guzmán E. 2009, Comunicación personal).

El proceso productivo presenta innovaciones tecnológicas aproximadamente desde el año 2005, como es la técnica por goteo debido al escás de agua y de que se podía sembrar casi durante todo el año. También la técnica del almácigo cambio, ya que ahora se pueden pedir los germinados de chiles a incubadoras que utilizan fertilizantes y una temperatura constante, que favorece el crecimiento de la semilla de 2 a 2 meses y medio hasta en 1 mes y medio. Las semillas son seleccionadas por los productores de la población, aunque también se venden germinados de chiles sin seleccionar la semilla, pero esto puede ser una desventaja para los productores, ya que no se sabe la calidad de la semilla. Las semillas seleccionadas de los productores solo germinan en un 80%.

Después del germinado se trasplanta la planta a acolchados (que favorecen a retener el agua y a que no crezcan malezas) en los surcos deben estar ya instalado los cintillos para el riego por goteo, donde también se le agrega al agua los fertilizantes, fungicidas y plaguicidas. En estos cultivos se puede hacer hasta 12 cortes como máximo, pero la media es entre 5-6 cortes. Una hectárea de siembra por goteo puede valer 100 mil pesos y por riego alrededor de 40 mil pesos (Pérez, A., Agustín-Sánchez, S. 2009. Comunicación personal).

El chile de agua genera una relación beneficio-costos superior a 2 y durante su proceso productivo se emplean más de 150 jornaleros por ciclo (López-López, P., Castro-García, F.H. 2009).

Los productores de chile de agua de la población de San Jerónimo Tlacoahuaya en el Estado de Oaxaca, cultivan la mayor cantidad de este fruto durante los meses de

marzo y abril sembrando semillas seleccionadas a partir de chiles de agua escogidos por su tamaño, color verde intenso (mejor conocido como verde blanco, por los productores) y calidad, se cubren las semillas con tierra fertilizada con abono, las semillas germinan aproximadamente después de ocho días de sembradas.

El rendimiento de chile de agua por surco es de 21 canastos producto de siete cortes, (tres canastos por corte). El precio de venta al público depende de la oferta y la demanda del fruto, por ejemplo, cuando la cosecha es abundante, hay una sobreoferta y si el tamaño del chile de agua es menor al tamaño estándar (12cm) el costo del canasto es bajo situándose alrededor de los \$100.00 pero cuando la cosecha es escasa, hay poca oferta del producto por lo que el costo del canasto se puede elevar hasta los \$1000.00 (Pérez, A., Agustín-Sánchez, S. Hernández, J. 2009).

## **4 JUSTIFICACIÓN**

El análisis químico bromatológico es importante para tener una referencia del valor nutritivo de un alimento, es el punto de partida para entender su desarrollo fisiológico al

igual que es importante para saber la calidad de un producto terminado o como materia prima.

No hay muchos trabajos de investigación que hayan determinado la capacidad antioxidante en alimentos (Lorenzo-León, et al. 2009), sobre todo en alimentos endémicos. El sur de México es particularmente importante en cuanto a la riqueza de especies vegetales, especialmente el área donde se entrelazan las dos principales regiones biogeográficas del continente americano: la neártica y la neotropical. Oaxaca es el estado con mayor biodiversidad, y muchas veces esta es endémica, gracias a estas condiciones biogeográficas (Rico-Arce, M.L. 2001). Mucha de la flora de Oaxaca se utiliza en remedios caseros o en mejorar el sabor de varios platillos, por lo que es importante investigar de una forma sistemática las propiedades fisicoquímicas y/o componentes que puedan ser favorables para una buena salud.

El género *Capsicum* representa una amplia y milenaria tradición cultural en la población de México. En el estado de Oaxaca cuenta con una gran variación de chiles, sin embargo son escasos los trabajos de sistemática de la diversidad existente, su caracterización y conservación y mejoramiento genético. El chile de agua (*Capsicum annuum*) es la variedad que presenta mayor número de estudios por su importancia social, económica y cultural en los Valles Centrales; pero dichos trabajos tratan de investigaciones específicas del proceso productivo y aspectos sanitarios, sin que hasta el momento se hayan realizado estudios sobre la diversidad y su aprovechamiento y sobre estrategias para la preservación y mejoramiento de esta variedad de chile (López-López, P., Castro-García, F.H. 2009). Por lo cual es importante realizar un análisis bromatológico y evaluar otras propiedades de este chile como lo es la capacidad antioxidante.

## **5 HIPÓTESIS.**

El chile de agua (*Capsicum annuum* L) presenta características bromatológicas y propiedades antioxidantes *in vitro* similares a otras variedades de *Capsicum annuum*.

## 6 OBJETIVOS.

### 6.1.1 Objetivo general:

Caracterizar la composición química y evaluar la capacidad antioxidante de extractos de chile de agua (*Capsicum annuum L*) fresco y seco a través de análisis químicos y pruebas químicas - enzimáticas de la actividad antioxidante para determinar el potencial efecto antioxidante del chile de agua.

### 6.1.2. Objetivos específicos:

- 1) Realizar el análisis químico bromatológico del chile de agua.
- 2) Determinar el contenido total de compuestos fenólicos en los extractos del chile de agua fresco y seco.
- 3) Determinar y comparar la actividad antioxidante de extractos de chile de agua aplicando dos métodos espectrofotométricos, tales como los métodos químicos DPPH (con el ensayo del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (con el ensayo del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico).
- 4) Determinar y comparar la actividad antioxidante de extractos del chile de agua empleando el ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) como sustrato y la actividad enzimática de la lacasa obtenida de dos diferentes fuentes (DeniLite IIS y *Rhus vernicifera*).

## 7 METODOLOGÍA

### 7.1. Material vegetal.

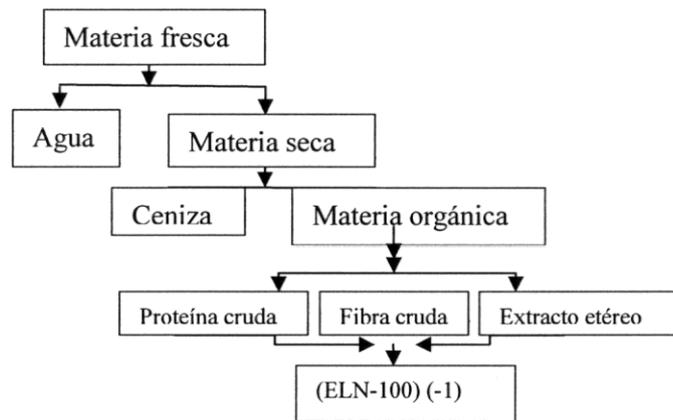
Los especímenes de chile de agua (*C. annuum*) en fresco se colectaron en la población de San Jerónimo Tlacoahuaya, estado de Oaxaca en los meses de marzo a junio de 2009. Los especímenes de chile de agua seco se colectaron en el mismo poblado

en el mes de abril a junio de 2009. Se colectaron 50 piezas de chile de agua fresco y 15 piezas de chile de agua seco natural. Se secaron 18 chiles de agua, en un túnel de aire. El tamaño promedio de los chiles de agua fue de 12cm. Cada pieza de chile tenía un peso de alrededor de 25 g.

Los chiles en secado natural, fueron expuestos al sol directamente, tendidos en petates. Los chiles en secado en túnel fueron cortados en varios trozos, para que tuvieran una superficie de contacto mayor y se depositaron en las charolas. El equipo utilizado fue un túnel de aire (Arfield limited, Ringwood Hampshire, England) con una temperatura control de 7,  $V_{control} = 7$ , velocidad del aire = 1.47 m/s. La temperatura del bulbo húmedo fue de 28°C, la temperatura del bulbo seco fue de 51°C.

## 7.2 Análisis químico bromatológico.

El análisis químico bromatológico tiene como propósito principal un análisis proximal que determinar en un alimento, el contenido de humedad, grasa, fibra, proteína y cenizas (Figura 18).



