



**UNIVERSIDAD  
VERACRUZANA**  
INSTITUTO DE CIENCIAS  
BÁSICAS



Actividad antioxidante y antimicrobiana de oleorresinas de chile chipotle  
(*Capsicum annuum*) elaboradas con aceite de aguacate

Tesis para obtener el grado de:  
MAESTRO EN CIENCIAS ALIMENTARIAS

Presenta:

L. N. Liesel Cerecedo Cruz

Directores de tesis:

Dr. Ebner Azuara Nieto

Dra. María Guiomar Melgar Lalanne

Xalapa-Enríquez, Veracruz

Octubre, 2016



Universidad Veracruzana



La presente tesis titulada

**“Actividad antioxidante y antimicrobiana de oleorresinas de chile chipotle (*Capsicum annuum*) elaboradas con aceite de aguacate”,**

Realizada por la

**L. N. LIESEL CERECEDO CRUZ**

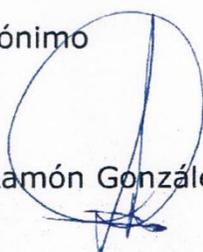
Ha sido aprobada por el comité de evaluación de tesis, y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Maestro en Ciencias Alimentarias**

Otorgando su autorización como jurado para ser presentada y defendida oralmente el 10 de octubre de 2016.

  
Dra. Alma Vázquez Luna

  
Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo

  
Dr. Cid Ramón González González

## DEDICATORIAS

A mis padres quienes se han pasado su vida alentándome y nunca dudan de mí, por su amor incondicional, apoyo, consejos e incontables sacrificios. Gracias por ser mi ejemplo a seguir, todo lo que soy es por ustedes.

A mi hermana Fany por su paciencia, apoyo y consejos durante toda mi vida, gracias.

A TODA mi familia, que siempre ha estado conmigo en todo momento.

LOS AMO...

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada para la realización de este trabajo.

A mis directores de tesis Dr. Ebner Azuara Nieto y Dra. María Guiomar Melgar Lalanne, por haber permitido trabajar con ellos, por todas sus enseñanzas, apoyo y tiempo para poder realizar este trabajo.

A mis sinodales: Dra. Alma Vázquez Luna, Dra. Rosa Isela Guzmán Gerónimo y Dr. Cid Ramón González González, por su tiempo empleado y sus consejos para la realización de este trabajo.

A todos los doctores que integran la maestría por los conocimientos impartidos a lo largo de dos años.

A todos mis compañeros de generación, por todo su apoyo, ayuda y paciencia durante el tiempo que compartimos. Un especial agradecimiento a Jacky, Erick y Dafne muchas gracias por todo lo que me han enseñado, por su apoyo desde las primeras clases hasta la primera vez que pise un laboratorio, gracias por toda su paciencia y por la gran amistad que hemos formado en todo este tiempo, por ser mis confidentes y compañeros de desvelos, de risas y de pláticas interminables, son de las mejores personas que he conocido y son muy especiales para mí, los quiero mucho. A mis compañeras de laboratorio, Jazmín, Flor y Kari quienes nunca se negaron a ayudarme, gracias por sus valiosas contribuciones a mi trabajo.

A mis amigas de mi vida, Ale y Arantza, quienes siempre han estado conmigo en todo momento, por siempre alentarme y darme ánimos, consejos y muchos momentos bonitos que hemos vivido a lo largo de todos estos años que llevamos siendo amigas. Gracias por su valiosa amistad y por ser parte importante en mi vida. Las quiero muchísimo.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
SUMMARY .....	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Género <i>Capsicum</i> .....	3
2.1.1. Generalidades del género <i>Capsicum</i> .....	3
2.1.2. Principales compuestos bioactivos del chile.....	4
2.1.3. Capsaicinoides.....	5
2.1.4. Carotenoides.....	8
2.1.5. Chile chipotle.....	10
2.2. Antioxidantes.....	11
2.2.1. Clasificación de antioxidantes.....	11
2.2.2. Mecanismo de acción.....	13
2.2.3. Oxidación lipídica.....	15
2.2.4. Actividad antioxidante.....	17
2.3. Antimicrobianos.....	18
2.3.1. Generalidades de los antimicrobianos.....	18
2.3.2. Clasificación de antimicrobianos.....	19
2.3.3. Grupos químicos con acción antimicrobiana aislados de plantas.....	19
2.3.4. Mecanismo de acción.....	21
2.3.5. Efecto sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas.....	22

2.3.6.	Plantas que destacan por su actividad antimicrobiana.....	23
2.4.	Oleorresinas.....	25
2.4.1.	Aspectos generales de oleorresinas.....	25
2.4.2.	Extracción convencional de oleorresinas.....	26
2.4.3.	Aceites comestibles como medio de extracción.....	28
3.	ANTECEDENTES.....	30
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
5.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	33
5.1.	Objetivos.....	33
5.1.1.	Objetivo general.....	33
5.1.2.	Objetivos específicos.....	33
5.2.	Hipótesis.....	33
6.	DIAGRAMA EXPERIMENTAL.....	34
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
7.1.	Aspectos generales.....	35
7.2.	Materias primas.....	35
7.2.1.	Bacterias y condiciones de cultivo.....	35
7.3.	Métodos.....	36
7.3.1.	Acondicionamiento de la materia prima.....	36
7.3.2.	Extracción líquido-sólido.....	36
7.3.3.	Caracterización físico-química de la oleorresina.....	37
7.3.4.	Carotenos totales en la oleorresina y el chile en polvo.....	37
7.3.5.	Compuestos fenólicos.....	38
7.3.6.	Determinación de color.....	39
7.4.	Actividad antioxidante.....	40
7.4.1.	Determinación del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP).....	40

7.4.2.	<b>Método por ABTS<sup>+</sup></b> .....	41
7.5.	<b>Cinética de oxidación a 6°C, 25 °C y 45 °C</b> .....	42
7.6.	<b>Estimación de la velocidad de formación de peróxidos y degradación de carotenos</b> .....	45
7.7.	<b>Actividad antimicrobiana</b> .....	47
7.7.1.	<b>Acondicionamiento de microorganismos</b> .....	47
7.7.2.	<b>Prueba de difusión en agar</b> .....	47
7.7.3.	<b>Determinación de la concentración mínima inhibitoria en agar</b> .....	48
7.8.	<b>Análisis estadístico</b> .....	48
8.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	49
8.1.	<b>Selección de la materia prima a utilizar para la realización de la oleorresina</b> .....	49
8.2.	<b>Caracterización físico-química de la oleorresina</b> .....	51
8.2.1.	<b>Carotenos y polifenoles totales</b> .....	51
8.2.2.	<b>Determinación de color</b> .....	53
8.3.	<b>Evaluación de la oxidación total de la oleorresina y el aceite de aguacate durante almacenamiento</b> .....	54
8.3.1.	<b>Índice de peróxidos</b> .....	55
8.3.2.	<b>Índice de anisidina</b> .....	60
8.3.3.	<b>Valor de Totox</b> .....	62
8.3.4.	<b>Degradación de carotenos totales</b> .....	65
8.3.5.	<b>Degradación de compuestos polifenólicos</b> .....	70
8.3.6.	<b>Atributos de color: Luminosidad, Hue y Cromaticidad</b> .....	72
8.4.	<b>Actividad antioxidante</b> .....	74
8.4.1.	<b>Porcentaje de inhibición por el método de ABTS<sup>+</sup></b> .....	74
8.4.2.	<b>Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC)</b> .....	76
8.5.	<b>Actividad antimicrobiana</b> .....	80

8.5.1. Pruebas de sensibilidad microbiana por difusión en placa. ....	80
8.5.2. Concentración mínima inhibitoria. ....	82
9. CONCLUSIONES.....	84
10. BIBLIOGRAFÍA.....	85
11. APÉNDICES. ....	95
APÉNDICE A. Curvas de calibración. ....	95
APÉNDICE B. Propiedades fisicoquímicas durante el proceso de almacenamiento. .....	97
APÉNDICE C. Gráficas del modelado matemático para la determinación de la velocidad de formación de peróxidos y degradación de carotenos en ambas concentraciones de oleorresinas. ....	100
APÉNDICE D. Congresos en el que este trabajo se presentó.....	104

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica del género Capsicum (Nuez et al., 1996). ....	3
<b>Cuadro 2.</b> Compuestos antioxidantes en especias y hierbas (Embucado, 2015). .....	12
<b>Cuadro 3.</b> Mecanismo de acción de los antioxidantes (Pokorny et al., 2001).....	14
<b>Cuadro 4.</b> Actividad antimicrobiana de productos de plantas seleccionados (Taylor, 2015). ....	24
<b>Cuadro 5.</b> Condiciones de extracción utilizadas. ....	37
<b>Cuadro 6.</b> Zona de inhibición de bacterias Gram positivas y negativas para oleorresinas de 3 variedades de chile elaboradas con aceite de maíz. ....	49
<b>Cuadro 7.</b> Zona de inhibición (mm) de bacterias patógenas para oleorresina de chile chipotle elaborada con aceite de oliva. ....	50
<b>Cuadro 8.</b> Caracterización química de la oleorresina. ....	51
<b>Cuadro 9.</b> Caracterización física de las oleorresinas. ....	53
<b>Cuadro 10.</b> Parámetros cinéticos en la formación de peróxidos a lo largo del almacenamiento. ....	59
<b>Cuadro 11.</b> Energía de activación durante el almacenamiento en ambas oleorresinas. ....	60
<b>Cuadro 12.</b> Índice de anisidina a lo largo del almacenamiento en las dos concentraciones de oleorresinas y aceite de aguacate. ....	61
<b>Cuadro 13.</b> Porcentaje de degradación de carotenos en las dos concentraciones de oleorresinas. ....	67
<b>Cuadro 14.</b> Parámetros cinéticos en la degradación de carotenoides a lo largo del almacenamiento. ....	69
<b>Cuadro 15.</b> Energía de activación durante el almacenamiento en ambas oleorresinas. ....	70
<b>Cuadro 16.</b> Porcentaje de degradación de compuestos fenólicos al final del almacenamiento a las 3 diferentes temperaturas. ....	72
<b>Cuadro 17.</b> Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS+. ....	75

<b>Cuadro 18.</b> Porcentaje de pérdida de la actividad antioxidante mediante ABTS al término del almacenamiento. ....	78
<b>Cuadro 19.</b> Porcentaje de pérdida de la actividad antioxidante mediante FRAP al término del almacenamiento. ....	78
<b>Cuadro 20.</b> Zona de inhibición (mm) de bacterias patógenas para ambas de oleorresina de chile chipotle y el control (aceite de aguacate). ....	80
<b>Cuadro 21.</b> Zona de inhibición (mm) de bacterias ácido lácticas para ambas de oleorresina de chile chipotle elaborada con aceite de aguacate. ....	81
<b>Cuadro 22.</b> Concentración mínima inhibitoria en ambas concentraciones de oleorresinas.....	83
<b>Cuadro 23.</b> Formación de peróxidos durante el almacenamiento en ambas oleorresinas y aceite de aguacate.....	97
<b>Cuadro 24</b> Índice de Totox a lo largo del almacenamiento.....	98
<b>Cuadro 25.</b> Degradación de carotenos totales en ambas concentraciones de oleorresinas.....	99
<b>Cuadro 26.</b> Degradación de compuestos polifenólicos al inicio y final del almacenamiento.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Género Capsicum (Omolo et al. 2014).	3
<b>Figura 2.</b> Estructuras comunes de a) capsaicinoides y b) capsinoides (Aza-González et al., 2010).	6
<b>Figura 3.</b> Estructura de la capsaicina y capsiate (Reyes-Escogido et al., 2011).	8
<b>Figura 4.</b> Principales carotenos en alimentos (Rodríguez-Amaya, 1999).	9
<b>Figura 5.</b> Esquema simplificado del mecanismo de autoxidación (Shahidi y Zhong, 2005).	16
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de acción antimicrobiana de extractos vegetales en la célula (Burt, 2004).	21
<b>Figura 7.</b> Pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas (Sánchez, 2006).	23
<b>Figura 8.</b> Relación entre la energía de activación con la velocidad de reacción y la temperatura (K).	47
<b>Figura 9.</b> Color de las dos concentraciones de oleorresinas: 1:2 (a) y 1:3 (b).	54
<b>Figura 10.</b> Índice de peróxidos en el aceite de aguacate a las 3 temperaturas a lo largo del almacenamiento.	55
<b>Figura 11.</b> Índice de peróxidos en las oleorresinas a) 1:2 y b) 1:3 durante el almacenamiento a 6, 25 y 45°C.	57
<b>Figura 12.</b> Índice de peróxidos en ambas concentraciones de oleorresinas y aceite de aguacate a 45 °C.	58
<b>Figura 13.</b> Valor de Totox en las oleorresinas 1:2 (a) y 1:3 (b).	63
<b>Figura 14.</b> Valor de Totox en el aceite de aguacate.	64
<b>Figura 15.</b> Valor de Totox en las dos concentraciones de oleorresina y aceite de aguacate a 45°C.	65
<b>Figura 16.</b> Degradación de carotenos totales a lo largo del almacenamiento en las dos concentraciones de oleorresinas.	66
<b>Figura 17.</b> Degradación de carotenos totales en el aceite de aguacate.	68

<b>Figura 18.</b> Degradación de compuestos polifenólicos en las dos concentraciones de oleorresina a) 1:2 y b) 1:3, y c) aceite de aguacate, en las 3 diferentes temperaturas a lo largo del almacenamiento.....	71
<b>Figura 19.</b> Propiedades de color en la concentración 1:2 (L*= luminosidad, C*= Chroma, H*=Hue) a las 3 diferentes temperaturas a lo largo del tiempo. ....	73
<b>Figura 20.</b> Propiedades de color en la concentración 1:3 (L*= luminosidad, C*= Chroma, H*=Hue) a las 3 diferentes temperaturas a lo largo del tiempo. ....	73
<b>Figura 21.</b> Propiedades de color en el aceite de aguacate (L*= luminosidad, C*= Chroma, H*=Hue) a las 3 diferentes temperaturas a lo largo del tiempo. ....	74
<b>Figura 22.</b> Actividad antioxidante mediante ABTS en las dos concentraciones de oleorresinas a) y b) y el aceite de aguacate c). ....	77
<b>Figura 23.</b> Actividad antioxidante mediante FRAP en las dos concentraciones de oleorresinas a) y b) y el aceite de aguacate c). ....	79

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

<b>%</b>	Porcentaje
<b>±</b>	Más/menos
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitros
<b>µmol</b>	Micromoles
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>BAL</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>CMH</b>	Caldo Mueller Hinton
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>Ea</b>	Energía de activación
<b>g</b>	Gramo
<b>GAE</b>	Equivalentes a ácido gálico
<b>h</b>	Hora
<b>HLB</b>	Balance hidrofílico lipofílico
<b>k</b>	Coeficiente cinético
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>m</b>	Masa
<b>meq</b>	miliequivalentes
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio
<b>nm</b>	Nanómetro

<b>p/v</b>	Peso/volumen
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>t</b>	Tiempo
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>v/v</b>	Volumen/volumen

## RESUMEN

Se han atribuido propiedades antioxidantes y antimicrobianas a las oleorresinas de Chile debido a su contenido de carotenoides, capsaicina y compuestos fenólicos. Éste tipo de extractos oleosos son comúnmente extraídos con solventes orgánicos; sin embargo, pueden quedar residuos dañinos para la salud y para el medio ambiente. Por ello se necesitan nuevos métodos de extracción, como lo es el uso de aceites comestibles como medio de extracción. El aceite de aguacate se extrae mediante presión física es una excelente opción por los compuestos bioactivos en su composición. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la capacidad antioxidante y antimicrobiana, así como su estado de oxidación a lo largo del almacenamiento a tres diferentes temperaturas de dos distintas concentraciones de oleorresinas de Chile chipotle realizadas con aceite de aguacate. Los resultados mostraron que el aceite de aguacate es un buen medio de extracción de carotenoides provenientes del Chile. A lo largo del almacenamiento la oxidación de las oleorresinas y el control (aceite de aguacate) incrementó conforme la temperatura aumentó. Los ensayos para la determinación de la capacidad antioxidante mostraron resultados favorables. Se observó que tanto la oleorresina como el aceite de aguacate presentaron una actividad antimicrobiana, siendo más sensibles las bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*) que las bacterias Gram negativas (*Salmonella entérica* y *Escherichia coli*) debido a su estructura externa que bloquea la penetración de compuestos hidrofóbicos a la membrana celular. El resultado de estos experimentos mostró que las oleorresinas de Chile tienen alto poder antioxidante y propiedades antimicrobianas, y que el aceite de aguacate es una excelente opción para su extracción, por lo que puede ser utilizado como un ingrediente bioactivo natural en la fabricación de alimentos.

Palabras clave: oleorresinas, *Capsicum annum* L., antioxidante, antimicrobiano, almacenamiento.

## SUMMARY

Antimicrobial and antioxidant properties have been attributed to chilli oleoresins due to its content of carotenoids, capsaicin and phenolic compounds. This type of oily extracts are commonly extracted with organic solvents, however, there may be residues which are harmful to health and the environment. That is why new methods of extraction are needed, for instance, the use of edible oils as means of extraction. Avocado oil can be obtained by cold press from the fruit and is an excellent option due to the phytochemicals present in its composition. The aim of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial capacity of two concentrations of chipotle oleoresins made with avocado oil and its oxidation state during storage at three different temperatures. The results showed that according to the lipid profile of avocado oil, this is a good medium of extracting carotenoids. During storage, oxidation of oleoresins and control (avocado oil) increased proportionally with the temperature. Assays for the determination of antioxidant capacity showed high antioxidant potential. It was observed that both oleoresin and avocado oil possess antimicrobial activity, being Gram-positive bacteria more sensitive (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) than Gram negative bacteria (*Salmonella enterica* and *Escherichia coli*) due to their external structure that block the penetration of hydrophobic compounds into the cell membrane. The outcome of these experiments showed that oleoresins from chilli have high antioxidant and antimicrobial properties, and that avocado oil is an excellent option for its extraction, so they can be used as a natural bioactive ingredient in the manufacturing of food.

Keywords: oleoresins, *Capsicum annum*, antioxidant, antimicrobial, storage.

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, hay nuevas preocupaciones sobre la inocuidad en los alimentos debido a la creciente aparición de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos causadas por microorganismos patógenos (*L. monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*), así como por el uso de aditivos sintéticos para prevenir la oxidación como butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT) y Terbutil hidroquinona (TBHQ) (Holley, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010; Kishk, 2013, Lammie *et al.*, 2016).

Debido a la mayor conciencia de los consumidores y la preocupación con respecto a los aditivos químicos sintéticos así como la creciente demanda por productos naturales, los antimicrobianos y antioxidantes naturales están recibiendo mucha atención por los beneficios que pueden proporcionar. Entre estos beneficios destacan: la reducción de la necesidad de antibióticos, el control de la contaminación microbiana en los alimentos, así como la mejora en las tecnologías de extensión de vida útil eliminando patógenos indeseables y/o retrasando el deterioro microbiano. Por su parte los antioxidantes de origen natural mejoran la estabilidad de los alimentos que contienen lípidos evitando así la pérdida de calidad sensorial y nutricional (Holley, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010).

En general, existen especies vegetales que poseen propiedades bactericidas, insecticidas y fungicidas. Entre ellos figura el género de *Capsicum*, comúnmente conocido como chile, que es ampliamente utilizado para fines culinarios e industriales por su sabor y color característicos. Se le han atribuido propiedades antimicrobianas, antioxidantes y pro-vitamínicas a diversas variedades de *Capsicum* dado su contenido de compuestos polifenólicos y carotenoides (Rodríguez Saucedo, 2011; Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012; Ponce *et al.*, 2008).

Las oleorresinas contienen los compuestos activos liposolubles de sus correspondientes especies en su forma más concentrada, que las hacen más estables, conteniendo componentes tanto no volátiles como volátiles, siendo estos últimos varios grupos de compuestos químicos, como los carotenoides, esteroides, alcaloides, glucósidos, etc. Esta fracción puede ser esencial para el sabor, el color, sensación en la boca, la textura y las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los alimentos, lo que las hace una excelente opción para el uso en alimentos (Kanakdande *et al.*, 2007; Restrepo, 2006; Shaikh, *et al.*, 2006).

## 2. MARCO TEÓRICO.

### 2.1. Género *Capsicum*.

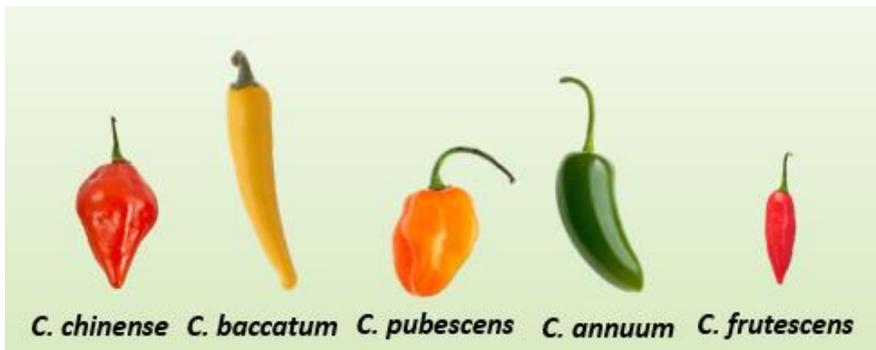
#### 2.1.1. Generalidades del género *Capsicum*.

En México, se denominan comúnmente como chiles o pimientos todas las especies del género *Capsicum*. Éste género es una de las solanáceas de mayor importancia económica a nivel mundial (IBPGR, 1983). El nombre científico del género deriva del griego: según unos autores de *Kapso* (picar), según otros de *Kapsakes* (cápsula), cuya clasificación taxonómica se muestra en el siguiente cuadro 1.

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del género *Capsicum* (Nuez *et al.*, 1996).

<b>División</b>	<i>Spermatofita</i>
<b>Clase</b>	<i>Dicotiledoneae</i>
<b>Orden</b>	<i>Solanales</i>
<b>Familia</b>	<i>Solanaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Capsicum</i>

El género *Capsicum* está formado por pequeñas hierbas perennes nativas de América del Sur tropical. Existen más de 20 especies; siendo las más domesticadas y cultivadas en todo el mundo: *C. annum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *chinense* y *C. pubescens* (Figura 1) (Omolo *et. al.*, 2014).



**Figura 1.** Género *Capsicum* (Omolo *et al.* 2014).

La planta del chile tiene hojas simples, de forma lanceolada u ovalada, formadas por un peciolo largo, que une la hoja con el tallo y la parte expandida, la lámina foliar o limbo. Su raíz es poco profunda y carece de raíz principal, pero desarrollan muchas raíces fibrosas que crecen hasta 30 centímetros que crecen por debajo de la superficie del suelo. Las flores son hermafroditas, esto es, la misma flor produce gametos masculinos y femeninos. La semilla del fruto tiene una forma aplastada hemidiscoidal y la mayoría de las semillas se sitúan en la región de la placenta central (corazón). Todas las especies cultivadas de *Capsicum* tienen semillas de color amarillo y su peso y tamaño las cuales están relacionadas con el tamaño del fruto (Nuez *et al.*, 1996; Sung *et al.*, 2005).

Algunas especies de este género han sido utilizadas de manera ornamental; sin embargo el único órgano que tiene gran importancia económica es el fruto. El fruto de chile ha sido botánicamente definido como una baya de una estructura hueca, llena de aire, con forma de cápsula (Nuez *et al.*, 1996; Waizel-Bucay y Camacho-Morfín, 2011)

La constitución anatómica del fruto está representada básicamente por el pericarpio y la semilla. Existe gran diversidad de formas y tamaños en los frutos pero, generalmente se agrupan en alargados y redondeados y tamaño variable, su color es verde al principio y luego cambia con la madurez a amarillo o rojo púrpura en algunas variedades, en todos los casos, se encuentra una amplia gama de tonalidades (Nuez *et al.*, 1996).

### **2.1.2. Principales compuestos bioactivos del chile.**

Además de su valor agrícola importante, el chile (*Capsicum spp.*) es una fuente natural de antioxidantes. Tiene gran valor nutricional por ser una buena fuente de diversos fitoquímicos como: flavonoides, compuestos fenólicos, carotenos, vitaminas (A y C) y capsaicinoides (Álvarez-Parrilla *et al.*, 2011; Antonious *et al.*, 2006). La ingesta de estos compuestos en los alimentos es un importante factor de protección de la salud. Se ha reconocido diversos beneficios en la prevención de algunas enfermedades, incluyendo el cáncer y las

enfermedades cardiovasculares, obteniendo dichos beneficios cuando se toma todos los días en cantidades adecuadas (Navarro *et al.*, 2006).

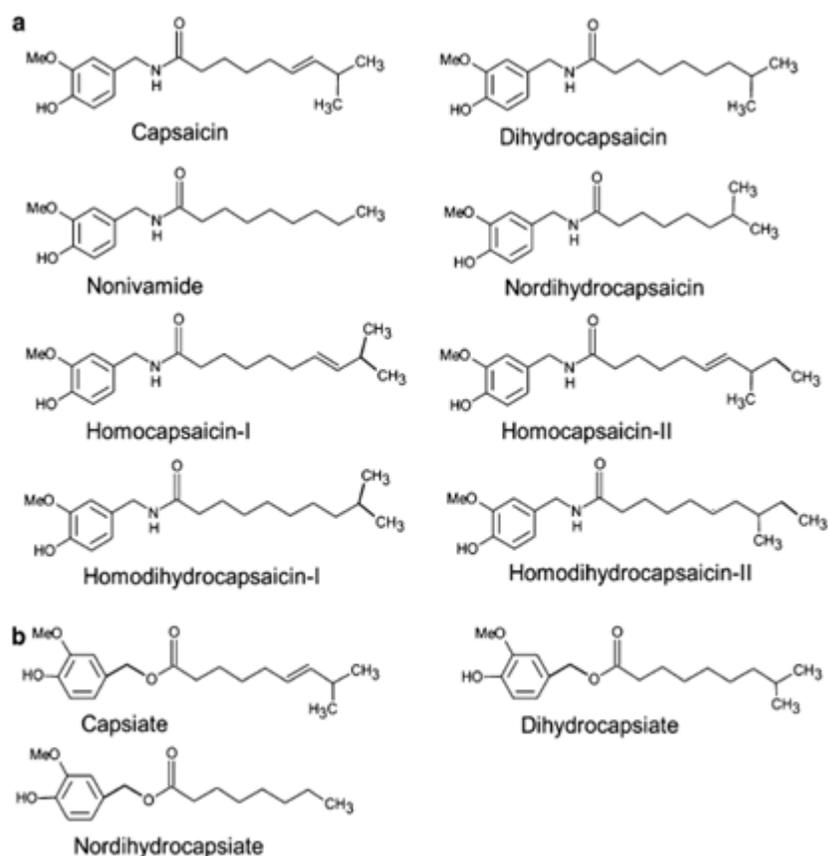
### 2.1.3. Capsaicinoides.

Los chiles son una buena fuente de nutrimentos como carbohidratos, azúcares, calcio, magnesio,  $\beta$ -carotenos, ácidos fenólicos, ácido ascórbico y tocoferoles, así como de capsaicinoides, los cuales son los compuestos responsables de la pungencia o “calor” típico de los chiles. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos tienen una gran importancia por sus diversas aplicaciones farmacéuticas, antimicrobiales e insecticidas, además de su creciente popularidad como alimento o especie, asimismo de que se ha demostrado tener excelentes propiedades antioxidantes (Yanishlieva-Maslarova, 2001; Barbero *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009).

La biosíntesis de estos compuestos se produce en las células de la epidermis de la placenta, donde son secretadas hacia la pared celular externa, y finalmente se acumulan dentro de las estructuras nombradas "vesículas" situado en la superficie placenta. Los capsaicinoides se encuentran en diferentes cantidades en los frutos de *Capsicum*, dependiendo sobre todo en el genotipo, la etapa de desarrollo y condiciones de cultivo y maduración (Topuz y Ozdemir, 2007; Aza-González *et al.*, 2011). Se pueden encontrar tanto en chiles picosos como en los dulces; sin embargo, en estos últimos los presentan en cantidades no detectables para el ser humano (Singh *et al.*, 2009).

Todos los capsaicinoides que se han identificados en los frutos de *Capsicum* son vanillilamidas (amidas primarias monosustituidas) de ácidos grasos ramificados o alcaloides, de 9-11 carbonos. Este grupo de compuestos químicos alcaloides tienen una estructura similar a la piperina (el componente activo de la pimienta blanca y negra, *Piper nigrum*) y zingerona (el componente activo del jengibre, *Zingiber officinale*) (Topuz y Ozdemir, 2007; Berke 2012).

