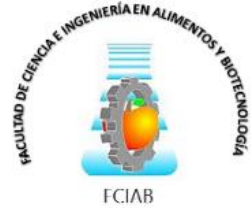




**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E**  
**INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**



---

**Tema:** Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de un extracto que contiene carotenoides obtenido a partir de *Capsicum annuum* en dos diferentes estados de madurez.

---

Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Abigail Micaela Chinchero Betancourt

**Tutor:** Lic. Danae Fernández Rivero, MsC

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre – 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Lic. Danae Fernández Rivero, MsC

### **CERTIFICA:**

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 25 de Julio del 2023

---

Lic. Danae Fernández Rivero, MsC

1757181209

**TUTORA**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Abigail Micaela Chinchero Betancourt, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Abigail Micaela Chinchero Betancourt

1727125500

**AUTORA**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de éste, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

Abigail Micaela Chinchero Betancourt

1727125500

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

---

Presidente de Tribunal

---

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 1803571585

---

Mg. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I. 1802726628

Ambato, 25 de Agosto del 2023

## **DEDICATORIA**

A Dios, por todas sus bendiciones y por darme la sabiduría y fortaleza necesaria para afrontar cada etapa de mi vida. “Porque el tiempo de Dios es perfecto”.

A mi querida mamá, Sara Betancourt. Por su amor incondicional, su apoyo constante y sus sacrificios para brindarme las mejores oportunidades. Nunca olvidaré sus noches en vela, sus esfuerzos y, sobre todo, su dedicación. Gracias, por ser mi fuente de inspiración, por creer en mí incluso cuando dudaba de mis capacidades y por alentarme a ser mejor cada día. Porque me enseñaste el valor del conocimiento y la sabiduría, la importancia del respeto y la honestidad, y la grandeza de los sueños.

A mi hermanito Angelito, el amor de mi vida y mi mejor regalo. Por ser mi motivación, mi fuente de alegría y por siempre sacarme una sonrisa.

A mis hermanitas Sarita y Rut, cómplices de risas, apoyo incondicional y cariño eterno. Por su paciencia en mis días difíciles, por ser mi soporte inquebrantable y por su compañía en todo este proceso.

A Danilo, un guía ejemplar en mi vida. Por abrirme su corazón y acogerme cómo una hija. Por su calidez y compromiso con nuestro bienestar y felicidad.

A mi papito Marcelo y mamita Mercy, mi pilar fundamental. Por sus enseñanzas y consejos. Por todo su amor y paciencia. Por incentivar me a seguir adelante con sus palabras de aliento. Les agradezco de corazón todo su esfuerzo.

A mis ñaños, Mauri y Gabito. Porque siempre me hicieron sentir especial y amada. Por su confianza y su apoyo. Por formar parte de cada etapa de mi vida y apoyarme en todo momento.

A Sami, Dani, Fiore y Benja por tantas aventuras y momentos compartidos. Por tanto amor y por siempre sacarme una sonrisa.

A mis amigos y todas aquellas personas que formaron parte de este lindo proceso.

## **AGRADECIMIENTO**

A todas aquellas personas que han sido parte fundamental en el camino hacia este sueño académico. Sin su apoyo incondicional y aliento constante, este logro no habría sido posible.

A mi familia por ser mi apoyo incondicional, mi soporte y motivación. Por siempre tener palabras de aliento y muchas veces ser mi luz en medio de tinieblas.

A mis queridos amigos, por hacer de mi carrera universitaria la aventura más inolvidable de mi vida. Por su cariño, apoyo y amistad. Sara, Leslie, Charlie y Esdras, gracias por siempre estar para mí, su presencia en mi vida ha sido muy significativa. Daniel, gracias por tu amistad incondicional, por ser apoyo constante, por tantas aventuras y risas. ¡A todos los llevo en el corazón!

A mi tutora, Lic. Danae Fernández, por guiarme adecuadamente durante el desarrollo de este proyecto. Por su paciencia y dedicación.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por recibirme en sus instalaciones y permitirme alcanzar este logro.

A mis docentes, por brindarme sus conocimientos en mi preparación profesional.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO .....	1
1.1 Antecedentes investigativos .....	1
1.1.1 <i>Capsicum annuum</i> .....	1
1.1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.1.2 Componentes bioactivos .....	2
1.1.2 Carotenoides .....	3
1.1.2.1 Características y propiedades físico – químicas.....	4
1.1.3 Estado de madurez.....	5
1.1.4 Escala de color CIELAB.....	6
1.1.5 Extracción de carotenoides .....	6
1.1.6 Estrés oxidativo y actividad antioxidante .....	7
1.1.6.1 Mecanismo de acción de los antioxidantes .....	9
1.1.6.2 Técnicas para evaluación de la actividad antioxidante .....	9
1.1.7 Actividad Antiinflamatoria .....	11
1.1.7.1 Sistema inmune y respuesta inflamatoria.....	11
1.1.7.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria .....	12
1.2 Objetivos.....	14
1.2.1 Objetivo General.....	14



1.2.2. Objetivos Específicos .....	14
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA .....	15
2.1 Materiales .....	15
2.1.1 Equipos de laboratorio .....	15
2.1.2 Material fungible.....	15
2.1.3 Reactivos.....	16
2.2 Métodos .....	17
2.2.1 Obtención de un extracto que contenga carotenoides.....	17
2.2.1.1 Recolección del material vegetal .....	17
2.2.1.2 Selección del material vegetal en base al estado de madurez .....	17
2.2.1.3 Obtención del material vegetal molido .....	18
2.2.1.4 Evaluación de factores para obtención de un extracto vegetal que contenga carotenoides .....	18
2.2.1.5 Cuantificación de carotenoides por espectrofotometría.....	19
2.2.2 Análisis estadístico .....	20
2.2.2.1 Hipótesis.....	22
Hipótesis Nula.....	22
Hipótesis Alternativa.....	22
2.2.2.2 Variables .....	22
Variable dependiente.....	22
Variables independientes .....	22
2.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de ají por método DPPH.....	23
2.2.3.1. Preparación del DPPH y Trolox.....	23
2.2.3.2. Evaluación de actividad antioxidante.....	23
2.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto de ají por ensayo de desnaturalización de la albúmina. ....	24

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
3.1 Análisis y discusión de los resultados .....	26
3.1.1 Obtención de un extracto que contiene carotenoides.....	26
3.1.1.1 Selección del material vegetal en base al estado de madurez .....	26
3.1.1.2 Evaluación de factores para obtención de un extracto vegetal que contiene carotenoides .....	28
3.1.1.3 Cuantificación de carotenoides por espectrofotometría.....	29
3.1.2 Evaluación de la actividad Antioxidante .....	32
3.1.3 Evaluación de actividad antiinflamatoria .....	35
3.2 Verificación de hipótesis .....	37
CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	38
4.1 Conclusiones.....	38
4.2 Recomendaciones .....	39
MATERIALES DE REFERENCIA .....	40
Referencias Bibliográficas.....	40
Anexos.....	48

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Composición química y nutricional de <i>C. annum</i> .....	3
<b>Tabla 2</b> Ensayos para determinación de actividad antioxidante .....	10
<b>Tabla 3</b> Diseño experimental A x B para proceso de extracción .....	21
<b>Tabla 4</b> Promedio de los valores obtenidos en escala CIELAB.....	27
<b>Tabla 5</b> Concentración total de carotenoides (mg/g). .....	30
<b>Tabla 6</b> Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox .....	33
<b>Tabla 7</b> Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de <i>C. annum</i> y del diclofenaco de sodio evaluada mediante el método de desnaturalización de proteínas .....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Capsicum annum</i> en dos diferentes estados de madurez.....	27
<b>Figura 2</b> Concentración de carotenoides totales en cada uno de los tratamientos. ...	31

## ÍNDICE DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1</b> Determinación de carotenoides totales .....	19
<b>Ecuación 2</b> Determinación de sólidos totales .....	20
<b>Ecuación 3</b> Determinación de la masa de sólidos extraídos .....	20
<b>Ecuación 4</b> Eficiencia de extracción .....	20
<b>Ecuación 5</b> Porcentaje de inhibición método DPPH .....	24
<b>Ecuación 6</b> Porcentaje de inhibición ensayo desnaturalización de la albúmina .....	25

## RESUMEN EJECUTIVO

El estudio de componentes bioactivos naturales, especialmente de los carotenoides resulta de gran interés en la comunidad científica debido a los efectos benéficos que tienen en la salud humana y en la prevención de enfermedades. Los carotenoides son pigmentos liposubles que en los frutos de *C. annuum.*, son responsables de la coloración específica dependiendo del estado de madurez. Existen pruebas epidemiológicas que demuestran su actividad antioxidante y antiinflamatoria, por lo que resultan competitivos frente a moléculas antioxidantes y antiinflamatorias de origen sintético.

Se obtuvo extractos etanólicos e hidroetanólicos de *Capsicum annuum.*, en dos estados de madurez distintos (100 por ciento maduro y un estado entre 40-60 por ciento de madurez), y con uso de solvente etanol a 3 diferentes concentraciones (70, 80 y 96 por ciento). El estado de madurez se determinó en base a la escala colorimétrica CIELAB. Se evaluó la actividad antioxidante mediante la medición del porcentaje de inhibición, utilizando el compuesto Trolox como referencia. Y, por último, se determinó la actividad antiinflamatoria mediante la medición del porcentaje de inhibición de la albúmina en concentraciones específicas.

Los resultados obtenidos señalan que a mayor grado de madurez existe mayor intensidad de color y a la vez mayor concentración de carotenoides. El mejor extracto se obtuvo con frutos en estado 100 por ciento maduro y con etanol a concentración de 96 por ciento, el contenido total fue de 225,18 miligramos de carotenoides por cada gramo de peso seco. A mayor concentración de carotenoides, mayor actividad antioxidante y antiinflamatoria.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, componentes bioactivos, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, escala de color CIELAB, carotenoides, extractos vegetales.