**Figura 18.** Esquema del análisis químico bromatológico.

### 7.2.1 Preparación de las muestras.

La muestra de chile de agua en fresco se cortó en pedazos y se dejó por 24 h en una estufa de aire forzado 28°C (Rios-Rocha, HSCF 102). Las muestras en seco (chile de agua en secado natural y túnel) se dejan 3 h para quitar la humedad en la estufa de aire forzado 28°C (Rios-Rocha, HSCF 102). Todas las muestras se muelen en un molino de martillos (Thomas-Wiley, USA) con una malla de 1 mm. La muestra molida se recolectó en bolsas. El análisis proximal fue determinado según las técnicas reportadas por la AOAC, 1990.

### **7.2.2 Humedad.**

Para cuantificar la humedad de las muestras se colocaron en charolas de aluminio a peso constante. Se pesaron de 3 a 4 g de muestra (chile en fresco, secado natural y secado en túnel) colocándose por separado en charolas de aluminio, dejándose en una estufa de aire forzado (Rios-Rocha, HSCF 102) por 24 h a 60°C. Después de este tiempo se pesaron. Las muestras se procesaron por triplicado.

### **7.2.3 Ceniza.**

Al cuantificar la ceniza en las muestras se pusieron en crisoles a peso constante. En cada crisol se pesó 0.5g de muestra por separado (chile en fresco, secado natural y secado en túnel) y se dejaron en una mufla (Lindberg, México) por 3 h a 550°C. Después de este tiempo se dejó enfriar la mufla y la muestra se colocó dentro de un desecador, posteriormente se pesaron los crisoles. Las muestras se procesaron por triplicado.

### **7.2.4 Proteína cruda**

La proteína se determinó por el método de Kjeldahl, en un equipo Büchi 334. Se pesaron 0.5 g de muestra por separado (chile en fresco, secado natural y secado en túnel) y se le agregó a cada muestra 4 g de mezcla reactiva de selenio. Posteriormente se le agregó 20mL de ácido sulfúrico concentrado, hasta que en el digestor la mezcla de las muestras tuvieran tonalidades verdes. Después se determinó el contenido proteico con el equipo Büchi 334, titulándose con ácido bórico.

### **7.2.5 Extracto etéreo o graso**

Se pesaron 2 g de cada muestra (chile en fresco, secado natural y secado en túnel) las cuales se dejaron en un dedal y este a la vez dentro de un vaso recolector. Los dedales se colocaron en el equipo (Velp científica), previamente puestos a peso constante con 60mL de hexano, por 155 min a 120°C. Después de este tiempo se colocaron los vasos recolectores en una estufa por 25 min. Las muestras se procesaron por triplicado.

### **7.2.6 Fibra cruda**

Las muestras (chile en fresco, secado natural y secado en túnel) desengrasadas se pesaron y colocaron en vasos de 600mL agregándosele 200mL de una solución de ácido sulfúrico 0.25N, se calentaron hasta ebullición por 30 min. Las muestras se filtraron y se les agregó 200mL de una solución de hidróxido de sodio 0.3N. De nuevo se filtran las muestras y los filtros se dejaron en una estufa de aire forzado (Rios-Rocha, HSCF 102) por 12 h a 60°C. Las muestras se procesaron por triplicado.

### **7.3 Extracción.**

A todas las muestras (chile fresco, chile seco natural y chile secado en túnel) se les trata por separado con 100% agua, 100% metanol y metanol-agua (1:1). De la muestra en fresco se pesó 5g y se le agregó 25mL de disolvente (100% agua, 100% metanol y metanol-agua 1:1, respectivamente). De cada una de los dos tipos de muestra en seco se pesan 0.25 g y se le agregó 20mL de disolvente (100% agua, 100% metanol y metanol-agua 1:1, respectivamente). Posteriormente, cada muestra se maceró y se agitó por 10 min. Finalmente, cada muestra se filtró con gasa y papel Wathman No. 4. Todas las muestras se procesaron por triplicado.

### **7.4 Cuantificación de fenoles totales.**

La concentración de fenoles totales en extractos fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de oxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Hernández-Ruiz J., 2001).

**7.4.1 Preparación de la curva de calibración.** Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1005g/100mL) de la cual se tomaron volúmenes de 2.5mL, 5mL, 10mL,

15mL y 20mL se aforó cada uno de estos a 100mL con agua destilada, obteniéndose distintas concentraciones.

**7.4.2 Preparación de las muestras.** Se tomaron 2.5mL de cada extracto obtenido y se aforaron a 10mL.

Tanto de las muestras como de las distintas concentraciones de la curva estándar se tomó una alícuota de 0.5mL, se le agregó 4.5mL de agua destilada, 0.2mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, y 0.5mL de una solución saturada de carbonato de sodio, se agitó y finalmente se le agregó 4.3mL de agua, y se agitó de nuevo. Se dejó en reposo por 1 h y se tomó la lectura a una longitud de onda de 725nm, en un espectrofotómetro (Spectronic genesys 2). Todas las muestras se procesaron por triplicado.

## **7.5 Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de DPPH.**

Se tomaron 2.5mL del extracto obtenido en las muestras secas y 6mL obtenidos del extracto de la muestra en fresco, estos volúmenes de extractos se aforaron a 10mL, de cada una de esta dilución se tomó 0.5mL y se le añadió 3.2mL de metanol al 99% y 100  $\mu$ L de una disolución metanólica del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) 0.5mM, la mezcla se incubó por 45 min en la oscuridad a una temperatura de 25°C. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de los medios de reacción a 517nm, el valor obtenido se comparó con un blanco compuesto por 3.7mL de metanol (99%) y 100  $\mu$ L de la solución DPPH 5mM.

La cuantificación de la actividad atrapadora del DPPH se llevó a cabo por sustracción de los valores de absorbancia a 517nm del blanco y de las muestras, considerando el descenso de absorbancia debido a la reducción del radical DPPH.

$$\% \text{ de inhibición} = ((\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) / \text{Abs}_{\text{blanco}}) * 100$$

Cálculo del valor IC<sub>50</sub>. Preparación de las soluciones stock: se tomaron 6mL del extracto de la muestra en fresco y 2.5mL de los extractos de chile de agua en seco, todas las muestras se aforaron a 10mL. A partir de cada solución stock se hicieron 5 diluciones (de tal forma que su absorbancia sea entre 0 a 1) y se aplicó el método de DPPH a cada una de las diluciones. Todas las muestras se procesaron por triplicado.

## **7.6 Evaluación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS.**

El radical catión de ABTS<sup>+</sup>, se produce al reaccionar ABTS 7mM y persulfato de potasio 2.45mM, la cual finalmente se aforó a 10mL con agua destilada. Esta solución se deja reposar por 16 h en la oscuridad.

Para realizar las determinaciones, primero se midió la absorbancia de la solución del radical ABTS. Esta absorbancia debe ser de  $0.7 \pm 0.02$ nm a una longitud de onda de 734nm.

Se tomaron 2.5mL del extracto obtenido en cada una de las muestras secas y 3mL obtenidos del extracto de la muestra en fresco, estos volúmenes de extractos se aforaron a 10mL, de esta dilución se tomó 30  $\mu$ L y se le añadió 2970  $\mu$ L de la disolución de ABTS<sup>+</sup> a una absorbancia  $0.7 \pm 0.02$ nm. La mezcla se incubó de por 6 min en la oscuridad a una temperatura de 25°C. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de los medios de reacción ( $A_{AOX}$ ) a 734nm y este valor se comparó con el valor obtenido para el radical catión ABTS<sup>+</sup> de  $0.7 \pm 0.02$ nm ( $A_{0.7nm}$ ). Para obtener el por ciento de inhibición del radical catión ABTS se aplicó la siguiente fórmula: **%inhibición=  $100 - ((A_{AOX} / A_{0.7nm}) * 100)$ .**

Para obtener el valor de IC<sub>50</sub>. Se tomaron 3mL de cada muestra de chile fresco o seco y se aforaron a 10mL, de cada solución stock se prepararon 5 diluciones (de tal forma que su absorbancia sea entre 0.2 a 1). Finalmente se aplicó el método de decoloración del ABTS a cada una de las diluciones. Todas las muestras se procesaron por triplicado.