Los componentes pungentes mayoritarios son la capsaicina y la dihidrocapsaicina (figura 2), los cuales pueden fluctuar dentro y entre especies y sus concentraciones van a depender de diversos factores ambientales. El contenido de capsaicina y de dihidrocapsaicina puede oscilar entre 2 y 6.639 mg/kg en ocho diferentes genotipos de chiles. Además de estos dos capsaicinoides principales, otros capsaicinoides menores se encuentran en los chiles, tales como norhidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina y homocapsaicina, entre otros (Antonious y Jarret, 2006; Barbero *et al.*, 2006; Usman *et al.*, 2014).



**Figura 2.** Estructuras comunes de a) capsaicinoides y b) capsinoides (Aza-González *et al.*, 2010).

Recientemente, estos compuestos se han utilizados con fines industriales y medicinales. En alimentos son ampliamente utilizados como aditivos alimentarios, ya que son ingredientes básicos para salsas y aderezos, como el curry (Aza-

González *et al.*, 2010). Los capsaicinoides también tienen fuertes propiedades fisiológicas y farmacológicas, ya que además de tener actividad antioxidante, pueden mejorar la secreción de catecolaminas adrenales, promover el metabolismo energético y suprimir la acumulación de grasa corporal. Igualmente ha sido utilizado como analgésicos, regulando la presión arterial, anticancerígeno y antiinflamatorio, (Topuz y Ozdemir, 2007; Singh *et al.*, 2009; Aza-González *et al.*, 2010).

De la misma manera se han usado como ingrediente activo en diversos productos que se encuentran actualmente en el mercado como por ejemplo: en aerosoles de autoprotección o en champús para la prevención en la pérdida de cabello e incluso como repelente para evitar que los ratones puedan roer los cables eléctricos subterráneos (Aza-González *et al.*, 2010).

#### **2.1.3.1. Capsaicina.**

La capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es un compuesto lipofílico, cristalino, incoloro e inodoro cuya fórmula molecular es  $C_{18}H_{27}NO_3$ . Su peso molecular es 305.4118 g/mol, y es soluble en aceites y alcohol. Su punto de fusión es de 65°C, punto de ebullición a 0.01 mmHg de 210-220°C, se sublima a 115°C y una  $UV_{m\acute{a}x}$  a 22.281 nm. Las glándulas de la placenta que se encuentra en el fruto es el productor de estos compuestos (Arora *et al.*, 2011; Reyes-Escogido *et al.*, 2011).

Recientemente se ha encontrado que la capsaicina tiene análogos provenientes de los pimiento rojos no pungentes; los capsinoides (Figura 3). Estos tienen un notable parecido estructural con los capsaicinoides excepto por su vinculación centro: una amida en la mitad para los capsaicinoides y un éster en los capsinoides (Reyes-Escogido *et al.*, 2011). En estudios recientes, se ha informado que cada análogo de los capsaicinoides es responsable de diferente sensación de ardor en la boca. La capsaicina y dihidrocapsicina son los capsaicinoides más picantes, con un valor equivalente de  $16.1 \times 10^6$  unidades scoville de calor (SHU) (Topuz y Ozdemir, 2007).



**Figura 3.** Estructura de la capsaicina y capsiate (Reyes-Escogido *et al.*, 2011).

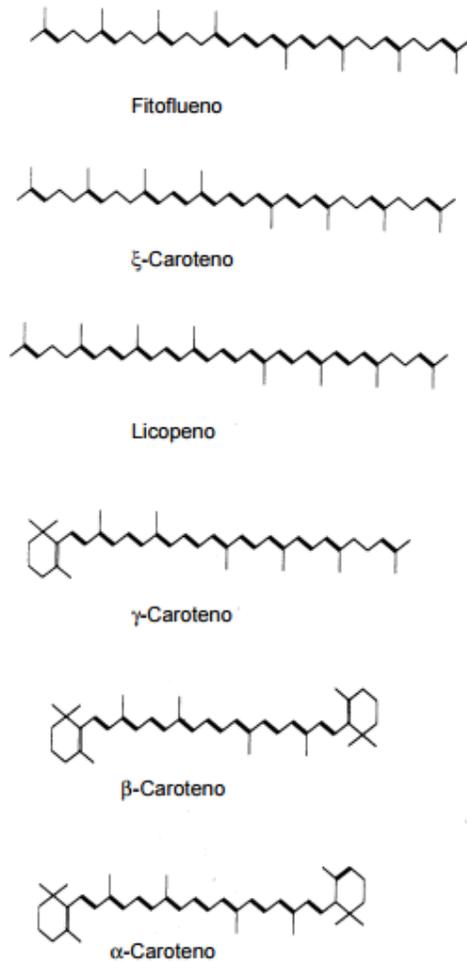
#### 2.1.4. Carotenoides.

Estos compuestos constituyen uno de los principales pigmentos de ciertas frutas, verduras, flores y de muchos microorganismos, como las algas rojas y verdes, hongos y bacterias fotosintéticas. Estas moléculas se encuentran libres en los tejidos de las plantas, en forma de cristales, como sólidos amorfos o en solución en medio lipídico, o bien, pueden presentarse como ésteres o combinados con azúcares y proteínas (Fennema, 1985). Si bien se le ha dado una importancia nutricional en los últimos años debido a que algunos de estos compuestos poseen actividad provitamínica A, el interés por estos pigmentos se ha multiplicado, ya que algunos estudios han indicado que pueden actuar como antioxidantes (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007).

Los carotenoides son un grupo de moléculas extremadamente hidrofóbicas, liposolubles, con muy limitada o nula solubilidad en agua, solubles en su mayoría solamente en disolventes apolares. Son compuestos muy inestables y sensibles al oxígeno, la luz y la temperatura. Conforman uno de los más importantes grupos de colorantes naturales, debido a su amplia distribución, diversidad estructural y numerosas funciones, y que se encuentran en casi todos los seres vivos, a pesar de que solo los vegetales pueden elaborarlos. (Domínguez, 2013).

Químicamente los carotenoides son tetraterpenoides, una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono ( $C_{40}$ ), que contienen 9 dobles enlaces conjugados en la cadena poliénica central (pueden ser de 3 a 15), con diversos grupos terminales (Figura 4), que causan las variadas propiedades

cromóforas en una clasificación de color rojo, naranja o amarillo, que son los que capta el ojo humano (Topuz y Ozdemir, 2007).



**Figura 4.** Principales carotenos en alimentos (Rodríguez-Amaya, 1999).

Los carotenoides del chile se pueden dividir en tres grupos:

1. Pigmentos principales o característicos: capsantina ( $C_{40}H_{38}O_3$ ) y capsorubina ( $C_{49}H_{60}O_4$ ), que son los que dan el color rojo.
2. Pigmentos con efecto de provitamina: criptoxantina ( $C_{40}H_{56}O$ ) y  $\beta$ -caroteno ( $C_{40}H_{56}$ ).
3. Otros pigmentos carotenoides: zeaxantina ( $C_{40}H_{56}O$ ) y luteína ( $C_{40}H_{56}O$ ).

La estructura de los carotenoides les confiere propiedades muy especiales y notables, que son la base de sus variadas funciones y acciones en toda clase de organismos vivos, son esenciales para la fotosíntesis pues brindan protección contra el efecto foto-oxidativo, promueven el mejoramiento del sistema inmunológico, y son indispensables para una vida en un ambiente de oxígeno debido a su alta capacidad antioxidante y gran poder en la inhibición de radicales libres, con lo que promueve la prevención de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración de la piel y envejecimiento (Domínguez, 2013).

### **2.1.5. Chile chipotle**

Entre las especies domesticadas del género *Capsicum*, *C annuum* es, por mucho, la más conocida y de mayor importancia económica ya que presenta una distribución más grande en todo el mundo y por lo general estos chiles se consumen crudos o cocidos y se han utilizado como aditivos en la industria alimentaria.

Algunas variedades, como el jalapeño y serrano, se utilizan principalmente para preparar salsas y guacamole. Otras variedades de chile, como piquín y de árbol, se utilizan principalmente en estado seco y molido. El chile piquín también se consume en escabeche. El chile chipotle (ahumado) es muy popular debido a su singular sabor, un poco dulce, y se pueden encontrar enlatados y/o procesados (González-Zamora *et al.*, 2013).

El chile chipotle (*Capsicum annum*) es un alimento e ingrediente de gran importancia en muchos países que resulta de la deshidratación de chile jalapeño rojo de cualquier variedad, con humo y calor de leña. Coloquialmente se le conoce también como “chilpotle” (NMX-FF-108-SCFI-2007, 2007). La palabra chipotle deriva del Náhuatl “chili” que se refiere a fruto picante y “pochtli” que significa ahumado. México es uno de los principales productores de chile jalapeño y el principal productor a nivel internacional de chile chipotle.

## **2.2. Antioxidantes.**

Para evitar la degradación de los alimentos debido a la oxidación, el empleo de antioxidantes se ha convertido en una necesidad para los productos alimenticios que son sensibles a este tipo de cambios químicos. Se han definido como sustancias que en pequeñas cantidades son capaces de prevenir o retardar la oxidación de materiales fácilmente oxidables, el cual, al interactuar con un radical libre, cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre no tóxico (Frankel y Meyer, 2000; Nadeem, 2011).

### **2.2.1. Clasificación de antioxidantes.**

Los antioxidantes se pueden clasificar como naturales o sintéticos. Actualmente casi todos los alimentos procesados contienen antioxidantes sintéticos, en pequeñas cantidades que son seguras, aunque hay estudios que indican lo contrario. El BHT (hidroxitolueno butilado) y BHA (hidroxianisol butilado) son los antioxidantes químicos más utilizados en la industria alimentaria. Sin embargo se ha reportado en algunos estudios que estos compuestos pueden ser perjudiciales para la salud ya que han demostrado ser cancerígenos, además de que no tienen beneficios nutricionales adicionales (Carocho y Ferreira, 2013, Embuscado, 2015). Hay una creciente demanda por los antioxidantes naturales debido a preocupaciones acerca de la seguridad de los antioxidantes sintéticos, además del incremento sobre las preferencias del consumidor por productos naturales y con un menor uso de aditivos alimentarios en productos alimenticios (Embuscado, 2015).

Las especias y hierbas son excelentes fuentes de antioxidantes naturales proveen sabores y colores a los alimentos, además de que se han utilizado con fines medicinales (Cuadro 2). Son una de las mejores fuentes de antioxidantes naturales debido a que contienen potentes compuestos que han demostrado impartir un efecto antioxidante en los alimentos (Embuscado, 2015).

**Cuadro 2.** Compuestos antioxidantes en especias y hierbas (Embuscado, 2015).

<b>Especia</b>	<b>Compuestos antioxidantes</b>
Clavo	Ácidos fenólicos (ácido gálico), glucósidos de flavonoles, aceites volátiles fenólicos (eugenol, eugenol acetilo), taninos.
Cúrcuma	Curcumina
Jengibre	Shogaol, gingerol.
Mejorana	Beta-caroteno, beta-sitosterol, ácido cafeico, carvacrol, eugenol, hidroquinona, mirceno, ácido rosmarínico, 4-terpineol.
Nuez moscada	Myristphenone, aceites volátiles fenólicos, ácidos fenólicos (ácido cafeico), flavonoides (catequinas).
Orégano	Ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido rosmarínico, derivados de cafeoil, cavacrol, flavonoides.
Pimiento rojo	Beta-caroteno en la fruta, beta-sitosterol en la planta, campesterol, ácido cafeico, canfeno en la fruta, la capsaicina, capsantina en la fruta, ácido clorogénico en la fruta, eugenol en la fruta, gamma-terpineno en la fruta, hesperidina en la fruta, ácido mirístico.
Romero	Carnosol, carnósico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, diterpenos fenólicos (ácido carnósico), carnosol, epi-rosmanol, flavonoides.
Salvia	Rosmanol, epirosmanol, ácidos fenólicos (ácido rosmarínico), diterpenos fenólicos (ácido carnósico), flavonoides.
Semilla de sésamo	Sesaminol, $\alpha$ -tocoferol, sesamol.
Tomillo	Ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido rosmarínico), timol, diterpenos fenólicos, flavonoides.

Los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico, los carotenoides, algunos compuestos a base de proteínas, productos de la reacción de Maillard, fosfolípidos y esteroides son los antioxidantes naturales que se encuentran en los alimentos. Por ejemplo, los compuestos fenólicos en alimentos hacen que la actividad antioxidante sea principalmente a su papel como agentes reductores, donantes de hidrógeno e inactivadores de oxígeno singlete. Algunos compuestos fenólicos también tienen la capacidad para quelar iones metálicos que actúan como catalizadores en reacciones de oxidación (Embuscado, 2015).

### **2.2.2. Mecanismo de acción.**

Los antioxidantes pueden actuar en los alimentos por diferentes mecanismos: (1) atrapan a radicales libres que inician reacciones de iniciación de oxidación, (2) inactivan iones metálicos, (3) quitan las especies reactivas de oxígeno como radicales libres, (4) rompen la cadena de reacciones de iniciación, y (5) reducen los peróxidos para prevenir la formación de radicales libres (Eskin *et al.*, 2001).

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con electrones desapareados altamente inestables y activos hacia las reacciones químicas con otras moléculas. Se derivan de tres elementos: oxígeno, nitrógeno y azufre, creando así las especies reactivas de oxígeno (ROS, *por sus siglas en inglés*), especies reactivas de nitrógeno (RNS, *por sus siglas en inglés*) y especies reactivas de azufre (RSS, *por sus siglas en inglés*). Las ROS incluyen radicales libres como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroperoxilo ( $HO_2\cdot$ ), radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el óxido nítrico (NO), y otras especies como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), ácido hipocloroso (HOCl) y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Las RNS derivan de NO por la reacción con  $O_2^-$ , formando  $ONOO^-$ . Las RSS se forman fácilmente por la reacción de ROS con tioles. Los principales blancos de estas especies reactivas son proteínas, moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico), azúcares y lípidos (Carocho, 2013).

La producción de ROS, RNS y RSS se ha relacionado con muchas enfermedades graves como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la aterosclerosis y derrame cerebral, trastornos neurológicos, trastornos renales, trastornos hepáticos, hipertensión, artritis reumatoide, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, trastornos degenerativos asociados con el envejecimiento, diabetes mellitus, complicaciones de diabetes, cataratas, la obesidad, autismo, enfermedades como Alzheimer, Parkinson y de Huntington, vasculitis, glomerulonefritis, lupus eritematoso, úlceras gástricas, hemocromatosis y preeclampsia, entre otros (Carocho, 2013).

**Cuadro 3.** Mecanismo de acción de los antioxidantes (Pokorny *et al.*, 2001).

<b>Tipo de antioxidante</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Ejemplos de antioxidantes</b>
<b>Antioxidantes propiamente dichos</b>	Inactivando radicales libres lipídicos	Compuestos fenólicos
<b>Estabilizadores de hidroperóxidos</b>	Previniendo descomposición de hidroperóxidos en radicales libres	Compuestos fenólicos
<b>Sinérgicas</b>	Promoviendo la actividad de los antioxidantes propiamente dichos	Ácido cítrico, ácido ascórbico
<b>Quelantes de metales</b>	Ligando metales pesados o compuestos inactivos	Ácido fosfórico, compuestos Maillard, ácido cítrico
<b>Extinguidores de oxígeno singulete</b>	Transformando oxígeno singulete en oxígeno triplete	Carotenos
<b>Sustancias que reducen hidroperóxido</b>	Reduciendo hidroperóxidos por vías no radicalarias	Proteínas, aminoácidos

Hay diversos compuestos bioactivos que han demostrado ser antioxidantes (Cuadro 3). Otro compuesto que se encuentra exclusivamente en las plantas de *Capsicum* y que ha mostrado ser un potente antioxidante son los capsaicinoides. Entre estos compuestos se encuentran en mayor medida la capsaicina y dihidrocapsaicina, los cuales pueden inhibir la peroxidación de lípidos mediada por el hierro y la oxidación de cobre dependiente de lipoproteínas de baja densidad

(LDL), un efecto atribuido a su capacidad de formar complejos con metales reducidos y actuar como donantes de hidrógeno. La capsaicina también puede prevenir la oxidación del ácido oleico a temperaturas de cocción, así como la formación de hidroperóxidos de lípidos de la autooxidación del ácido linoleico (Pokorny *et al.*, 2001; Rosa, *et al.*, 2002).

Los alimentos se deterioran o sufren diversas reacciones de degradación, tanto por calentamiento como por almacenamiento. Uno de los principales procesos de deterioro son las reacciones de oxidación y descomposición de los productos de oxidación que provocan disminución en el valor nutricional y de la calidad sensorial. La oxidación puede inhibirse por varios métodos que incluye impedir el acceso al oxígeno, el uso de temperaturas bajas, la inactivación de las enzimas que catalizan la oxidación, la reducción de la presión de oxígeno y un empaquetado adecuado (Pokorny *et al.*, 2001).

### **2.2.3. Oxidación lipídica.**

La rancidez oxidativa ocurre cuando las grasas y aceites o alimentos que contienen lípidos sufren oxidación. Esta reacción química es responsable del desarrollo de malos olores y desagradables sabores en muchos alimentos que los vuelve rancios. Además de la pérdida de la calidad del producto debido al desarrollo de olores y sabores rancios, hay cambios en el color y la textura y, por lo tanto, en la aceptación del consumidor. También hay pérdidas en la calidad nutricional debido a la degradación de los ácidos grasos esenciales y vitaminas. Como se mencionó anteriormente, hay riesgos de salud asociados con la oxidación de lípidos o de aceites debido a la formación de compuestos tóxicos cuando las grasas y aceite se someten a degradación oxidativa. Estos productos de oxidación pueden causar daños en los organismos vivos, así como la mutagénesis y carcinogénesis (Embuscado, 2015).

Los dobles enlaces presentes en los ácidos grasos facilitan la eliminación los átomos de hidrógeno y, por consiguiente, forman un radical, haciendo los ácidos

grasos monoinsaturados (MUFA, *por sus siglas en inglés*) y saturados (SFA, *por sus siglas en inglés*) más resistentes a los radicales que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, *por sus siglas en inglés*) (Carocho, 2013). Tanto la auto-oxidación como la oxidación térmica de ácidos grasos insaturados se produce a través de una reacción en cadena de radicales libres que procede a través de tres pasos de iniciación, propagación y terminación (Figura 5) (Shahidi y Zhong, 2005).

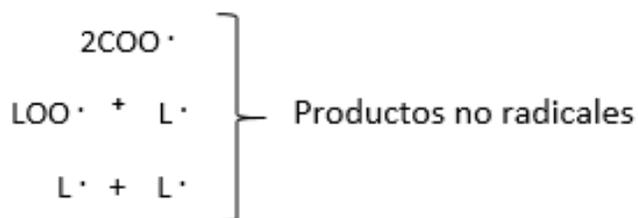
Iniciación:



Propagación:



Terminación:



**Figura 5.** Esquema simplificado del mecanismo de autoxidación (Shahidi y Zhong, 2005).

Cuando la grasa o el aceite contenido en los alimentos reaccionan con el oxígeno atmosférico se forman los hidroperóxidos que han sido identificados como productos primarios de autoxidación; la descomposición de hidroperóxidos produce aldehídos, cetonas, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles, y compuestos epoxi, conocidos como productos de oxidación secundarios, los cuales son los responsables de impartir los sabores y olores indeseables. Estos compuestos, junto con los radicales libres, constituyen las bases para la medición

de deterioro oxidativo de los lípidos alimenticios (Shahidi y Zhong, 2005; Embuscado, 2015).

#### **2.2.4. Actividad antioxidante.**

Los antioxidantes naturales a menudo son multifuncionales y su actividad dominante y su mecanismo en un sistema de ensayo particular va a depender de las condiciones de oxidación, que afectan tanto a la cinética de la oxidación, como a la composición del sistema. Los diferentes factores que afectan a la oxidación de lípidos incluyen la presencia de oxígeno y los iones de metales de transición, la humedad, el calor y la luz.

Por otra parte, la actividad antioxidante de una sustancia va a depender de diversos factores, tales como: su composición, su concentración, la temperatura, la presión de oxígeno y la presencia de otros antioxidantes y componentes habituales de los alimentos, por ejemplo, proteínas y agua (Frankel y Meyer, 2000).

La determinación de la actividad antioxidante se basa en comprobar como un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Estos métodos ayudan a predecir el potencial antioxidante *in vitro* de los mismos antes de ser ingeridos; así mismo, nos permite determinar la protección frente a la oxidación y el deterioro del alimento que disminuye su calidad y valor nutricional.

Algunos autores han hecho referencia que los antioxidantes no tienen un único compuesto al cual atribuirle la actividad antioxidante, es decir, la capacidad antioxidante de una mezcla viene dada por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; además depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo (Kuskoski *et al.*, 2005).

Hasta la fecha hay varios ensayos de actividad de antioxidante, cada uno con su objetivo específico dentro de la matriz y todas ellas con sus ventajas y desventajas (Kuskoski *et al.*, 2005).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. Algunos de los métodos *in vitro* aplicado para determinar la actividad antioxidante se han dividido de acuerdo a la manera en la cual se estabilizan los radicales libres mediante la transferencia de hidrógeno (HAT: *por sus siglas en inglés* “Hydrogen Atom Transfer”) donde el antioxidante y el sustrato compiten por el radical libre sintético, o por transferencia de electrones (ET: *por sus siglas en inglés* “Electron Transfer”) donde la transferencia del electrón involucra una reacción de oxidación con el antioxidante que es un indicador del punto final de la misma (Kuskoski *et al.*, 2005; Villano *et al.*, 2007; Carochi, 2013).

## **2.3. Antimicrobianos.**

### **2.3.1. Generalidades de los antimicrobianos.**

Los compuestos antimicrobianos presentes en los alimentos pueden extender la vida útil de los alimentos procesados y no procesados mediante la reducción de la tasa de crecimiento o viabilidad microbiana. Originalmente se añadían especias y hierbas para cambiar o mejorar el sabor y también podían aumentar la vida útil debido a su naturaleza antimicrobiana. Algunas de éstas mismas sustancias también son conocidas por contribuir a la autodefensa de las plantas contra los organismos infecciosos (Holley, 2004; Tajkarimi *et al.*, 2010).

Los consumidores hoy en día están prestando más atención al riesgo de los agentes patógenos transmitidos en los alimentos, así como la presencia de conservantes químicos artificiales utilizados para controlar a los patógenos

transmitidos por los alimentos. Los conservantes sintéticos han sido utilizados en los alimentos por décadas; sin embargo, un aumento de la percepción por los consumidores de que los compuestos sintéticos pueden conducir a consecuencias negativas para la salud ha dado lugar a una aceptación reducida de su uso en los alimentos (Aljaloud *et al.*, 2012).

Como resultado, se busca utilizar conservantes más naturales con actividad antimicrobiana para garantizar productos alimenticios seguros y saludables. Es por ello que la demanda de productos frescos mínimamente tratados están aumentando por lo que ha surgido la necesidad de buscar alternativas de conservación así como el interés por los agentes antimicrobianos de origen vegetal (Aljaloud *et al.*, 2012; Rodríguez-Sauceda, 2011).

Los antimicrobianos se utilizan en los alimentos por dos razones principales: (1) para controlar los procesos de descomposición natural (conservación de alimentos), y (2) para evitar/controlar el crecimiento de microorganismos, incluidos los microorganismos patógenos (inocuidad alimentaria) (Tajkarimi *et al.*, 2010).

### **2.3.2. Clasificación de antimicrobianos.**

Los antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen, de tal forma existen antimicrobianos de origen animal, vegetal o microbiano. El primero de estos grupos incluye proteínas, enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosano. El segundo grupo incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores, ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, mientras que el tercer grupo incluye compuestos producidos por microorganismos, como las bacteriocinas (Rosas-Gallo, 2011).

### **2.3.3. Grupos químicos con acción antimicrobiana aislados de plantas.**

La composición, estructura, así como los grupos funcionales de los aceites provenientes de las plantas juegan un papel importante en la determinación de la

actividad antimicrobiana (Holley, 2004). Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente microorganismos (Domingo y López-Brea, 2003).

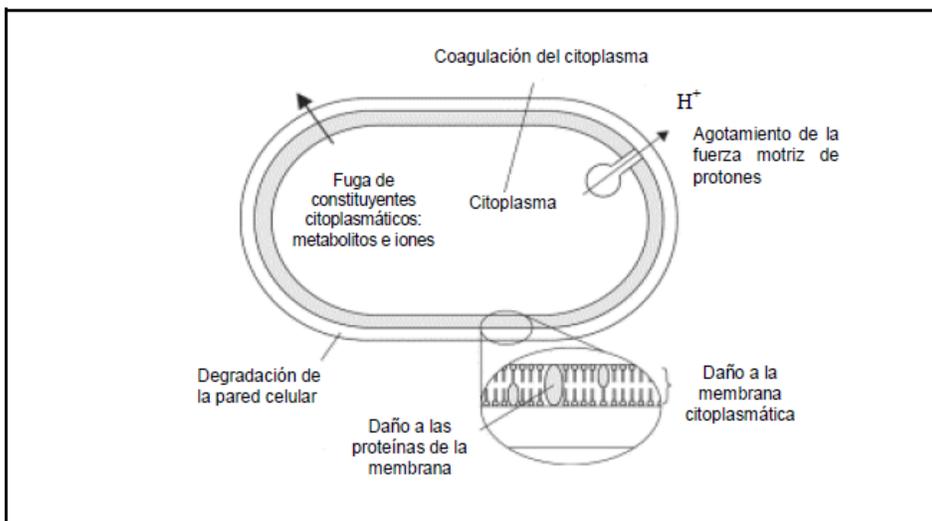
Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados. Los compuesto fenólicos simples son compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámicos y cafeico. Algunas plantas productoras de compuestos de estas características son el tomillo (*Tymus vulgaris*), la manzanilla (*Matriarca chamomilla*) y la gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*), cuyo principio activo, la arbutina, ha sido utilizado a lo largo de los años en el tratamiento de la infección urinaria. Las posiciones y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parece que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. Dentro de este grupo destacan también los aceites esenciales, compuestos causantes del agradable olor de determinadas plantas y algunos con poder antimicrobiano, como el mentol obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la capsaicina (Domingo y López-Brea, 2003).

Otros grupos de compuestos químicos encontrados en las plantas son las quinonas (forman complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas inactivando la proteína y anulando su función), taninos (sustancias capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero), cumarinas (interacción con el ADN eucariota), flavonas (forman compuestos con proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana), alcaloides (se intercalan entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo y López-Brea, 2003).

### 2.3.4. Mecanismo de acción.

Teniendo en cuenta el gran número de diferentes grupos de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es importante decir que su actividad antimicrobiana no se atribuye a un mecanismo específico; sin embargo, existen algunos sitios de acción en la célula en donde pueden ocurrir los siguientes efectos: daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a las proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz, dichos sitios de acción se muestran en la Figura 6 (Burt, 2004).

Generalmente, el flujo de iones de potasio es una señal temprana del daño a la membrana citoplasmática y es seguido por el flujo de los demás constituyentes citoplasmáticos. La pérdida de la permeabilidad de la membrana es identificada como causa de la muerte celular y depende de la hidrofobicidad de los solutos que cruzan la membrana y de la composición de la misma. El coeficiente de partición de los aceites esenciales en las membranas celulares es un determinante crucial para su efectividad, por lo que se esperan variaciones cuantitativas en la actividad de los agentes antimicrobianos contra diferentes bacterias (Rosas-Gallo *et al.*, 2011).



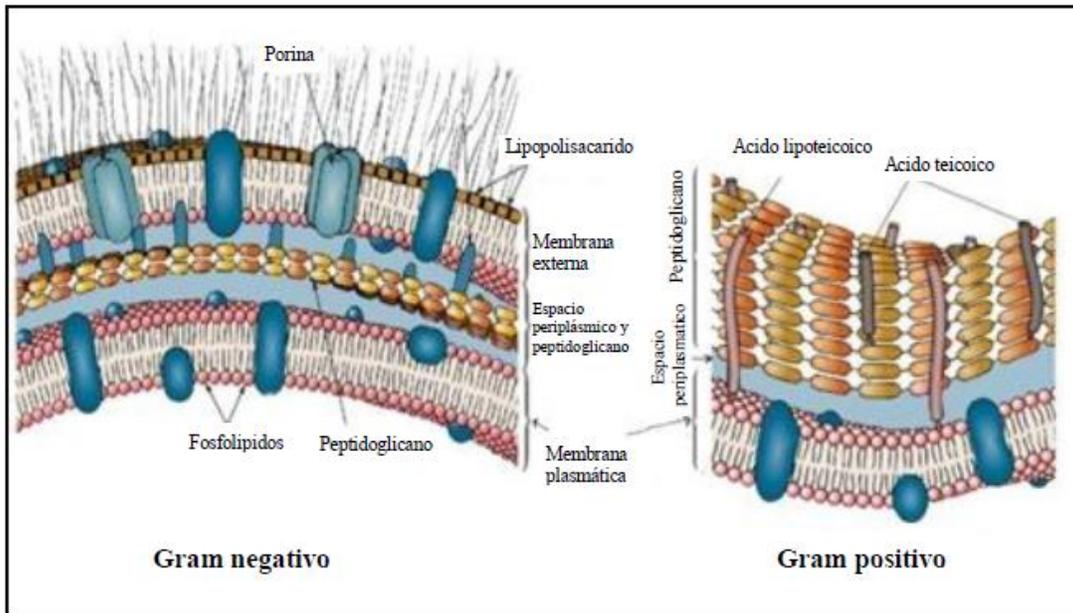
**Figura 6.** Mecanismos de acción antimicrobiana de extractos vegetales en la célula (Burt, 2004).