## ABSTRACT

The study of natural bioactive components, especially carotenoids, is of great interest in the scientific community due to the beneficial effects they have on human health and disease prevention. Carotenoids are liposoluble pigments that in *C. annuum*. fruits are responsible for the specific coloration depending on the stage of maturity. There is epidemiological evidence that demonstrates their antioxidant and anti-inflammatory activity, which is why they are competitive against antioxidant and anti-inflammatory molecules of synthetic origin.

Ethanollic and hydroethanollic extracts of *Capsicum annuum*., were obtained at two different stages of maturity (100 percent mature and a stage between 40-60 percent mature) and using ethanol solvent at 3 different concentrations (70, 80 and 96 percent). The stage of maturity was determined based on the CIELAB colorimetric scale. Antioxidant activity was evaluated by measuring the percentage of inhibition, using the Trolox compound as a reference. And finally, anti-inflammatory activity was determined by measuring the percentage inhibition of albumin at specific concentrations.

The results obtained indicate that the higher the degree of maturity, the greater the color intensity and the higher the concentration of carotenoids. The best extract was obtained with fruit at 100 percent maturity and with ethanol at a concentration of 96 percent, the total content was 225.18 milligrams of carotenoids per gram of dry weight. The higher the concentration of carotenoids, the higher the antioxidant and anti-inflammatory activity.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, bioactive components, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, CIELAB colorimetric scale, carotenoids, vegetal extracts.

## CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes investigativos

#### 1.1.1 *Capsicum annuum*

##### 1.1.1.1 Generalidades

*Capsicum annuum* o mejor conocido como “ají dulce” es una de las 5 especies principales del género *Capsicum*, y es nativo de las zonas tropicales y húmedas de América Central y del Sur (**Gamarra et al., 2020**). A nivel mundial se considera una especie importante económicamente en base a su gran demanda y consumo, por lo que durante los últimos años se registró una producción aproximada de 4,2 millones de toneladas de ají (**Villa & Ochoa, 2020**). En el caso específico del Ecuador, según **BPA (2021)**, se estima que, aproximadamente 200 hectáreas corresponden al cultivo de ají con rendimientos aproximados de 15000 kg/ha.

Se trata de una planta que puede alcanzar hasta 1 metro de altura, con hojas verdes y flores blancas. El fruto puede variar dependiendo de factores como el clima y origen, pero por lo general presenta un tamaño entre 12 -15 cm, forma elongada y aroma fuerte (**Mňahončáková et al., 2021**). *Capsicum annuum* se caracteriza por poseer una amplia variedad de metabolitos activos, los cuales aportan colores y sabores característicos y que, además, resultan beneficiosos para la salud humana (**Batiha et al., 2020**).

### 1.1.1.2 Componentes bioactivos

Los componentes bioactivos que contiene *C. annuum*, se producen durante el metabolismo y demuestran efectos protectores en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas (**Samtiya et al., 2021**). Se establece que estos compuestos juegan un papel importante y preventivo frente a ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular o mejor relacionada como enfermedad ocular generada por la edad (**García et al., 2018**).

Entre los componentes más importantes, destacan los carotenoides, vitaminas C y E, capsaicinoides (capsaicina) y compuestos fenólicos como es el caso de los flavonoides y ácidos fenólicos (**Villa & Ochoa, 2020**). De forma general, el contenido total de estos componentes depende de diversos factores, como son factores ambientales, factores de cultivo, genéticos y, finalmente factores fisiológicos como el estado de madurez (**Kádár et al., 2022**).

Los carotenoides mayoritarios en *C. annuum* son la capsantina y capsorrubina, los cuales aportan cerca del 60% de carotenoides totales; y además de ser mayoritarios son exclusivos para el género *Capsicum* (**Carranco et al., 2021**). El porcentaje restante lo componen otros tipos de carotenoides como es el caso del  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, luteína entre otros (**Metibemu & Ogungbe, 2022**). En la tabla 1 se reportan valores aproximados de diferentes componentes por cada 100 g de material vegetal fresco.

**Tabla 1***Composición química y nutricional de C. annuum*

<b>Componente</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
Agua	g	85,5 – 89
Proteínas	g	0,9 – 2,0
Grasas	g	0,7 – 0,8
Carbohidratos	g	8,8 – 12,4
Calcio	mg	21,5 - 58
Hierro	mg	0,9 – 1,3
Carotenoides	g	2,5 – 2,9
Riboflavina	mg	0,1 – 0,6
Niacina	mg	48 - 60
Ácido ascórbico	mg	70 - 300

*Nota:* Los valores corresponden a 100 g de muestra de frutos de *C. annuum* en peso fresco

**Fuente:** (Vallejo & Estrada, 2020)

En los últimos años se ha evidenciado gran interés en el estudio y cuantificación de estos componentes bioactivos, dado que, se han convertido en una excelente alternativa para reemplazar a los compuestos de origen sintético. Su amplia disponibilidad, así como sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas, han despertado gran interés en la comunidad científica y en la industria alimentaria (Akhtar et al., 2021). Esta iniciativa surge debido a los efectos nocivos que generan varias moléculas sintéticas a largo plazo (Kamiloglu et al., 2021). Por ejemplo, el consumo prolongado y excesivo de antioxidantes y antiinflamatorios comerciales induce reacciones cancerígenas y trastornos gastrointestinales (Sociales et al., 2021).

### 1.1.2 Carotenoides

Son pigmentos liposolubles orgánicos sintetizados por todos los organismos fotosintéticos. Desde el punto de vista químico, se los conoce como tetraterpenos



compuestos por 40 átomos de carbono (Carranco et al., 2021). Se encuentran de forma natural en diversas estructuras de plantas, en donde confieren una coloración específica dependiendo del estado de madurez del fruto (Villa & Ochoa, 2020). Pueden clasificarse en xantófilas y carotenos, los primeros contienen carbono, hidrógeno y átomos de oxígeno en sus anillos terminales; mientras que los últimos solo contienen carbono e hidrógeno (Meléndez, 2019).

### 1.1.2.1 Características y propiedades físico – químicas

Las características estructurales más notorias de los carotenoides son, el sistema de dobles enlaces conjugados que tienen y es conocido como cromóforo; así como la presencia de anillos en su estructura química. Estas características son las responsables de la absorción de luz en la región visible y en consecuencia de su capacidad colorativa, forma de la molécula y de su efectividad en procesos de transferencia de energía durante la fotosíntesis (Meléndez, 2019).

Las propiedades físicas y químicas de los carotenoides desempeñan un importante papel con respecto a su funcionalidad; gracias a estas propiedades, los carotenoides tienen múltiples funciones benéficas en la salud humana como es el caso de la actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria que se asocian con la prevención de enfermedades (Batiha et al., 2020). A continuación, se detallan algunas propiedades que son de carácter relevante al momento de llevar a cabo procesos de extracción y cuantificación de carotenoides.

**Solubilidad:** De forma general, la mayoría de los carotenoides son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. De forma más específica, se establece que los carotenoides presentan polaridades muy diversas, por lo que no todos serán igual de solubles en un solvente determinado (Mňahončáková et al., 2021). Las xantófilas son solubles en solventes polares como el etanol, metanol y acetona. En contraste, los carotenos son más solubles en solventes apolares o poco polares como por

ejemplo el hexano y el éter de petróleo. Sin embargo, también existen algunos carotenos que son solubles en solventes polares (**Meléndez, 2019**).

**Absorción de luz:** Los carotenoides absorben luz UV-visible debido a la presencia de su sistema de dobles enlaces (cromóforo). Normalmente existen tres máximos de absorción. Las longitudes de onda a las que aparecen dependen del sistema de doble enlaces que presenta el carotenoide, así como también del solvente empleado para medir el espectro (**Aparicio, 2017**). Independientemente del solvente empleado, los valores de longitud de onda aumentan a medida que lo hace el tamaño del cromóforo, es decir que existe mayor longitud de onda a mayor número de sistemas de dobles enlaces (**Meléndez, 2019**).

Los carotenoides en disolución obedecen a la ley de Lambert-Beer por lo que pueden ser cuantificados por método espectrofotométrico. En este sentido, existe relación entre la absorbancia y el coeficiente de absorción específico ( $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ ), para esto se recomienda medidas de absorbancia en un intervalo de 0,1 – 0,8 con longitud de onda aproximada a 450 nm. En dependencia del solvente de extracción, el coeficiente de absorción específico puede variar, por lo que no se considera un valor estándar (**Meléndez, 2019**).

### 1.1.3 Estado de madurez

Durante la maduración, el contenido de carotenoides incrementa y esto se evidencia en la coloración que presenta el fruto en las diferentes etapas de madurez (**Hassan et al., 2019**). En estado inmaduro, los frutos de *C. annuum* presentan coloración verde, mientras que en estado 100% maduro predomina la pigmentación roja (**García et al., 2018**); por otro lado, cuando se evidencian tonalidades entre amarillentas y anaranjadas se estima un estado de madurez entre 40-60%. Esta relación existente entre la maduración del ají y la coloración que presenta en postcosecha se confirma con escalas colorimétricas como la escala de CIELAB (**Paredes et al., 2019**).

De esta forma, se considera que existe relación directa entre el estado de madurez del fruto y la cantidad de carotenoides que contiene. En el estudio de **Paredes y sus colaboradores (2019)**, se evidencia que frutos completamente maduros tienen altos contenidos de carotenoides (193,12 mg/g), mientras que los frutos con grado de madurez entre 40-60% tienen menor contenido (75,50 mg/g). Sin embargo, estos valores no son definitivos, ya que la cantidad total de carotenoides puede variar dependiendo de la especie, condiciones climáticas y manejo postcosecha.

#### **1.1.4 Escala de color CIELAB**

CIELAB o espacio de color  $L^* a^* b^*$ , es el espacio de color más utilizado, ya que sus resultados coinciden con los de la percepción humana real. Los parámetros que representa corresponden a  $L^*$ , la luminosidad;  $a^*$ , el color rojo (valores positivos) o verdes (valores negativos); y  $b^*$ , color amarillo (valores positivos) o color azul (valores negativos) (**Meléndez, 2019**). Según plantea **Padrón (2019)**, la escala CIELAB es la más utilizada en el área de investigación y puede obtenerse a partir del uso de plataformas de programación, mediante el procesamiento de imágenes digitales.