## **7.7 Evaluación de la capacidad antioxidante por el sistema ABTS/lacasa.**

### **7.7.1 Sistema ABTS/lacasa DeniLite IIS.**

**7.7.1.1 Preparación de los extractos del chile de agua:** para las muestras en seco los extractos no se diluyeron, en el caso de la extracción en fresco se tomaron 1.5mL los cuales se aforaron a 10mL.

**7.7.1.2 Solución lacasa DeniLite IIS:** Se pesaron 100 mg de la enzima y se le agregaron 5mL de una solución de acetatos 0.1M a pH 4. La mezcla se dejó en agitación durante 5 h en un baño de hielo.

**7.7.1.3 Curva estándar.** Los componentes de la mezcla de reacción son: 0.1mL de solución de lacasa, 0.1mL de amortiguador de acetato de potasio 0.1M a pH 4, 0.8mL de agua, 0.1mL de ácido gálico a cuatro diferentes concentraciones y 0.1mL de una solución ABTS 5mM. El blanco contiene todos los componentes a excepción de la solución de ABTS 5mM.

**7.7.1.4 Evaluación de la capacidad antioxidante:** Para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras se utilizó la mezcla de reacción que se describió en el párrafo anterior para la preparación de la curva estándar, excepto que no se le adicionó el ácido gálico, en lugar de éste compuesto fenólico se le agregó 0.1mL del extracto de cada una de las muestras de chile fresco o seco.

Tanto para la determinación de la curva estándar como para la evaluación de la capacidad antioxidante de las muestras, todas las lecturas se hicieron a una longitud de onda de 728nm. Las lecturas de las absorbencias obtenidas se graficaron contra el tiempo, para obtener la gráfica del tiempo lag, que a su vez se gráfica contra la concentración.

## **7.7. 2 Sistema ABTS/lacasa *Rhus vernicifera***

**7.7.2.1 Preparación de los extractos del chile de agua:** Las muestras de los extractos de chile de agua en seco no se diluyeron, en el caso de los extractos del chile en fresco se tomaron 1.5mL y se aforaron a 10mL.

**7.7.2.2 Solución de lacasa *Rhus vernicifera*:** Se pesaron 10 mg de la enzima, los cuales se disolvieron en 2mL de agua desionizada. Se dejaron en agitación moderada

durante 2h en un baño de hielo. Después se almacenaron en tubos Eppendorf de 1mL a -20°C.

**7.7.2.3 Curva estándar.** Los componentes de la mezcla de reacción son: 0.1mL de solución de lacasa, 0.1mL de amortiguador de acetatos 0.1M a pH 5, 0.7mL de agua, 0.1mL de ácido gálico a cuatro diferentes concentraciones y 0.1mL de una solución ABTS 5mM. El blanco contiene todos los componentes a excepción de la solución de ABTS 5mM. El volumen final es de 1mL.

**7.7.2.4 Evaluación de la capacidad antioxidante:** Para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras se utilizó la mezcla de reacción que se describió en el párrafo anterior para la preparación de la curva estándar, excepto que no se le adicionó el ácido gálico, en lugar de éste compuesto fenólico se le agregó 0.1mL del extracto de cada una de las muestras de chile fresco o seco.

Tanto para la determinación de la curva estándar como para la evaluación de la capacidad antioxidante de las muestras, todas las lecturas se hicieron a una longitud de onda de 728nm.

Las lecturas de las absorbencias obtenidas se graficaron contra el tiempo para obtener una gráfica del tiempo lag, que a su vez se gráfica contra la concentración.

## **8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **8.1 *Análisis proximal.***

#### **8.1.1 Determinación de humedad.**

Al determinar la humedad en las muestras de chile de agua se tienen los siguientes resultados (tabla 5).

**Tabla 5.** Contenido de humedad del chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

MUESTRA	% de humedad	% Materia seca
En fresco	93.83±0.049	6.68±0.14
Secado fresco*	6.171±0.049 <sup>a</sup>	93.83±0.0485
Secado en túnel	6.17±0.057 <sup>a</sup>	93.83±0.047
Secado natural	4.36±0.331	95.64±0.331

\*Método recomendado por la AOAC. a: Letras iguales sin diferencia significativa ( $p<0.05$ ).

### 8.1.2 Determinación de ceniza

La determinación de ceniza de las muestras de chile de agua dan los siguientes resultados (tabla 6).

**Tabla 6.** Porcentaje de ceniza del chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

MUESTRA	% de ceniza en BS
En fresco	7.12±0.153 <sup>a</sup>
Secado en túnel	6.76±0.062 <sup>a</sup>
Secado natural	7.09±0.317 <sup>a</sup>

a: Letras iguales sin diferencia significativa ( $p<0.05$ ).

### 8.1.3 Determinación de proteína.

Para la determinación del contenido de proteína en las muestras de chile de agua se realizó mediante el método de Kjeldahl los resultados se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Contenido proteico del chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

MUESTRA	% de proteína en BS
En fresco	18.29±0.115 <sup>a</sup>
Secado en túnel	17.53±0.234 <sup>b</sup>
Secado natural	16.72±0.154 <sup>c</sup>

a: Letras iguales sin diferencia significativa ( $p<0.05$ ).

### 8.1.4 Determinación de grasa.

La determinación de grasa o extracto etéreo de las muestras de chile de agua dan los siguientes resultados (tabla 8).

**Tabla 8.** Contenido graso o extracto etéreo del chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

MUESTRA	% graso en BS
En fresco	1.13±0.016 <sup>a</sup>
Secado en túnel	1.17±0.034 <sup>a</sup>
Secado natural	2.57±0.067

a: Letras iguales sin diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Tukey

### 8.1.5 Determinación de fibra cruda.

La determinación de fibra cruda de las muestras de chile de agua dan los siguientes resultados (tabla 9).

**Tabla 9.** Contenido de fibra cruda del chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

MUESTRA	%fibra cruda en BS
En fresco	32.67±2.047
Secado en túnel	28.13±1.011 <sup>a</sup>
Secado natural	25.99±1.09 <sup>a</sup>

a: Letras iguales sin diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

### 8.1.6 Comparación del análisis bromatológico del chile de agua (*C. annum* L.) con otras especies del género *Capsicum*.

En la tabla 10 se muestra el contenido del análisis bromatológico del chile de agua en fresco, secado en túnel y natural.

**Tabla 10.** Análisis bromatológico del chile de agua fresco, secado natural y túnel, en base seca (BS).

Por ciento (%)	En fresco (BS)	Secado en túnel (BS)	Secado natural (BS)
Humedad	6.171±0.049	6.17±0.057	4.36±0.331
Ceniza	7.12±0.143	6.77±0.059	7.09±0.303
Proteína	18.29±0.115	17.53±0.234	16.72±0.154

<b>Graso</b>	1.13±0.015	1.18±0.032	2.57±0.154
<b>Fibra cruda</b>	32.67±1.921	28.14±0.948	25.99±1.043
<b>Carbohidratos</b>	67.29	68.35	69.29

Como se puede observar en la tabla 4 las otras variedades de *Capsicum* contienen menor porcentaje de agua desde 71.23 a 87 % de humedad. El chile de agua contiene un 93.87%, ya que para cultivar este chilar una de sus características es que se requiere abundante agua para su crecimiento. El porcentaje de ceniza al chile de Huistla como se nota en la tabla 4, en esta misma tabla podemos ver que hay chiles que tienen un mayor contenido de ceniza como son sambo y pimiento rojo; y el chile huerta tiene 5.20% de ceniza menor que el chile de agua con un 6.68%.