Los componentes de los aceites esenciales también parecen actuar sobre las proteínas de las células que se encuentran embebidas en la membrana citoplasmática, ya les permite incorporarse a los lípidos de las membranas bacterianas perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a las fugas de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte de la célula (Ultee *et al.*, 2002). Las enzimas ATPasas que se encuentran localizadas en dicha membrana pueden ser alcanzadas por las moléculas lipídicas, viéndose afectada la regulación de energía y la síntesis de componentes estructurales (Rosas-Gallo, 2011).

### **2.3.5. Efecto sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas.**

A partir de los años 90 se han publicado numerosos estudios sobre la actividad antimicrobiana de extractos de plantas, utilizando extractos de especias, hierbas secas aceites esenciales o sus componentes, encontrando efecto antibacteriano frente a diversos tipos de bacterias como por ejemplo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli O157:H7*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, y *Staphylococcus aureus* (Burt, 2004). También se ha reportado actividad frente a *Aeromonas hydrophila* *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, y levaduras (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Sin embargo, las bacterias Gram negativas son más resistentes a los aceites vegetales que las bacterias Gram positivas debido a la presencia de su estructura de una pared celular hidrofílica. El hecho de que los microorganismos Gram negativos sean menos susceptibles a la acción de antibacterianos, se debe a que estos contienen un lipopolisacárido (Figura 7) que rodean la pared celular bloqueando la penetración de compuestos hidrofóbicos y así, evitando la acumulación de los aceites esenciales en la membrana celular diana (Sánchez, 2006; Taylor, 2015).



**Figura 7.** Pared celular de bacterias gram negativas y gram positivas (Sánchez, 2006).

### 2.3.6. Plantas que destacan por su actividad antimicrobiana.

Las hierbas, especias y extractos de plantas son productos considerados GRAS (“Generally Recognized as Safe” *por sus siglas en inglés*; Generalmente reconocidos como seguros,) por la FDA (“Food and Drug Administration” *por sus siglas en inglés*; Administración para drogas y alimentos), que han utilizado durante siglos en los sistemas de alimentos como medio de sabor y conservantes. Las especias como clavo, canela, orégano y el romero son algunas de las especias y hierbas más comunes con fuerte actividad antimicrobiana. En el siguiente cuadro se enumera la actividad antimicrobiana de los productos vegetales seleccionados contra los patógenos transmitidos por los alimentos y los microorganismos deteriorativos (Cuadro 4) (Taylor, 2015).

**Cuadro 4.** Actividad antimicrobiana de productos de plantas seleccionados (Taylor, 2015).

<b>Categorías</b>	<b>Productos</b>	<b>Eficaz contra</b>
Hierbas y especias	Canela, clavo, mostaza, pimienta, cilantro, comino, orégano, romero, salvia, jengibre, cúrcuma	<i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Semillas	Semillas de uva, semillas de moscatel, cardamomo, semillas de amapola, semillas de anís, semillas de apio	<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Campylobacter jejuni</i>
Hojas	Cilantro, hoja de laurel, albahaca, tomillo, menta, hierba de limón, acedera, ruta	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>S. aureus</i>
Frutas	Granada, peras xoconostle, mora amarilla, frambuesa, fresa	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i>
Vegetales	Pimiento morrón, cebollinas, brócoli, col rizada	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. Typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i>
Flores, brotes	Hibiscus, rosa, clavo	<i>B. cereu</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Corteza, cáscara	Cassia, cáscara de limón, cáscara de granada	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella infantis</i> <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. aureus</i>

En particular, en especies del género *Capsicum*, se han encontrado compuestos antimicrobianos y antifúngicos, contra distintas cepas bacterianas (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*) así como en algunos hongos (Dorantes *et al.*, 2000; Nadeem *et. al.*, 2011; Aljaloud *et al.*, 2012; Omolo *et. al.*, 2014).

## 2.4. Oleorresinas.

### 2.4.1. Aspectos generales de oleorresinas.

Las oleorresinas son unas sustancias líquidas o semi-sólidas viscosas obtenidas por extracción a partir de un polvo finamente molido, que contiene el aroma y el sabor de su fuente (Berke, 2012). Son extractos de naturaleza oleosa obtenidos de especias o diferentes partes de plantas que se utilizan en todo el mundo, y desde siempre, como ingrediente indispensable para aportar a infinidad de productos alimenticios, sabor y aroma, además de algunas propiedades específicas, por las cuales actualmente también tienen amplia aplicación en la industria cosmética, farmacéutica y fitofarmacéutica; en alimentación animal y en aplicaciones agrícolas (Restrepo, 2006).

Las oleorresinas de chiles presentan principalmente componentes lipofílicos como mono, di y triglicéridos; ácidos grasos libres; pigmentos (carotenos con estructura hidrocarbonada o xantófilas con oxígeno); aceites esenciales; resinas ácidas y sus ésteres; terpenos y productos de oxidación o polimerización de estos terpenos; ceras, esteroides vegetales y en mayor o menor medida, capsaicinoides. Una parte importante de estos compuestos liposolubles proceden de la parte carnosa de los frutos y semillas del pimiento, que tienen actividad antioxidante (Fernández-Trujillo, 2007).

Por otra parte, Berke (2012) encontró que los capsaicinoides en oleorresinas son compuestos muy estables y por lo general no se descomponen, incluso durante el procesamiento a altas temperaturas y durante largos períodos de almacenamiento, así mismo, los capsaicinoides en productos secos (frutos, polvo, etc.) no son tan estables como en oleorresinas.

El rendimiento de las oleorresinas de frutos *Capsicum* depende del color del pimiento original, y es muy variable según especies u otros factores existiendo variaciones de acuerdo a la casa comercial y origen de la materia prima (Fernández-Trujillo, 2007).

De acuerdo con Restrepo (2006) las oleorresinas presentan múltiples ventajas de manejo, dosificación, estandarización, almacenamiento y control microbiológico contra el producto en polvo, tales como:

- **Economía.** Se dan tasas de reemplazo de hasta 100 Kg del producto en polvo, por 1 o 2 Kg de oleorresina, dependiendo de la concentración de ésta última.
- **Uniformidad.** Los ingredientes activos de color, sabor y propiedades físicas son estandarizados.
- **Calidad.** Son productos totalmente naturales y libres de residuos de disolventes así como de pesticidas.
- **Pureza.** Son productos libres de impurezas y materia extraña.
- **Esterilidad.** No presentan contaminación microbiana, debido a la alta concentración de sus componentes.
- **Cumplimiento con las especificaciones.** La FDA regula los procesos y están clasificadas como productos GRAS, lo que permite su libre adición dentro de las formulaciones alimenticias.
- **Posibilidad de dilución.** Puede adecuarse perfectamente a las formulaciones de cada producto, por ser solubles en una gran variedad de disolventes.
- **Mayor vida de anaquel.** La alta concentración de las oleorresinas y el estar prácticamente libres de agua, asegura la esterilidad con la consecuente eliminación del deterioro por plagas y crecimiento microbiano así como la baja degradación por oxidación o pérdida de sabor.

#### **2.4.2. Extracción convencional de oleorresinas.**

Las oleorresinas de Chile son obtenidas por métodos convencionales de extracción con solventes orgánicos. El procesamiento de la materia prima para obtener la oleorresina consta de tres etapas, la deshidratación, molienda y extracción de la fracción lipofílica con el disolvente. Las leyes alimentarias de países

que consumen estos productos controlan ese último paso. En la zona de la Unión Europea, la Directiva 95/45/CE (Comisión Europea, 1995) indica que los disolventes permitidos para la producción de oleorresinas de Chile, así como los niveles máximos de residuos. Por lo tanto, acetona, diclorometano, acetato de etilo, etanol, metanol, y hexano son disolventes empleados en la etapa de extracción, siendo el último el más empleado actualmente por la industria alimentaria. Posteriormente, el disolvente se elimina desde el producto en dos etapas; una primera se consigue mediante concentración del extracto en evaporadores de tubos verticales bajo vacío para reducir la temperatura del proceso. Esta primera etapa se deja de 1-4% del disolvente. Un segundo paso se realiza para llegar a los requisitos legales respecto a los límites máximos de disolvente residual en la oleorresina final (10 mg/Kg de diclorometano y 50 mg/Kg para el resto de los disolventes mencionados anteriormente), mediante el calentamiento indirecto del extracto. Ambos pasos (especialmente el segundo) someter el extracto a un alto estrés térmico, con temperaturas cercanas a los 100 °C aplicados durante 5-6 h, lo que puede implicar el desarrollo de reacciones de degradación relacionados con los procesos de calentamiento (degradación térmica y de isomerización) (Pérez-Gálvez *et al.*, 2004, Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012).

En la actualidad, las tendencias de la legislación alimentaria son para disminuir los niveles de disolventes de residuos así como nuevos datos sobre sus valores de toxicidad y NOEL (nivel sin efecto observable) son revisados y establecidos. Además, se requiere de la industria de alimentos para modificar esas condiciones de procesamiento para reducir los niveles de contaminantes cuando sea técnicamente posible. Por lo tanto, los niveles máximos de residuos hexano se restringieron a partir de 5 mg/Kg a 1 mg/Kg en la fabricación o fraccionamiento de grasas y aceites. Una reducción en los niveles de residuos de disolventes en los aditivos alimentarios implicaría cambiar las condiciones de procesamiento en la etapa de eliminación de disolventes, probablemente, aumentar el régimen de tiempo y temperatura. En ese caso, pueden ocurrir otros cambios en las características generales del producto final, no sólo respecto a la capacidad de coloración sino también la calidad nutricional o del contenido provitamina A (Pérez-Gálvez *et al.*,

2004). Por lo anterior, ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de extracción, como el uso de aceites comestibles.

### **2.4.3. Aceites comestibles como medio de extracción.**

El uso de aceites comestibles como medio de extracción puede ser una novedosa opción para procesos de extracción no acuosos ya que presentan ventajas potenciales en la salud, la seguridad y las cuestiones relacionadas desde el punto de vista ecológico. Hasta la fecha, el uso de aceites comestibles como disolventes no polares para la extracción de compuestos bioactivos de *Capsicum* ha sido poco explorado (Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012). En la actualidad existen una diversidad de aceites en el mercado, sin embargo, la mayoría de ellos contienen antioxidantes sintéticos. El aceite de aguacate es una excelente opción para la utilización como medio de extracción, ya que no tiene antioxidantes sintéticos añadidos y provee distintos compuestos bioactivos dando beneficios a la salud, además de tener una estabilidad oxidativa parecida a la del aceite de oliva (Berasategi *et al.*, 2012).

#### **2.4.3.1. Aceite de aguacate.**

El aceite de aguacate tiene la ventaja, al igual que el aceite de oliva, se puede obtener de la fruta por medio de un método de extracción en frío, que es una tecnología de bajo costo que permite mantener en el aceite cantidades significativas de los fitoquímicos bioactivos presentes en la fruta. Se debe también mencionar que, cuando se obtienen por procedimientos de extracción no prensado en frío, los métodos de extracción aplicadas para la obtención de aceite de aguacate pueden modificar las características físicas y químicas del producto final (Berasategi *et al.*, 2012).

El aceite de aguacate puede ser utilizado como un ingrediente en alimentos funcionales, debido a su alta concentración de ácidos grasos monoinsaturados

(oleico), y cantidades sustanciales de compuestos beneficiosos para la salud, tales como vitaminas y fitoesteroles antioxidantes (Berasategi *et al.*, 2012).

Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que la fruta de aguacate puede ser considerada como parte de una dieta de prevención del cáncer, debido a su alto contenido de fitoquímicos siendo particularmente significativo en este sentido, las sustancias bioactivas solubles en lípidos, además ha mostrado que el consumo del aceite de aguacate como una fuente de lípidos con alimentos ricos en carotenoides mejora la absorción de carotenoides en los seres humanos (Unlu *et al.*, 2005; Berasategi *et al.*, 2012).

### 3. ANTECEDENTES

Las oleorresinas de *Capsicum annuum* se han aplicado en todo el mundo como aditivo para aportar sabor y aroma en el área de la industria alimentaria. Sin embargo, estudios recientes le han atribuido propiedades antioxidantes y, en menor medida, antimicrobianas. Por lo general, dichas oleorresinas han sido extraídas por una variedad de solventes orgánicos. Se han encontrado diversas alternativas para evitar este tipo de sustancias nocivas, Cavazza *et al.* (2015) hicieron un estudio en el cual añadieron 3 diferentes polvos de chile (alta, mediana y baja pungencia) extraídos en aceites de oliva extra virgen y de girasol para evaluar su estabilidad oxidativa a lo largo de 12 meses, demostrando ser eficaz en la mejora de su estabilidad a lo largo del tiempo estudiado. El efecto más fuerte se registró cuando emplearon el chile menos picante, lo que muestra que el efecto protector no podía atribuirse al contenido capsaicinoides.

Guadarrama-Lezama *et al.* (2013), caracterizaron extractos no acuosos de *Capsicum annuum L.* usando tres diferentes aceites a diferentes tiempos y temperaturas de extracción, siendo la mejor a 50°C por un lapso de tiempo corto, en donde se obtuvo la mayor cantidad de carotenoides y actividad antioxidante. Además, se observó que el tipo de aceite utilizado para las extracciones influye en la actividad antioxidante y exhibe diferentes afinidades con los carotenoides. En este estudio el uso de temperaturas elevadas mejoró la extracción de los carotenoides, sin embargo, no evalúan el estado de oxidación del aceite, por lo que en el presente estudio la extracción se realiza en temperatura ambiente.

Otros estudios han evaluado como es que afectan los tiempos de extracción a la liberación de los diferentes compuestos bioactivos encontrados en el chile (*Capsicum annuum*) seco en relación con la actividad antioxidante, como lo encontrado por Caporaso *et al.* (2013), quienes caracterizaron el aceite de oliva aromatizado por adición de chile seco (*Capsicum annuum*) a diferentes concentraciones hasta 30 días después de la infusión, encontrando que los capsaicinoides y compuestos aromáticos fueron liberados rápidamente dentro de la

primera semana de la infusión de chile en los extractos oleosos, ya que a mayores tiempos de infusión puede promover la liberación de ciertos compuestos que podría acelerar la oxidación de lípidos.

En un estudio anterior, Sun-Waterhouse *et al.*, (2011) investigaron los efectos de compuestos fenólicos añadidos sobre la estabilidad de almacenamiento de aceites de aguacate y de coco. Los aceites de aguacate y de coco en la ausencia (aceite de control) y presencia (aceite tratado) de ácido cafeico o ácido *p*-cumárico se almacenaron a 20 y 60 °C durante 50 días. El contenido de fenoles totales, índice de peróxidos, valor de *p*-anisidina, ácidos grasos libres y la composición de los ácidos grasos de los aceites obtenidos fueron examinados en los días 0, 7, 15, 23, 35 y 50, concluyendo que, la incorporación de compuestos fenólicos en productos oleosos es factible y beneficioso para aumentar la estabilidad del aceite y el valor nutritivo.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los últimos años los consumidores han mostrado preocupación por reducir el consumo de alimentos con aditivos sintéticos, buscando cada vez más ingerir alimentos naturales o lo más cercano a ello. Esto ha llevado a la búsqueda de aditivos de origen natural, como algunas especias y vegetales, entre ellos destaca el género *Capsicum*, el cual representa una excelente fuente de compuestos bioactivos funcionales. Las oleorresinas de chile como aditivo alimentario podrían ser útiles para la protección de algunos productos susceptibles a descomposición. Es por ello que son de alto interés para la industria alimentaria, ya que confieren color y sabor a los alimentos, además de sus sustancias bioactivas que le pueden proveer propiedades antioxidantes y antimicrobianas a los alimentos. Sin embargo, actualmente las técnicas de extracción de oleorresinas que se han utilizado, hacen uso de diferentes solventes orgánicos los cuales son tóxicos para el ser humano y potencialmente dañinos para el medio ambiente. Por lo que el uso de aceites comestibles como medio de extracción, puede ser una excelente opción para procesos de extracción no acuosos, ya que presenta ventajas en cuanto a salud, seguridad y medio ambiente.

## 5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 5.1. Objetivos

#### 5.1.1. Objetivo general.

Evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de oleorresinas de chile chipotle (*Capsicum annuum*) elaboradas con aceite de aguacate.

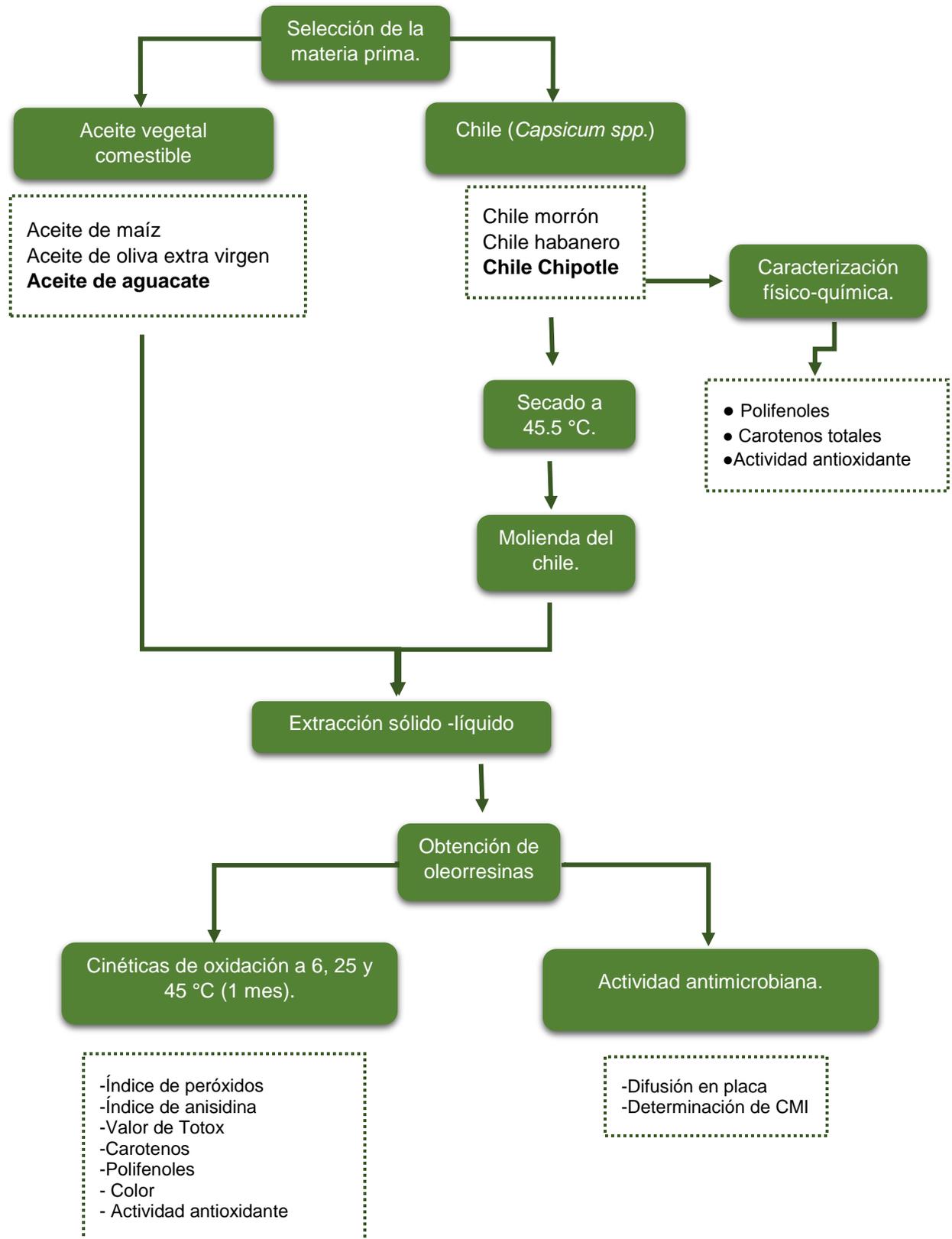
#### 5.1.2. Objetivos específicos.

- Selección de la materia prima a utilizar.
- Establecer una metodología eficaz de extracción para la obtención de una oleorresina de chile chipotle en aceite de aguacate.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de la oleorresina obtenida.
- Evaluar el efecto protector de la presencia de chile Chipotle en la oxidación del aceite de aguacate en tres diferentes temperaturas.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de la oleorresina de chile chipotle a lo largo del tiempo de almacenamiento a distintas temperaturas.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de la oleorresina de chile chipotle sobre cepas de patógenos y bacterias ácido lácticas.

### 5.2. Hipótesis.

Las oleorresinas de chile chipotle (*C. annuum*) elaboradas con aceite de aguacate (*Persea americana*) son capaces de proteger la oxidación a lo largo del tiempo ya que presenta propiedades antioxidantes y, contiene propiedades antimicrobianas contra algunos patógenos por lo que pueden ser utilizados como aditivos naturales y ambientalmente amigables en alimentos.

## 6. DIAGRAMA EXPERIMENTAL.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Aspectos generales

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Alimentos del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana sito en Av. Castelazo Ayala S/N, Col. Industrial Ánimas, 91192 Xalapa Enríquez, Ver.

### 7.2. Materias primas

Los frutos que fueron utilizados para la realización de este proyecto fueron adquiridos en un supermercado de la localidad, el chile habanero, chipotle y pimienta morrón (*C. chinense*, *C. annuum* y *C. annuum var. annuum*) que se utilizó fue comprado seco, limpio y empacado marca Chedraui selecto® (Xalapa, Veracruz, México).

Los aceites utilizados como medios para realizar la oleorresina cuya denominación es: aceite de oliva extra virgen (Full Circle, Italia), aceite comestible puro de maíz (La Patrona, México) y aceite de aguacate 100% puro (Aguacatlán, México), fueron adquiridos en un supermercado de la localidad Xalapa, Veracruz, México.

#### 7.2.1. Bacterias y condiciones de cultivo.

Las cepas bacterianas (*Escherichia coli* ATCC 43895, *Salmonella enterica* Serovar. *Thyphimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* FRI 134, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus casei shirota*, *Streptococcus thermophilus* ATCC 19987, *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258, *Streptococcus thermophilus* ATCC BAA-250, *Streptococcus thermophilus* ATCC BAA-491, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbreakii sub bulgaris* ATCC 11842, *Lactobacillus helveticus* ATCC

7995, *Lactobacillus delbreakii sub bulgaris* ATCC BAA-365) fueron proporcionadas por el laboratorio Biotecnología del Doctorado en Ciencias en Alimentos del Instituto Politécnico Nacional.

### **7.3. Métodos.**

#### **7.3.1. Acondicionamiento de la materia prima.**

Se empleó una variedad comercial seca de chile habanero, chile morrón en polvo y chile chipotle. Estas variedades de chile fueron secadas y ahumadas previamente a su compra.

Los frutos se seleccionaron por su uniformidad y color, descartando frutos enfermos manchados o deteriorados. Se eliminó el exceso de humedad de los frutos mediante el acondicionamiento en una estufa (Shel Lab) a 45.5 °C por 48 o hasta 72 h, es decir, hasta obtener una humedad constante a dicha temperatura. Una vez alcanzada la humedad mínima se procedió a pulverizar el chile en un molino hasta obtener un polvo fino. El chile pulverizado se mantuvo en bolsas de polietileno, selladas al vacío y en un lugar fresco y sin luz hasta su utilización.

#### **7.3.2. Extracción líquido-sólido.**

Para la realización de la oleorresina se utilizaron 3 diferentes tipos de aceites (maíz, oliva y aguacate) con 3 variedades de chile (Chile habanero, chile chipotle y pimiento morrón) bajo 3 condiciones de extracción como se muestra en el siguiente cuadro 5, donde la materia prima fue previamente tratada como se menciona anteriormente (Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012).

Brevemente, la materia prima fue mezclada en las cantidades y condiciones ya indicadas, en un frasco ámbar. En el caso de la extracción con agitación se utilizó un agitador magnético. Asimismo, para medir la temperatura se utilizó un termómetro durante el tiempo que dura la extracción para verificar que la temperatura sea la indicada. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 3500 rpm

por 15 min para separar los sólidos y obtener la oleorresina. La oleorresina fue almacenada en recipientes de cristal color ámbar a 10 °C para su uso posterior.

**Cuadro 5.** Condiciones de extracción utilizadas.

Tipo de extracción	Cantidad de materia prima	Temperatura	Tiempo	Agitación magnética
1	50 g de chile/ 100 mL de aceite	T/A	48 horas	No
2	50 g de chile/ 100 mL de aceite	T/A	48 horas	Si
3	50 g de chile/ 100 mL de aceite	60 °C	10 minutos	Si

Se realizó un proceso de selección con materias primas utilizadas tomando en cuenta si las oleorresinas con las 3 variedades de chile (*Capsicum spp.*) tenían o no tenían actividad antimicrobiana y, si los aceites utilizados para la realización de las oleorresinas poseían antioxidantes sintéticos añadidos.

La condición utilizada para este trabajo fue la primera ya que la utilización de agitación magnética y temperaturas elevadas promovían la oxidación del aceite. Se evaluaron dos concentraciones de oleorresinas: la primera (proporción 1:2) (p/v) con 50 g de chile por cada 100 mL de aceite, y la segunda (proporción 1:3) (p/v) con 50 g de chile por cada 150 mL de aceite.

### 7.3.3. Caracterización físico-química de la oleorresina.

### 7.3.4. Carotenos totales en la oleorresina y el chile en polvo.

La cuantificación del contenido de carotenoides totales se realizó semanalmente y posterior a la extracción de la oleorresina. Se determinaron espectrofotométricamente las fracciones isocromáticas roja y amarilla, así como los carotenoides totales, mediante el método propuesto por Hornero-Méndez y

Mínguez-Mosquera (2001), utilizando un espectrofotómetro con arreglo de diodos UV-VIS.

Para la oleorresina, se pesaron 120 o 180 µg de muestra se diluyeron con 25 mL de acetona en un tubo de centrifuga en oscuridad hasta que se mezclaran uniformemente. Se vertieron las muestras de cada solución en la celda del espectrofotómetro y se midieron los datos de absorbancia a 472 y 508 nm, utilizando como blanco el solvente. Los valores obtenidos se introdujeron en las fórmulas desarrolladas por Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, (2001), con base en la Ley de Lambert y Beer para concentraciones conocidas de estándares de ambas fracciones carotenoidales para otro producto de la familia *Capsicum*, la paprika:

$$CR = \frac{A_{508} - x \ 2144.0 - A_{472} \times 403.3}{270.9}$$

$$CY = \frac{A_{472} - x \ 1724.3 - A_{508} \times 2450.1}{270.9}$$

$$CT = CR + CY$$

**(Ec. 1)**

Donde:

CR: Fracción roja

CY: Fracción amarilla

A: Absorbancia

### **7.3.5. Compuestos fenólicos.**

Se utilizó la prueba de Folin para determinar los compuestos fenólicos en la oleorresina de chile usando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012) con modificaciones. El reactivo se diluyó 10 veces con agua desionizada. La oleorresina se diluyó en una proporción de 1:5 con etanol, y una alícuota de 0,1 mL se mezcló con 0,75 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluida. Después la solución de reacción que había sido incubada a temperatura ambiente (TA) durante

5 min, se añadió 0.75 mL (60 g/L) de solución de bicarbonato de sodio y se mezcló a fondo. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 90 min y luego se filtró utilizando un filtro de jeringa de 0.45 µm (Whatman®). La absorbancia de la solución se determinó a 750 nm. El ácido gálico se utilizó como patrón de referencia y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (µg) por mL de oleorresina, a diferentes concentraciones.

Asimismo se aplicó la siguiente fórmula para determinar el porcentaje de pérdida:

$$\% \text{ de pérdida: } \left( \frac{A_0 - A_f}{A_0} \right) 100$$

**(Ec. 2)**

Donde:

A<sub>0</sub>: Polifenoles al inicio del almacenamiento.

A<sub>f</sub>: Polifenoles al final del almacenamiento.