Una plataforma muy versátil y útil para obtener escala de color CIELAB es el software Matlab. El procesamiento surge a partir de un algoritmo que reconoce imágenes digitales, las procesa y genera una segmentación y promedio de píxeles, con lo que se obtiene una escala RGB (espacio de color de cámaras digitales). Finalmente, con el uso de fórmulas los valores de RGB pueden ser transformados a diferentes escalas, en este caso la escala CIELAB (**Padrón, 2019**).

#### **1.1.5 Extracción de carotenoides**

Para el proceso de extracción de carotenoides se debe tener en cuenta factores como el tiempo de extracción, temperatura, y tipo de solvente. Debido a la gran diversidad

de polaridades que tienen los carotenoides, no existe un método estándar para la extracción de los mismos (**Carranco et al., 2021**). De forma general, varios protocolos constan de los mismos tres pasos: Primero, trituración de las muestras que permite desintegrar los tejidos y facilitar la liberación de los carotenoides. Seguidamente, la homogenización con solventes de extracción que puede efectuarse de distintas formas ya sea con agitadores mecánicos o con mortero y pistilo. Finalmente, el proceso de extracción, en dónde se obtiene el extracto de interés a partir de la interacción entre el solvente y el material vegetal (**Meléndez, 2019**).

Se considera que para extraer la mayor cantidad de carotenoides se use una mezcla de solventes, de tal modo, el éter de petróleo y el hexano suelen mezclarse con acetona o etanol, de la misma forma el diclorometano puede usarse en estas combinaciones (**Gamarra et al., 2020**). Sin embargo, la mezcla de solventes puede generar peróxidos lo que significa un posible riesgo ambiental, así como también puede ser nocivo para la salud (**Meléndez, 2019**). En este contexto, el etanol a diferentes concentraciones se considera como una opción rentable y óptima.

Existen estudios en donde se evidencia que con etanol se consiguió extraer una cantidad considerable de carotenoides para frutos del género *Capsicum*. Un ejemplo es el estudio de **Dong y sus colaboradores (2019)**, en dónde se utilizó etanol en un rango de concentraciones de 60-95% para la extracción de carotenoides de un fruto maduro (coloración roja). La relación de material vegetal con respecto al volumen del solvente fue de 1:40 y tiempos de extracción de 90-150 minutos. El rendimiento de extracción obtenido fue del 89,8%, lo que se consideró como una extracción eficiente.

### **1.1.6 Estrés oxidativo y actividad antioxidante**

Los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas inestables y altamente reactivas que se forman como resultado del metabolismo fisiológico

aeróbico normal (**Suleman, 2018**). El desequilibrio en la producción de estas moléculas genera estrés oxidativo en los sistemas vivos, induciendo un deterioro de las funciones celulares (**Carvajal, 2019**). Esto desencadena una serie de reacciones que causan alteraciones metabólicas, afecciones cardiovasculares, neurodegenerativas, entre otras, que en diversos casos resultan crónicas (**Rodrigues et al., 2019**).

El cuerpo humano consta de un sistema de defensa que produce compuestos antioxidantes los cuáles son capaces de eliminar los radicales libres; sin embargo, a medida que el organismo envejece la producción de estos compuestos disminuye, por lo cual es necesario un aporte dietético rico en antioxidantes (**Metibemu & Ogungbe, 2022**). Sin embargo, la mayor parte de suplementos dietéticos se encuentran conformados por antioxidantes sintéticos, y su ingesta a largo plazo resulta nociva para la salud (**Reinoso et al., 2019**).

Por tal razón, en los últimos años el consumo de vegetales se ha incrementado, debido a que dichos alimentos poseen diversos compuestos antioxidantes (**Urrialde et al., 2022**). De igual manera, la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve la ejecución de investigaciones relacionadas con la identificación compuestos bioactivos, que son los principales responsables de la capacidad antioxidante (**Araya et al., 2020**).

Las propiedades antioxidantes de los extractos de diferentes plantas son de gran interés, dado que existe una tendencia creciente a reemplazar los antioxidantes sintéticos por naturales (**Shah & Mir, 2022**). En diversas investigaciones, se ha identificado que las especies del género *Capsicum* son una potente alternativa antioxidante, puesto que son una fuente rica en compuestos bioactivos, como es el caso de los carotenoides (**Azlan et al., 2022**).

### **1.1.6.1 Mecanismo de acción de los antioxidantes**

Los antioxidantes actúan a través de varios mecanismos para ejercer su actividad protectora (**Tiwari, 2017**). Entre los más importantes destacan los mecanismos HAT (Transferencia de átomos de hidrógeno), SET (Transferencia de un solo electrón) y quelación de metales (**Santos et al., 2019**). En el mecanismo HAT, el antioxidante dona un átomo de hidrógeno a un radical libre, de forma que lo neutraliza. En el mecanismo SET, el antioxidante transfiere un electrón a un radical libre lo que le convierte en menos reactivo (**Hunyadi, 2019**). Finalmente, en la quelación de metales, los antioxidantes se unen a metales de transición que catalizan la formación de las ROS (**Wen et al., 2020**).

### **1.1.6.2 Técnicas para evaluación de la actividad antioxidante**

Los métodos para la evaluación de actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce un daño oxidativo, el mismo que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante (**Christodoulou et al., 2022**). Existen varias técnicas analíticas disponibles para la determinación de actividad antioxidante tanto en muestras de alimentos, así como en extractos vegetales.

Los diferentes métodos se clasifican en tres grupos principales, que son técnicas de espectrofotometría, cromatografía y electroquímica; algunos de estos métodos se detallan en la tabla 3 (**Sadeer et al., 2020**). Entre estos ensayos, los métodos espectrofotométricos son usados comúnmente debido a su sensibilidad, rapidez, bajo costo y reproducibilidad, entre estos resalta la técnica del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (**Munteanu & Apetrei, 2021**).

**Tabla 2***Ensayos para determinación de actividad antioxidante.*

<b>Ensayo</b>	<b>Principio del método</b>	<b>Determinación</b>
DPPH	Reacción antioxidante con un radical orgánico.	Colorimétrica
ORAC	Reacción antioxidante con radicales peróxido, inducida por 2,2'-azobis-2-amidino-propano (AAPH)	Pérdida de fluorescencia de la fluoresceína
CUPRAC	Reducción de Cu (II) a Cu (I) por antioxidantes	Colorimétrica
ABTS	Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico	Colorimétrica

**Nota:** DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo; ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno; CUPRAC: Poder antioxidante reductor cúprico; ABTS: ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico). **Fuente:** (Munteanu & Apetrei, 2021).

La técnica DPPH se fundamenta en el uso de un radical libre estable, que permite la identificación de la actividad antioxidante de diversos compuestos (Cidade et al., 2020). Este radical libre estable se caracteriza por su color púrpura intenso. El ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes para neutralizar el radical DPPH, lo que provoca un cambio de color de púrpura a amarillo pálido. (Bouabid et al., 2020).

Gracias a su facilidad en la medición, velocidad de reacción y estabilidad del radical, el método de DPPH es usado con frecuencia en la mayoría de los estudios. Un ejemplo es el reportado por Hamed y sus colaboradores (2019), en dónde se evaluó la actividad antioxidante de un extracto de *Capsicum* que contenía compuestos

bioactivos, para lo que se evidenció un elevado potencial antioxidante con un porcentaje de inhibición de radicales libres del 87%.

### **1.1.7 Actividad Antiinflamatoria**

La inflamación es un fenómeno fisiológico que se genera en respuesta a una lesión, infección o estrés (**Hou et al., 2020**). Generalmente, es una respuesta protectora natural, sin embargo, en etapas prolongadas desemboca en una inflamación crónica, dando lugar a afecciones como la diabetes, artritis, asma, trastornos digestivos, cáncer y enfermedades autoinmunes o trastornos neurodegenerativos (**Ginwala et al., 2019**).

La inflamación es tratada con fármacos esteroides y no esteroides, no obstante, el consumo prolongado produce efectos nocivos como la gastritis hemorrágica, hipertensión, inmunosupresión y úlcera digestiva (**YanHang & KeWu, 2019**). Por tal motivo, en los últimos años, el estudio de metabolitos provenientes de productos naturales, ha generado un enorme interés científico, especialmente en el ámbito farmacológico, en virtud de la capacidad que presentan ciertos compuestos para detener la evolución de enfermedades inducidas por procesos inflamatorios (**Aswad et al., 2018**). Cabe destacar, que los componentes bioactivos exhiben efectos terapéuticos prometedores sobre la inflamación tanto *in vitro* como *in vivo* (**Hou et al., 2020**).

#### **1.1.7.1 Sistema inmune y respuesta inflamatoria**

El sistema inmune al reconocer estructuras patogénicas altamente conservadas (patrones moleculares asociados a patógenos) o moléculas endógenas no infecciosas (patrones moleculares asociados a daños) mediante los receptores de reconocimiento de patógenos, genera una respuesta protectora, que resulta ser la inflamación (**Ma et al., 2018**). La activación de estos receptores da como resultado la producción de



distintas citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral, la interleucina y las quimiocinas (**Ginwala et al., 2019**).

Las vías inflamatorias, como la proteína quinasa activada por mitógeno, la quinasa, transductores de señales, y activadores de la transcripción apoyan en la respuesta inmune por medio de la formación de citoquinas inflamatorias, maduración de células dendríticas, proliferación y supervivencia celular, y diferenciación de células T (**Afonina et al., 2017**). De la misma manera, las citocinas y las quimiocinas se encargan de movilizar más células inmunitarias al sitio de la infección, como los neutrófilos circulantes, que destruyen agentes microbianos mediante la generación de interferón, proteasas y especies reactivas de oxígeno (**Ginwala et al., 2019**). Las citocinas también inducen la producción de ciclooxigenasa-2, una enzima que cataliza la producción de prostaglandinas, que son mediadores clave de la inflamación (**Gandhi et al., 2019**).