El contenido proteico del chile de agua (*C. annum*) es mayor (15.99-17.12%) que todos los reportados en las otras variedades de *Capsicum* reportados en la tabla 4 que van de un 10.90 a 14%, excepto por el pimiento rojo que tiene 16% de proteína.

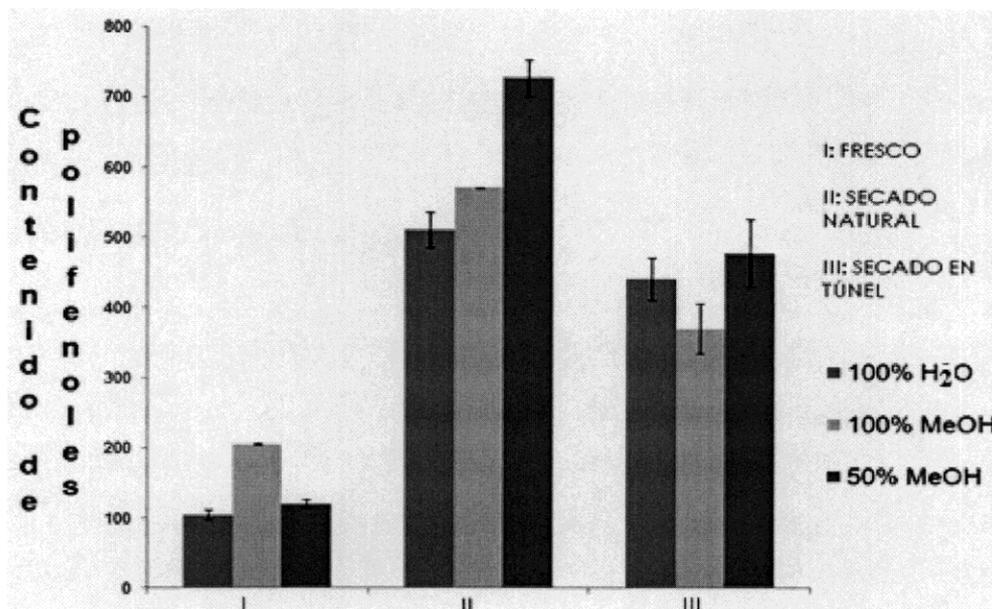
El contenido de fibra en el chile de agua (*C. annum*) es mayor (24.86-30.65%) que todos los reportados en las otras variedades de *Capsicum* como se observa en la tabla 4 que van de un 11.30% a 19, excepto por el pimiento rojo que tiene un 26% similar al chile de agua en las muestras de secado natural.

El porcentaje graso en estas variedades de chile va desde 10.40 a 15.50 estos valores son mucho mayor, que los porcentaje encontrados en el chiles de agua. Además podemos observar que el chile de agua con el tratamiento de secado natural tiene una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con las muestra en fresco y secado en túnel, teniendo los siguientes valores 2.57±0.154, 1.13±0.015 y 1.18±0.032 respectivamente.

## **8.2 Cuantificación de fenoles totales del chile de agua**

El contenido de polifenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu en las diferentes muestras de chile de agua se muestra en la gráfica 2. Se comparan los tres tipos de muestra (fresco, secado natural y secado en túnel), para cada tipo de muestra se compara la eficiencia del disolvente (agua 100%, metanol 100% o mezcla metanol agua 1:1). Los resultados muestran que para la muestra en fresco el contenido de polifenoles fue mayor en el extracto metanólico en contraste con las muestras en seco en donde el

contenido de polifenoles fue mayor cuando el extracto se realizó con la mezcla metanol-agua 1:1.



**Gráfica 2.** Contenido total de polifenoles (mg/100g) de chile de agua. Se muestra el valor promedio de tres réplicas así como su  $\pm$ DS. (En base seca).

El contenido de polifenoles totales en las muestras de chile de agua (fresco, secado natural y secado en túnel) se comparó con el contenido de polifenoles de otras variedades de *C. annuum*, (Tabla 11). Los valores que se presentan con la muestra y otras variedades en fresco son muy variados. En los resultados en las muestras secas son similares a las reportadas en otras variedades. El contenido de polifenoles en las distintas variedades de *C. annuum* en fresco varía desde un mínimo de 118 mg AGE/100g para el pimiento amarillo hasta 7360 mg AGE/100g para el chile serrano verde, el chile de agua en fresco tiene un contenido de polifenoles totales similar al pimiento amarillo. Con respecto a la muestras en seco, el contenido de polifenoles totales es comparable con lo reportado por Soriano Santos et al. 2006 para *Capsicum* spp.

**Tabla 11.** Contenido de polifenoles totales del chile de agua fresco y seco en comparación con otras variedades de *Capsicum*.

Muestra <sup>a</sup>	Polifenoles totales (mg AGE/100g)
Fresco	

Chile de agua	205.51 ±10.71 <sup>a</sup>
Chile serrano verde	7360 (Conforti y cols., 2007 )
Chile serrano rojo	4320 (Conforti y cols., 2007 )
Pimiento amarillo	118 ( Racchi y cols., 2002 )
<b>Seco</b>	
Chile de agua (al sol)	523.7±25.4 <sup>b</sup>
Chile de agua (túnel)	723.46±70.47 <sup>c</sup>
<i>Capsicum spp.</i>	245 – 528 (Soriano-Santos y cols., 2006)

a: todas las muestras de chile de agua en fresco tiene una diferencia significativa. (p<0.05).

**Tabla 12.** Contenido de polifenoles totales en base seca (BS) del chile de agua (*Capsicum annuum*) fresco y seco en túnel y natural.

Muestra <sup>a</sup>	Polifenoles totales (mg AGE/100g)
<b>Fresco</b>	
Chile de agua	1,243.16 ±10.71 <sup>a</sup>
<b>Seco</b>	
Chile de agua (al sol)	568.98±25.47 <sup>c</sup>
Chile de agua (túnel)	786.37±70.47 <sup>b</sup>

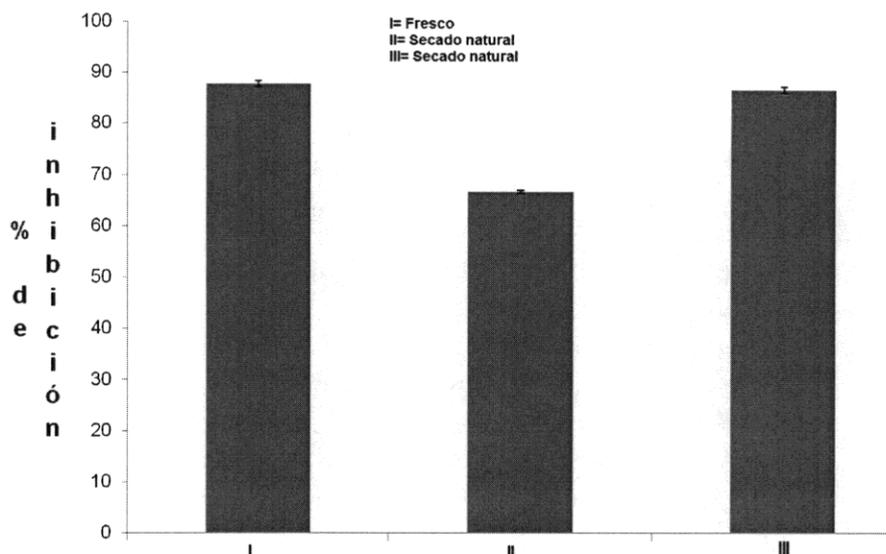
a: todas las muestras de chile de agua en fresco tiene una diferencia significativa, (p<0.05).