### 7.3.6. Determinación de color

El análisis de color de la oleorresina se evaluó a lo largo del tiempo a 3 diferentes temperaturas y se determinó con un colorímetro ColorFlex V1-72 (Hunter Lab, USA), basado en los 3 componentes del espacio de color de la escala CIELab: L\*, a\* y b\* (Mehmet *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2002).

- **L\*** mide el grado de luminosidad (0 / +100)
- **a\***, el grado de coloración rojiza a verde (+100/ -80) y,
- **b\***, el grado de coloración amarilla o azulosa (+70/ -80).

Se calcularon los siguientes parámetros complementarios:

a) *Chroma*, o cambio en la intensidad del color (0=tenué, 60=intenso):

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

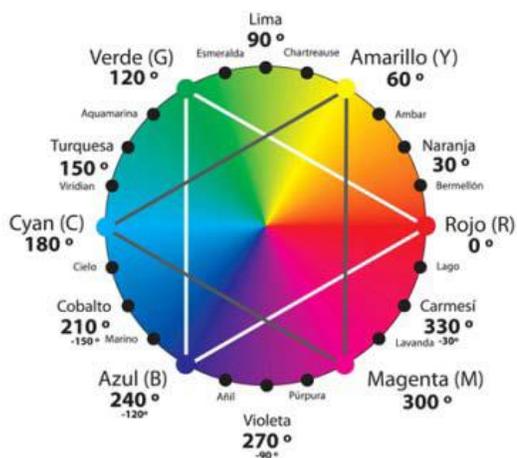
(Ec. 3)

b) *Ángulo de Color* o *Ángulo Matiz* (Hue Angle). Se expresa en grados:

$$H^* = \arctan \frac{b^*}{a^*}$$

(Ec. 4)

0° = rojo  
 60° = amarillo  
 120° = verde  
 180° = azul  
 240° = añil  
 360° = rojo



## 7.4. Actividad antioxidante

### 7.4.1. Determinación del poder antioxidante reductor de fierro (FRAP).

La determinación del poder reductor/antioxidante férrico se llevó a cabo de acuerdo con Benzie and Strain (1996) con algunas modificaciones. Se midieron los cambios en la absorbancia a 593 nm debido a la formación del compuesto Fe (II)-tripirydyltriazine de color azul proveniente de la forma oxidada incolora del Fe (III) por la acción de los antioxidantes donadores de electrones. FRAP se preparó mezclando un buffer de acetato a 300 mM, a pH 3.6, TPTZ 10 mM y FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (solución acuosa 20 mM) en una proporción 10:1:1, e inmediatamente fue incubado durante 30 minutos. 100 µL de las muestras fueron diluidas con 1 mL de acetona.

El porcentaje de inhibición se representó como una función de la concentración y el TEAC (capacidad antioxidante equivalente Trolox), se calculó a partir de la relación de coeficiente de regresión lineal del analito y el de la Trolox. Los resultados se expresaron como mmol equivalentes de Trolox.

#### 7.4.2. Método por ABTS<sup>+</sup>.

Este método se siguió como lo descrito por Sousa, *et al.* (2015), y se basa en la capacidad de los antioxidantes para reducir el ácido 2,2'-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) radical (ABTS<sup>+</sup>), un cromóforo azul-verde que tiene su absorbancia máxima a 734 nm. Los valores obtenidos a partir del análisis espectrofotométrico se comparan con los dados por Trolox, un análogo de la vitamina E que posee una actividad antioxidante equivalente de solución 1 mM del analito. El ABTS se disolvió en agua para obtener una concentración de 7 mM, y el radical catión ABTS<sup>+</sup> se formó reaccionando la solución stock ABTS con 2.45mM persulfato de potasio. La mezcla se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h antes de su uso. La solución stock ABTS<sup>+</sup> se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$  a 734nm a 25°C. Una vez que el radical ABTS<sup>+</sup> se formó se tomaron 2.9 mL y se colocaron en vial, inmediatamente después se le añadió 100 µL de cada una de las muestras. La curva de calibración se preparó usando Trolox diluido en etanol a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mM. El análisis se llevó a cabo exactamente a 30 min después de la adición de la muestra y la absorbancia se leyó a 734nm utilizando un espectrofotómetro. Para cada dilución, se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{blanco}}} \right) 100$$

**(Ec. 5)**

Donde:

$Abs_{blanco}$  = La absorbancia del radical ABTS

$Abs_{muestra}$  = La absorbancia de la muestra después de 30 min.

El porcentaje de inhibición se representó como una función de la concentración y el TEAC (capacidad antioxidante equivalente Trolox), se calculó a partir de la relación de coeficiente de regresión lineal del analito y el de la Trolox. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{mol}$  equivalentes de Trolox.

### **7.5. Cinética de oxidación a 6 °C, 25 °C y 45 °C.**

Para la evaluación de la oxidación lipídica se realizó una cinética de oxidación midiendo índice de peróxidos, índice de anisidina, valor de Totox y degradación de carotenos y polifenoles totales. Teniendo las diferentes muestras de oleorresina a las 3 temperaturas, se prosiguió a tomar muestras una vez por semana en un tubo eppendorf y se congelaron a -40 °C hasta su posterior análisis. Para las cinéticas de degradación de compuestos polifenólicos y carotenos totales se prosiguió con la metodología antes mencionada.

#### **7.5.1. Índice de peróxidos.**

Para la determinación del índice de peróxidos se siguió el procedimiento de acuerdo con la Norma Mexicana (NMX-F-154-1987).

Se pesó una masa de 5.0 g  $\pm$  0.05 g de aceite dentro de un matraz, se añadieron 30 mL de una solución de ácido acético-cloroformo y se agitó la muestra hasta que se disolvió totalmente. Con una Pipeta Mohr, se agregaron 0.5 mL de solución saturada de yoduro de potasio; se agitaron y se dejaron reposar durante 1 minuto, y posteriormente se le adicionaron 30 mL de agua. Después, se tituló lenta y cuidadosamente con una solución 0.01 N de tiosulfato de sodio; y se agitó vigorosamente después de cada adición, hasta tener una coloración ligeramente

amarilla; inmediatamente se añaden 1.0 mL de solución indicadora de almidón y se continuó la titulación sin dejar de agitar hasta la desaparición del color azul. Se hizo una prueba en blanco en las mismas condiciones en las que se efectuó la muestra y se anotaron los mililitros de solución de tiosulfato gastados en la titulación la cual no debe exceder de 0.1 mL de tiosulfato. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

Los resultados se calcularon expresando los miliequivalentes de peróxido contenidos en un kilogramo de aceite mediante la siguiente fórmula:

$$IP = (A - A_1) \times N \times \frac{1000}{M}$$

**(Ec. 6)**

Donde:

IP = Índice de peróxido.

A = Mililitros de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la muestra.

A<sub>1</sub> = mL de solución de tiosulfato de sodio gastados en la titulación del blanco.

N = Normalidad de la solución de tiosulfato de sodio.

M = Masa de la muestra en gramos.

### 7.5.2. Índice de *p*-anisidina.

El valor de *p*-anisidina es una medición del contenido de carbonilos en los aceites o grasas, y se determinó por el método estándar de acuerdo con AOCS (*"American Oil Chemists' Society" por sus siglas en inglés; Sociedad Americana de Químicos de Aceite*) (2009).

Se basa en la reactividad entre el enlace carbonilo del aldehído y el grupo amina de la *p*-anisidina, lo que lleva a la formación de una base de Schiff que absorbe a 350 nm. Se pesaron 0.5 g de muestra dentro de un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con hexano, después se midió la absorbancia (Ab) de la

solución a 350 nm en un espectrofotómetro con una celda con disolvente como blanco. Posteriormente se tomaron 5 mL de la solución grasa en un tubo de ensayo y 5 mL de disolvente en un segundo tubo. Se adicionó 1 mL de solución *p*-anisidina a cada tubo y se agitaron. Se midió la absorbancia del primer tubo (*A<sub>s</sub>*), teniendo como blanco de referencia el segundo tubo.

El índice de *p*-anisidina se determinó por duplicado y, en porcentaje, se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de } p\text{-anisidina} = \frac{25 (1.2 A_s - A_b)}{m}$$

**(Ec. 7)**

Donde:

*m*: masa en gramos de la porción de prueba.

*A<sub>s</sub>*: absorbancia de la solución grasa después de la reacción con el reactivo *p*-anisidina.

*A<sub>b</sub>*: absorbancia de la solución grasa.

### 7.5.3. Valor total de oxidación (Totox)

Se utilizó el valor total de oxidación (Totox) para estimar el deterioro oxidativo de los lípidos. El valor Totox se define como la suma de los índices de peróxidos (PV) y *p*-anisidina (*p*-AV) para la oxidación total y se calcula de acuerdo con la fórmula (Tatt *et al.*, 2009):

$$\text{Valor de Totox} = 2(PV) + p - AV$$

**(Ec. 8)**

## 7.6. Estimación de la velocidad de formación de peróxidos y degradación de carotenos.

Las velocidades de formación de peróxidos y degradación del contenido total de carotenoides se calcularon tomando en cuenta el promedio de los valores a lo largo de las 4 semanas de almacenamiento.

Se buscó el ajuste para calcular la constante de formación y/o degradación de carotenoides ( $k$ ) a determinadas temperaturas, lo cual permite establecer a que temperatura la oleorresina muestra mejor estabilidad.

El análisis matemático se realizó con las ecuaciones publicadas por Vikram *et al.*, (2005), asumiendo que la reacción de degradación de los carotenoides y la formación de peróxidos presentes en la oleorresina siguen una cinética de primer orden, ajustando los resultados experimentales correspondientes a las 2 concentraciones de oleorresina y a 3 temperaturas de almacenamiento.

$$-dC/dt = kC$$

**(Ec. 9)**

Donde:

**C** = Concentración de carotenoides o de peróxidos presentes en la oleorresina

**t** = Tiempo

**k** = Constante de reacción o coeficiente cinético ( $\text{tiempo}^{-1}$ )

Si  $C_0$  es la concentración inicial de carotenoides o de peróxidos presentes en la oleorresina (medida a tiempo cero), la integración de la ecuación (9) da como resultado:

$$C = C_0 \exp (-kt)$$

**(Ec. 10)**

La forma lineal de la ecuación (10) es:

$$\ln C = \ln C_0 - kt$$

**(Ec. 11)**

Para la reacción de primer orden, se graficó “ln C” contra el tiempo “t” la cual será una línea recta, y la constante de velocidad está representada por la pendiente.

La dependencia de la temperatura de una reacción es descrita por la ecuación de Arrhenius:

$$k = k_0 \exp (-E_a/RT)$$

**(Ec. 12)**

Donde:

$k_0$  = Factor de frecuencia (tiempo<sup>-1</sup>)

$k$  = Coeficiente cinético o constante de reacción (tiempo<sup>-1</sup>)

$R$  = Constante universal de los gases (8.3145 J/mol K)

$T$  = Temperatura absoluta (K)

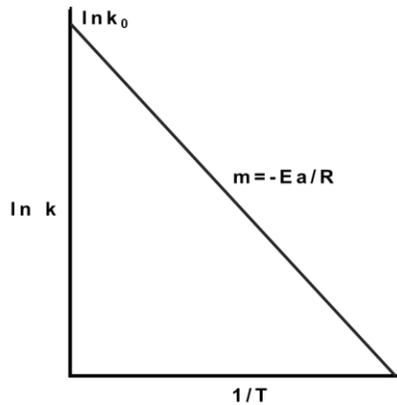
$E_a$  = Energía de activación (J/mol)

La ecuación de Arrhenius es su forma lineal es:

$$\ln k = \ln k_0 - E_a/RT$$

**(Ec. 13)**

Al graficar el logaritmo natural del coeficiente cinético ( $k$ ) como una función del inverso de la temperatura absoluta, se obtuvo una línea recta (figura 8) donde la energía de activación ( $E_a$ ) está determinada por la pendiente de la recta dividida por la constante universal de los gases. La intersección de la línea recta con el eje de las ordenadas es  $\ln k_0$ .



**Figura 8.** Relación entre el logaritmo natural del coeficiente cinético y el inverso de la temperatura (K).

## 7.7. Actividad antimicrobiana.

### 7.7.1. Acondicionamiento de microorganismos.

Antes del experimento cada cepa bacteriana fue activada de la siguiente manera: una asada del inóculo en refrigeración se transfirió a 5 mL de caldo Mueller-Hinton y se incubó por 24 h a 37 °C.

### 7.7.2. Prueba de difusión en agar.

Para la prueba de actividad antimicrobiana descrita por Dussault *et al.* (2013) modificada, se utilizó la técnica de difusión en agar con discos de papel filtro de 6 mm de diámetro previamente esterilizados, estos discos se impregnaron con una alícuota de 5  $\mu$ L de la oleoresina. Como control negativo se utilizó el aceite de aguacate (Ahuacatlan®). Todos los discos impregnados se dejaron durante 20 minutos en reposo en la campana para su completa absorción.

Las placas con caldo Mueller-Hinton, ya solidificadas, se inocularon con 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana ( $10^7$  UFC/mL) una micropipeta (Science med). Una vez que se absorbió el inóculo, se procedió a colocar los discos de papel previamente tratados.

### **7.7.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria en agar.**

El método de dilución en agar fue elegido para medir las actividades antimicrobianas de las dos concentraciones de las oleorresinas contra las cepas microbianas seleccionadas de acuerdo a los resultados de las pruebas en difusión en placa. De acuerdo con el procedimiento de Liang *et al.* (2012) con algunas modificaciones: se hicieron una serie de diluciones de 25, 20, 15 y 10% (v/v) con agar Mueller Hinton y como agente surfactante HLB 12 en una proporción 1:10 (oleorresina/HLB) en tubos eppendorf, mezclándolos vigorosamente en un vortex. Una vez que estuvieron perfectamente bien mezcladas, se agregaron 10  $\mu$ L de la bacteria ajustada a 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC por mL) a cada una de las diluciones ya realizadas y se incubaron 24 h a 37°C. Posteriormente, al término de la incubación, las diluciones fueron vertidas sobre de las placas previamente preparadas, y se incubaron por 24 h a 37 °C.

La concentración mínima inhibitoria se determinó como la concentración más baja en que las oleorresinas inhibieron el visible crecimiento de los microorganismos. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### **7.8. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas durante el tiempo de almacenamiento a las distintas concentraciones y tres temperaturas, fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías; asimismo, para la comparación de distintos datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía. Para la comparación de medias se llevó a cabo con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5% ( $p > 0.05$ ). Se utilizaron los programas estadísticos StatSoft, Inc. (2004) STATISTICA. Las gráficas se realizaron con el Software SigmaPlot versión 10.0, con apoyo en el programa Microsoft Excel 2013.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 8.1. Selección de la materia prima a utilizar para la realización de la oleorresina.

La primera etapa del trabajo consistió en la selección de la materia prima a utilizar. Para ello, se realizaron tres oleorresinas con diferentes variedades de chile (pimiento morrón, chile chipotle, y chile habanero) extraídas con aceite de maíz y se evaluó su actividad antagonista frente a cinco cepas de bacterias patógenas (*E. coli*, *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. aureus FRI*). Para estudiar este efecto se realizaron pruebas de sensibilidad antimicrobiana en placa, utilizando como control negativo el aceite de maíz.

De las tres oleorresinas evaluadas resultó que la oleorresina realizada con chile habanero no presentó ninguna actividad y, por el contrario, la que se realizó con pimiento morrón, mostró una mayor actividad antimicrobiana, como se muestra en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Zona de inhibición de bacterias Gram positivas y negativas para oleorresinas de 3 variedades de chile elaboradas con aceite de maíz.

Bacteria	Zona de inhibición (mm) Chile habanero	Zona de inhibición (mm) Chile chipotle	Zona de inhibición (mm) Pimiento morrón
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	3.0 ± 0.08	4.0 ± 0.08
<i>Staphylococcus aureus FRI</i>	SA	3.5 ± 0.05	3.0 ± 0.05
<i>Listeria monocytogenes</i>	SA	3.0 ± 0.10	3.0 ± 0.10
<i>Escherichia coli</i>	SA	SA	SA
<i>Salmonella enterica</i>	SA	SA	SA

SA: Sin actividad antimicrobiana. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

Dorantes *et al.* (2000) probaron extractos isopropanólicos de tres diferentes chiles (alta, mediana y baja pungencia) sobre bacterias patógenas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus*)

encontrando que el chile menos pungente (pimiento morrón) mostró mejor actividad antimicrobiana, al contrario, el chile habanero no tuvo actividad. Por lo que los resultados obtenidos son congruentes con la bibliografía existente.

Posteriormente, se realizó una evaluación organoléptica para la elección de las tres oleorresinas probadas, resultando que la oleorresina realizada con chile chipotle fue la que tuvo mejores características sensoriales. Por otro lado, el aceite de maíz se descartó ya que actualmente en el mercado éste tipo de aceites contienen antioxidantes sintéticos por lo que no permitía la observación del proceso de enranciamiento.

Esto llevó a la prueba de otro tipo de aceite para la realización de la oleorresina de chile chipotle, la cual fue elaborada con aceite de oliva extra virgen, no obstante, el aceite de oliva mostró una elevada actividad antimicrobiana, como se observa en el cuadro 7. Además, al igual que el aceite de maíz, contiene antioxidantes sintéticos añadidos, por lo que se tuvo que descartar.

**Cuadro 7.** Zona de inhibición (mm) de bacterias patógenas para oleorresina de chile chipotle elaborada con aceite de oliva.

Bacterias	Zona de inhibición (mm) Oleorresina de chile chipotle	Zona de inhibición Aceite de oliva
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.05
<i>Staphylococcus aureus FRI</i>	3.5 ± 0.1	3.0 ± 0.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.5 ± 0.08	3.0 ± 0.05
<i>Escherichia Coli</i>	SA	SA
<i>Salmonella enterica</i>	SA	SA

\*SA: No mostró actividad antimicrobiana. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± desviación estándar.

Finalmente, se seleccionó aceite de aguacate, ya que no hay referencias bibliográficas sobre su actividad antimicrobiana y no contiene antioxidantes sintéticos añadidos.

## 8.2. Caracterización físico-química de la oleorresina.

### 8.2.1. Carotenos y polifenoles totales.

La caracterización inicial de la oleorresina se muestra en el cuadro 8 para las dos concentraciones de la misma.

**Cuadro 8.** Caracterización química de la oleorresina.

Propiedad	Oleorresina 1:2	Oleorresina 1:3	Aceite de aguacate
Carotenos totales (µg/mL)	408.86 ± 4.649 <sup>c</sup>	309.843 ± 0.839 <sup>b</sup>	40.079 ± 1.356 <sup>a</sup>
Polifenoles totales (µg ác. gálico/mL)	211.911 ± 2.970 <sup>c</sup>	162.473 ± 2.328 <sup>b</sup>	8.737 ± 0.752 <sup>a</sup>

\*Las letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas por fila ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

La cantidad de carotenos totales para las oleorresinas fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) con  $408.86 \pm 4.649 \mu\text{g/mL}$  y  $309.843 \pm 0.839 \mu\text{g/mL}$  para la concentración 1:2 y 1:3, respectivamente. En un estudio realizado por Guadarrama-Lezama *et al.* (2012), caracterizaron extractos oleosos con diferentes aceites comestibles con la variedad de *Capsicum annum L. grossum*, en cortos tiempos de extracción y con la aplicación de temperaturas (60, 70 y 80°C) obteniendo cantidades ( $231.1 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$  de carotenos) siendo estas menores a las encontradas en este estudio. Estas diferencias pueden deberse a la técnica de extracción y a la diferente variedad de chile que utilizaron. Así mismo, se puede observar que la oleorresina con la concentración 1:2 presenta mayor contenido de carotenos totales en comparación con la oleorresina 1:3, ya que a mayor cantidad de aceite disminuye la concentración de los compuestos extraídos del polvo de chile. La cantidad de estos pigmentos en el chile chipotle reportado por Hervert-Hernández *et al.* (2010) fue de  $1914.0 \pm 29.9 \mu\text{g/g}$ , siendo superior a lo encontrado en el presente estudio en las oleorresinas.

Por otro lado, hay reportes en los que relacionan el grado de extracción en este tipo de oleorresinas con el perfil lipídico del aceite. Debido a que los carotenoides son compuestos no polares solubles en disolventes no polares, aceites y grasas, su hidrofobicidad, estabilidad, y actividad antioxidante dependen del tipo de ácido graso a la que se esterifica el carotenoide. La composición, el grado de insaturación, y la longitud de las cadenas de ácidos grasos de diferentes aceites tienen una fuerte influencia en su afinidad por los carotenoides, y por lo tanto, los extractos obtenidos con cada tipo de aceite tienen una composición diferente de carotenoides y en consecuencia una actividad antioxidante diferente (Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012).

En los resultados obtenidos por Guadarrama-Lezama *et al.* (2012), obtuvieron una mejor extracción con el aceite de maíz el cual tiene una alta proporción de ácidos grasos saturados (12% aproximadamente) lo que sugiere que los ácidos grasos saturados tienen una mejor afinidad por los carotenoides y exhiben una mejor estabilidad en comparación con los extractos obtenidos mediante el uso de ácidos grasos insaturados. Pérez-Rosales *et al.* (2005) compararon al aceite de aguacate con el perfil de ácidos grasos saturados del aceite de girasol, maíz, oliva, soya y cacahuate con una variación de 10 al 19 %. Por lo que el perfil lipídico es ideal para una buena extracción de carotenoides.

Se realizó una curva de calibración (apéndice A) para la cuantificación de compuestos fenólicos totales, o polifenoles totales presentes en las dos concentraciones de oleorresinas y el aceite de aguacate tomándose como referencia al ácido gálico.

Los resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos para las oleorresinas y el aceite de aguacate se muestran en el cuadro 5 expresados como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico (GAE) por un mL de muestra.

Se puede observar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el contenido de polifenoles en las concentraciones 1:2 y 1:3, con  $211.911 \pm 2.970$  y  $162.473 \pm 2.328$   $\mu\text{g}$  ác. gálico/mL respectivamente, y para el aceite de aguacate cuyo contenido de

dichos compuestos bioactivos es significativamente menor con  $8.737 \pm 0.752 \mu\text{g} \text{ác. gálico/mL}$ . Debido a la estructura de los polifenoles, que en su mayoría son hidrofílicos, se tuvo un rendimiento bajo en las oleorresinas. En el chile chipotle Moreno-Escamilla *et al.* (2015) reportó que el total de compuestos polifenólicos son similares o más altos que en los chiles jalapeños frescos, encontrando valores superiores ( $1819 \mu\text{g} \text{ác. gálico/g}$  aproximadamente). Por lo que debido al proceso de extracción gran parte de los polifenoles encontrados en el fruto se pierden, ya que el aceite al ser liposoluble dichos compuestos no pueden ser extraídos por su carácter hidrosoluble.

### 18.2.2. Determinación de color

Los parámetros de color iniciales se muestran en el cuadro 9. Para la luminosidad en el aceite de aguacate se obtuvieron valores de  $20.556 \pm 1.094$ , teniendo valores más bajos en las oleorresinas, con  $0.86 \pm 0.045$  y  $1.62 \pm 0.047$  en la concentración 1:2 y 1:3 respectivamente, reflejando colores más oscuros debido al proceso de extracción de compuestos bioactivos provenientes del chile chipotle.

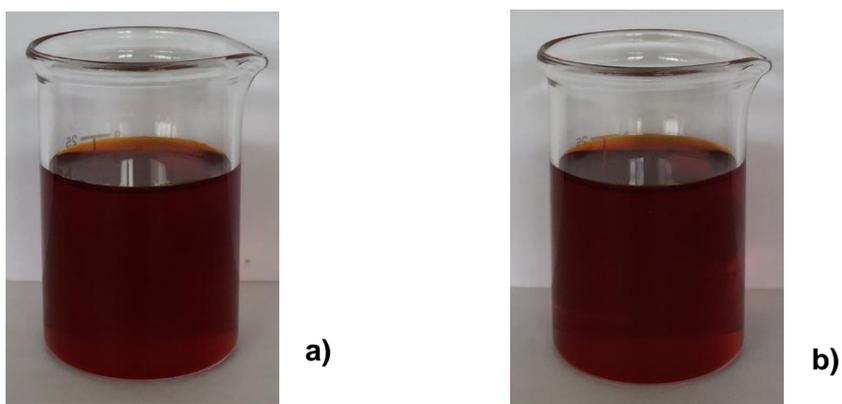
**Cuadro 9.** Caracterización física de las oleorresinas.

Parámetro	Oleorresina 1:2	Oleorresina 1:3	Aceite de aguacate
L*	$0.86 \pm 0.045^a$	$1.62 \pm 0.047^a$	$20.556 \pm 1.094^b$
a*	$3.16 \pm 0.047^a$	$4.74 \pm 0.055^a$	$-2.843 \pm 1.084^b$
b*	$0.57 \pm 0.051^a$	$0.92 \pm 0.065^a$	$7.946 \pm 0.205^b$
H*	$3.21 \pm 0.055^a$	$4.83 \pm 0.063^a$	$69.8 \pm 2.088^b$
C*	$10.322 \pm 0.754^a$	$10.970 \pm 0.643^a$	$8.443 \pm 0.14^a$

\*Las letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas por fila ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

Con los parámetros de a\* y b\* se obtuvo la saturación (cromaticidad) y el ángulo de color (Hue), no teniendo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ambas concentraciones de oleorresinas pero teniendo diferencias significativas con el

aceite de aguacate, como se puede observar en la cuadro 9. Estos valores indican que los rangos de colores en que se encuentran las dos concentraciones de oleorresinas van desde magenta a rojo, poco saturadas y oscuras (figura 9), y tonalidades de verde-amarillo para el aceite de aguacate. Estos cambios en el color se podrían atribuir a la migración de los compuestos del chile chipotle al aceite de aguacate durante el proceso de maceración. Compuestos tales como: compuestos fenólicos, pigmentos, antioxidantes, aceites esenciales.



**Figura 9.** Color de las dos concentraciones de oleorresinas: 1:2 (a) y 1:3 (b).

Dado que el color es uno de los parámetros más importantes en la selección de la mayoría de los productos alimenticios, las oleorresinas de chile, son utilizadas por su intenso color debido a los carotenoides que contiene, confiriéndoles un uso en la industria alimentaria como colorantes (Topuz y Ozdemir, 2007, Nadeem *et al.*, 2011).

### **8.3. Evaluación de la oxidación total de la oleorresina y el aceite de aguacate durante almacenamiento.**

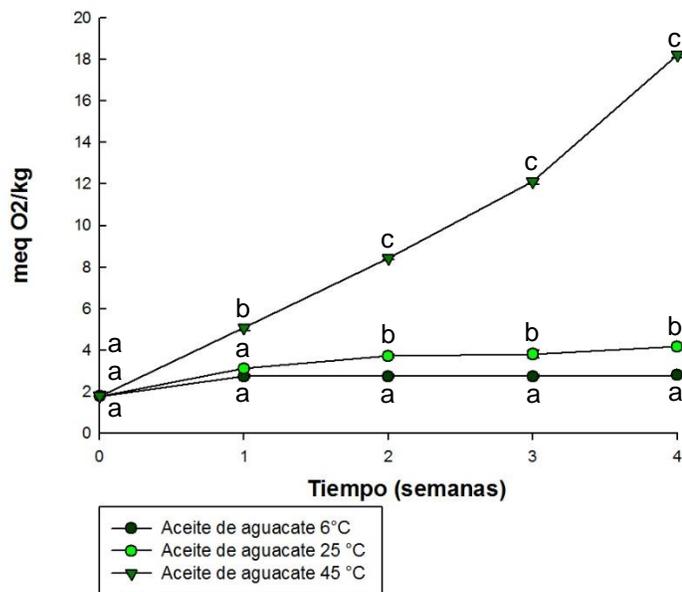
El estado de oxidación general es un parámetro de gran importancia para la evaluación de la calidad de las grasas y aceites, ya que este evalúa la resistencia a la oxidación durante el procesamiento y almacenamiento. En este trabajo, para evaluar el estado de oxidación total de las oleorresinas y el aceite de aguacate, se

utilizó el valor de Totox, el cual toma en cuenta los productos primarios (índice de peróxidos) y secundarios (índice de anisidina) de oxidación (Moigradean *et al.*, 2012).

### 8.3.1. Índice de peróxidos.

El índice de peróxidos se utilizó para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento (4 semanas), en la producción de productos primarios de oxidación (hidroperóxidos) de la oleorresina.

El índice de peróxidos aumentó a lo largo del tiempo y con el incremento de la temperatura en cada una de las muestras. Antes del tratamiento con el chile chipotle en polvo, el aceite de aguacate presentó un índice de peróxido por debajo de la máxima permitida para su clasificación como -aceites vírgenes y grasas y aceites prensados en frío- (15 meq O<sub>2</sub>/kg) de acuerdo con las regulaciones del CODEX (1999) para grasas y aceites comestibles (Figura 10).