La eliminación del agente extraño y la reprogramación de las células efectoras para acabar de forma eficaz con la producción de mediadores inflamatorios conduce a la resolución de la inflamación y al retorno de la homeostasis (**Ginwala et al., 2019**).

#### **1.1.7.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria**

La evaluación de la actividad antiinflamatoria puede determinarse con ensayos *in vivo*, así como ensayos *in vitro*. Como ejemplo de los primeros, se menciona al “modelo de edema plantar inducido”. Este modelo se basa en la inducción de inflamación en las patas de los roedores, para luego medir el grado de inflamación a lo largo del tiempo y la eficiencia de un antiinflamatorio de interés. Aunque se han reportado resultados aceptables con este modelo, no se considera un método accesible (**Anokwah et al., 2022**).

Para lo cual, surge como alternativa la técnica de “desnaturalización de la albúmina”. Un ensayo *in vitro* que es rápido y accesible, y que consiste en la capacidad que tiene la albúmina para interactuar con metabolitos antiinflamatorios (**Dharmadeva et al., 2019**). Este proceso implica en exponer a la albúmina a condiciones que degradan su estructura y le hacen perder su función biológica. Una vez desnaturalizada la albúmina, se puede evaluar la capacidad de un metabolito para prevenir o reducir la desnaturalización. Esto se realiza mediante técnicas como la espectrofotometría, la evaluación de la actividad enzimática o la observación de cambios en las propiedades físicas y químicas de la albúmina desnaturalizada (**Chaiya et al., 2022**).

Por ejemplo, en el estudio reportado por **Kebbi (2015)**, se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante el ensayo de desnaturalización de proteínas. Se utilizaron extractos hidrometanólicos de hojas, semillas y frutos de *Capsicum chinense* y se comparó con diclofenáco sódico como medicamento estándar. Los resultados obtenidos indicaron que los extractos tenían efecto positivo contra la inflamación, presentando un porcentaje de inhibición del 59,38%.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de un extracto que contiene carotenoides obtenido a partir de *Capsicum annuum* en dos diferentes estados de madurez.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Obtener un extracto que contiene carotenoides a partir del fruto de *Capsicum annuum* mediante el uso del solvente etanol a 3 diferentes concentraciones.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto obtenido por el método de DPPH.
- Comprobar la actividad antiinflamatoria del extracto obtenido por el ensayo de desnaturalización de la albúmina.

## **CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA**

### **2.1 Materiales**

Los materiales que se emplearon en el desarrollo del presente trabajo de investigación se clasificaron en: equipos de laboratorio, material fungible y reactivos. Los mismos que se detallan a continuación:

#### **2.1.1 Equipos de laboratorio**

- Estufa
- Balanza analítica
- Minivórtex
- Plancha de calentamiento y agitación
- Espectrofotómetro
- Micropipetas (10-100  $\mu$ L; 100-1000  $\mu$ L; 20-200  $\mu$ L)
- Incubadora
- Baño térmico
- Centrífuga
- Refrigerador

#### **2.1.2 Material fungible**

- Espátulas
- Tubos Falcon (15 mL y 50 mL)
- Botellas ámbar (100 mL)
- Microtubos Eppendorf (1,5 mL y 2 mL)
- Puntas para micropipeta (10-100  $\mu$ L; 100-1000  $\mu$ L; 20-200  $\mu$ L)
- Tubos de ensayo con tapa

- Gradilla para tubos de ensayo
- Matraces Erlenmeyer (50 mL)
- Vasos de precipitación (25 mL y 50 mL)
- Probetas (10 mL y 25 mL)
- Balón de aforo (10 mL y 25 mL)
- Imanes de agitación
- Celdas o cubetas para espectrofotómetro
- Gradilla para tubos Falcon
- Gradilla para microtubos Falcon
- Embudos de vidrio
- Varilla de agitación
- Papel filtro
- Papel aluminio

### **2.1.3 Reactivos**

- Agua destilada
- Etanol 96%
- Metanol 80%
- Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
- 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Fosfato de disodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Diclofenaco de sodio ( $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NCl}_2\text{O}_2$ ) (fármaco)

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Obtención de un extracto que contenga carotenoides**

La obtención de un extracto vegetal que contenía carotenoides se basó en 5 pasos esenciales: Recolección del material vegetal; selección y clasificación de frutos en base a su grado de madurez; obtención de material vegetal molido; proceso de extracción, en dónde se evaluó los factores que influyen directamente en este proceso; y finalmente, cuantificación de carotenoides totales. Los mismos se detallan a continuación.

#### **2.2.1.1 Recolección del material vegetal**

Los frutos pertenecientes a *Capsicum annuum* (ají) fueron comprados en el mercado mayorista de la ciudad de Ambato. Para esto se escogió aquellos frutos que presentaron dos diferentes coloraciones, frutos con coloración roja completa y frutos con coloración entre amarilla y naranja (40 unidades en total). Todos los frutos fueron almacenados en una caja aislada y fueron transportados a los Laboratorios de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología para una posterior selección y clasificación.

#### **2.2.1.2 Selección del material vegetal en base al estado de madurez**

El proceso de selección estuvo basado en el estado de madurez conforme a la escala colorimétrica de CIELAB como lo planteó **Paredes y sus colaboradores (2019)**. El primer paso consistió en adquirir imágenes digitales con una cámara de un teléfono móvil, usando iluminación natural y una superficie de fondo blanco. Las imágenes fueron tomadas a una altura aproximada de 15 cm y guardadas en formato JPG en un ordenador.

Mediante la plataforma Matlab en versión gratuita, se empleó técnicas de procesamiento, segmentación por regiones y promediado de imágenes de forma individual, con lo que se obtuvo una representación en formato RGB. Luego, mediante el uso de fórmulas se transformó a escala CIELAB.

Se clasificó los frutos en dos grupos, para lo que se seleccionó como 100% maduros aquellos frutos que presentaron valores aproximados a  $L = 35,93 \pm 2,302$ ;  $a = 44,83 \pm 1,634$ ;  $b = 34,46 \pm 1,801$  (coloración roja). Por otro lado, los frutos que indicaron valores aproximados a  $L = 48,24 \pm 1,59$ ;  $a = 24,96 \pm 2,450$ ;  $b = 53,138 \pm 2,163$ ; (amarillo - naranja) fueron categorizados en el grupo correspondiente a 40-60% estado de madurez.

### **2.2.1.3 Obtención del material vegetal molido**

Los frutos seleccionados fueron lavados de forma superficial con agua corriente para de esta forma eliminar impurezas. Se retiró las semillas, el tallo y las venas. Posteriormente, se tomó como referencia la metodología propuesta por **Mňahončáková y sus colaboradores (2021)**, para lo que se secó en una estufa a  $55^{\circ}\text{C}$  por 30 horas. Transcurrido el tiempo de secado, las muestras se trituraron, se almacenaron en fundas Ziploc, y se registró su peso total.

### **2.2.1.4 Evaluación de factores para obtención de un extracto vegetal que contenga carotenoides**

Para este paso se tomó como referencia las metodologías propuestas en las investigaciones de **Gamarra y sus colaboradores (2020)**, así como de **Mňahončáková y sus colaboradores (2021)**, para lo cual se realizó la extracción con el uso del solvente etanol a tres diferentes concentraciones: 96%, 80% y 70%; y el material vegetal pulverizado en dos estados de madurez (100% y 40-60% maduro).

La experimentación se llevó a cabo por triplicado, por lo que, se obtuvo un total de 18 tratamientos.

Primero se homogenizó 0,45 g de muestra vegetal con 25 mL de solvente en un vórtex durante 10 minutos, en agitación constante y completa oscuridad. Segundo, se transfirió la mezcla obtenida a un matraz Erlenmeyer y se llevó a la plancha de agitación y calentamiento con las siguientes condiciones: 60°C, 400 rpm y 90 minutos. Tercero, se filtró y se recuperó el sobrenadante, se registró el porcentaje de humedad del filtrado y el volumen recuperado (mL) del extracto. Finalmente, los extractos fueron almacenados en tubos Falcon a 4°C en oscuridad total.

#### 2.2.1.5 Cuantificación de carotenoides por espectrofotometría

Se determinó la concentración total de carotenoides mediante el método espectrofotométrico como se detalla en la investigación de **Alcalá y sus colaboradores (2018)**. La lectura se realizó con la longitud de onda de 450 nm. Para el cálculo correspondiente se ocupó la Ecuación 1 obtenida del estudio de **Ventosa y sus colaboradores (2018)**.

$$\text{Carotenoides totales} \left( \frac{mg}{g} \right) = \frac{V \times A \times 1000}{(A_{1cm}^{1\%}) \times 100 \times M}$$

**Ecuación 1.** Determinación de carotenoides totales

**Donde:**

$V = \text{Volumen del extracto (mL)}$

$A = \text{Absorción a 450 nm}$

$(A_{1cm}^{1\%}) = \text{Coeficiente de absortividad (2500 g/100 mL * cm)}$

$M = \text{peso inicial de la muestra (g)}$



Posteriormente se realizó un análisis de los extractos obtenidos. Se determinó sólidos totales (Ecuación 2), la masa de sólidos extraídos (Ecuación 3) y finalmente la eficiencia de extracción (Ecuación 4).

$$\%SST = 100 - \% Humedad$$

**Ecuación 2.** *Determinación de sólidos totales*

En la Ecuación 3, *M* representa la masa del extracto obtenido (g).

$$MSE = \frac{\%SST * M}{100}$$

**Ecuación 3.** *Determinación de la masa de sólidos extraídos*

Por último, en la Ecuación 4, *MV* representa la masa del material vegetal empleado en el proceso de extracción (g).

$$\%Eficiencia\ extracción = \left(\frac{MSE}{MV}\right) * 100$$

**Ecuación 4.** *Eficiencia de extracción*

### 2.2.2 Análisis estadístico

Para este paso se utilizó un diseño experimental A×B con tres réplicas obteniendo así un total de 18 tratamientos. En la Tabla 3 se detallan los factores, el factor A corresponde al estado de madurez del fruto de *Capsicum annum*, con dos niveles, en este caso: estado 100% maduro con coloraciones rojas y estado de madurez 40-60% con coloraciones entre amarillentas y anaranjadas, basado en la escala colorimétrica de CIELAB. El factor B corresponde a la concentración del solvente etanol, con 3 niveles, que serían 96%, 80% v/v y 70% v/v.