En la tabla 12 se muestran los polifenoles totales, tanto en fresco como en base seca (BS) las muestras tienen diferencia significativa (p<0.05). Por lo que el contenido de polifenoles totales o fenoles totales es diferente en cada muestra (chile de agua en fresco, secado en túnel y secado natural).

### **8.3 Evaluación de la capacidad antioxidante DPPH.**

#### **8.3.1 Por ciento de inhibición del radical DPPH.**

El por ciento de inhibición del radical DPPH en el chile de agua es similar en las muestras en fresco (I) con un valor de 87.67±0.59 y secado en túnel (III) 86.54±0.62, respectivamente, (gráfica 3). El chile secado al sol (II) presento un promedio de inhibición de 66.54±2.44 el cual fue significativamente menor a las muestras descritas anteriormente.



**Gráfica 3.** Capacidad antioxidante evaluada por el método de reducción del DPPH.

Al comparar el por ciento de inhibición del DPPH del chile de agua en fresco ( $87.67 \pm 0.59$ ) con los valores reportados para el chile serrado en fresco que es de 89% (Conforti et al. 2007), se tiene que presentan valores similares (tabla 13).

**Tabla 13.** Capacidad antioxidante determinada para el chile de agua con el método de reducción DPPH, en comparación con chile serrano verde y rojo.

Muestra	% de inhibición (DPPH)
Fresco	
Chile de agua	$87.67 \pm 0.59^a$
Chile serrano verde	89 (Conforti et al. 2007)
Chile serrano rojo	75 (Conforti et al. 2007)
Seco	
Chile de agua (al sol)	$66.54 \pm 2.44^b$
Chile de agua (túnel)	$86.54 \pm 0.62^a$

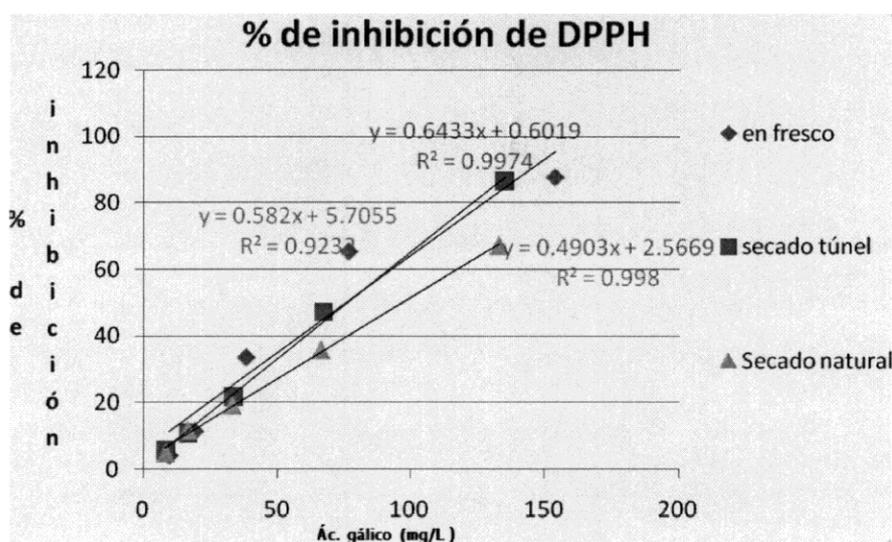
a: Letras iguales sin diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Como se observa en la tabla 13 el contenido de los porcentajes del chile de agua en fresco y secado en túnel,  $87.67 \pm 0.59$  y  $86.54 \pm 0.62$  respectivamente, en los cuales no se encontró ninguna diferencia significativa al realizar un análisis estadístico ( $p < 0.005$ ), por lo

que se puede decir que tienen el mismo efecto en disminuir al radical DPPH. A diferencia del chile de agua en secado natural ( $66.54 \pm 2.44$ ) que si difiere con las otras dos muestras (chile en fresco y secado en túnel), por lo que tiene un menor efecto en reducir el radical DPPH.

### 8.3.2 IC<sub>50</sub> del la evaluación del ensayo DPPH.

Al realizar una regresión lineal de los datos de la determinación de la capacidad antioxidante del DPPH de cada muestra se obtienen los valores de la capacidad antioxidante con un 50% de inhibición del radical DPPH (gráfica 4).



**Gráfica 4.** Por ciento de inhibición de DPPH obtenido a diferentes concentraciones de polifenoles (mg AGE/L).

Al interpolar en la gráfica el 50% de inhibición del radical DPPH, se obtiene para cada muestra los valores siguientes (tabla 14):

**Tabla 14.** Valores de IC<sub>50</sub> del ensayo DPPH expresados en mg/L, para cada muestra.

MUESTRA	IC <sub>50</sub> (mg/L)
En fresco	76.10
Secado en túnel	76.8
Secado natural	96.48

Al comparar el valor de IC<sub>50</sub> del chile de agua en fresco con el chile serrano verde y rojo (tabla 15) se nota que el valor del IC<sub>50</sub> del chile de agua en fresco es aproximadamente 5 veces menor que el reportado para el chile serrano (Conforti et al. 2007). Esto difiere de los valores similares encontrados al comparar el por ciento de inhibición del DPPH del chile de agua en fresco (87.67±0.59) con los valores reportados para el chile serrado en fresco que es de 89% (Conforti et al. 2007), esta diferencia en el valor de IC<sub>50</sub> del chile de agua en fresco con el chile serrano verde y rojo hace que el chile de agua tenga una mayor capacidad de inhibir la oxidación que la que tiene el chile serrano. No se encontraron valores reportados en el valor de IC<sub>50</sub> para chile de agua en seco.

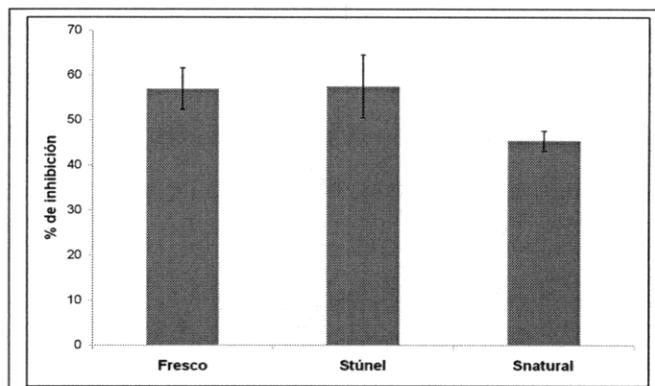
**Tabla 15.** Valor IC<sub>50</sub> del extracto polifenólico del chile de agua en comparación con el chile serrano

<b>Muestra</b>	<b>IC50 (mg/L)</b>
<b>Fresco</b>	
Chile de agua	<b>76.1</b>
Chile serrano verde	<b>389 (Conforti et al. 2007)</b>
Chile serrano rojo	<b>419 (Conforti et al. 2007)</b>
<b>Seco</b>	
Chile de agua (al sol)	<b>94.48</b>
Chile de agua (túnel)	<b>76.8</b>

## **8.4 Evaluación de la capacidad antioxidante ABTS.**

### **8.4.1 Por ciento de inhibición del radical ABTS**

El por ciento de inhibición del radical ABTS es similar en las muestras en fresco y secado en túnel, teniendo los siguientes valores 56.95±4.65 y 57.5±7.04 respectivamente. El chile secado al sol presento un promedio de inhibición menor de 45.35±2.22 (gráfica 16).



**Gráfica 5.** Capacidad antioxidante de las muestras de chile de agua evaluadas por el método de reducción del ABTS.

Los valores obtenidos del por ciento de inhibición del radical ABTS para el chile de agua se compararon con el valor reportado para el por ciento de inhibición del radical ABTS del pimiento rojo en fresco que es de 57% (Ki Hyeon Sim & Han Young Sil, 2008), por lo que el resultado reportado para el pimiento rojo es similar a los encontrados en el chile de agua en fresco y al secado en túnel pero mayor que para el determinado al chile de agua secado al sol (tabla 16). Para esta última muestra es factible que la exposición directa al sol y al ambiente sean las causas de un deterioro de sus componentes fenólicos y por lo tanto en un descenso en su poder de inhibición de la oxidación.