**Figura 10.** Índice de peróxidos en el aceite de aguacate a las 3 temperaturas a lo largo del almacenamiento.

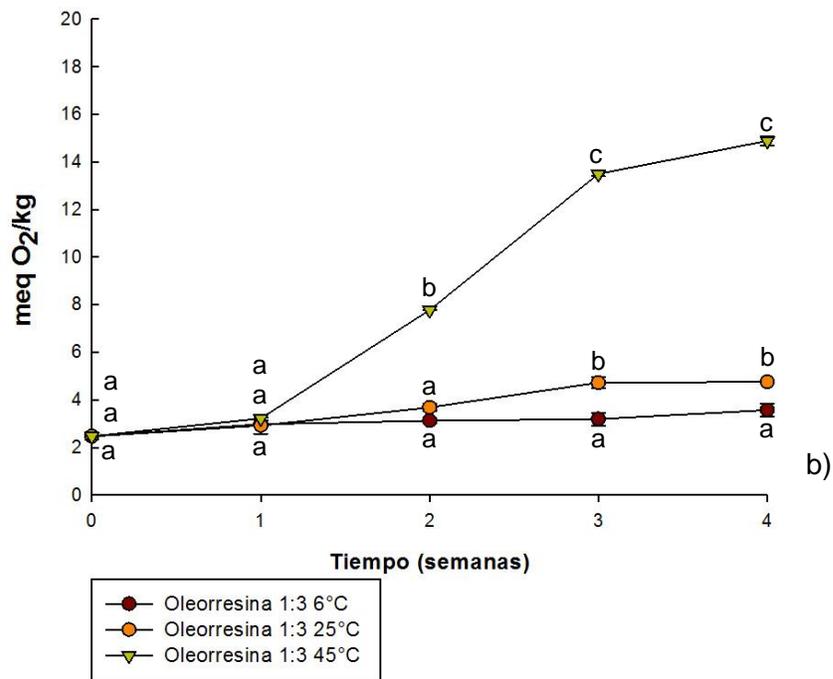
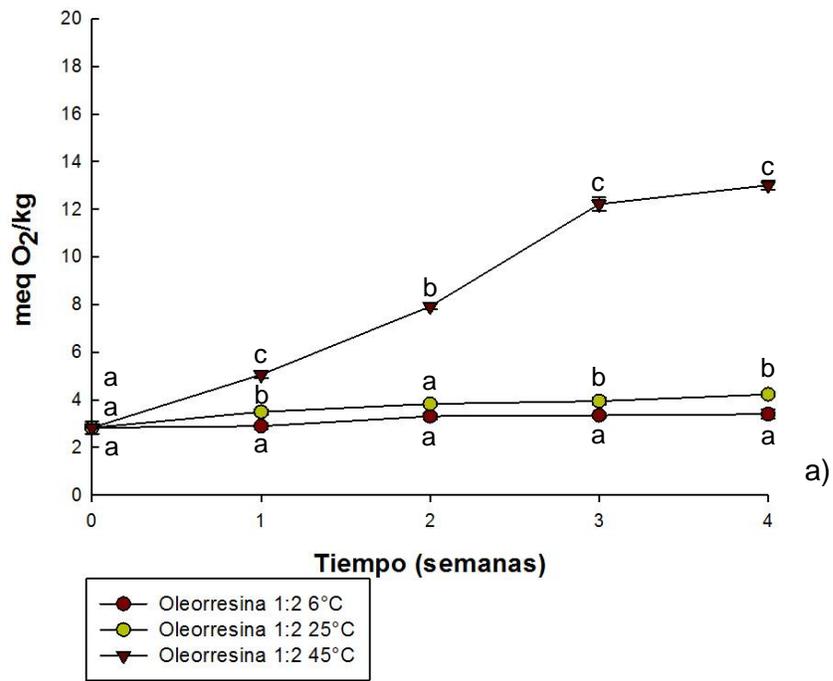
\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

Después del almacenamiento a 6 y 25 °C el aceite de aguacate se mantuvo relativamente constante, elevándose su índice de peróxidos solamente a 4 meq O<sub>2</sub>/kg, teniendo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) a partir de la semana 4.

Al igual que el aceite de aguacate, las dos concentraciones de oleorresinas se mantuvieron estables a las temperaturas de 6 y 25°C (figura 11), aumentando gradualmente hasta casi 5 meq O<sub>2</sub>/kg, habiendo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) para las últimas dos semanas de almacenamiento. Por lo tanto, las tasas de formación de estos compuestos para el control (aceite de aguacate) y las oleorresinas a 6 y 25 °C, se mantuvieron bajas durante el almacenamiento pero encontrándose por debajo de lo dictado por el CODEX (1999) al término de las 4 semanas.

Por el contrario, para la temperatura de 45 °C, inicialmente presenta tasas bajas de formación de estos compuestos durante la primera semana, pero después de eso la formación de peróxidos aumenta considerablemente. Este primer periodo de tiempo se denomina periodo de inducción (PI) o tiempo de inducción (TI) el cual es el tiempo necesario para alcanzar un aumento repentino en las tasas de formación de estos compuestos (Shahidi y Zhong, 2005).

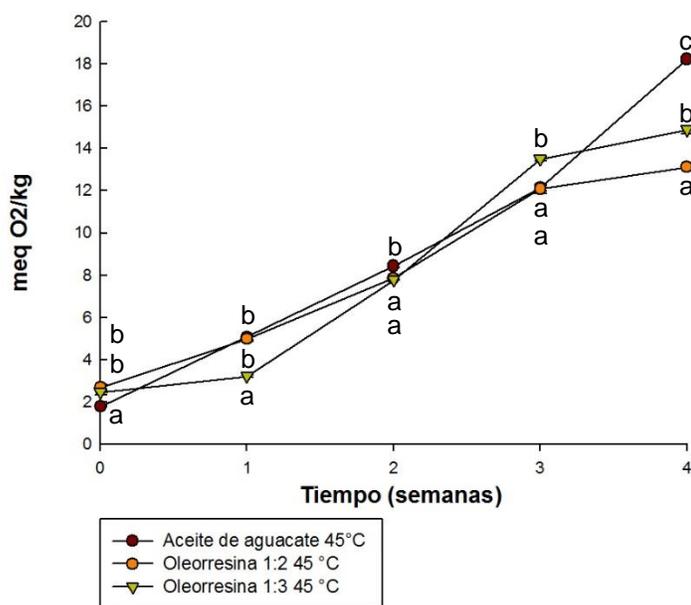
Durante el almacenamiento a 45 °C, para las dos concentraciones de oleorresinas y el control, hay un aumento en la velocidad de oxidación a partir de la 2 semana, teniendo diferencias significativas ( $p>0.05$ ), pero mostrando patrones de cambio similares en las oleorresinas (1:2 y 1:3) a lo largo de las 4 semanas y no sobrepasando los 15 meq. O<sub>2</sub>/kg normados por el CODEX (1999). En cambio, en el aceite de aguacate, durante la semana 4 hay un aumento en la velocidad de formación de estos compuestos primarios, superando los límites máximos para este índice.



**Figura 11.** Índice de peróxidos en las oleorresinas a) 1:2 y b) 1:3 durante el almacenamiento a 6, 25 y 45°C.

\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

El incremento del índice de peróxidos durante el almacenamiento en las dos concentraciones de oleorresinas y el control, indica que el proceso de oxidación predominó; es decir, que la tasa de formación de peróxidos fue mayor que la descomposición de los mismos. Ésta rápida formación de compuestos primarios de oxidación ha sido estudiada por Aragao *et al.* (2008), quien observó que conforme se incrementa la temperatura, la degradación de estos compuestos es acelerada y al mismo tiempo incrementa su tasa de formación, creando una competición entre estos dos procesos. Como se puede observar en la figura 12, en la semana 4, durante el almacenamiento a 45°C, la formación de peróxidos es más rápida en el aceite de aguacate que en las oleorresinas 1:2 y 1:3. Esto se debe al efecto protector que tiene la capsaicina del chile chipotle contra la oxidación del aceite de aguacate (Henderson y Henderson, 1992).



**Figura 12.** Índice de peróxidos en ambas concentraciones de oleorresinas y aceite de aguacate a 45 °C.

\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

Por lo tanto, las temperaturas de almacenamiento tienen una gran influencia en la magnitud del índice de peróxidos, donde el aumento en los valores fue debido

a las elevadas tasas de autoxidación del aceite y de la descomposición de hidroperóxidos a mayores temperaturas (Sun-Waterhouse *et al.*, 2011).

### 8.3.1.1. Velocidad de formación de peróxidos.

En el cuadro 10 se muestran los resultados de la cinética de formación de peróxidos a través de un modelo de primer orden. Esto coincide con lo reportado por Piedrahita *et al.* (2015), quienes estudiaron la degradación oxidativa del aceite de choibá enriquecido con extracto de romero y encontraron que para todos sus tratamientos los modelos cinéticos se ajustaron a un modelo de primer orden.

**Cuadro 10.** Parámetros cinéticos en la formación de peróxidos a lo largo del almacenamiento.

Oleoresina	Temperatura (°C)	k (sem <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
1:2	6	0.0513	0.9272
	25	0.0926	0.9413
	45	0.3935	0.9727
1:3	6	0.0804	0.9468
	25	0.1789	0.9748
	45	0.5023	0.9705

Como se puede observar, los valores menores del coeficiente cinético (k) a lo largo del almacenamiento corresponden a la temperatura de 6°C, independientemente de la concentración de la oleoresina. La formación de peróxidos fue más lenta en la oleoresina 1:2 (ver Cuadro 10), debido a su mayor concentración de compuestos bioactivos.

Como se observa en el cuadro 10, incrementando la temperatura, el coeficiente cinético también aumenta. Esto indica que la formación de peróxidos durante el almacenamiento dependerá de la temperatura a la que se someta la oleoresina.

Los valores obtenidos del análisis de la energía de activación ( $E_a$ ) se presentan en el cuadro 11, pudiéndose observar que la oleorresina 1:2 tuvo los valores más altos comparados con la concentración 1:3.

**Cuadro 11.** Energía de activación durante el almacenamiento en ambas oleorresinas.

Oleorresina	$k_0$ (semanas <sup>-1</sup> )	Energía de activación (J/mol)
1:2	659343.600	38336.7
1:3	228433.400	34597.9

Este aumento en la energía de activación implica una mejora en la resistencia a la oxidación de lípidos. Este comportamiento se observó en el estudio realizado por Piedrahita *et al.* (2015) quienes para su aceite de Choibá enriquecido con extracto de romero la energía de activación fue superior con respecto al control, lo que indica que la adición de antioxidantes naturales puede reducir la velocidad de oxidación lo que resulta en una mejora en la vida útil del producto.

Por lo tanto, la energía de activación se puede ver afectada por la adición de antioxidantes, la variación en la presión parcial de oxígeno, y otros factores que pueden alterar el mecanismo de reacción.

### 8.3.2. Índice de anisidina.

El índice de anisidina radica en la reacción entre aldehídos y la *p*-anisidina. Este es un parámetro adecuado para evaluar la historia y prever el comportamiento futuro de un aceite, proporcionando información acerca de la producción de productos secundarios de oxidación. Los compuestos medidos por el índice de *p*-anisidina son de suma importancia ya que es posible que entre ellos se encuentren aldehídos oxigenados tóxicos, conocidos por su actividad cito y genotóxica y

probables causantes de enfermedades degenerativas (Tatt-Wai *et al.*, 2009; Bonaldi, 2013).

Los resultados obtenidos mostraron que (cuadro 12), entre las dos concentraciones de oleorresinas no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en la formación de éste tipo de compuestos, además de mantener valores bajos a lo largo del almacenamiento en las 3 temperaturas, lo que da una idea de que, debido a la captación/inactivación de los hidroperóxidos por parte de los polifenoles, carotenos y/o capsaicinoides, hubo una mínima formación de compuestos secundarios de oxidación.

**Cuadro 12.** Índice de anisidina a lo largo del almacenamiento en las dos concentraciones de oleorresinas y aceite de aguacate.

Tiempo (semanas)	Temperatura (°C)	Concentración 1:2	Concentración 1:3	Aceite de aguacate
0	6	1.012 ± 0.157 <sup>b,A</sup>	0.981 ± 0.157 <sup>b,A</sup>	0.205 ± 0.061 <sup>a,A</sup>
	25	1.012 ± 0.158 <sup>b,A</sup>	0.981 ± 0.158 <sup>b,A</sup>	0.205 ± 0.061 <sup>a,A</sup>
	45	1.012 ± 0.159 <sup>b,A</sup>	0.981 ± 0.159 <sup>b,A</sup>	0.205 ± 0.061 <sup>a,A</sup>
1	6	1.963 ± 0.261 <sup>b,B</sup>	1.857 ± 0.234 <sup>b,A</sup>	0.286 ± 0.059 <sup>a,A</sup>
	25	1.151 ± 0.163 <sup>b,A</sup>	2.161 ± 0.358 <sup>c,A</sup>	0.323 ± 0.114 <sup>a,A</sup>
	45	1.537 ± 0.072 <sup>b,AB</sup>	2.015 ± 0.197 <sup>b,A</sup>	0.546 ± 0.089 <sup>a,A</sup>
2	6	1.151 ± 0.163 <sup>b,A</sup>	1.572 ± 0.385 <sup>b,A</sup>	0.319 ± 0.058 <sup>a,A</sup>
	25	1.408 ± 0.153 <sup>b,AB</sup>	1.401 ± 0.019 <sup>b,A</sup>	0.621 ± 0.206 <sup>a,A</sup>
	45	1.964 ± 0.063 <sup>b,B</sup>	1.327 ± 0.041 <sup>ab,A</sup>	0.919 ± 0.122 <sup>a,A</sup>
3	6	1.143 ± 0.099 <sup>b,A</sup>	1.591 ± 0.226 <sup>b,A</sup>	0.332 ± 0.082 <sup>a,A</sup>
	25	1.017 ± 0.019 <sup>ab,A</sup>	1.544 ± 0.341 <sup>b,A</sup>	0.763 ± 0.119 <sup>a,AB</sup>
	45	1.381 ± 0.055 <sup>a,A</sup>	1.381 ± 0.214 <sup>a,A</sup>	1.157 ± 0.119 <sup>a,B</sup>
4	6	1.451 ± 0.335 <sup>c,A</sup>	2.322 ± 0.171 <sup>b,B</sup>	0.479 ± 0.145 <sup>a,A</sup>
	25	1.008 ± 0.148 <sup>a,A</sup>	1.611 ± 0.281 <sup>a,A</sup>	1.002 ± 0.065 <sup>a,AB</sup>
	45	1.116 ± 0.083 <sup>a,A</sup>	1.809 ± 0.141 <sup>b,AB</sup>	1.303 ± 0.095 <sup>ab,B</sup>

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

Por otra parte, en el aceite de aguacate los valores fueron aumentando a través del tiempo, sin embargo, no hubo diferencias significativas en cada uno de los tiempos (semana 0-4) en 6, 25 y 45°C. Se puede observar que en el control los

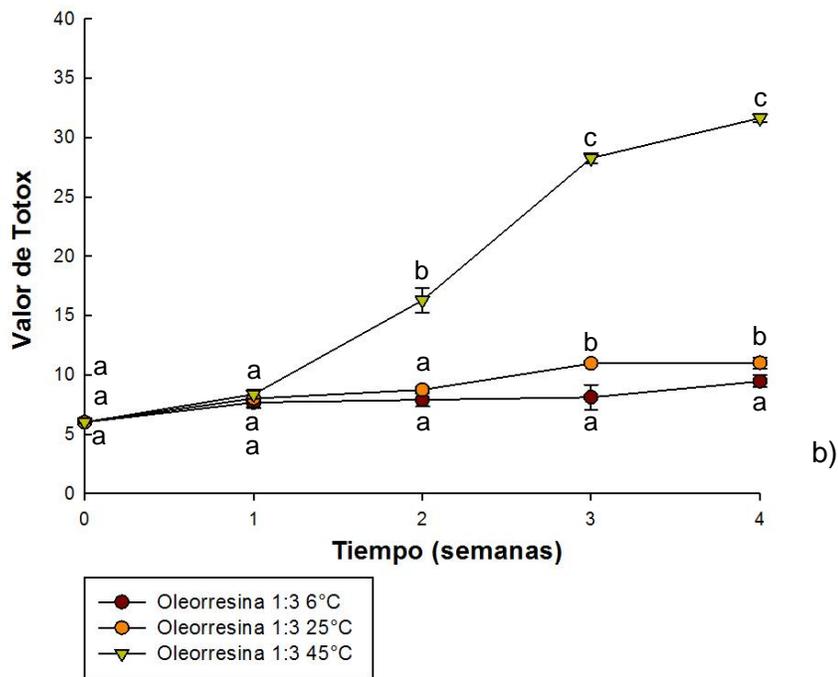
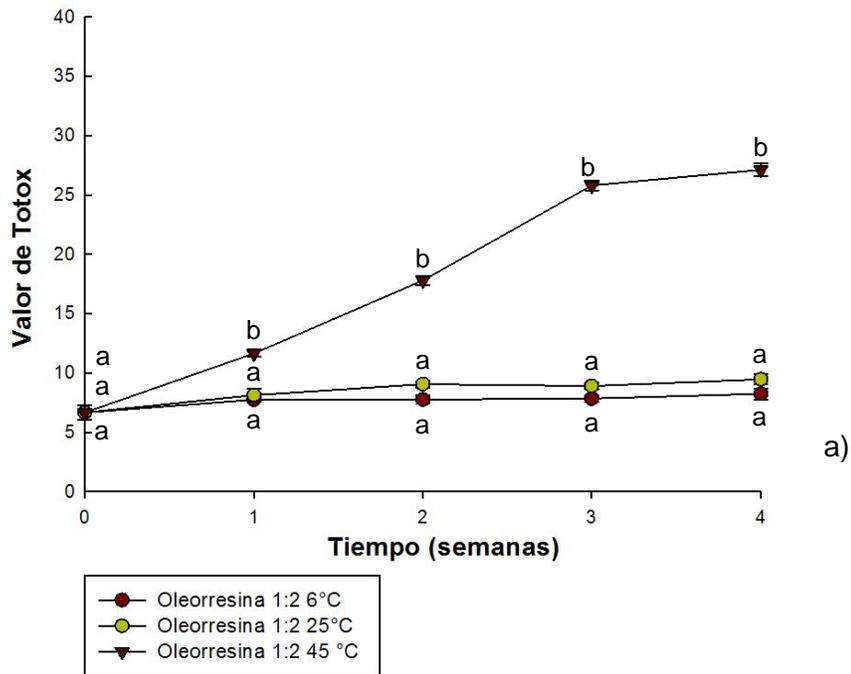
valores se mantuvieron por bajo de los encontrados en ambas concentraciones de oleorresinas. Este mismo comportamiento fue observado por Sun-Waterhouse *et al.* (2011), quienes en su evaluación de la incorporación de compuestos fenólicos en aceite de aguacate y coco, el control (aceite puro) tuvo valores inferiores que en los aceites tratados. Ellos lo asociaron a que los productos de degradación de los compuestos fenólicos podrían contribuir a lecturas más altas en éste índice.

En este estudio, tanto en las oleorresinas como en el aceite de aguacate, todos los valores se mantuvieron por debajo de 7, lo que indica una oxidación secundaria leve. La baja formación de compuestos secundarios de oxidación podría estar relacionado con la captación de los radicales libres por parte de los compuestos bioactivos del chile y/o del aceite de aguacate (Sun-Waterhouse *et al.*, 2011).

### **8.3.3. Valor de Totox.**

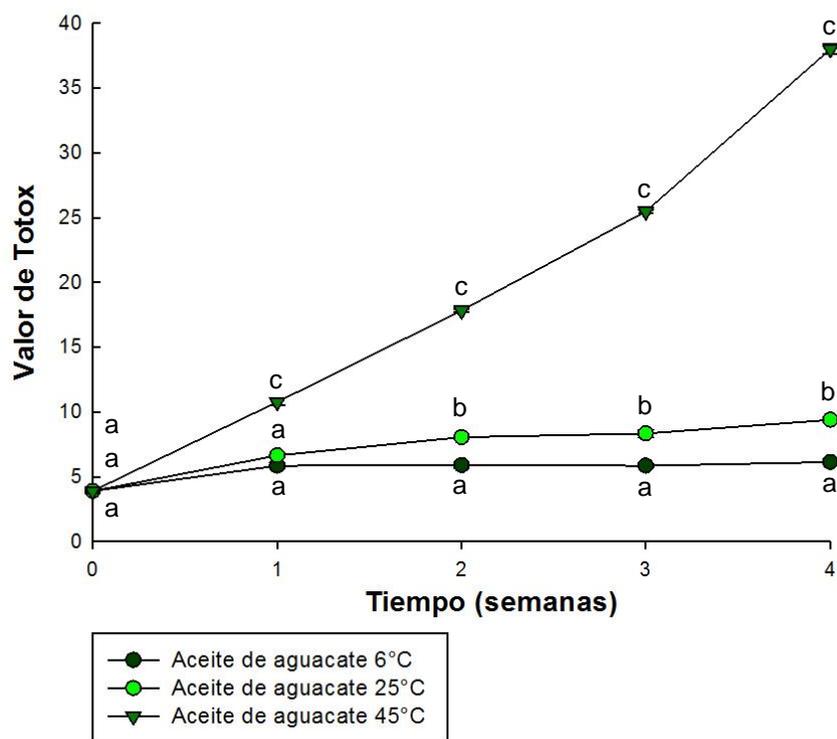
Este valor es obtenido a partir de dos mediciones, índice de peróxidos y de anisidina, y es calculado como: dos veces el valor de índice de peróxidos, más una vez el valor de anisidina. Este parámetro proporciona información acerca del estado de oxidación completa del aceite, con un valor de Totox máximo aceptable de 30 (O'Connor *et al.*, 2007).

Se puede observar que en las dos concentraciones de oleorresinas (figura 13) y en el aceite de aguacate (figura 14), en las temperaturas de 6 y 25 °C, se mantuvieron estables a lo largo del almacenamiento. Esto concuerda con lo reportado por Sun-Waterhouse *et al.*, (2011) quienes estudiaron el efecto adición de compuestos fenólicos en la estabilidad en el almacenamiento (20 y 60 °C) en aceites de aguacate y coco, evaluando a los aceites en ausencia (control) y presencia de ácido cafeico y p-cumárico, encontrando que el valor de Totox para el control y los aceites de aguacate tratados a 20 °C se mantuvo por debajo de 10, coincidiendo con los resultados encontrados en este estudio



**Figura 13.** Valor de Tototox en las oleorresinas 1:2 (a) y 1:3 (b).

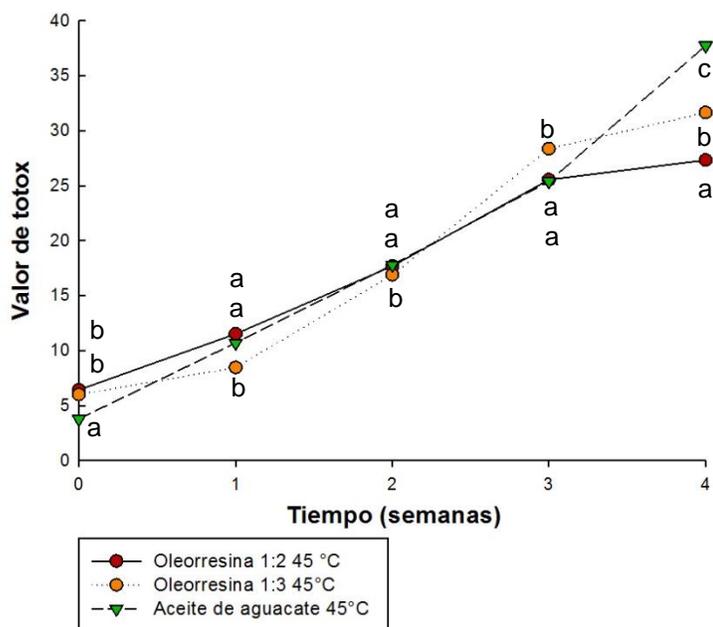
\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.



**Figura 14.** Valor de TOTOX en el aceite de aguacate.

\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

El incremento de la temperatura de almacenamiento de 25 a 45 °C causó patrones y magnitudes de cambio en el valor de TOTOX similares en ambas oleorresinas y en el aceite de aguacate hasta en la semana 3. Para la última semana de almacenamiento tanto las oleorresinas como el control, tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) siendo el aceite de aguacate quien obtuvo un valor mayor (figura 15), lo que podría indicar que el control es menos estable oxidativamente. Esto puede ser posible debido al hecho de que los productos de autooxidación se forman a una velocidad más lenta durante el periodo de inducción a temperaturas inferiores (Choe y Min, 2006) y los aceites con alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados son más sensibles a la temperatura de almacenamiento que los que tienen principalmente ácidos grasos saturados (Sun-Waterhouse *et al.*, 2011).



**Figura 15.** Valor de Totox en las dos concentraciones de oleorresina y aceite de aguacate a 45°C.

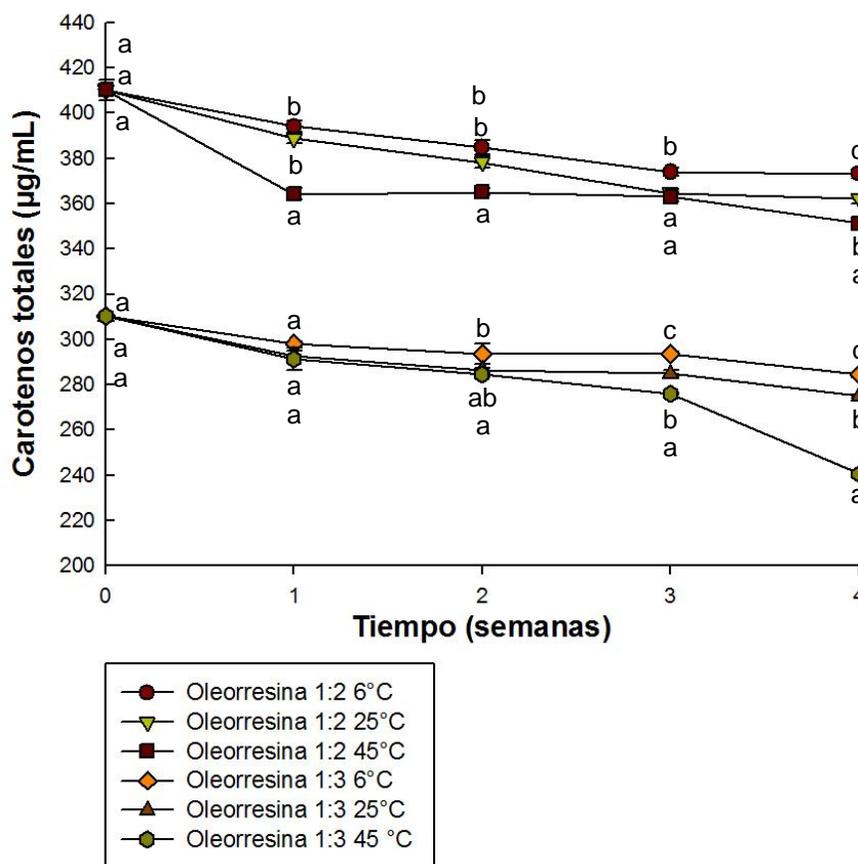
\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

Por lo tanto, los resultados sugieren que se pueden relacionar los valores de Totox menores en las oleorresinas al efecto protector que ejercen los polifenoles, carotenoides y capsaicinoides provenientes del chile chipotle.

#### 8.3.4. Degradación de carotenos totales.

Recientemente, la extracción de carotenoides ha sido de gran interés en la industria alimentaria como ingredientes funcionales y/o aditivos, ya que estos compuestos bioactivos han mostrado tener actividad antioxidante debido a las características de su estructura (Mínguez-Mosquera, 2002, Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012).

En el presente estudio, la cinética de degradación de carotenos totales de las dos concentraciones de oleorresina durante el almacenamiento a 6, 25 y 45°C se muestra en la figura 16.



**Figura 16.** Degradación de carotenos totales a lo largo del almacenamiento en las dos concentraciones de oleorresinas.

\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

Se puede observar que, la degradación de estos pigmentos en 6 y 25°C tiene un patrón de cambio parecido durante el almacenamiento, sin embargo, a partir de la semana 3 se encuentran diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre éstas dos temperaturas. Para la temperatura de 45°C, la degradación de los carotenos en las dos concentraciones de oleorresinas muestran patrones de cambio diferente, siendo la oleorresina 1:3 la que tiene una mayor disminución de estos compuestos.