**Tabla 3**

*Diseño experimental A x B para proceso de extracción*

<b>Factor A</b>	<b>Factor B</b>
a1: 100% maduro	b1: etanol 96%
a2: 40-60% madurez	b2: etanol – agua 80% v/v
	b3: etanol – agua 70% v/v

*Nota:* Factor A: Estado de madurez y Factor B: Concentración del solvente etanol. a1: nivel 1 del factor A (grado 100% maduro con coloración roja); y a2: nivel 2 (grado 40-60% madurez con coloración entre amarilla y anaranjada). b1: nivel 1 del factor B (concentración etanol 96%); b2: nivel 2 (concentración etanol 80%); y b3: nivel 3 (concentración etanol 70%).

Respuesta experimental: Concentración total de carotenoides.

Para el análisis estadístico de los datos experimentales se empleó Statgraphics Centurion 18 de StatPoint Technologies Inc., a través de un análisis de varianza ANOVA, con comparación de medias múltiples que se determina con la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95%.

Una vez realizado el proceso de cuantificación de carotenoides por espectrofotometría, se escogió el extracto que contenía mayor concentración de carotenoides. El extracto seleccionado pasó a la etapa de pruebas que se detallan en los puntos 2.2.2 y 2.2.3; los cuales corresponden a la evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria respectivamente.

### **2.2.2.1 Hipótesis**

#### **Hipótesis Nula**

La concentración de carotenoides presentes en el extracto obtenido de ají (*Capsicum annuum*) no varía dependiendo el estado de madurez del fruto.

#### **Hipótesis Alternativa**

La concentración de carotenoides presentes en el extracto obtenido de ají (*Capsicum annuum*) varía dependiendo el estado de madurez del fruto.

### **2.2.2.2 Variables**

#### **Variable dependiente**

-Concentración de carotenoides.

#### **Variables independientes**

-Concentración del solvente

-Estado de madurez del fruto

### **2.2.3 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto de ají por método DPPH**

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidralizo (DPPH). Para esto se tomó como referencia la investigación de **Irivibulkovit y sus colaboradores (2018)**.

#### **2.2.3.1. Preparación del DPPH y Trolox**

Primero, se preparó una solución stock de DPPH a una concentración 150  $\mu\text{M}$ , para lo cual se pesaron 0,0059 g del reactivo y se disolvieron en 100 mL de metanol al 80% (metanol-agua, 80:20) Luego, para la elaboración de la curva estándar, se pesaron 0,0125 g de Trolox y se disolvieron en 100 mL de metanol al 50% (metanol-agua, 50:50), alcanzando una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . A partir de la solución stock de Trolox se realizaron diversas diluciones (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500  $\mu\text{M}$ ).

#### **2.2.3.2. Evaluación de actividad antioxidante**

El ensayo se lo ejecutó en una placa de 96 pocillos, en la cual se colocó el blanco, control y la solución Trolox o el extracto vegetal, los mismos que se prepararon de la siguiente manera:

**Blanco:** 180  $\mu\text{l}$  de dilución (metanol-agua, 80:20) + 20  $\mu\text{l}$  agua destilada.

**Control:** 180  $\mu\text{l}$  de DPPH + 20  $\mu\text{l}$  agua destilada.

**Muestra:** 180  $\mu\text{l}$  de la solución DPPH + 20  $\mu\text{l}$  extracto o Trolox.

Al terminar la preparación de la placa se procedió a agitar durante un minuto y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este lapso se midió la placa en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515nm. Se realizaron 3 réplicas y se calculó el porcentaje de inhibición mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de inhibición} = \left[ 1 - \left( \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right) \right] \times 100$$

**Ecuación 5. Porcentaje de inhibición método DPPH**

**Donde:**

**A muestra:** absorbancia de la muestra

**A blanco:** absorbancia del blanco

**A control:** absorbancia del control

#### **2.2.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto de ají por ensayo de desnaturalización de la albúmina.**

Lo primero que se hizo fue obtener la albúmina de huevo, para esto se separó la yema de la clara, se recogió la clara en un recipiente y se agregó aproximadamente 100 mL de agua destilada. Se agitó de forma suave hasta que se formó un precipitado de clara. Posteriormente, se centrifugó la mezcla por 15 minutos a 4000 rpm y se recuperó el sobrenadante que corresponde a la ovoalbúmina (**Rajesh et al., 2019**).

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto de carotenoides se empleó el extracto que presentó mayor concentración de carotenoides y se llevó a cabo la metodología descrita por **Yesmin y sus colaboradores (2020)**, y **Kebbi (2015)**. Para esto, se mezcló 2 mL de extracto o diclofenaco sódico a diferentes concentraciones (1000, 500, 200, 100 µg/mL), con 2,8 mL de solución salina tamponada con fosfato (pH=6,4) y con 2 mL de albúmina de huevo. El blanco

consistió en la misma mezcla anterior, pero se ocupó agua destilada en lugar de extracto o diclofenaco sódico.

Se incubó a 37°C durante 15 minutos y transcurrido ese tiempo se midió absorbancia a 660 nm. Luego, se indujo la desnaturalización llevando la mezcla a baño de agua térmico a 70°C durante 10 minutos. Después de enfriar se volvió a medir la absorbancia a 660 nm. Cada experimento se realizó por triplicado y se registró el promedio. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%inhibición = \left(1 - \frac{OD_2 - OD_1}{OD_3 - OD_1}\right) \times 100$$

**Ecuación 6.** *Porcentaje de inhibición ensayo desnaturalización de la albúmina*

**Donde:**

*OD<sub>1</sub> = Absorbancia de muestra antes de la desnaturalización*

*OD<sub>2</sub> = Absorbancia muestra después de desnaturalización*

*OD<sub>3</sub> = Absorbancia del control después de desnaturalización*

## CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Análisis y discusión de los resultados

#### 3.1.1 Obtención de un extracto que contiene carotenoides

##### 3.1.1.1 Selección del material vegetal en base al estado de madurez

En la investigación científica, el color puede ser representado en base a la escala colorimétrica o espacio de color CIELAB. Los parámetros evaluados L\* (luminosidad); a\* (coloración que va de verde a rojo); y b\* (de azul a amarillo) permiten realizar una medición de color rápida que se relaciona directamente con el estado de madurez (**Silvar et al., 2022**).

En la Tabla 4 se presenta el promedio de los valores obtenidos en la escala de color CIELAB con relación al estado de madurez de los frutos de *Capsicum annuum*. De un total de 30 unidades, 5 fueron descartadas por presentar manchas negras, esto en base a que estas pigmentaciones influyen directamente en el análisis de imágenes, lo que significa una alteración de resultados y mala interpretación del grado de madurez (**Casquete et al., 2021**).

La clasificación se basó en los parámetros establecidos en la escala colorimétrica CIELAB. Por una parte, se seleccionó 11 unidades que correspondieron a un estado 100% maduro, con coloraciones completamente rojas (Grupo R); y de la misma forma, se seleccionó 11 frutos categorizados con un estado 40-60% de madurez, que variaban desde amarillas a anaranjadas (Grupo A). Los frutos restantes presentaron valores diferentes a los establecidos, por lo que no cumplieron con los parámetros de selección y no fueron tomados en cuenta.

**Tabla 4**

*Promedio de los valores obtenidos en escala CIELAB*

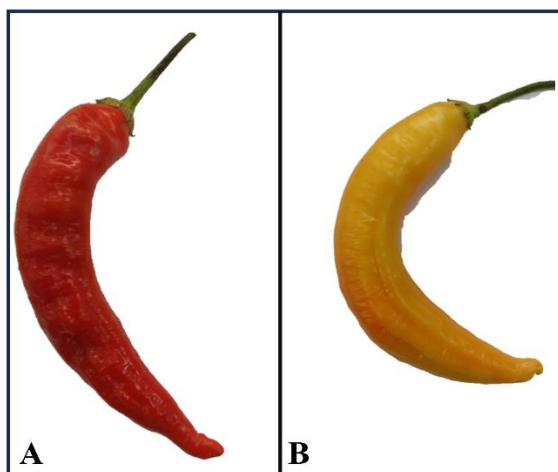
Escala de color CIELAB	Estado de madurez	
	Grupo A 40% a 60% de madurez	Grupo R 100% maduro
L*	48,3459 ± 1,1351	35,9729 ± 1,2362
a*	24,9795 ± 1,2399	44,9399 ± 0,8039
b*	53,0482 ± 1,0019	35,0298 ± 1,1532

*Nota:* Valores promedio de 11 muestras para cada estado de madurez ± desviación estándar. L\*=luminosidad; a\*, color rojo (valores positivos); y b\*, color amarillo (valores positivos).

En la figura 1 se observa como ejemplo la coloración que presentó un fruto clasificado como 100% maduro (A), así como la coloración presentada por un fruto con estado de madurez 40-60% (B). El resto de las fotos de los frutos seleccionados se presentan en la sección de anexos (Figura B1 y Figura B2).

**Figura 1**

*Capsicum annuum* en dos diferentes estados de madurez.



*Nota:* **A:** Fruto de *C. annuum* clasificado como 100% maduro (Grupo R). **B:** Fruto de *C. annuum* perteneciente al grupo de grado de madurez entre 40-60% (Grupo A).