**Tabla 16.** Valores de la Capacidad antioxidante evaluada con el método de reducción, ABTS para el chile de agua y pimiento rojo.

Muestra	% de inhibición (ABTS)
<b>Fresco</b>	
Chile de agua	56.95±4.65 <sup>a</sup>
Pimiento rojo	57 (Ki Hyeon Sim & Han Young Sil, 2008)
<b>Seco</b>	
Chile de agua (al sol)	45.35±2.22 <sup>a</sup>
Chile de agua (túnel)	57.5±7.04 <sup>a</sup>
Chile ancho	52 (Monroy-Vázquez, A. et al, 2007)

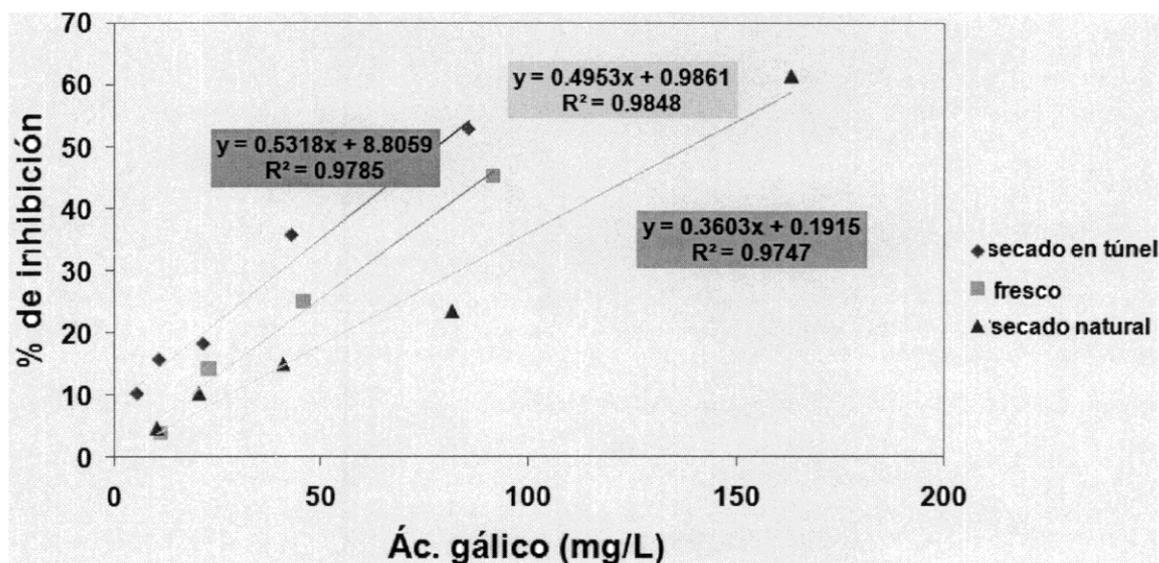
a: Letras iguales sin diferencia significativa (p<0.05).

El efecto que las muestras tienen para inhibir el radical ABTS, no tiene ninguna diferencia significativa, al realizar un análisis estadístico (p<0.005), por lo que se podría

utilizar cualquiera de las muestras (chile en fresco, secado en túnel y natural) y se tendría el mismo efecto.

### 8.4.2 IC<sub>50</sub> del la evaluación del ensayo ABTS.

Al realizar una regresión lineal de los datos de la determinación de la capacidad antioxidante del ABTS de cada muestra se obtienen los valores de la capacidad antioxidante con un 50% de inhibición del radical ABTS (gráfica 6).



**Gráfica 6.** Por ciento de inhibición del radical ABTS obtenido a diferentes concentraciones de polifenoles (mg AGE/L).

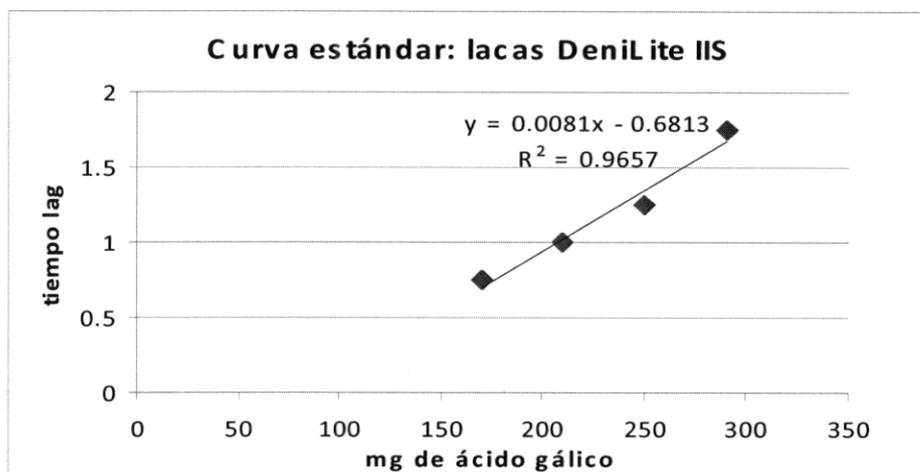
Al interpolar en la gráfica el 50% de inhibición del radical ABTS, se obtiene para cada muestra los valores siguientes (tabla 17):

**Tabla 17.** Valores de IC<sub>50</sub> del ensayo ABTS expresados en mg/L, para cada muestra.

MUESTRA	IC <sub>50</sub> (mg/L)
En fresco	98.96
Secado en túnel	77.46
Secado natural	138.24

## 8.5 Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua por el sistema ABTS/lacasa (DeniLite IIS)

Se realizó una curva estándar con ácido gálico (sigma, Alemania), (gráfica 7).



**Gráfica 7.** Curva estándar con lacasa DeniLite IIS a diferentes concentraciones de ácido gálico contra el tiempo lag.

El sistema ABTS/lacasa se evaluó en dos tipos de muestra de chile de agua: para las muestras en peso seco los extractos se usaron sin diluir en cambio las muestras en peso fresco el extracto utilizado se aforo a un volumen de 10mL (tabla 18). Los resultados están dados mg EAG por cada 100 g de muestra. Para las muestras en peso fresco (extractos diluidos) los valores encontrados fueron: en la muestra en fresco 23.65, en secado natural y secado túnel 91.38 y 106.89, respectivamente. Los resultados de las muestras (mg EAG por cada 100 g) tratadas en peso seco (extractos sin diluir) dan los siguientes valores: En fresco 281.52, en secado natural y secado en túnel 99.32 y 116.89 respectivamente.

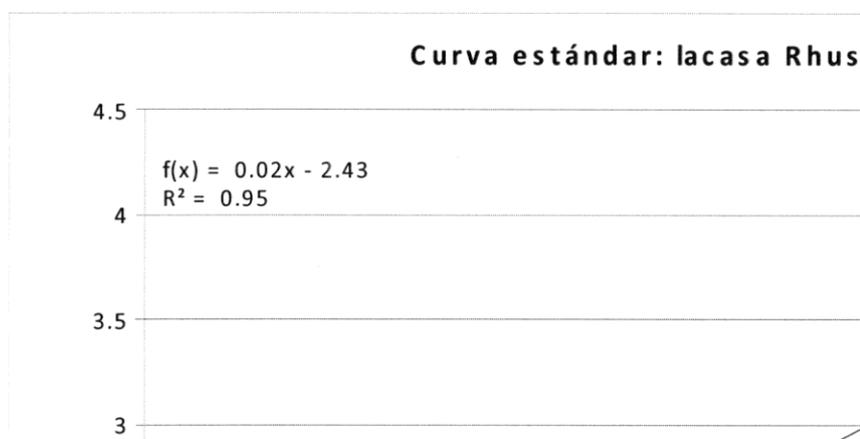
**Tabla 18.** Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua por el sistema ABTS/lacasa (DeniLite IIS) en peso fresco (extracto diluido) y en peso seco (extracto sin diluir).