Como se puede observar en el cuadro 13, para las temperaturas de 6 y 25 °C durante el almacenamiento, el porcentaje de degradación de carotenos no tuvo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las dos concentraciones de oleorresinas. Sin embargo, en 45 °C, la pérdida de estos pigmentos fue significativamente diferente ( $p>0.05$ ) en todas las semanas de almacenamiento, excepto la semana 3. Para la última semana de almacenamiento el porcentaje de pérdida fue mayor en la oleorresina 1:3 con 22.458 % comparado con la oleorresina 1:2 con un porcentaje del 14.398.

**Cuadro 13.** Porcentaje de degradación de carotenos en las dos concentraciones de oleorresinas.

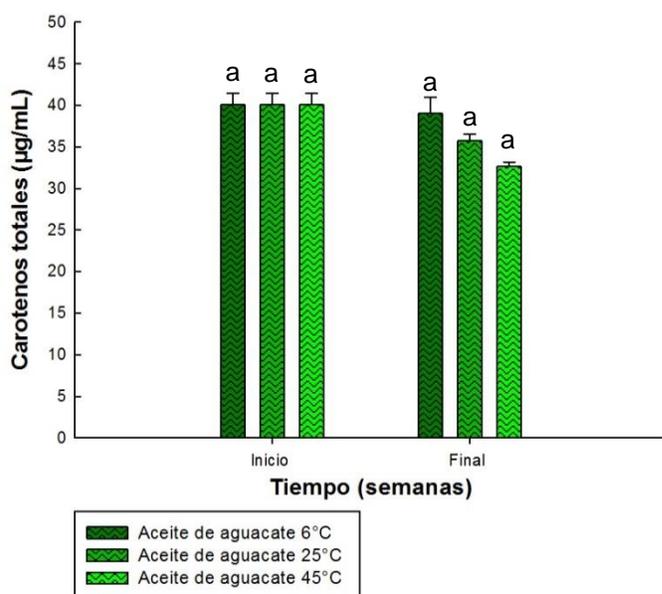
Tiempo (semanas)	Temperatura (°C)	Concentración 1:2	Concentración 1:3
1	6	3.9 ± 1.367 <sup>a,A</sup>	3.862 ± 0.164 <sup>a,A</sup>
	25	5.241 ± 1.566 <sup>a,A</sup>	5.61 ± 0.709 <sup>a,A</sup>
	45	11.215 ± 1.545 <sup>b,B</sup>	6.065 ± 1.624 <sup>a,A</sup>
2	6	6.197 ± 1.138 <sup>a,A</sup>	5.337 ± 1.522 <sup>a,A</sup>
	25	7.799 ± 1.644 <sup>a,A</sup>	7.644 ± 0.235 <sup>a,A</sup>
	45	11.019 ± 1.09 <sup>b,B</sup>	8.269 ± 0.331 <sup>a,A</sup>
3	6	8.847 ± 1.105 <sup>b,A</sup>	5.341 ± 0.185 <sup>a,A</sup>
	25	11.115 ± 0.857 <sup>a,A</sup>	8.173 ± 0.624 <sup>a,AB</sup>
	45	11.521 ± 0.473 <sup>a,A</sup>	11.013 ± 0.275 <sup>a,B</sup>
4	6	9.003 ± 0.808 <sup>a,A</sup>	8.311 ± 0.31 <sup>a,A</sup>
	25	11.743 ± 1.362 <sup>a,AB</sup>	11.335 ± 0.31 <sup>a,A</sup>
	45	14.398 ± 0.716 <sup>a,B</sup>	22.458 ± 0.546 <sup>b,B</sup>

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

La degradación de los carotenos puede ocurrir en paralelo a la presencia de oxígeno y, la presencia de radicales libres también pueden acelerar la velocidad de degradación. Se entiende que la oxidación de carotenos depende de la oxidación simultánea de grasas no saturadas. Estas grasas no saturadas se oxidan probablemente en los primeros pasos de la de almacenamiento del aceite por la lipoxigenasa, y el producto de oxidación, a su vez oxida a los carotenoides. Tanto

el oxígeno y presencia de radicales libres podrían explicar la disminución del contenido de carotenoides en temperaturas elevadas (Ayadi *et al.*, 2009).

Además, se puede observar que la degradación de estos compuestos en el aceite de aguacate (control) para las 3 temperaturas es mínima y sin diferencias significativas ( $p>.05$ ) (Figura 17). En algunos estudios, se ha visto que las reacciones de oxidación causadas por los grupos alquilo de los ácidos grasos insaturados y el oxígeno activo presente, los pigmentos de clorofila presentes en el aceite de aguacate podrían permitir la autoxidación a través de la absorción de la luz (Werman & Neeman, 1986; Moya Moreno *et al.*, 1999).



**Figura 17.** Degradación de carotenos totales en el aceite de aguacate.

\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

#### 8.3.4.1. Velocidad de degradación de carotenoides

En el cuadro 14 se muestran los resultados cinéticos de la degradación de los carotenoides a través de un modelo de primer orden, debido a que

experimentalmente se observó que la disminución del contenido de carotenoides se llevó a cabo expresando un comportamiento donde se da inicialmente un descenso constante en las primeras semanas para posteriormente tener una disminución marcada entre la 3 y 4 semana mostrando un comportamiento asintótico.

**Cuadro 14.** Parámetros cinéticos en la degradación de carotenoides a lo largo del almacenamiento.

Oleoresina	Temperatura (°C)	K (sem <sup>-1</sup> )	r <sup>2</sup>
1:2	6	0.0241	0.9659
	25	0.0313	0.9713
	45	0.0382	0.9612
1:3	6	0.0189	0.9484
	25	0.0268	0.9543
	45	0.0562	0.9431

En general, los valores de la constante (k) a 6 y 25 °C son menores que en la temperatura de 45 °C independientemente de la concentración de la oleoresina, lo que nos indica que conforme la temperatura se eleva la degradación de estos compuestos va incrementando durante su almacenamiento. Esto concuerda con lo encontrado por Vikram *et al.* (2005), quienes realizaron cinéticas de termodegradación de la vitamina C en jugos de naranja, donde aplicaron diferentes métodos de calentamiento a diferentes temperaturas y conforme elevaron la temperatura del tratamiento tuvieron una mayor pérdida de los carotenoides.

Respecto a la energía de activación (Ea) en la degradación de carotenoides (cuadro 15) se puede observar que en la concentración 1:2 (Ea=8707.250 J/mol) tiene una menor energía comparada con la oleoresina 1:3 (Ea=20550.54 J/mol). Estos resultados podrían explicar que a una mayor concentración de oleoresina se aceleran las reacciones de degradación de dichos pigmentos.

**Cuadro 15.** Energía de activación durante el almacenamiento en ambas oleorresinas.

Oleorresina	$k_0$ (semanas <sup>-1</sup> )	Energía de activación (J/mol)
1:2	1.040	8707.250
1:3	123.530	20550.54

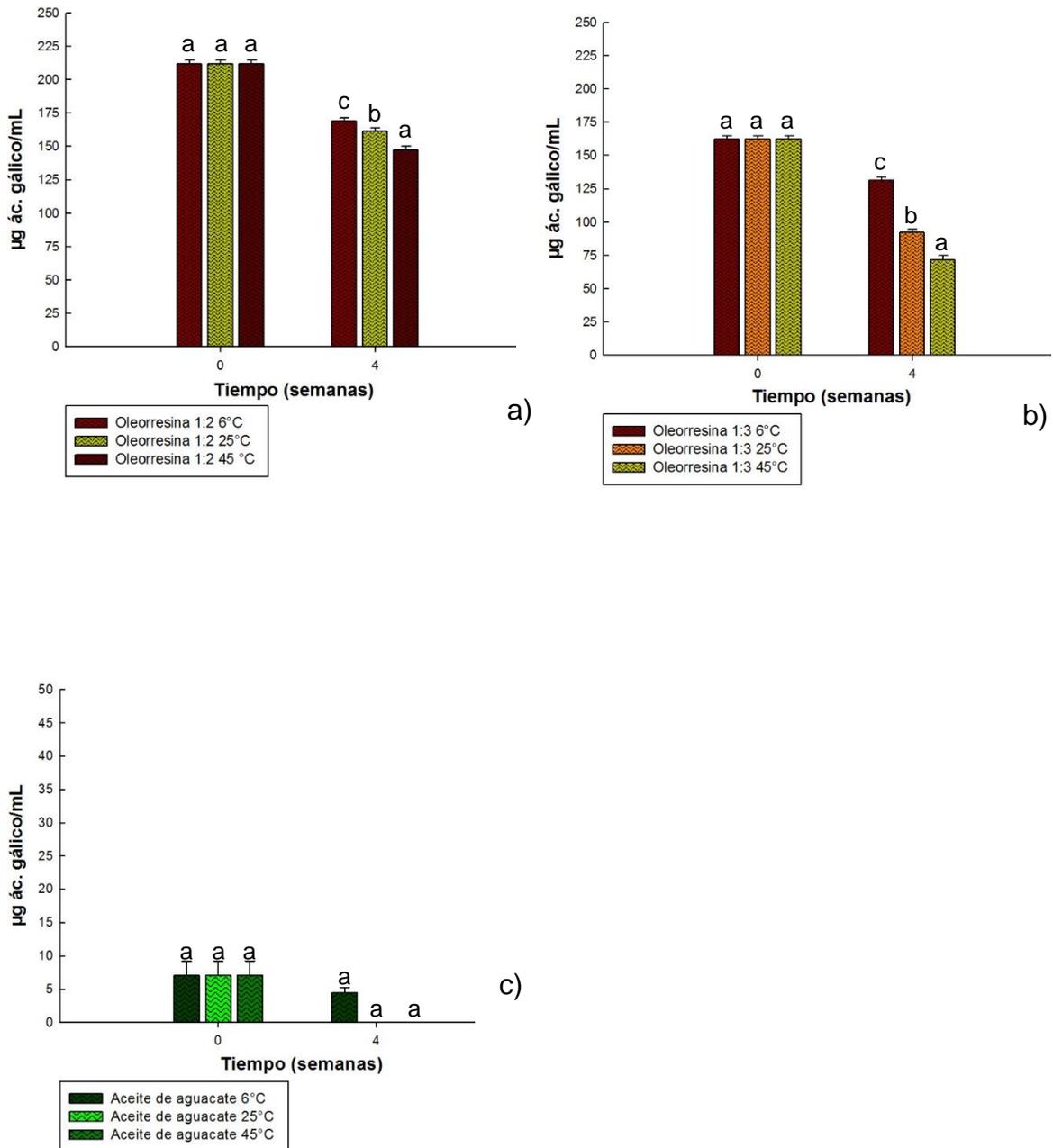
Por lo que, se puede pensar que en las temperaturas de 6 y 25 °C la degradación de carotenos es mediada por la energía de activación y, conforme la temperatura se eleva, en este caso a 45 °C las reacciones ya no son controladas por la energía de activación, sino por la colisiones que se encuentran ( $k_0$ ).

Algunos estudios indican que cuando la energía de activación es superior implica que es necesario un cambio de temperatura más pequeño para degradar un compuesto específico más rápidamente y, estos valores pueden variar dependiendo del método de calentamiento al cual se someta (Vikram *et al.* 2005).

### 8.3.5. Degradación de compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos en las oleorresinas de chile chipotle que han sido detectados por el reactivo de Folin, juegan un papel importante en la actividad antioxidante de éste tipo de oleorresinas (Guadarrama-Lezama *et al.*, 2012).

El contenido de polifenoles totales en las oleorresinas y aceite de aguacate a lo largo del almacenamiento es presentado en la figura 18. En la oleorresina de menor concentración (1:3) se observa una degradación significativa ( $p>0.05$ ) en las temperaturas de 25 y 45 °C, por el contrario en la oleorresina de mayor concentración (1:2), en las 3 temperaturas dicha degradación fue mucho menor.



**Figura 18.** Degradación de compuestos polifenólicos en las dos concentraciones de oleoresina a) 1:2 y b) 1:3, y c) aceite de aguacate, en las 3 diferentes temperaturas a lo largo del almacenamiento.

Para la cantidad de compuestos fenólicos en el aceite de aguacate se puede observar que es significativamente menor a comparación con las dos

concentraciones de oleorresinas sólo para la temperatura de refrigeración y, una degradación completa para las temperaturas de 25 y 45°C (cuadro 16).

**Cuadro 16.** Porcentaje de degradación de compuestos fenólicos al final del almacenamiento a las 3 diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Oleorresina 1:2 (%)	Oleorresina 1:3 (%)	Aceite de aguacate (%)
6	20.131 ± 2.162 <sup>a,A</sup>	19.098 ± 1.533 <sup>a,A</sup>	48.710 ± 7.763 <sup>b,A</sup>
25	23.776 ± 2.080 <sup>a,A</sup>	43.045 ± 2.092 <sup>b,B</sup>	100 ± 0 <sup>c,B</sup>
45	30.382 ± 1.922 <sup>a,A</sup>	55.815 ± 1.397 <sup>b,C</sup>	100 ± 0 <sup>c,B</sup>

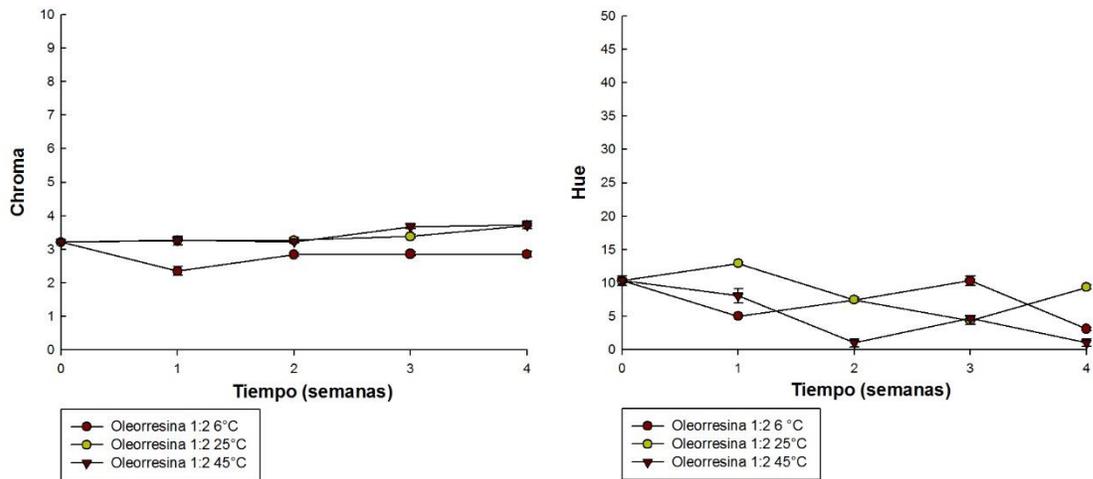
\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± desviación estándar.

### 8.3.6. Atributos de color: Luminosidad, Hue y Cromaticidad.

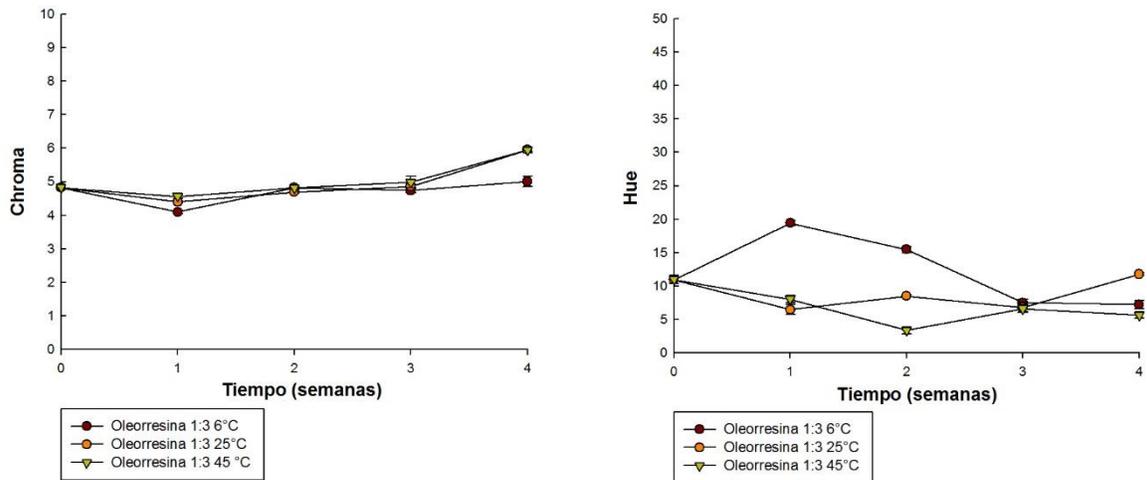
En las figuras 19, 20 y 21 se muestran los cambios de color a lo largo del almacenamiento a las 3 diferentes temperaturas.

Para el parámetro de ángulo de color (Hue) la concentración de 1:2 se mantuvo estable en las 3 temperaturas, manteniendo el ángulo de color en las gamas de magenta-rojo. Por otro lado, en la concentración de 1:3 tuvo unas variaciones no muy significativas pero mayores que la concentración 1:2.

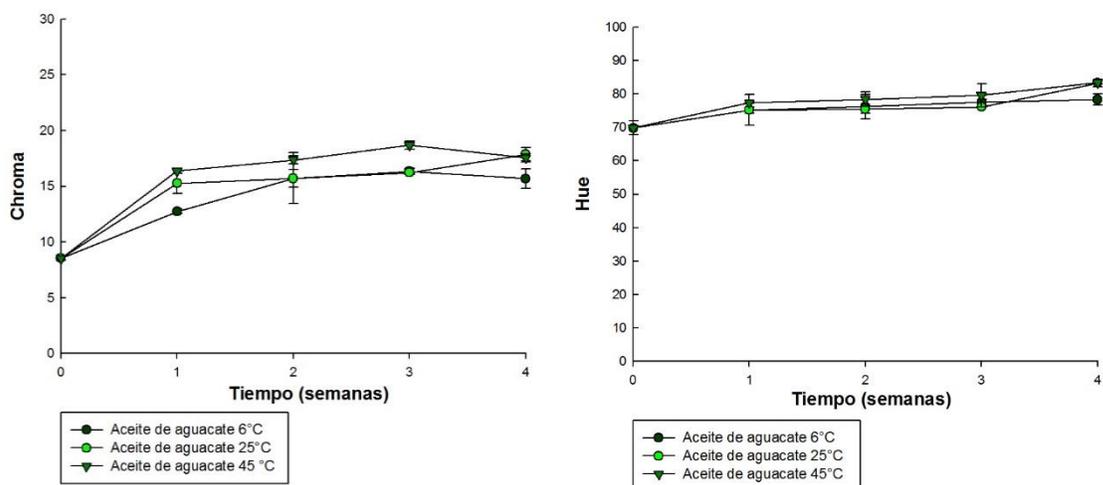
Para poder determinar el grado de saturación de las oleorresinas se determinó mediante el parámetro de cromaticidad. Se observó que hubo una pequeña diferencia entre las dos concentraciones, siendo más saturada la oleorresina de 1:3, comparada con la 1:2. Asimismo se puede observar que ambas concentraciones tiene un pequeño incremento conforme el tiempo de almacenamiento es mayor.



**Figura 19.** Propiedades de color en la concentración 1:2 ( $L^*$ = luminosidad,  $C^*$ = Chroma,  $H^*$ =Hue) a las 3 diferentes temperaturas a lo largo del tiempo.



**Figura 20.** Propiedades de color en la concentración 1:3 ( $L^*$ = luminosidad,  $C^*$ = Chroma,  $H^*$ =Hue) a las 3 diferentes temperaturas a lo largo del tiempo.



**Figura 21.** Propiedades de color en el aceite de aguacate ( $L^*$ = luminosidad,  $C^*$ = Chroma,  $H^*$ =Hue) a las 3 diferentes temperaturas a lo largo del tiempo.

Para el parámetro  $L^*$  los valores se mantuvieron estables lo largo de las 4 semanas de prueba para las dos concentraciones de oleorresinas, encontrando solo diferencias mínimas en las temperaturas de 6 y 25 °C, y una variación ligeramente mayor en 45°C.

La evaluación del color de productos alimenticios a lo largo del almacenamiento es un aspecto muy importante ya que su observación permite detectar ciertas anomalías y defectos. En la industria alimentaria, el color es un parámetro en base al cual se realizan clasificaciones de productos, se evalúan materias primas, se hace control de procesos y se miden indirectamente otros parámetros, como lo es por ejemplo la oxidación o degradación de un producto (Abdullah *et al.* 2004, Delmoro *et al.*, 2010).

## 8.4. Actividad antioxidante.

### 8.4.1. Porcentaje de inhibición por el método de ABTS<sup>•+</sup>.

No existe un único compuesto antioxidante responsable mayoritariamente de la capacidad antioxidante de los chiles. El género *Capsicum* posee que distintos compuestos bioactivos que podrían jugar este papel (Materska y Perucka, 2005).

En el cuadro 17 se muestran los porcentajes de inhibición de todas las muestras al principio y fin del almacenamiento. Se puede observar que hay una diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre las oleorresinas, tanto para la concentración 1:2 ( $83.849 \pm 0.916$  %) como 1:3 ( $75.258 \pm 0.635$  %) teniendo un alto porcentaje de inhibición. Esto coincide con lo reportado por Guadarrama-Lezama *et al.* (2012) quienes en su estudio, sus extractos oleosos de otra variedad de *Capsicum* realizados con aceite maíz, girasol y cártamo mostraron un 90, 75 y 60% de captación de radicales en ABTS<sup>+</sup>, los cuales son similares con los porcentajes encontrados en este estudio. Estas diferencias podrían deberse a la variedad de chile utilizada, además de las condiciones de extracción utilizadas. Cabe mencionar que en el estudio de Guadarrama-Lezama *et al.* (2012) los aceites utilizados contienen antioxidantes sintéticos adicionados.

**Cuadro 17.** Capacidad antioxidante mediante el método de ABTS.+.

Tiempo (semanas)	Temperatura (°C)	% inhibición en oleorresina 1:2	% inhibición en oleorresina 1:3	% inhibición aceite de aguacate
0	TA	$83.849 \pm 0.916^{c,D}$	$75.258 \pm 0.635^{b,C}$	$56.478 \pm 0.923^{a,D}$
4	6	$74.084 \pm 0.923^{c,C}$	$68.262 \pm 0.848^{b,B}$	$35.821 \pm 0.825^{a,C}$
	25	$69.154 \pm 0.985^{c,B}$	$66.713 \pm 0.937^{b,B}$	$23.380 \pm 0.923^{a,B}$
	45	$55.774 \pm 0.645^{c,A}$	$49.014 \pm 0.879^{b,A}$	$16.478 \pm 0.845^{a,A}$

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). \*TA: temperatura ambiente. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

Se puede observar que la capacidad antioxidante disminuye conforme aumenta la temperatura. Para las oleorresinas, a pesar de que hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ), no hay un cambio drástico en 6 y 25 °C al final del almacenamiento. En cambio, al término de las 4 semanas en la temperatura de 45°C se puede ver que hay una pérdida mucho mayor en el porcentaje de inhibición para ambas concentraciones de oleorresinas. Por su lado, el aceite de aguacate presentó

una pérdida importante en 6 y 25°C y, en la temperatura de 45 °C tuvo una pérdida muy superior a las anteriores.

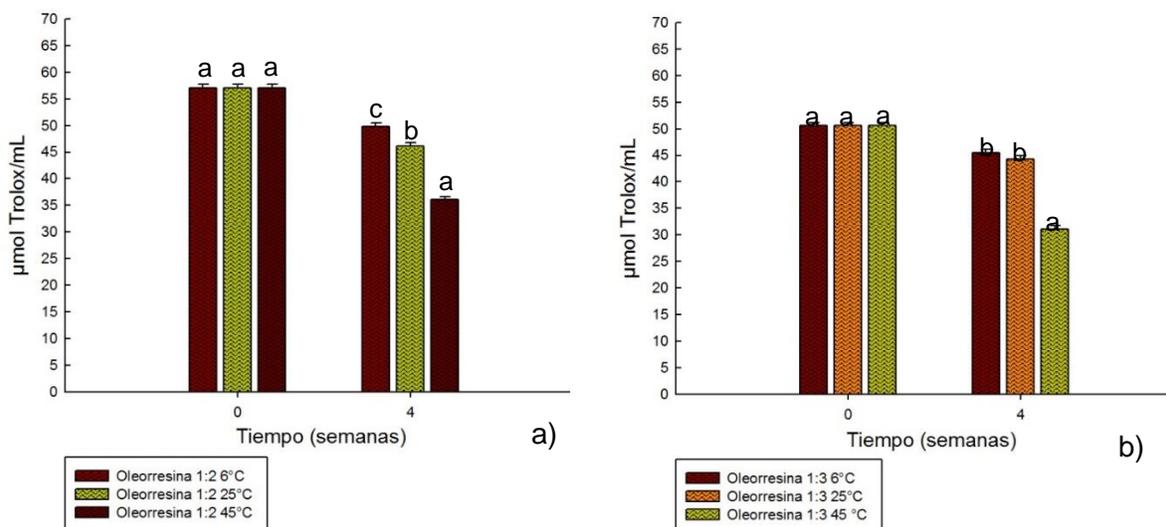
Por lo que, la alta actividad antioxidante en las oleorresinas se puede atribuir a los polifenoles, carotenoides y capsaicinoides provenientes del chile; además de mejorar su estabilidad durante el almacenamiento

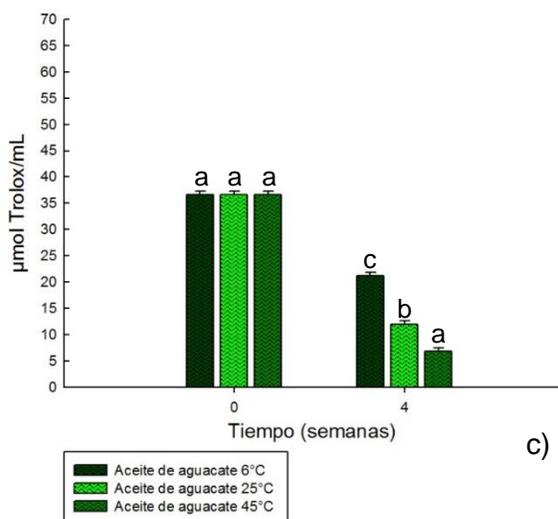
#### 8.4.2. Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC).

Se realizó una curva de calibración para la evaluación de la capacidad antioxidante (apéndice A) donde los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g}$  equivalentes a Trolox por mL.

Para poder explorar la posible relación entre los valores obtenidos en el índice de Totox y el poder antioxidante atribuible a los compuestos antioxidantes de la oleorresina y el aceite de aguacate se llevaron a cabo las pruebas de FRAP y ABTS para todas las muestras (oleorresinas 1:2 y 1:3 y aceite de aguacate).

Los valores obtenidos en  $\text{TEAC}_{\text{ABTS}}$  se muestran en las siguientes gráficas (figura 22), donde se muestran la capacidad antioxidante en todas las muestras al inicio y final del almacenamiento. Se pudo observar que la actividad antioxidante fue dependiente a la concentración de la oleorresina, teniendo valores más altos en la concentración 1:2.





**Figura 22.** Actividad antioxidante mediante ABTS en las dos concentraciones de oleorresinas a) y b) y el aceite de aguacate c).

\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

Durante el almacenamiento hubo una misma tendencia de pérdida en las dos concentraciones de oleorresinas conforme la temperatura incrementó. Por otro lado, para el aceite de aguacate que aunque sigue el mismo patrón, la disminución de los valores son significativamente mayores ( $p>0.05$ ) comparado con las dos concentraciones de oleorresinas.

En el cuadro 18 y 19 se muestran el porcentaje de pérdida en relación a los valores de TEAC, tanto en ABTS como en FRAP.

Como se puede observar entre las dos concentraciones de oleorresinas hay una tendencia similar, por el contrario, en el aceite de aguacate dicha pérdida es significativamente mayor ( $p>0.05$ ) teniendo una gran pérdida en la temperatura de 45 °C.

**Cuadro 18.** Porcentaje de pérdida de la actividad antioxidante mediante ABTS al término del almacenamiento.

Temperatura (°C)	Oleoresina 1:2 (%)	Oleoresina 1:3 (%)	Aceite de aguacate (%)
6	12.756 ± 0.964 <sup>a,A</sup>	10.292 ± 1.229 <sup>a,A</sup>	42.016 ± 0.951 <sup>b,A</sup>
25	19.181 ± 2.211 <sup>b,B</sup>	12.566 ± 1.831 <sup>a,A</sup>	67.319 ± 1.659 <sup>c,B</sup>
45	36.671 ± 1.316 <sup>a,C</sup>	38.618 ± 1.514 <sup>a,B</sup>	81.36 ± 1.522 <sup>b,C</sup>

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). \*T/A: temperatura ambiente. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± desviación estándar.