A partir de los valores calculados, se puede evidenciar que, de forma general, a medida que incrementa el estado de madurez, existe un incremento del valor  $a^*$ , lo que significa un aumento del color rojo y ausencia del color verde. De la misma manera, se observó disminución del valor  $b^*$ , correspondiente a una disminución del color amarillo. Con respecto a la luminosidad, se evidencia que el grupo A presenta valores más altos comparados al grupo R.

Según lo plantea **Paredes y sus colaboradores (2019)**, la intensidad del color en los frutos de ají se debe principalmente a la biosíntesis de carotenoides, que inicia a partir de la conversión del cloroplasto en cromoplasto. Este proceso implica la degradación de la clorofila y activación de las vías metabólicas que permiten la síntesis y acumulación de los carotenoides (**Metibemu & Ogungbe, 2022**). Por lo que a medida que incrementa la maduración existe una disminución del color verde, y presencia de diferentes coloraciones que van desde amarillas y anaranjadas hasta alcanzar un color rojo intenso (**Meléndez, 2019**). De esta forma, se confirma la presencia de carotenoides tanto en el grupo A, así como en el grupo R, en base a la coloración observada.

Aunque el índice de color se relaciona directamente con la cantidad de carotenoides totales, **Carranco y sus colaboradores (2021)**, plantean que también existe relación con el tipo de carotenoide presente. En este contexto, un aumento en el color rojo se relaciona con la presencia de un alto contenido de los carotenoides capsantina y capsorrubina. Mientras que carotenoides como la zeaxantina, violaxantina y  $\beta$ -caroteno, son los responsables de coloraciones amarillas (**Carranco et al., 2021**).

### **3.1.1.2 Evaluación de factores para obtención de un extracto vegetal que contiene carotenoides**

El proceso de extracción se llevó a cabo con los frutos en dos diferentes estados de madurez, por una parte, frutos 100% maduros; y por otra, frutos entre un 40-60% de

madurez. Además, se empleó el solvente etanol a 3 diferentes concentraciones por lo que los extractos obtenidos fueron: 6 extractos etanólicos (obtenidos con Etanol puro a concentración del 96%) y 12 extractos hidroetanólicos (obtenidos con Etanol a concentraciones de 80 y 70%). Según lo plantea **Meléndez (2019)**, el etanol es un solvente orgánico comúnmente utilizado debido a su capacidad para disolver componentes bioactivos como es el caso de los carotenoides.

Por otro lado, se establece que existe relación directa entre el grado de madurez de un fruto y la cantidad total de carotenoides que contiene, a medida que el grado de madurez incrementa, aumenta la concentración de carotenoides (**Villa & Ochoa, 2020**).

### **3.1.1.3 Cuantificación de carotenoides por espectrofotometría**

En la tabla 5 se reporta el promedio de los valores obtenidos de concentración de carotenoides (mg/g), con su respectiva desviación estándar. Así como también el % de eficiencia de extracción de cada uno de los 6 tratamientos.

A partir del análisis de varianza ANOVA, se demostró que los factores analizados tienen efecto estadísticamente significativo sobre la concentración total de carotenoides extraídos (mg/g), con un nivel de confianza del 95%. Es decir que la concentración de carotenoides depende del estado de madurez de los frutos de *C. annuum*, así como también de la concentración del solvente empleado en la extracción.

**Tabla 5***Concentración total de carotenoides (mg/g).*

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración de carotenoides (mg/g)</b>	<b>% Eficiencia de extracción</b>
T1	225,120 <sup>a</sup> ± 0,069	78
T2	216,240 <sup>b</sup> ± 0,170	76
T3	187,830 <sup>c</sup> ± 0,470	66
T4	180,180 <sup>d</sup> ± 0,119	65
T5	99,210 <sup>e</sup> ± 0,069	58
T6	90,615 <sup>f</sup> ± 0,113	57

*Nota:* Los valores expuestos son resultados del promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. <sup>a, b, c, d, e, f, g</sup> Valores con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas entre la relación concentración solvente/estado de madurez sobre la concentración total de carotenoides, a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Concentración establecida en (mg/g) miligramo de carotenoides por cada gramo de peso seco. T: Tratamiento. T1: 100% madurez – etanol 96%; T2: 40-60% madurez – etanol 96%; T3: 100% madurez – etanol 80%; T4: 40-60% madurez – etanol 80%; T5: 100% madurez – etanol 70%; T6: 40-60% madurez – etanol 70%.

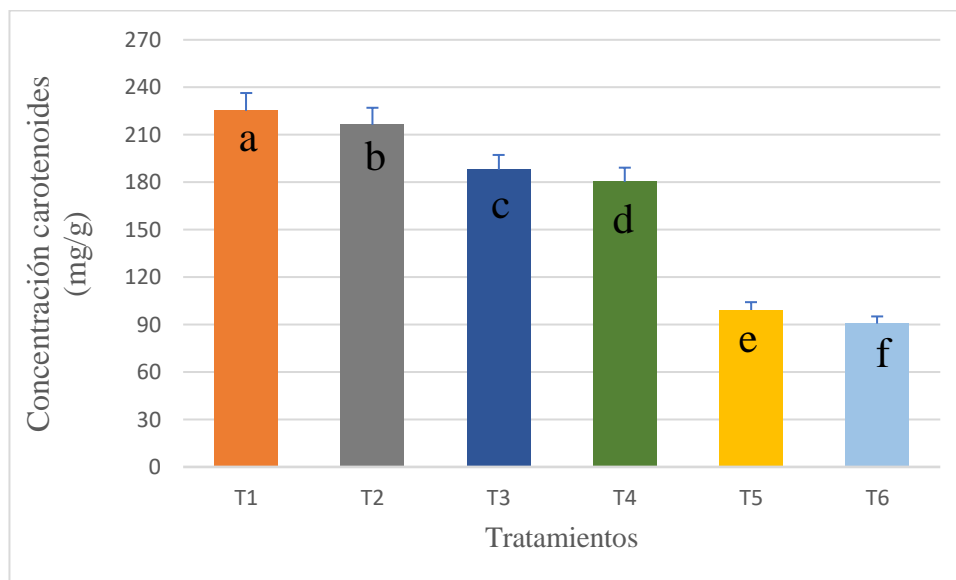
Se evidenció que a mayor concentración de solvente y a mayor grado de madurez, existe una mejor extracción de carotenoides lo que se representó en mayor concentración, y a la vez con un porcentaje de eficiencia de extracción elevado. En la figura 2 se aprecia de forma visual la diferencia entre cada uno de los tratamientos. Mientras que en el Anexo C (figura C2) se puede observar la interacción entre los factores con respecto a la concentración de carotenoides; en esa figura se confirma que la mejor interacción es frutos 100% maduros con solvente a concentración del 96%.

De la misma forma, la figura C3, que corresponde a la superficie de respuesta evidencia que, a mayor concentración de etanol y mayor grado de madurez, se obtiene extracto con mayor contenido de carotenoides. Finalmente, se establece que,

a partir de la prueba de Tukey, existió diferencia significativa entre los dos factores analizados.

**Figura 2**

*Concentración de carotenoides totales en cada uno de los tratamientos.*



**Nota:** T1: 100% madurez – etanol 96%; T2: 40-60% madurez – etanol 96%; T3: 100% madurez – etanol 80%; T4: 40-60% madurez – etanol 80%; T5: 100% madurez – etanol 70%; T6: 40-60% madurez – etanol 70%. a, b, c, d, e, f, g Valores con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas entre la relación concentración solvente/grado de madurez sobre la concentración total de carotenoides, a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ).

El mejor tratamiento corresponde al tratamiento 1 para lo que se obtuvo una concentración de 225,180 mg de carotenoides por cada gramo de peso seco. Este valor obtenido es superior a, 193, 13 mg/g (Paredes et al., 2019); 100,37 mg/g (Gamarra et al., 2020); 43,32 mg/g (Hassan et al., 2019), y 1203  $\mu$ g luteína/g, 2167  $\mu$ g  $\beta$ -caroteno/g, y 9667  $\mu$ g capsantina/g (Rodríguez et al., 2020); valores reportados de concentración de carotenoides para extractos vegetales de *Capsicum* en diferentes estudios.

Por lo tanto, se establece que una mayor concentración de solvente garantiza una mayor eficiencia en el proceso de extracción. Esto se debe a que el etanol en mayor

concentración favorece las rupturas de las membranas celulares lo que facilita la liberación de los compuestos liposubles (**Meléndez, 2019**). Además, los carotenoides son solubles en solventes orgánicos, y al incrementar la concentración, aumenta la capacidad de disolución (**Hassan et al., 2019**).

Con respecto al grado de madurez, se determinó que el contenido de carotenoides fue superior en el grupo R (100% maduro). Esto concuerda con lo reportado en el estudio de **Paredes y sus colaboradores (2019)**, en dónde se comparó el contenido de carotenoides totales en diferentes estados de madurez, para lo que se observó que el mejor resultado fue en los frutos 100% maduros.

Esto último se debe a que en estado 100% maduro, *Capsicum* presenta un alto contenido de capsantina y capsorrubina, carotenoides que confieren la coloración roja intensa y que son solubles en solventes polares (**Carranco et al., 2021**). A mayor concentración de solvente existe mayor polaridad, ya que existe mayor proporción de moléculas polares y como consecuencia mayor afinidad entre el solvente y los carotenoides (**Meléndez, 2019**).

### **3.1.2 Evaluación de la actividad Antioxidante**

La capacidad antioxidante se valoró mediante el ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Según plantean **Batiha y sus colaboradores (2020)**, la actividad antioxidante depende de la concentración de carotenoides. Por lo que, el porcentaje de inhibición aumenta conforme la concentración de carotenoides incrementa. En este contexto, no solo se evaluó la actividad antioxidante del extracto que presentó mayor cantidad de carotenoides, sino también de todos los demás tratamientos. Esto con la finalidad de poder identificar la relación existente entre la concentración de carotenoides y la capacidad de inhibir o eliminar los radicales DPPH. Estos resultados se evidencian en la Tabla 6.