Muestra	DeniLite IIS (mg EAG/100g)	DeniLite IIS (mg EAG/100g) Peso seco

<b>Fresco</b>		
Chile de agua	23.65	281.52
<b>Seco</b>		
Chile de agua (al sol)	91.38	99.32
Chile de agua (túnel)	106.89	116.89

### **8.6 Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua en el sistema ABTS/lacasa (*Rhus vercinifera*).**

Se realizó una curva estándar con ácido gálico, (gráfica 8).



**Gráfica 8.** Curva estándar con lacasa *Rhus vercinifera* a diferentes concentraciones de ácido gálico contra el tiempo lag.

El sistema ABTS/lacasa se evaluó en dos tipos de muestra de chile de agua: para las muestras en peso seco los extractos se usaron sin diluir en cambio las muestras en peso fresco el extracto utilizado se aforo a un volumen de 10mL (tabla 19). Los resultados están dados mg EAG por cada 100g de muestra. Para las muestras en peso fresco (extractos diluidos) los valores encontrados fueron: en la muestra en fresco 71.95, en secado natural y secado túnel 45.76 y 258.647, respectivamente. Los resultados de las muestras (mg EAG por cada 100g) tratadas en peso seco (extractos sin diluir) dan los siguientes valores: En fresco 855.99, en secado natural y secado en túnel 49.74 y 281.7 respectivamente.

**Tabla 19.** Evaluación de la capacidad antioxidante del chile de agua por el sistema ABTS/lacasa (*Rhus vercinifera*) en peso fresco (extracto diluido) y en peso seco (extracto sin diluir).

<b>Muestra</b>	<b><i>Rhus vercinifera</i> (mg EAG/100g)</b>	<b><i>Rhus vercinifera</i> (mg EAG/100g). Peso seco</b>
<b>Fresco</b>		
Chile de agua	71.95	855.99
<b>Seco</b>		
Chile de agua (al sol)	45.76	49.74
Chile de agua (túnel)	258.647	281.7

De los métodos para evaluar la capacidad antioxidante utilizados existe más información reportada de los métodos químicos DPPH y ABTS, ya que el método enzimático ABTS/lacasa es un ensayo relativamente nuevo para evaluar la capacidad antioxidante. Este último método sigue una tendencia numérica igual que los métodos más establecidos, esto se puede ver en las tablas 13,16, 18 y 19. En donde la capacidad antioxidante es mayor en el chile de agua en fresco, en secado en túnel y finalmente en secado natural.

## 9 CONCLUSIONES

-Los datos del análisis proximal de el chile de agua (*C. annuum* L.) son similares a los datos reportados para otras variedades de *C. annuum*. Un caso particular es el contenido de humedad que reporta un valor superior ( $93.83\pm 0.049$ ) a lo reportado en otras variedades. Los datos con una mayor diferencia entre las muestras es el contenido graso que casi se duplica en la muestra en secado natural; esto probablemente se debe que el método de extracción también extrae ciertos pigmentos como los carotenoides que están presentes en la muestra en secado natural.

-La mayor eficiencia obtenida por el método Folin-Ciocalteu fue con la extracción al 100% metanol en el chile de agua (*C. annuum* L.) en fresco. En las muestras en seco (secado natural y túnel) el mejor rendimiento por el método Folin-Ciocalteu se obtuvo al utilizar la mezcla metanol-agua 50:50.

-La capacidad antioxidante evaluada como porcentaje de inhibición del radical DPPH fue similar al que se encuentra en otras variedades de chile en fresco ( $87.6\pm 0.59$ ). Sin embargo al someter al chile de agua a dos tratamientos diferentes de secado. El secado al sol presentó la menor capacidad de inhibición del radical de DPPH ( $66.54\pm 2.44$ ), posiblemente el estrés abiótico a la que fue sometido el chile de agua durante el tratamiento de secado. En el valor de  $IC_{50}$  en la evaluación del ensayo DPPH del extracto del chile de agua en fresco es cinco veces inferior al reportado para otras variedades de chile, tal como el chile serrano. Lo cual indica que tiene una mayor capacidad antioxidante que la variedad con la que se comparó.

-La capacidad antioxidante evaluada como porcentaje (%) de inhibición del radical ABTS fue similar al que se encuentra en otras variedades de chile en fresco ( $56.95\pm 4.65$ ). Sin embargo al someter al chile de agua a los dos tratamientos diferentes de secado, se encontró que la muestra que se secó al sol presentó menor capacidad de inhibición del radical de ABTS ( $45.35\pm 2.22$ ) que la muestra secada en túnel ( $57.5\pm 7.04$ ). Hasta el

momento no se han encontrado reportes del valor de IC<sub>50</sub> del ensayo ABTS en la literatura científica para el género *Capsicum* por lo que no se puede comparar los resultados obtenidos con el chile de agua con otras variedades de *Capsicum*. Lo que sí se puede decir es que el porcentaje de todas las muestras en el chile de agua no tienen diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

-En los ensayos del sistema ABTS/lacasa en ambas enzimas (DeniLite IIS y *R. vercinifera*) se tiene que el valor de la capacidad antioxidante del chile de agua en fresco es mayor, seguido del secado en túnel y finalmente del secado en natural. Al comparar los sistemas ABTS/lacasa DeniLite IIS y ABTS/lacasa con *R. vercinifera* se encontró que es más eficiente el sistema ABTS/lacasa con *R. vercinifera*, esto seguramente se debe a la diferencia de origen de las enzimas utilizadas.

-En general, de la evaluación de la capacidad antioxidante, se puede concluir que las pruebas realizadas en este trabajo muestran que el chile de agua en fresco presenta una mayor capacidad antioxidante, seguida de la muestra secada en túnel y por último con la menor capacidad antioxidante la muestra secada al natural.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ángeles, R., Pérez, A., Pérez-Pérez, J., Guzmán E. 2009, Comunicación personal. Agricultor de la comunidad de San Jerónimo Tlacoahuaya, Oaxaca, México.
2. AOAC, 1990. Association of Official Analytical, Official Methods of Analysis Chemists. 15<sup>th</sup> edition. Washington, D.C. USA.
3. Apak, R., Kubilay Güçlü, Birsen Demirata, Mustafa Özyürek, Saliha E. Çelik, Burcu Bektaşoğlu, K. I. Berker and Dilek Özyurt, 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assay applied to phenolic compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules* **12**, 1496-1547.
4. Arana A., Téllez A., Yagüe S., Ferriñán E., Moreno, S. Domínguez, A. Silva R., Villar J.C. y González A.E., 2002. Deslignificación de pasta al sulfato de *pinus radiata* utilizando levaduras recombinantes. Congreso Iberoamericano de Investigación de Celulosa y Papel (CIADICYP 2002) Campinas, Brasil
5. Avello, M. y Suwalsky M., 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismo de protección. *Atenea* **494**(II sem): 161-172.
6. Azurdia, C. 2009. Agrobiodiversidad de Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Capítulo 9.
7. Bafna AR. and Mishra SH. 2005. Actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. *Ars Pharmaceutica* **46**: (2): 125-138.
8. Berka, R. M., Schneider, P., Golightly, E. J., Brown, S. H., Madden, M., Brown, K. M., Halkier, T., Mondorf, K. and Xu, F. 1997. Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme produced in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. **63**(8): 3151-3157.
9. Brenda. 2009. El Sistema de Información completa de Enzima. <http://www.brenda-enzymes.org>.
10. Burkitt, M. J. 2004. Biomedical aspects of free radicals: recent developments through the application of EPR. *Electron Paramagnetic Resonance* **19**: 33-81
11. Conforti, f; Statti, G. A., and Menichini, F. 2007. Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. *Food Chemistry* **102**: 1096–1104