**Cuadro 19.** Porcentaje de pérdida de la actividad antioxidante mediante FRAP al término del almacenamiento.

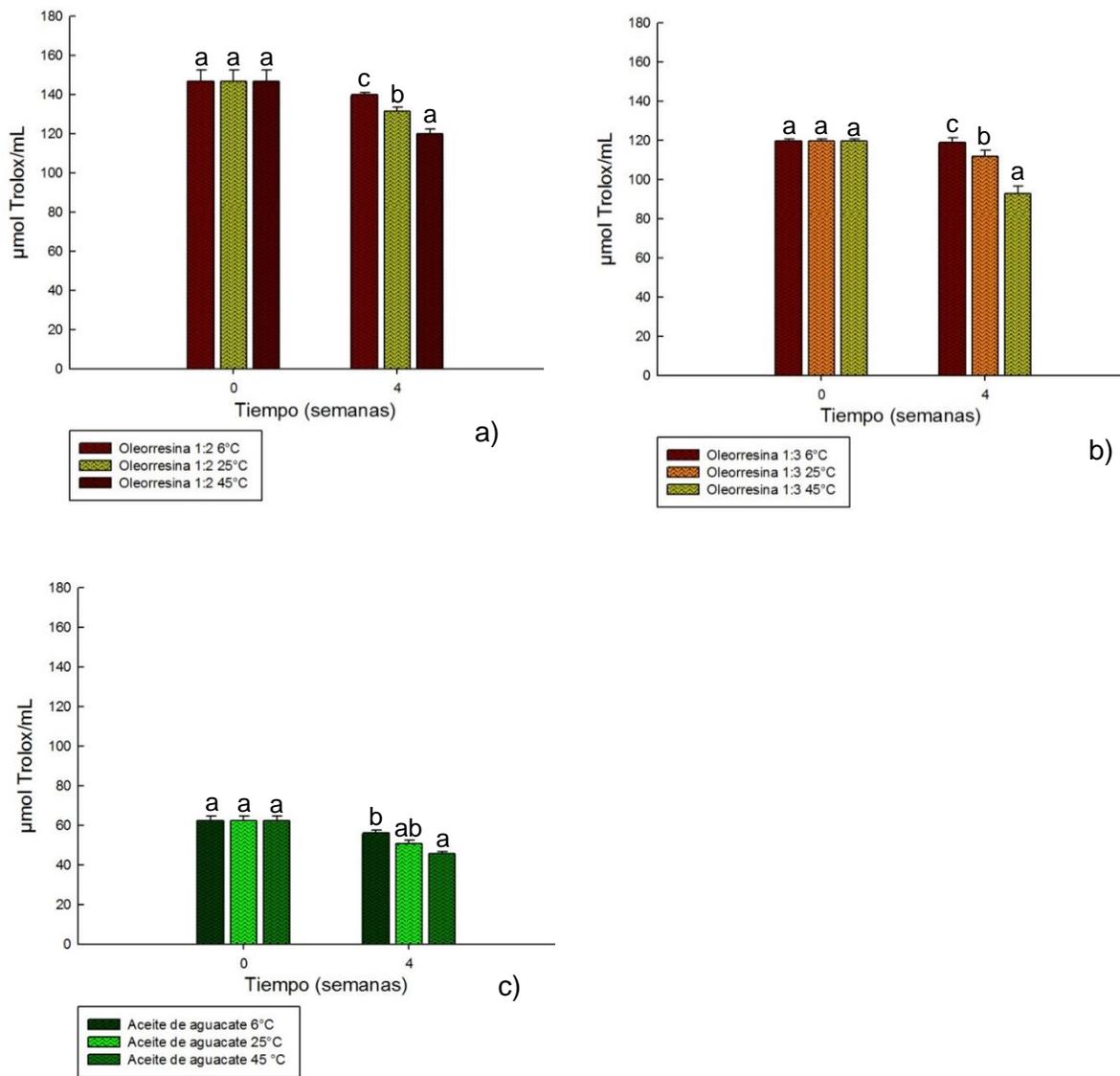
Temperatura (°C)	Oleoresina 1:2 (%)	Oleoresina 1:3 (%)	Aceite de aguacate (%)
6	4.653 ± 1.222 <sup>ab,A</sup>	2.268 ± 1.224 <sup>a,A</sup>	9.802 ± 1.049 <sup>b,A</sup>
25	10.319 ± 2.931 <sup>a,A</sup>	6.424 ± 1.575 <sup>a,A</sup>	18.333 ± 0.739 <sup>b,B</sup>
45	18.214 ± 1.952 <sup>a,B</sup>	22.213 ± 2.31 <sup>ab,B</sup>	26.761 ± 3.626 <sup>b,C</sup>

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p>0.05$ ). \*T/A: temperatura ambiente. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± desviación estándar.

Esto puede ser relacionado con el estado de oxidación de las oleorresinas y el aceite, es decir, en la temperatura de 45°C que es donde hay un mayor valor de Totox para todos los tratamientos, es donde hay una mayor pérdida de la actividad antioxidante.

La determinación de TEAC mediante el método de FRAP durante el almacenamiento a las 3 temperaturas se muestra en la figura 23. Se puede observar que a medida que la temperatura aumenta, su capacidad antioxidante disminuye, como pasó con TEAC<sub>ABTS</sub>. Se puede observar los valores son significativamente más altos ( $p>0.05$ ) que los obtenidos por el método de ABTS. Esto podría ser porque el ABTS por ser para compuestos lipofílicos está reaccionando con los compuestos bioactivos liposolubles presentes en la oleorresina, y en cambio, el

FRAP por su capacidad de medir también a los compuestos hidrofílicos, además de interactuar con los componentes tanto hidro como lipofílicos.



**Figura 23.** Actividad antioxidante mediante FRAP en las dos concentraciones de oleoresinas a) y b) y el aceite de aguacate c).

\*Las letras con letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones  $\pm$  SD.

## 8.5. Actividad antimicrobiana.

Los alimentos son importantes vectores de muchos agentes nocivos (priones, virus, bacterias, parásitos, toxinas, metales pesados, etc.) que pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos. En la actualidad, hay muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de distintas hierbas y especias (Singh *et al.*, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010.), sin embargo son muy pocos que han evaluado la actividad antimicrobiana en oleorresinas (Dussault *et al.*, 2014), por lo que en el presente estudio se determinó el potencial antimicrobiana de las oleorresinas de chile chipotle realizadas con aceite de aguacate.

### 8.5.1. Pruebas de sensibilidad microbiana por difusión en placa.

Una vez que la materia prima fue seleccionada se realizaron las pruebas de sensibilidad antimicrobiana en placa para las mismas bacterias patógenas. Las medidas de los diámetros de inhibición (mm) se muestran en la cuadro 20, pudiéndose observar que las bacterias Gram positivas fueron las más sensibles a las dos concentraciones de oleorresinas.

**Cuadro 20.** Zona de inhibición (mm) de bacterias patógenas para ambas de oleorresina de chile chipotle y el control (aceite de aguacate).

Bacteria	Zona de inhibición (mm) oleorresina 1:2	Zona de inhibición (mm) oleorresina 1:3	Zona de inhibición (mm) aceite de aguacate
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.833 ± 0.288	4.333 ± 0.288	3.333 ± 0.288
<i>Staphylococcus aureus FRI</i>	1.333 ± 0.28	2.833 ± 0.288	1.833 ± 0.288
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.1 ± 0.287	1.166 ± 0.288	1.166 ± 0.288
<i>Escherichia coli</i>	S/A	S/A	S/A
<i>Salmonella enterica</i>	S/A	S/A	S/A

\*Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

**Cuadro 21.** Zona de inhibición (mm) de bacterias ácido lácticas para ambas de oleorresina de chile chipotle elaborada con aceite de aguacate.

Bacteria	Zona de inhibición (mm) oleorresina 1:2	Zona de inhibición (mm) oleorresina 1:3	Zona de inhibición (mm) aceite de aguacate
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0.166 ± 0.288	2.333 ± 0.577	S/A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.333 ± 0.577	1.333 ± 0.577	0.667 ± 0.577
<i>Lactobacillus plantarum 299v</i>	1.333 ± 0.577	S/A	1.167 ± 0.288
<i>Lactobacillus casei shirota</i>	S/A	S/A	S/A
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19987	S/A	S/A	S/A
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 19258	0.166 ± 0.288	2.333 ± 0.288	0.833 ± 0.288
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC BAA-250	0.166 ± 0.288	0.333 ± 0.288	0.167 ± 0.287
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC BAA-491	S/A	S/A	S/A
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.166 ± 0.288	0.166 ± 0.288	0.55 ± 0.556
<i>Lactobacillus delbreakii sub bulgaris</i> ATCC 11842	2.166 ± 0.2886	1.1666 ± 0.288	1.667 ± 0.288
<i>Lactobacillus helveticus</i> ATCC 7995	0.166 ± 0.288	0.166 ± 0.288	0.833 ± 0.288
<i>Lactobacillus delbreakii sub bulgaris</i> ATCC BAA-365	0.666 ± 0.288	2.1666 ± 0.288	0.833 ± 0.288

S/A: Sin actividad antimicrobiana. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

No se tienen reportes de que el aceite de aguacate tenga actividad antimicrobiana, no obstante, en el presente estudio se observó dicha actividad (cuadro 20).

Se puede observar que la bacteria más sensible en esta prueba fue *Listeria monocytogenes* seguida por *Staphylococcus aureus* FRI. Se puede notar que el aceite de aguacate también muestra actividad antimicrobiana, en un menor grado comparado con las oleorresinas, pudiéndole atribuir también la actividad antimicrobiana a los compuestos bioactivos del Chile.

Asimismo esta prueba fue realizada en diferentes bacterias ácido lácticas, como se muestra en el cuadro 21. Si bien este tipo de oleorresinas se utilizan en la industria alimentaria como colorantes y/o antioxidantes, las propiedades antimicrobianas que le pueden proveer como aditivo alimentario es una ventaja más para diversos productos como por ejemplo los fermentados.

De las bacterias patógenas que mostraron zonas de inhibición más altas fueron seleccionadas para determinar la concentración mínima inhibitoria.

#### **8.5.2. Concentración mínima inhibitoria.**

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se seleccionaron los microorganismos que tuvieron mejor actividad antimicrobiana (*Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Staphylococcus aureus* FRI 134).

Los resultados se muestran en el siguiente cuadro 22, donde se puede observar que no hubo relación entre ambas concentraciones de oleorresinas teniendo la misma CMI, de 15 y 20 % (v/v), para *S. aureus* y *L. monocytogenes* respectivamente.

**Cuadro 22.** Concentración mínima inhibitoria en ambas concentraciones de oleorresinas.

Porcentaje de oleorresina (v/v)	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Oleorresina 1:2	Oleorresina 1:3	Oleorresina 1:2	Oleorresina 1:3
10	+	+	+	+
15	+	+	+	+
20	+	+	-	-
25	-	-	-	-

+: Si hubo crecimiento bacteriano; -: No hubo crecimiento bacteriano. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones.

## 9. CONCLUSIONES.

- Con el aceite de aguacate por su perfil lipídico, se puede obtener un buen grado de extracción de los componentes bioactivos del chile chipotle.
- Los cambios en el contenido de polifenoles y carotenoides totales podrían explicar las diferencias observadas, tanto en las oleorresinas como el control (aceite de aguacate), sobre la resistencia en la oxidación térmica.
- Las dos concentraciones de oleorresinas se oxidaron en un mayor magnitud en la temperatura de 45 °C, siendo dicha oxidación significativamente mayor ( $p>0.05$ ) en el control.
- Para la actividad antioxidante las oleorresinas en las dos concentraciones tuvieron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) en comparación con el control. La pérdida de la capacidad antioxidante estuvo influenciada por el tiempo del almacenamiento y el aumento de la temperatura, siendo la temperatura de 45 °C la más afectada.
- Las oleorresinas mostraron actividad antimicrobiana contra algunas bacterias patógenas y ácido lácticas, lo que podría ser útil para la utilización en algunos productos alimentarios.
- No se tienen reportes de que el aceite de aguacate tenga actividad antimicrobiana, no obstante, en el presente estudio se observó dicha actividad.
- Los resultados obtenidos muestran que las dos concentraciones de oleorresinas tienen altas propiedades antioxidantes por lo que se puede utilizar como aditivo 100% natural.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

**Abdullah, M. Z., Guan, L. C., Lim, K. C. and Karim, A. A. 2004.** The applications of computer vision and tomographic radar imaging for assessing physical properties of food. *Journal of Food Engineering* 61: 125-135.

**Aljaloud, S. O., Gyawali, R., Reddy, M. R. and Ibrahim, S. A. 2012.** Antibacterial Activity of Red Bell Pepper against *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. *Internet Journal of Food Safety*, Vol.14, 44-47.

**Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A. Amarowicz, R. and Shahidi, F. 2011.** Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. , 59; 163-173.

**Anabela Sousa, A., Casal, S., Malheiro, R., Lamas, H., Bento, A. and Pereira, J. A. 2015.** Aromatized olive oils: Influence of flavouring in quality, composition, stability, antioxidants, and antiradical potential. *Food Science and Technology*. 60, 22-28.

**Antonius, G. F. and Jarret, R. L. 2006.** Screening *Capsicum* accessions for capsaicinoids content. . *Journal of Environmental Science and Health*.

**Aragao, G. M. F., Corradini, M. G., Peleg, M. 2008.** A Phenomenological Model of the Peroxide Value's Rise and Fall During Lipid Oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 85:1143–1153.

**Arora, R., Gill, N. S., Rana, A. C. 2011.** An Overview about Versatile Molecule Capsaicin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*; 3(4): 280-286.

**Ayadi, M. A., Grati-Kamoun N., Attia H. 2009.** Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2613–2619.

**Aza-González C., Núñez-Paleniús, H. G., Ochoa-Alejo, N. 2011.** Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). *Plant Cell Reports Biotechnology*, 30, 695–706.

**Barbero, G. F., Palma, M. and Barroso, C. G. 2006.** Pressurized liquid extraction of capsaicinoids from peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(9), 3231-3236.

**Berasategi, I., Barriuso, B., Ansorena, D. and Astiasarán, I. 2012.** Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. *Food Chemistry*. 132, 439–446.

**Berke, T. G. 2012.** *Capsicum* cultivars. *Seminis Vegetable Seeds*, USA, and S.C. Shieh, AVRDC: The World Vegetable Center, Taiwan.

**Bin F. and T.P. Labuza. 1977.** Shelf Life Testing: Procedures and Prediction Methods for Frozen Foods. Disponible en <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F97>.

**Bonaldi, E. 2013.** Evaluación del estado de oxidación del aceite vegetal usado y la acción de los antioxidantes naturales incorporados. Facultad Regional Rosario, Universidad Tecnológica Nacional Zeballos 1341 (S2000BQA) Rosario, Santa Fe, Argentina.

**Burt, S. 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential. *International Journal of Food Microbiology*, 223– 253.

**Caporaso, N., Paduano, A., Nicoletti, G. and Sacchi, R. 2013.** Capsaicinoids, antioxidant activity, and volatile compounds in olive oil flavored with dried chili pepper (*Capsicum annuum*). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 1434–1442.

**Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R. 2013.** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 15-25.

**Cavazza, A., Corti, S., Mancinelli, C., Bignardi, C. and Corradini, C. 2015.** Effect of the addition of Chili Pepper powder on vegetable oils oxidative stability. DOI 10.1007/s11746-015-2738-9.

**Choe, E. and Min, D. B. 2006.** Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. Comprehensive reviews in food science and food safety, Vol. 5. Institute of Food Technologists.

**Chun-Ying, L., Hee-Woong, K., He, L., Deug-Chan, L., Hae-Ik, R. 2014.** Antioxidative effect of purple corn extracts during storage of mayonnaise. Food Chemistry, 592–596.

**CODEX STAN 19-1981. 1999.** Norma del codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales.

**Collera-Zuñiga, O., García-Jiménez, F., Meléndez-Gordillo., R. 2011.** Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annum* L. Food Chemistry 90 109–114.

**Delmoro, J., Muñoz, D., Nadal, V., Clementz, A., Pranzetti, V. 2010.** El color en los alimentos: determinación de color en mieles. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano Argentina. Invenio, vol. 13, núm. 25, pp. 145-152.

**Di Mattia, C., Balestra, F., Sacchetti, G., Neri, L., Mastrocola, D., Pittia, P. 2015.** Physical and structural properties of extra-virgin olive oil based mayonnaise. Food Science and Technology, 764-770.

**Domingo, D. y López-Brea, M. 2003.** Plantas con acción antimicrobiana. Sociedad española de quimioterapia, 385-393.

**Domínguez, I. L. 2013.** Estabilidad de la oleorresina de chile habanero (*Capsicum chinense*) *microencapsulada en  $\beta$ -ciclodextrina*. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad Veracruzana.

**Dorantes, L., Colmeneroa, R., Hernández, H., Mota, L., Jaramillo, M. E., Fernández, E., Solano, C. 2000.** Inhibition of growth of some foodborne pathogenic

bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 57, 125–128.

**Dussault, D., Dang Vu, K., Lacroix, M. 2014.** In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham. *Meat Science*, 514–520.

**Embuscado, M. E. 2015.** Spices and herbs: Natural sources of antioxidants a mini review. *Journal of Functional Foods*.

**Eskin N. A. M., D. Robinson S. 2001.** Food shelf life stability: Chemical, biochemical and microbiological changes. CRC series in contemporary food Science. Boca Raton: CRC press.

**Fennema, 1985.**

**Fernández-Trujillo, J. P. 2007.** Extracción convencional de oleorresina de pimentón dulce y picante I. Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT).

**Frankel, E. N., Meyer, A. S. 2000.** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:1925-1941.

**González-Zamora, A., Sierra-Campos, E., Luna-Ortega, J. G., Pérez-Morales, R., Rodríguez-Ortiz, J. C., García-Hernández, J. L. 2013.** Characterization of different *Capsicum* varieties by evaluation of their capsaicinoids content by high performance liquid chromatography, determination of pungency and effect of high temperatura. *Molecules*, 18, 13471-13486; doi: 10.3390/molecules181113471.

**Guadarrama-Lezama, A. Y., Dorantes-Álvarez, L., Jaramillo-Flores, M. E., Pérez-Alonso, C., Niranjan, K., Gutiérrez-López, G. F., Alamilla-Beltrán, I. 2012.** Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 29-37.

**Harvell K. P., W. B. 1997.** The environment produces a significant effect on pungency of chili. . *Horticultural Science*, 32, 1292-1297.

**Henderson, D. E., Henderson, S. L. 1992.** Thermal decomposition of capsaicin: Interactions with oleic acid at high temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40, 2263-2268.

**Holley, R. A., Patel, D. 2005.** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 273-292.

**Hornero-Méndez, D. and Mínguez-Mosquera, M. I. 2001.** Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 49, 3584-3588

**IBPGR, 1983.** Genetics Resources of Capsicum: A global Plan Action. International Board for Plant Genetic Resources AGPG/IBPGR/82/12. Rome. Italy. 49 p.

**Johnson, C. D., Decoteau, D. R. 1996.** Nitrogen and potassium fertility affects Jalapeño pepper plant growth, pod yield and pungency. . *HortScience*, 31, 1119-1123.

**Kishk, Y. F. M., Elsheshetawy, H. E. 2013.** Effect of ginger powder on the mayonnaise oxidative stability, rheological measurements and sensory characteristics. *Journals of Agricultural Science*, 213-220.

**Kuskoski, M., Asuero, M. A., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. 2005.** Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campinas*, 25(4):726-732, out.-dez.

**Liang, R., Xu, S., Shoemaker C. F., Li, Y., Zhong, F. and Huang, Q. 2012.** Physical and Antimicrobial Properties of Peppermint Oil Nanoemulsions.

**Martínez-Martínez, A. 2003.** Carotenoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

**Materska, M., Perucka, I. 2005.** Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum L.*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1750-1756.

**Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J. 2007.** Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla, España.

**Moigradean, D., Atena-Poiana, M., Gogoasa, I. 2012.** Quality characteristics and oxidative stability of coconut oil during storage. Banat`s University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine, Faculty of Food Processing Technology, Calea Aradului 119, Timisoara, RO 300645, Romania.

**Moreno-Escamilla, J. O., De la Rosa, L. A., López-Díaz, J. A., Rodrigo-García, J., Núñez-Gastélum, J. A., Alvarez-Parrilla, E. 2015.** Effect of the smoking process and firewood type in the phytochemical content and antioxidant capacity of red Jalapeño pepper during its transformation to chipotle pepper. Food Research International.

**Moya Moreno, M.C.M., Mendoza Olivares, D., Amezquita Lopez, F.J., Gimeno Adelantado, J.V. and Bosch Reig, F. 1999.** Determination of unsaturation grade and trans isomers generated during thermal oxidation of edible oils and fats by FTIR. Journal of Molecular Structure, 482 / 483, 551–556.

**Nadeem, M. Muhammad-Anjum, F., Rafiq-Khan, M., Saeed, M., Riaz, A., 2011.** Antioxidant Potential of Bell Pepper (*Capsicum annum L.*). A Review. Pakistan Journal of Food Sciences, 45-51.

**Navarro J. M., Flores, P., Garrido, C., Martinez, V. 2006.** Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. Food Chemistry.

**NMX-F-154-1987. 1987.** Determinación del índice de peróxido.

**NMX-FF-108-SCFI-2007. 2007.** Productos alimenticios -chile chipotle ó chilpotle (*Capsicum annum*)-. Especificaciones y métodos de prueba. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

**Nuez F., O. R. Gil, J. Costa. 1996.** El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Madrid: Ediciones Mundi.Prensa.

**Omolo, M. A., Wong, Z. Z., Mergen, A. K., Hastings, J. C., Le, N. C., Reiland, H. A., Case, K. A. and Baumler D. J. 2014.** Antimicrobial Properties of Chili Peppers. *Infectious Diseases and Therapy*.

**Pérez-Gálvez, A. y Garrido-Fernández, J. 1997.** Termodegradación de carotenoides en el pimentón. Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa. Vol. 48. Fase. 5, 290-296

**Pérez-Rosales, L., Villanueva-Rodríguez, S. y Cosío-Ramírez, R. 2005.** El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *e-Gnosis* [online], Vol. 3, Art.10.

**Perucka, I., Oleszek, W. 2000.** Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum L.* by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section. *Food Chemistry* 71 287±291.

**Piedrahita, A. M., Peñaloza, J., Cogollo, A., Rojano, B. A. 2015.** Kinetic Study of the Oxidative Degradation of Choibá Oil (*Dipteryx oleifera* Benth.) with Addition of Rosemary Extract (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food and Nutrition Sciences*, 6, 466-479.

**Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001.** Antioxidants in food. Practical applications. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England.

**Ponce, A. G., Rouraa, S. I., del Valle, C. E., Moreiraa, M. R. 2008.** Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*. 49, 294–300.

**Restrepo Gallego, M. 2006.** Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.

**Reyes-Escogido, M. L., Gonzalez-Mondragon, E. G., Vazquez-Tzompantzi, E. 2011.** Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules* 16, 1253-1270; doi: 10.3390/molecules16021253.

**Rodríguez-Amaya, D. B. 1999.** Carotenoides y preparación de alimentos: la retención de carotenoides, provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. Departamento de Ciencias de Alimentos Facultad de Ingeniería de Alimentos. Universidad Estatal de Campinas C.P. 6121, 13083-970 Campinas, SP., Brasil.

**Rodríguez-Sauceda, N. E. 2011.** Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Universidad Autónoma Indígena de México. pp. 153-170

**Rosa, A., Deiana, M., Casu, V., Paccagnini, S., Appendino, G., Ballero, M. and Dessí, M. A. 2002.** Antioxidant Activity of Capsinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 7396-7401

**Rosas-Gallo, A., López-Malo, A. 2011.** Actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo. *Temas selectos de ingeniería de alimentos.*, 41-50.

**Sánchez, C. 2006.** Antibióticos, ayer, hoy y mañana. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Piso 4. C1428EGA. Capital Federal. Argentina.

**Shahidi, F. and Zhong, Y. 2005.** Lipid Oxidation: Measurement Methods. En *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Fereidoon Shahidi.

**Singh, S., Jarret, R., Russo, V., Majetich, G., Shimkus, J., Bushway, R. and Perkins, B. 2009.** Determination of capsinoids by HPLC-DAD in capsicum spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3452-3457.

**Stewart, C., Kang, B. C., Liu, K., Mazourek, M., Moore, S. L., Young-Yoo, E., Byung-Dong, K., Paran, I. and Jahn, M. M. 2007.** Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany*.

**Sung, Y., Chang, Y. Y. and Ting, N. L. 2005.** Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Botanical Bulletin Academia Sínica*, 46, 35-42.

- Sun-Waterhouse, D., Thakorlal, J. and Zhou., J. 2011.** Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1575–1585.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., Cliver, D. O. 2010.** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 1199-1218.
- Tatt-Wai, W., Saad, B., Peng Lim, B. 2009.** Determination of Totox value in palm oleins using a FI-potentiometric analyzer. *Food Chemistry* 113 285–290.
- Taylor, T. M. 2015.** *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality.* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: Number 269.
- Topuz, A., Ozdemir, F. 2007.** Assessment of carotenoids, capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected peppers cultivars (*Capsicum annum L.*) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 596-602.
- Tuberoso, C. I. G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P. 2007.** Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food chemistry*, 1494–1501.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J. and Moezelaar, R. 2002.** The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1561–1568.
- Unlu, N. Z., Bonh, T., Clinton, S. K. and Schwartz, S. J. 2005.** Carotenoid Absorption from Salad and Salsa by Humans Is Enhanced by the Addition of Avocado or Avocado Oil. Department of Food Science and Technology and Internal Medicine, Columbus, OH 43210.
- Usman, M. G., Rafii, M. Y., Ismail, M. R., Malek, M. A., Latif, M. A. 2014.** Capsaicin and Dihydrocapsaicin Determination in Chili Pepper Genotypes Using Ultra-Fast Liquid Chromatography. *Molecules*, 19, 6474-6488; doi: 10.3390/molecules19056474.

**Vikram, V. B., Ramesh, M. N., Prapulla, S. G. 2005.** Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. *Journal of Food Engineering* 69 31–40.

**Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. 2007.** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71 230–235.

**Waizel-Bucay, J., Camacho-Morfín, R. 2011.** El género *Capsicum*. Una versión panorámica. *Revista de divulgación científica y tecnológica. Universidad de las Américas Puebla*. Año 16, Número 60, Abril-Junio, 2011.

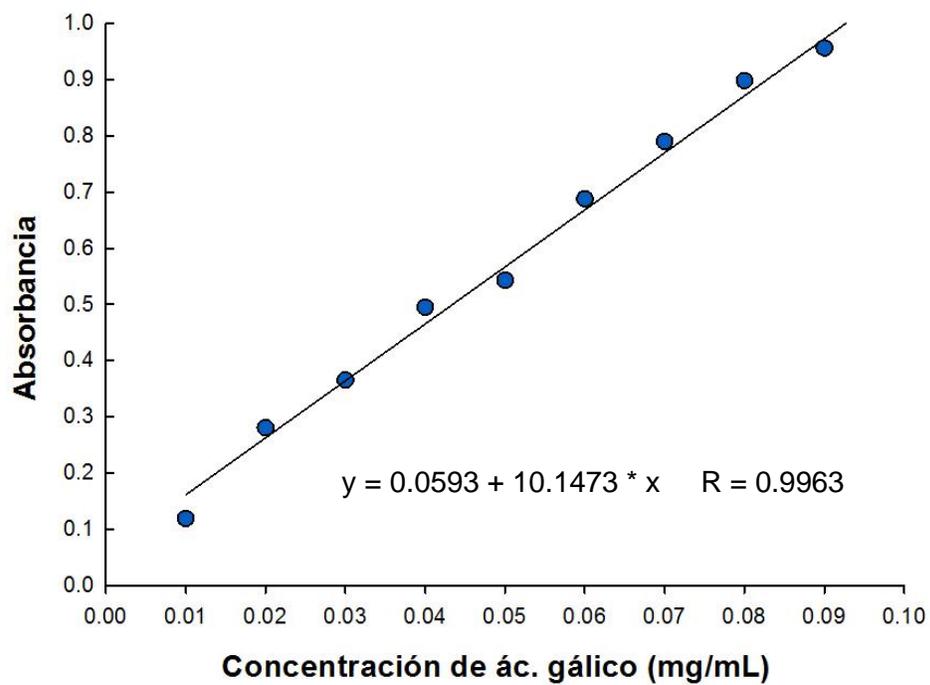
**Werman, M.J. and Neeman, I. 1986.** Oxidative stability of avocado oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, 355–360.

**Yanishlieva-Maslarova, N. V. 2001.** Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits herbs, spices and teas. In: *Antioxidants in Food*. Chapter 10. Edited by Pokorny, Yanishlieva and Gordon. Woodhead Publishing Limited.