**Tabla 6***Capacidad antioxidante en equivalentes Trolox*

Tratamientos	% Inhibición	μmol Equivalente Trolox/L
<b>T1</b>	85,522 <sup>a</sup> ± 0,154	468,355 <sup>a</sup> ± 0,832
<b>T2</b>	81,347 <sup>c</sup> ± 0,157	445,849 <sup>b</sup> ± 0,845
<b>T3</b>	83,711 <sup>b</sup> ± 0,107	458,596 <sup>c</sup> ± 0,707
<b>T4</b>	78,634 <sup>d</sup> ± 0,103	431,225 <sup>d</sup> ± 0,682
<b>T5</b>	68,274 <sup>e</sup> ± 0,124	375,374 <sup>e</sup> ± 0,818
<b>T6</b>	45,300 <sup>f</sup> ± 0,084	251,528 <sup>f</sup> ± 0,557

*Nota.* Los valores del porcentaje de inhibición de DPPH y μmol Equivalente Trolox/L son resultado del promedio de 3 repeticiones. T1: 100% madurez – etanol 96%; T2: 100% madurez – etanol 80%; T3: 100% madurez – etanol 70%; T4: 40-60% madurez – etanol 96%; T5: 40-60% madurez.

a, b, c, d, e, f, g Los valores con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativa entre las concentraciones y la relación solvente/grado de madurez sobre la actividad antioxidante ( $p < 0,05$ ).

A partir de este análisis extra, se pudo evidenciar que el primer tratamiento (T1), que se obtuvo a partir de frutos en estado 100% maduro y con etanol al 96%, demostró ser un notable inhibidor de radicales DPPH, presentando valores de  $85,522 \pm 0,154\%$  de inhibición, los cuales equivalen a  $468,355 \pm 0,832\%$  μmol de equivalentes Trolox, reactivo que fue utilizado como patrón estándar. Mientras que, el tratamiento 6, obtenido con frutos entre 40-60% madurez y etanol al 70%, resultó tener la menor capacidad antioxidante de todos los extractos analizados.

Dentro de este marco, **Flieger & Flieger, (2020)**, señalan que los antioxidantes reaccionan con el DPPH por diferentes mecanismos, como la transferencia de átomos de hidrógeno (TAH), transferencia de un solo electrón (TSE) y transferencia secuencial de electrones con pérdida de protones (TSEP). Los extractos al ser obtenidos con etanol reaccionan mediante los mecanismos TSE y TSEP, dado que estos predominan en un ambiente no acuoso, principalmente debido a la capacidad del solvente orgánico para crear puentes de hidrógeno con los antioxidantes (**Flieger & Flieger, 2020**).

El comportamiento de los distintos extractos resulta ser muy favorable con respecto a investigaciones similares, puesto que, **Choi y sus colaboradores, (2023)**, en su investigación obtuvieron valores desde  $158.74 \pm 2.26$  hasta  $217.63 \pm 2.48$   $\mu\text{mol}$  de equivalentes Trolox, conforme el grado de madurez aumentaba. De igual manera, **Chel y sus colaboradores, (2022)**, lograron un porcentaje de inhibición de  $49.55 \pm 0.16\%$  con un fruto de coloración naranja amarillenta, lo que corresponde aproximadamente a un 60 a 70% estado de madurez.

En ese mismo contexto, los resultados revelan que los extractos provenientes de *C. annuum* con un índice de madurez del 100% alcanzan mejores porcentajes de inhibición, esto se debe principalmente a que, en estado maduro la concentración de carotenoides es más alta y dado que, estos metabolitos son responsables de la capacidad antioxidante, se genera una mayor inhibición de radicales DPPH (**Dong et al., 2019**).

**Choi y sus colaboradores, (2023)**, confirman estos resultados, dado que en su respetiva investigación obtuvieron un resultado superior de actividad antioxidante con *C. annuum* completamente maduro. De la misma manera, se constata que a medida que la concentración del solvente aumenta, mayor es la extracción de compuestos bioactivos. **Ahmed y sus colaboradores., (2022)** aseveran que tanto el solvente como su concentración influyen directamente en el rendimiento de los compuestos bioactivos de interés, especialmente en métodos que corresponden a extracciones sólido-líquido, esto como resultado de la influencia que inducen las polaridades de los solventes.

Las afirmaciones anteriores sugieren que, la variabilidad en los resultados es consecuencia de los estados de madurez y el solvente empleado en la extracción, dado que los distintos tratamientos decrecieron dependiendo de esos factores (T1>T3>T2>T4>T5>T6). De la misma forma, los valores obtenidos podrían estar siendo afectados por factores externos como la época de recolección, procedencia, tratamiento y calidad de los frutos; esto en base a que estos factores son determinantes en el rendimiento y concentración de compuestos bioactivos como los carotenoides (**Choi et al., 2023**).

### 3.1.3 Evaluación de actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se determinó de forma *in vitro* usando el diclofenaco de sodio como fármaco estándar y el extracto que presentó mayor concentración de carotenoides, es decir el extracto correspondiente al tratamiento 1 (100% maduro con solvente etanol al 96%). Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina y se detallan en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico C. annuum y del diclofenaco de sodio evaluada mediante el método de desnaturalización de proteínas.*

Muestra	Concentración (µg/mL)			
	1000	500	200	100
<b>Diclofenaco</b>	96,469 <sup>a</sup> ± 0,08	70,699 <sup>b</sup> ± 0,64	53,453 <sup>c</sup> ± 0,98	31,897 <sup>d</sup> ± 0,84
<b>Extracto (T1)</b>	57,957 <sup>a</sup> ± 0,71	36,392 <sup>b</sup> ± 0,52	22,226 <sup>c</sup> ± 0,35	8,665 <sup>d</sup> ± 0,38

*Nota:* Los resultados son los promedios ± desviación estándar. <sup>a, b, c, d, e, f, g</sup> Valores con letras diferentes en la misma fila presentan diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones y la relación solvente/grado de madurez sobre la actividad antiinflamatoria, a un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ).

Con el análisis de varianza ANOVA y la prueba de Tukey, se demostró que a un nivel de confianza del 95% existe diferencia estadísticamente significativa entre el promedio del porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina, tanto para el fármaco estándar como para el extracto etanólico.

Los resultados obtenidos indican que a una concentración de 1000 µg/mL, el diclofenaco y el extracto etanólico alcanzaron un porcentaje elevado de inhibición de



la desnaturalización de la albúmina. El diclofenaco sódico es un fármaco de tipo no esteroideo (AINE), por lo que tiene la capacidad de actuar como un antiinflamatorio potente (**Anokwah et al., 2022**). De esta manera se evidencia su actividad frente a la desnaturalización de la albúmina, reportándose así un valor de 96,46%. Por otro lado, el extracto etanólico de *C. annuum* presentó un porcentaje de inhibición del 57,95%.

Se observa que a medida que incrementa la concentración del fármaco y del extracto, también incrementa el porcentaje de inhibición. Esto supone que el extracto puro posee mayor actividad antiinflamatoria a comparación de las diluciones del extracto. El extracto a mayor concentración contiene mayor cantidad de carotenoides, que son los compuestos bioactivos responsables de la actividad antiinflamatoria (**Cho et al., 2020**).

Los carotenoides actúan bloqueando dos vías importantes de señalización celular (factor nuclear kappa B y proteínas quinasas activadas por mitógenos). Ambas vías se encuentran involucradas en la producción de mediadores proinflamatorios y en la proliferación de células cancerosas, los cuales son los responsables de los procesos patológicos de la inflamación (**Chel et al., 2022**).

Los resultados se asemejan al estudio de **Kebbi (2015)**, en dónde se evidenció que extractos obtenidos a partir de *Capsicum* presentaron actividad antiinflamatoria *in vitro*. Se reportó que los extractos hidrometanólicos presentaron una inhibición contra la desnaturalización de proteínas del 59,38% en comparación con el mostrado por el control Diclofenaco (80%). No obstante, este porcentaje de inhibición ocurrió a una concentración de 400 µg/mL, mientras que en este estudio el porcentaje alcanzado de 57,95% fue a una concentración de 1000 µg/mL.

La diferencia de resultados podría estar relacionada con el tipo de material vegetal, ya que el contenido de carotenoides es diferente en el fruto, en las cáscara y en las semilla de *C. annuum*. Además, en el estudio de **Kebbi (2015)**, se reporta

condiciones climáticas específicas, por lo que se considera que la composición del suelo afectó al contenido total de carotenoides.

Finalmente, existen estudios en donde se evidencia que la actividad antioxidante se relaciona directamente con la actividad antiinflamatoria; esto en base a que el estrés oxidativo causa inflamación, por lo que un antioxidante también puede disminuir o prevenir la inflamación (**Pappalardo et al., 2021**). Esto concuerda con lo obtenido, ya que el extracto seleccionado presentó mayor concentración de carotenoides y a la vez mayor actividad antioxidante, y en todas las concentraciones se evidenció la actividad antiinflamatoria.

### **3.2 Verificación de hipótesis**

En base a los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, indicando que la concentración de carotenoides presentes en un extracto obtenido a partir de *Capsicum annum*, varía dependiendo del estado de madurez del fruto.

## CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

- Se evaluó la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los carotenoides presentes en extractos etanólicos e hidroetanólicos obtenidos a partir de *Capsicum annuum* en dos diferentes estados de madurez. Los resultados demuestran que tienen potencial para ser aplicados en la industria farmacéutica y alimentaria como posible reemplazo de moléculas sintéticas.
- La intensidad del color aumenta al mismo tiempo que incrementa la maduración por lo que, los frutos de *C. annuum* con grado de madurez entre 40-60%, presentaron coloración entre amarilla y anaranjada. Mientras que, en estado 100% maduro presentaron coloración roja intensa.
- El solvente etanol en concentración 96% permitió obtener extractos con mayor contenido de carotenoides, el mejor tratamiento fue el 1, el cual se obtuvo con frutos 100% maduros y presentó una concentración de 225,180 mg/g (miligramos de carotenoides por cada gramo de peso seco).
- Se evidenció que a mayor concentración de carotenoides existe mayor actividad antioxidante. El extracto etanólico obtenido con frutos 100% maduros y etanol al 96%, se categorizó como el mejor tratamiento ya que presentó un porcentaje de inhibición del 85,5% de radicales DPPH, equivalente a 468,3  $\mu\text{mol}$  de Trolox.
- Se comprobó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *C. annuum* mediante su capacidad para inhibir la desnaturalización de la albúmina de huevo, obteniéndose el mayor porcentaje de inhibición con una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (57,95%). El contenido de carotenoides totales se relaciona directamente con la actividad antioxidante y a la vez con la actividad antiinflamatoria.