12. Chávez-López, C., Esparza-García, J. Hidalgo, M. Loera C. y Rodríguez R., 2005. Producción de la enzima lacasa por hongos *Cladosporium cladosporioides* en presencia de fenantreno. VI Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería La Habana, Cuba
13. Childs, R. E. and Bardsley, W. G. 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal*. **145**: 93-103.
14. Esperanza, N., Vargas, M. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología* **2**: 64-72
15. Fitó C. Montserrat. 2003. Efectos antioxidantes del aceite de oliva y sus compuestos fenólicos. Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral
16. García L. García L.V. Rojo D.M. y Sánchez E., 2001. Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista Cubana Investigación Biomédica* **20**(3): 231-235.
17. Goycoolea, E. 2007. La Producción de Chile en México: Estadísticas de Producción México y el Mundo. *Info rural*. [http://www.conaproch.org/ch\\_situacion\\_nacional.htm](http://www.conaproch.org/ch_situacion_nacional.htm)
18. Gracia M.A. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. Primer Verano de Introducción a la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro, México.
19. Gutteridge, J. M. C. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* **41**(12): 1819-1828.
20. Hernández-Ruiz J., Arnao M.B. Hiner Alexander N.P., García Canóvas, F. and Acosta M., 2001. Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochemical Journal* **354**: 107-114.
21. Huang, D., Ou, B., and Prior, R. L. 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53** (6): 1841-1856.
22. Huttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A., 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 387-394.

23. Kuskoski, E.M., Fett, R., Asuero, G.A., García-Padilla, M.C. e Troncoso, A.M. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **24** (4): 691-693.
24. Kyriakides, I., and Agathos S.N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluent. *Biotechnology Advances* **22**: 161-187.
25. Lentz, D.L., Pohl, M.D., Alvarado, J.L., Tarighat, S., and Bye, R. 2007. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in México. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(17): 6232-6237.
26. Loizzo, R, M., Tudis, R., Menichini, F., Statti,A.G., and Menechini F. 2008. Influence of ripening stage on health benefits properties of *Capsicum annum* Var. *acuminatum* L.: *in vitro* studies. *Journal of Medicinal Food* **11**(1): 184-189.
27. López-López, P., y Castro-García, F.H. 2009. La diversidad de los chiles (*Capsicum* ssp., *Solanaceae*) de Oaxaca. Avances de Investigación de la Red de Hortalizas del SINAREFI Libro Científico No. 1. INIFAP (Campo Experimental Bajío. Celaya, Gto. México. 459 p. Impreso en México.
28. Lorenzo-León, H.C., Rodríguez-Galdón, B., Rodríguez- Rodríguez, E.M y Díaz-Romero, C. 2009. Capacidad antioxidante de diferentes variedades de cebolla. *CyTA-Journal of Food*, Vol. 7, No. 1, 53-58.
29. Mayera, A.M., and Staplesb, R.C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**: 551–565.
30. Maforimbo, E. 2002. Evaluation of capsicum as a source of natural antioxidant in preventing rancidity in sunflower oil. *The Journal of Food Technology in Africa*, **7**: 68-72.
31. Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol.*, **26**(2) : 211-219
32. Monge, A. Chorghade, M. Erhardt, P.W., Ganellin, C.R., Noga, K, Lindberg, P., Perun, T.J. Topliss, J.G., Trivedi, B.K. and Wermuth, C.J. 2001. Medicinal chemistry in the development of societies: biodiversity and natural products. *Química Nova* **24**(1): 153-155.

33. Monroy-Vázquez, A., Totosaus, A., González, G.L., Fuente, S.K., García-Martínez, I. 2007. Antioxidante l. chile ancho (*Capsicum annum* L. grossum sendt.) y romero (*Rosmaris officinalis* L.) como Fuentes naturales de antioxidants. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria* **10**(9): 112-116
34. Nälzen, C., Basu, S., Wolk, A. and Vessby, B. 2006. The importance of dietary antioxidants on plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation *in vivo* in middle-aged men. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* **50**(2): 64-70.
35. Padilla, F. C., Rincón, A. M., y Bou-Rached, L. 2008. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* **58**(3): 303-308.
36. Pérez, A., Agustín-Sánchez, S. Hernández, J. 2009. Comunicación personal. Agricultor de la comunidad de San Jerónimo Tlacoahuaya, Oaxaca, México
37. Pérez-Jiménez J., and Saura-Calixto, F. 2008. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. *International Journal of Food Science and Technology* **43**: 185-191.
38. Pérez Tortosa, V. y Calderón García, A. 2008. Proyecto de investigación de los antioxidantes del tomillo. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. <http://repositorio.bib.upct.es/dspace/handle/10317/159>.
39. Perry, L., Flannery, K.V., 2007. Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, México. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(29): 11905-11909.
40. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **26**: 1231-1237.
41. Rico-Arce, M.L. 2000. El género Acacia (*Leguminosae, Mimosoideae*) en el estado de Oaxaca, México. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **58**(2): 251-302
42. Rivas, S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *TRENDS in Biotechnology* **24**(5): 219-226
43. Racchi, M., Daglia, M., Lanni, C., Papetti, A., Govoni, S. and Gazzani, G. 2002. Antiradical activity of water soluble components in common diet vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **5**: 1272-1277

44. Salazar-Olivo, L.A. y Silva-Ortega, C.O. 2004. Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio. *Biologia Scripta* **1**(1): 7-14.
45. Santas, J., Carbó, R., Gordon, M.H., and Almajano, M.P. 2008. Comparison of the antioxidant activity of two Spanish onion varieties. *Food chemistry* **107**: 1210-1216.
46. Soares, G.M.B., Pessoa de Amorim, M. T. y Costa-Ferreira, M. 2001. Use of laccase together with redox mediators to decolourize Remazol brilliant blue R. *Journal of Biotechnology* **89**: 123–129.
47. Soriano-Santos J. Ugalde-Benitez, V., Tovar-Pérez, E. and Guerrero-Legarreta, I. 2008. A new enzymatic method to assess the total antioxidant activity in foods by using laccase: a polyphenoloxidase. 3rd International congress Food Science and Food Biotechnology in developing countries Queretaro, México, October 14-16.
48. Stratil, P., Klejdus, B. and Kubán, V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 607-616.
49. Tejada H. I. 1992. Control de calidad y análisis de los alimentos para animales. Secretaria de Educación Pública, 2<sup>da</sup> edición. México. pp. 15-25.
50. Vázquez- Flota, M.L., Monforte-González, M., Gutiérrez-Carbajal, G., Velázquez-García, C., y Nieto-Pelayo, Y. 2007. La biosíntesis de los capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotecnia Mexicana* **30**(4): 353-360.
51. Velasco-Velasco, V.A., Trinidad, S.A., Tirado-Torres, J.L., Téliz-Ortiz, D., Martínez-Garza, A., y Cadena-Hinojosa, M. 1998. Efecto de algunos nutrimentos en plantas de chile de agua infectadas con virus. *Terra* **16**(4): 317-324.
52. Venereo, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* **31**(2): 126-33.
53. Verma, N., Behera, B.C. and Makhija, U. 2008. Antioxidant and hepatoprotective activity of a Lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **151**: 167-181.
54. Yi-Fang, C., Jie, S., Xianzhong, W. and Rui, H.L. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 6910-6916.

55. Yu-Tang, T. Jyh-Horng Wu, Chih-Yu Huang, Yueh-Hsiung Kuo and Shang-Tzen Chang, 2009. Antioxidant activities and phytochemical characteristics of extracts from *Acacia confusa* bark. *Bioresource Technology* **100**: 509-514.
56. Zamora S. J.D., 2007. Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición* **34**(1): 17-26