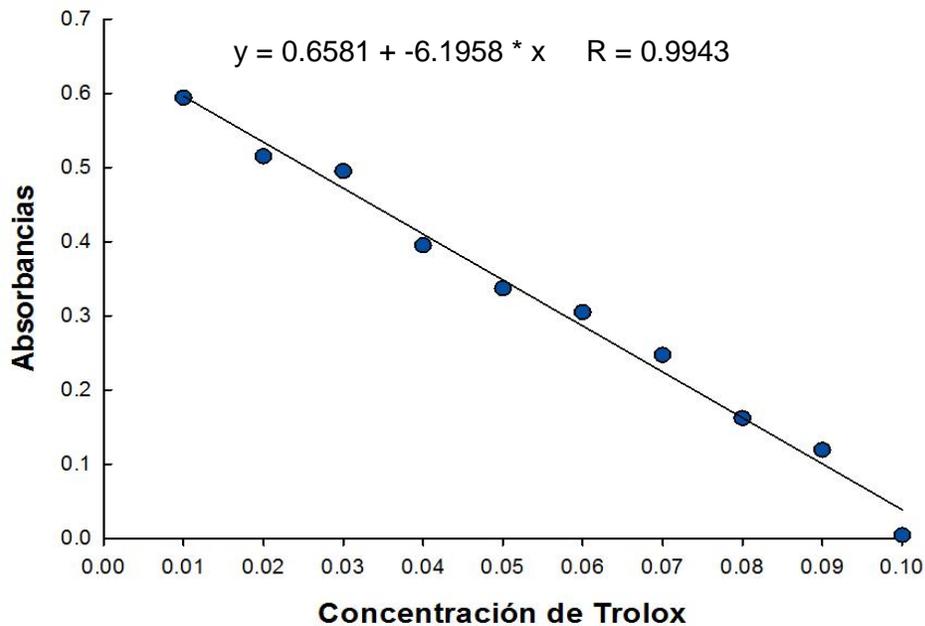
## 11. APÉNDICES.

### APÉNDICE A. Curvas de calibración.

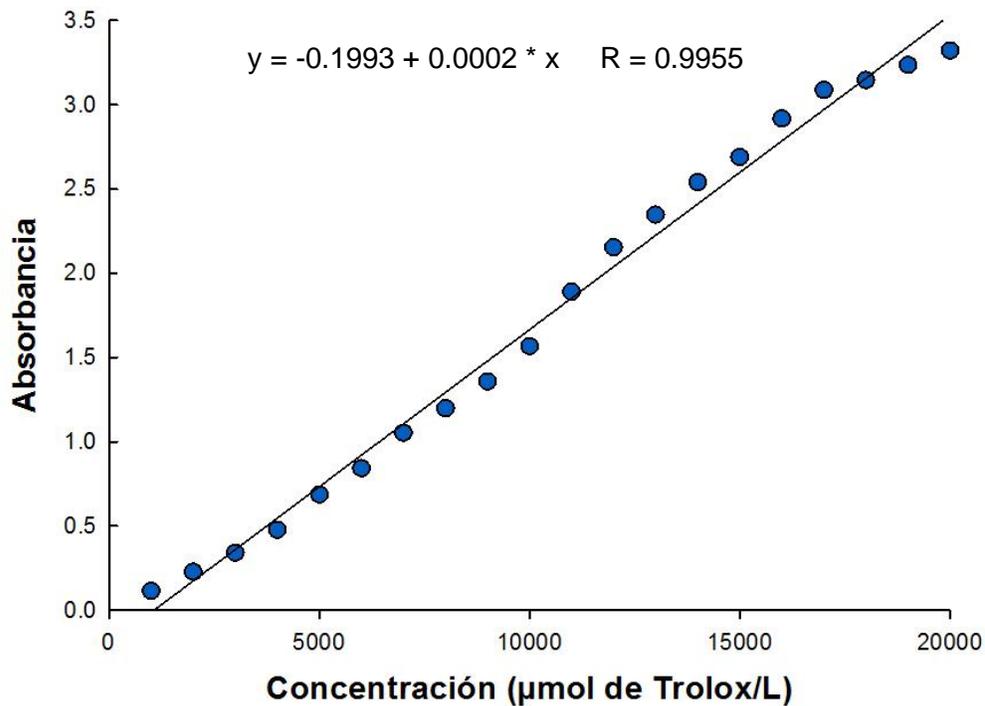
Polifenoles: Elaboración de curva estándar.



Actividad antioxidante: Elaboración de curva estándar por el método ABTS.



Actividad antioxidante: Elaboración de curva estándar por el método FRAP.



## APÉNDICE B. Propiedades fisicoquímicas durante el proceso de almacenamiento.

**Cuadro 23.** Formación de peróxidos durante el almacenamiento en ambas oleorresinas y aceite de aguacate.

Tiempo (semanas)	Temperatura (°C)	Concentración 1:2	Concentración 1:3	Aceite de aguacate
0	6	2.827 ± 0.257 <sup>b,A</sup>	2.514 ± 0.149 <sup>b,A</sup>	1.847 ± 0.094 <sup>a,A</sup>
	25	2.827 ± 0.257 <sup>b,A</sup>	2.514 ± 0.149 <sup>b,A</sup>	1.847 ± 0.094 <sup>a,A</sup>
	45	2.827 ± 0.257 <sup>b,A</sup>	2.514 ± 0.149 <sup>b,A</sup>	1.847 ± 0.094 <sup>a,A</sup>
1	6	2.892 ± 0.136 <sup>a,B</sup>	2.904 ± 0.136 <sup>a,A</sup>	2.787 ± 0.087 <sup>a,A</sup>
	25	2.492 ± 0.125 <sup>a,A</sup>	2.926 ± 0.339 <sup>a,A</sup>	3.161 ± 0.079 <sup>a,A</sup>
	45	5.055 ± 0.148 <sup>b,C</sup>	3.174 ± 0.067 <sup>a,A</sup>	5.113 ± 0.123 <sup>b,B</sup>
2	6	3.305 ± 0.117 <sup>a,A</sup>	3.124 ± 0.091 <sup>a,A</sup>	2.789 ± 0.089 <sup>a,A</sup>
	25	3.824 ± 0.074 <sup>a,A</sup>	3.672 ± 0.164 <sup>a,A</sup>	3.718 ± 0.059 <sup>a,B</sup>
	45	7.919 ± 0.122 <sup>ab,B</sup>	7.479 ± 0.014 <sup>a,B</sup>	8.454 ± 0.062 <sup>b,C</sup>
3	6	3.345 ± 0.104 <sup>a,A</sup>	3.258 ± 0.569 <sup>a,A</sup>	3.788 ± 0.052 <sup>a,A</sup>
	25	3.943 ± 0.159 <sup>a,B</sup>	4.705 ± 0.232 <sup>b,B</sup>	3.788 ± 0.135 <sup>a,B</sup>
	45	12.220 ± 0.275 <sup>a,C</sup>	13.446 ± 0.101 <sup>b,C</sup>	12.169 ± 0.121 <sup>a,C</sup>
4	6	3.397 ± 0.195 <sup>ab,A</sup>	3.565 ± 0.267 <sup>b,A</sup>	2.828 ± 0.056 <sup>a,A</sup>
	25	4.227 ± 0.091 <sup>a,B</sup>	4.702 ± 0.059 <sup>a,B</sup>	4.209 ± 0.061 <sup>a,B</sup>
	45	13.009 ± 0.178 <sup>a,C</sup>	14.882 ± 0.191 <sup>b,C</sup>	18.355 ± 0.245 <sup>c,C</sup>

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

**Cuadro 24** Índice de Totox a lo largo del almacenamiento.

Tiempo (semanas)	Temperatura (°C)	Concentración 1:2	Concentración 1:3	Aceite de aguacate
0	6	6.666 ± 0.599 <sup>b,A</sup>	6.008 ± 0.121 <sup>b,A</sup>	3.901 ± 0.137 <sup>a,A</sup>
	25	6.666 ± 0.599 <sup>b,A</sup>	6.008 ± 0.121 <sup>b,A</sup>	3.901 ± 0.137 <sup>a,A</sup>
	45	6.666 ± 0.599 <sup>b,A</sup>	6.008 ± 0.121 <sup>b,A</sup>	3.901 ± 0.137 <sup>a,A</sup>
1	6	7.747 ± 0.169 <sup>b,A</sup>	7.666 ± 0.454 <sup>b,A</sup>	5.855 ± 0.235 <sup>a,A</sup>
	25	8.138 ± 0.524 <sup>b,A</sup>	8.012 ± 0.763 <sup>ab,A</sup>	6.643 ± 0.058 <sup>a,A</sup>
	45	11.648 ± 0.251 <sup>b,B</sup>	8.365 ± 0.382 <sup>a,A</sup>	10.774 ± 0.273 <sup>b,B</sup>
2	6	7.762 ± 0.355 <sup>b,A</sup>	7.893 ± 0.555 <sup>b,A</sup>	5.898 ± 0.216 <sup>a,A</sup>
	25	9.057 ± 0.291 <sup>a,A</sup>	8.745 ± 0.224 <sup>a,A</sup>	8.059 ± 0.094 <sup>a,B</sup>
	45	17.804 ± 0.405 <sup>b,B</sup>	16.286 ± 1.058 <sup>a,B</sup>	17.828 ± 0.145 <sup>b,B</sup>
3	6	7.836 ± 0.279 <sup>b,A</sup>	8.107 ± 1.046 <sup>b,A</sup>	5.850 ± 0.135 <sup>a,A</sup>
	25	8.905 ± 0.299 <sup>a,A</sup>	10.956 ± 0.191 <sup>b,B</sup>	8.340 ± 0.293 <sup>a,B</sup>
	45	25.820 ± 0.425 <sup>b,B</sup>	28.273 ± 0.437 <sup>a,C</sup>	25.496 ± 0.136 <sup>b,C</sup>
4	6	8.245 ± 0.459 <sup>b,A</sup>	9.454 ± 0.505 <sup>b,A</sup>	6.137 ± 0.135 <sup>a,A</sup>
	25	9.463 ± 0.424 <sup>a,A</sup>	11.016 ± 0.476 <sup>b,B</sup>	9.404 ± 0.148 <sup>a,B</sup>
	45	27.134 ± 0.546 <sup>a,B</sup>	31.655 ± 0.311 <sup>b,C</sup>	38.013 ± 0.401 <sup>c,C</sup>

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

**Cuadro 25.** Degradación de carotenos totales en ambas concentraciones de oleorresinas.

Tiempo (semanas)	Temperatura (°C)	Concentración 1:2	Concentración 1:3
0	6	410.298 ± 4.473 <sup>a,A</sup>	310.211 ± 0.493 <sup>a,A</sup>
	25	410.298 ± 4.474 <sup>a,A</sup>	310.211 ± 0.494 <sup>a,A</sup>
	45	410.298 ± 4.475 <sup>a,A</sup>	310.211 ± 0.495 <sup>a,A</sup>
1	6	394.257 ± 2.532 <sup>b,B</sup>	298.229 ± 0.631 <sup>a,A</sup>
	25	388.746 ± 2.181 <sup>b,B</sup>	292.806 ± 2.009 <sup>a,A</sup>
	45	364.234 ± 2.356 <sup>b,A</sup>	291.393 ± 4.978 <sup>a,A</sup>
2	6	384.822 ± 3.049 <sup>b,B</sup>	293.649 ± 4.309 <sup>a,B</sup>
	25	378.271 ± 2.489 <sup>b,B</sup>	286.496 ± 0.982 <sup>a,AB</sup>
	45	365.056 ± 1.598 <sup>b,A</sup>	284.558 ± 1.355 <sup>a,A</sup>
3	6	373.974 ± 1.827 <sup>b,B</sup>	293.642 ± 1.024 <sup>a,C</sup>
	25	364.656 ± 0.557 <sup>b,A</sup>	284.854 ± 1.492 <sup>a,B</sup>
	45	363.012 ± 2.027 <sup>b,A</sup>	276.046 ± 0.437 <sup>a,A</sup>
4	6	373.325 ± 2.018 <sup>b,C</sup>	284.429 ± 1.005 <sup>a,C</sup>
	25	362.095 ± 2.055 <sup>b,B</sup>	275.046 ± 0.653 <sup>a,B</sup>
	45	351.205 ± 2.884 <sup>b,A</sup>	240.541 ± 1.343 <sup>a,A</sup>

\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

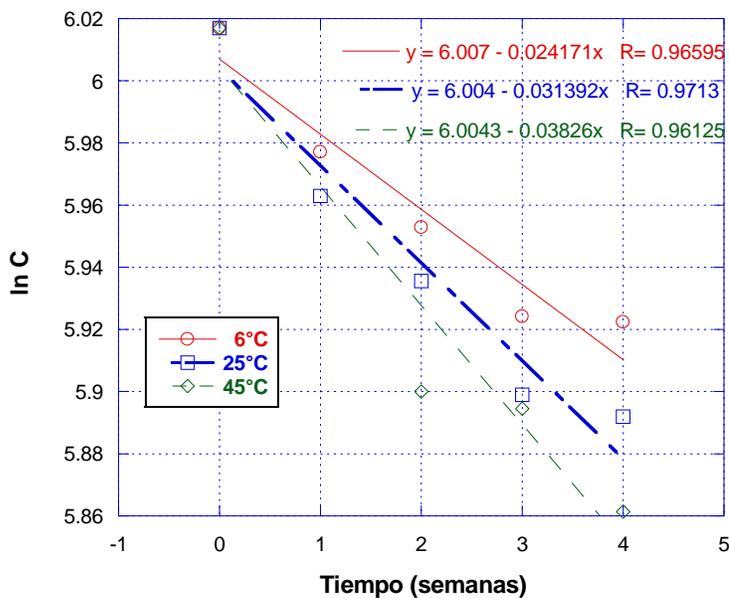
**Cuadro 26.** Degradación de compuestos polifenólicos al inicio y final del almacenamiento.

Tiempo	Temperatura (°C)	Concentración 1:2	Concentración 1:3	Aceite de aguacate
Inicio	TA	211.911 ± 2.971 <sup>c</sup>	162.473 ± 2.328 <sup>b</sup>	7.095 ± 2.147 <sup>a</sup>
Final	6	169.207 ± 2.258 <sup>c,C</sup>	131.431 ± 2.221 <sup>b,C</sup>	4.467 ± 0.752 <sup>a,A</sup>
	25	161.487 ± 2.431 <sup>c,B</sup>	92.504 ± 2.051 <sup>b,B</sup>	0 ± 0 <sup>a,A</sup>
	45	147.526 ± 2.743 <sup>c,A</sup>	71.808 ± 3.281 <sup>b,A</sup>	0 ± 0 <sup>a,A</sup>

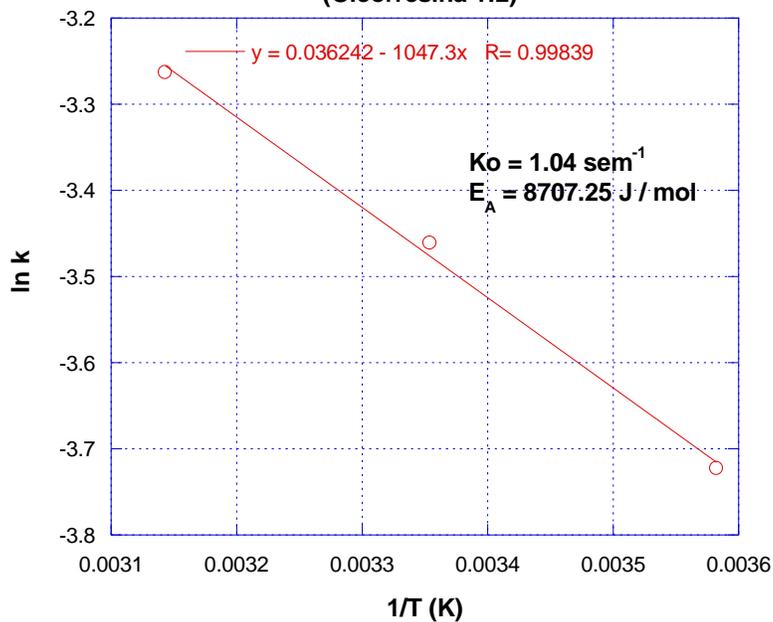
\*Las filas con letras minúsculas iguales y columnas con letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). \*TA: temperatura ambiente. Los datos representan el promedio de 3 réplicas o mediciones ± SD.

**APENDICE C. Gráficas del modelado matemático para la determinación de la velocidad de formación de peróxidos y degradación de carotenos en ambas concentraciones de oleorresinas.**

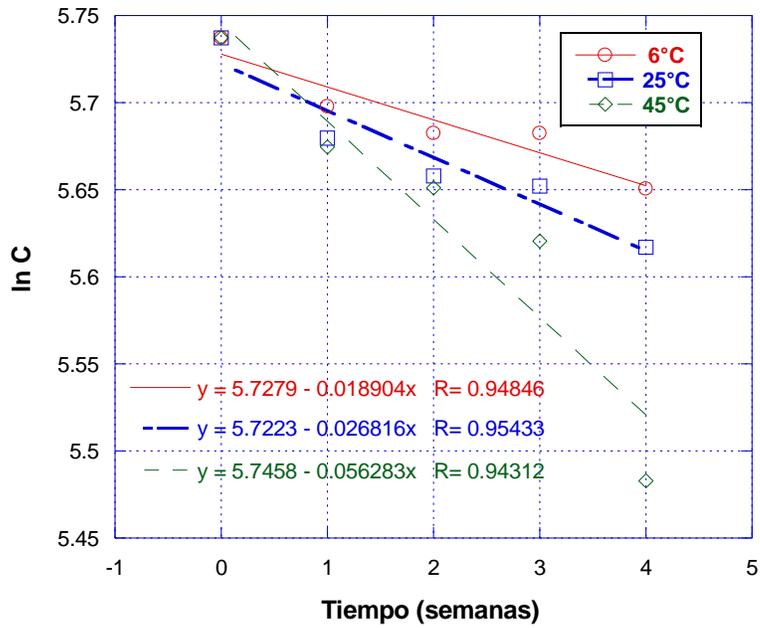
**Cinética de 1er. Orden para Carotenos  
(Oleorresina 1:2)**



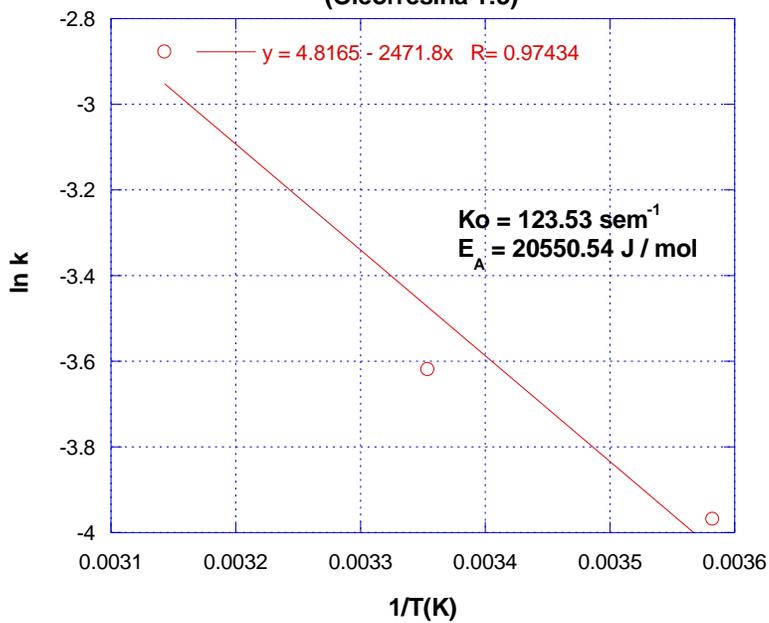
**Gráfica de correlación para determinar  
Energía de activación  
(Oleorresina 1:2)**



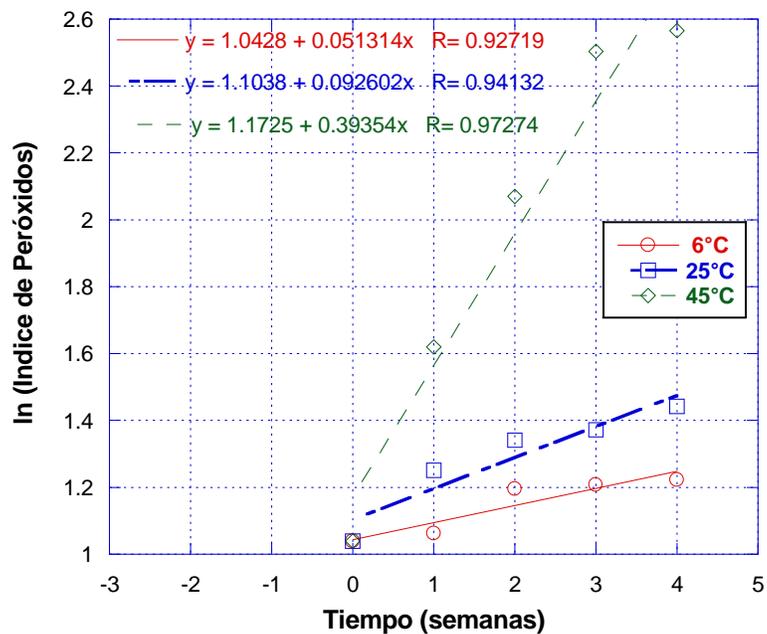
**Cinéticas de 1er Orden para Carotenos  
(Oleoresina 1:3)**



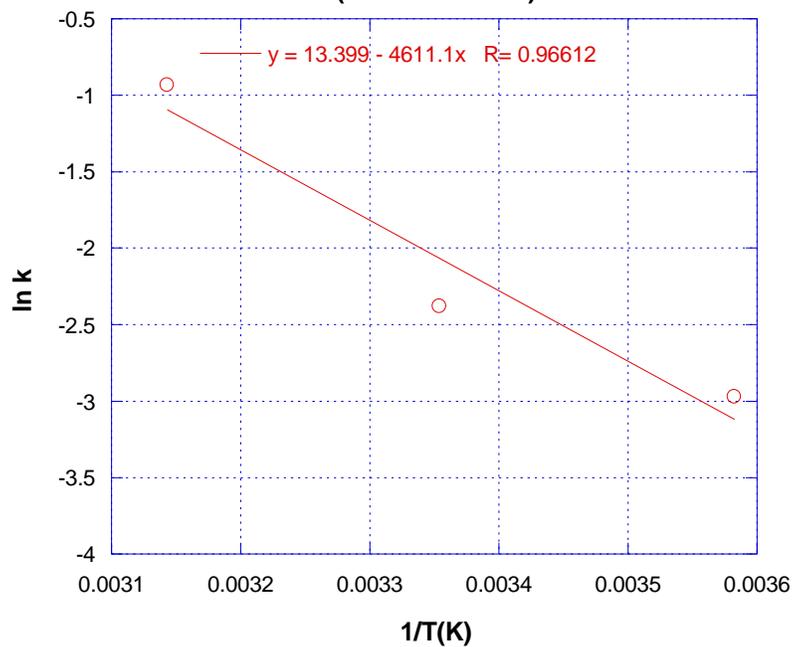
**Gráfica de correlación para determinar  
Energía de activación  
(Oleoresina 1:3)**



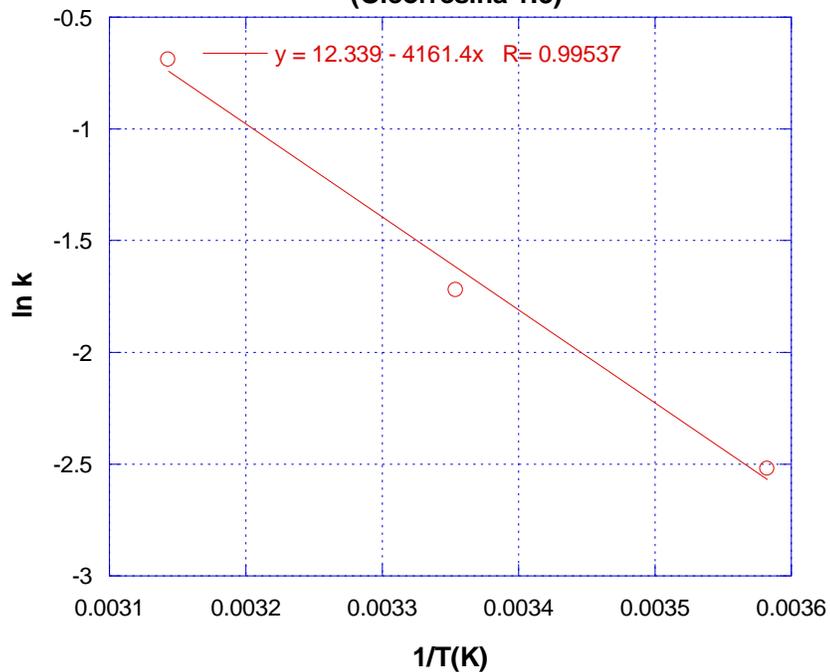
**Cinética de 1er. Orden para Índice de Peróxidos  
(Oleorresina 1:2)**



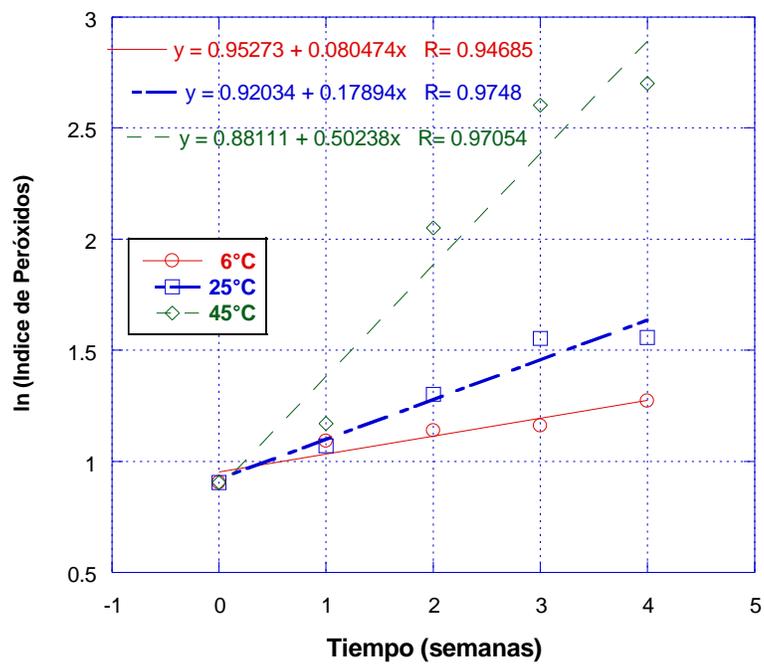
**Gráfica de correlación para determinar  
Energía de activación  
(Oleorresina 1:2)**



**Gráfica de correlación para determinar  
Energía de activación  
(Oleoresina 1:3)**



**Cinética de 1er. Orden para Índice de Peróxidos  
(Oleoresina 1:3)**



## APENDICE D. Congresos en el que este trabajo se presentó.





# Extienden la presente Constancia

a

Cerecedo Cruz L., Lalanne Melgar M. G. y Azuara Nieto E.

Por su destacada participación en el Trabajo Libre titulado :

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE  
OLEORRESINAS DE CHILE HABANERO Y PIMIENTO MORRÓN  
SOBRE DIFERENTES BACTERIAS PATÓGENAS.

Dentro del:

CVCCAL 8

Congreso Internacional

“Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los Alimentos  
en la Industria y Servicios de Alimentación”

Del 28 al 30 de Octubre de 2015, Mérida, Yucatán



M.C. Mirna A. Manzanilla Romero  
Directora del Instituto  
Tecnológico de Mérida

Dra. Marcela Zamudio Maya  
Directora Facultad de  
Ingeniería Química de la UADY

Dr. Víctor Manuel López Toledo  
Presidente del Comité  
Organizador, Mérida  
SOMEICCA AC

M. en C. Jorge Aguilar Valenzuela  
Presidente Nacional de  
SOMEICCA AC



Dirección  
General de  
Investigaciones



Instituto de  
Ciencias  
Básicas **50+**  
Años

Universidad Veracruzana

Otorgan la presente

# CONSTANCIA

A:

**Liesel Cerecedo Cruz**

Por su destacada participación como:

**POSTER**



en el Congreso Internacional de Ingeniería y Ciencias Químicas – CHEMSCIE, cuyo  
tema principal fue **“Avances de la Ingeniería y Ciencias Químicas:  
Su impacto en la Innovación Industrial y el Desarrollo Sustentable”**  
celebrado los días 3 y 4 de septiembre del 2015 en  
Boca del Río, Veracruz, México.

  
Dra. Carmen G. Blázquez Domínguez  
Directora General de Investigaciones

  
Dr. Josué Cortés Zárate  
Director del Instituto de Ciencias Básicas