## 4.2 Recomendaciones

- Evaluar otras técnicas para la medición de color y obtención de la escala colorimétrica CIELAB, que permitan la determinación del grado de madurez. Por ejemplo, el análisis de imágenes hiperespectrales con el uso de espectrómetros de imágenes.
- Se recomienda el empleo de una placa de 96 pocillos para el proceso de cuantificación de carotenoides por espectrofotometría con la finalidad de disminuir errores en la medición de absorbancia.
- Los carotenoides son componentes bioactivos sensibles a la luz y a los cambios extremos de temperatura. Por lo que es necesario llevar a cabo el proceso de extracción en oscuridad total y sin necesidad de congelarlos.
- Se recomienda experimentar con otros ensayos para la evaluación de la actividad antioxidante. Los métodos espectrofotométricos son una opción viable debido a su sensibilidad, rapidez, y accesibilidad.
- Desarrollar un ensayo *in vivo* para la evaluación de la actividad antiinflamatoria, como es el caso del “modelo de edemas plantares inducidos”; para de esta forma comparar los resultados obtenido en el presente estudio.
- Determinar la vida útil de los extractos obtenidos para que de esta forma se pueda conocer su estabilidad a lo largo del tiempo, y la durabilidad de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias correspondientes a los componentes bioactivos.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias Bibliográficas

- Afonina, I. S., Zhong, Z., Karin, M., & Beyaert, R. (2019). Limiting inflammation - The negative regulation of NF- $\kappa$ B and the NLRP3 inflammasome. *Nature Immunology*, 18(8), 861–869. <https://doi.org/10.1038/ni.3772>
- Ahmed, N., Dahmane, D., Hafitha, M., Soumeiya, M., & Soumeiya, K. (2022). Effect of extraction mode on phenolics contents and biological activities of two species of thyme extracts . E ffet dumode d ’ extraction sur les contenus phénoliques et les. *12*(2), 3204–3216.
- Akhtar, A., Asghar, W., & Khalid, N. (2021). Phytochemical constituents and biological properties of domesticated capsicum species: A review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 4(9), 201–225. <https://doi.org/10.31989/bchd.v4i9.837>
- Alcalá, C., de la Rosa, L., Pedraza, J., Medina, O., Meza, S., Medrano, A., Plenge, L., & Álvarez, E. (2018). Phytochemical characterization of an extract of *Capsicum annuum* cv. “Jalapeño” and its cytotoxic activity in 3T3-L1 cells. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(August), 28–36.
- Anokwah, D., Kwatia, E. A., Amponsah, I. K., Jibira, Y., Harley, B. K., Ameyaw, E. O., Obese, E., Biney, R. P., & Mensah, A. Y. (2022). Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant potential of the stem bark extract and some constituents of *Aidia genipiflora* (DC.) dandy (rubiaceae). *Heliyon*, 8(8), e10082. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10082>
- Aparicio, E. (2017). Técnicas colorimétricas Colorimetric techniques “La colorimetría es la ciencia que estudia la medida de los colores.” *Visión Criminológica Criminalista*, 1, 18–23.
- Araya, A., Luna, J., Ramírez, L., Leiva, A., Valdivia, F., Vega, S., & Rodríguez, M. (2020). Importancia del Conocimiento por la Población de las Propiedades

Antioxidantes en Plantas Nativas de Chile. *Contribuciones Científicas y Tecnológicas*, 45(1), 29–33. <https://doi.org/10.35588/cdicyt.v44i1.4628>

Aswad, M., Rayan, M., Abu-Lafi, S., Falah, M., Raiyn, J., Abdallah, Z., & Rayan, A. (2018). Nature is the best source of anti-inflammatory drugs: indexing natural products for their anti-inflammatory bioactivity. *Inflammation Research*, 67(1), 67–75. <https://doi.org/10.1007/S00011-017-1096-5/METRICS>

Azlan, A., Sultana, S., Huei, C. S., & Razman, M. R. (2022). Antioxidant, Anti-Obesity, Nutritional and Other Beneficial Effects of Different Chili Pepper: A Review. *Molecules*, 27(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules27030898>

Batiha, G., Alqahtani, A., Ojo, O. A., Shaheen, H. M., Wasef, L., Elzeiny, M., Ismail, M., Shalaby, M., Murata, T., Zaragoza-Bastida, A., Rivero-Perez, N., Beshbishy, A. M., Kasozi, K. I., Jeandet, P., & Hetta, H. F. (2020). Biological Properties, Bioactive Constituents, and Pharmacokinetics of Some *Capsicum spp.* and Capsaicinoids. *Int. J. Mol. Sci*, 21, 5179. <https://doi.org/10.3390/ijms21155179>

Bouabid, K., Lamchouri, F., Toufik, H., & Faouzi, M. E. A. (2020). Phytochemical investigation, in vitro and in vivo antioxidant properties of aqueous and organic extracts of toxic plant: *Atractylis gummifera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112640. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112640>

BPA. (2021). *Uso de buenas prácticas agrícolas para acceder a mercados de exportación*. Quito: Ecuador

Carranco, M. E., Calvo, M. de la concepción, & Pérez, F. (2021). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 61(3), 233–241.

Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1).

Casquete, R., Velazquez, R., Hernandez, A., de Guia Cordoba, M., Aranda, E., Bartolome, T., & Martin, A. (2021). Evaluation of the quality and shelf-life of cayenne (*Capsicum spp.*). *LWT*, 145, 111338. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.111338>

- Chaiya, P., Senarat, S., Phaechamud, T., & Narakornwit, W. (2022). In vitro anti-inflammatory activity using thermally inhibiting protein denaturation of egg albumin and antimicrobial activities of some organic solvents. *Materials Today: Proceedings*, 65, 2290–2295. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2022.04.916>
- Chel, L., Castañeda, G., López, M., Scampicchio, M., Morozova, K., Oney, J., Ferrentino, G., Acevedo, J. J., & Rodríguez, I. (2022). In Vivo Anti-Inflammatory Effect, Antioxidant Activity, and Polyphenolic Content of Extracts from *Capsicum chinense* By-Products. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27041323>
- Cho, S. Y., Kim, H. W., Lee, M. K., Kim, H. J., Kim, J. B., Choe, J. S., Lee, Y. M., & Jang, H. H. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory activities in relation to the flavonoids composition of pepper (*Capsicum annuum L.*). *Antioxidants*, 9(10), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antiox9100986>
- Choi, M. H., Kim, M. H., & Han, Y. S. (2023). Physicochemical properties and antioxidant activity of colored peppers (*Capsicum annuum L.*). *Food Science and Biotechnology*, 32(2), 209–219. <https://doi.org/10.1007/s10068-022-01177-x>
- Christodoulou, M. C., Orellana Palacios, J. C., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Moreno, A., & Hadidi, M. (2022). Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antiox11112213>
- Cidade, H., Rocha, V., Palmeira, A., Marques, C., Tiritan, M. E., Ferreira, H., Lobo, J. S., Almeida, I. F., Sousa, M. E., & Pinto, M. (2020). In silico and in vitro antioxidant and cytotoxicity evaluation of oxygenated xanthone derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2017.01.006>
- Dharmadeva, S., Sandaruwan, L., Prasadinie, C., & Kumarasinghe, N. (2019). In vitro anti-inflammatory activity of *Ficus racemosa L.* bark using albumin denaturation method. *AYU (An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda)*, 39(4), 239–242. [https://doi.org/doi:10.4103/ayu.AYU\\_27\\_18](https://doi.org/doi:10.4103/ayu.AYU_27_18)

- Dong, X., Li, X., Ding, L., Cui, F., Tang, Z., & Liu, Z. (2019). Stage extraction of capsaicinoids and red pigments from fresh red pepper (*Capsicum*) fruits with ethanol as solvent. *Lwt Ciencia y Tecnología de Los Alimentos*, 59(1), 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.051>
- Flieger, J., & Flieger, M. (2020). The [DPPH•/DPPH-H]-HPLC-DAD Method on Tracking the Antioxidant Activity of Pure Antioxidants and Goutweed (*Aegopodium podagraria L.*) Hydroalcoholic Extracts. *Molecules*, 25, 2–17.
- Gamarra, N. N., Velásquez, S. A., & Roque, B. L. (2020). Mejoramiento de la extracción de carotenoides y capsaicinoides del ají nativo (*Capsicum baccatum*), asistido con enzimas celulolíticas. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 55–60. <https://doi.org/10.15381/RPB.V27I1.17588>
- Gandhi, J., Khera, L., Gaur, N., Paul, C., & Kaul, R. (2019). Role of modulator of inflammation cyclooxygenase-2 in gammaherpesvirus mediated tumorigenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00538>
- Ginwala, R., Bhavsar, R., Chigbu, D. G. I., Jain, P., & Khan, Z. K. (2019). Potential Role of Flavonoids in Treating Chronic Inflammatory Diseases with a Special Focus on the Anti-Inflammatory Activity of Apigenin. *Antioxidants 2019, Vol. 8, Page 35*, 8(2), 35. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8020035>
- Hamed, M., Kalita, D., Bartolo, M. E., & Jayanty, S. S. (2019). Capsaicinoids, polyphenols and antioxidant activities of *Capsicum annuum*: Comparative study of the effect of ripening stage and cooking methods. *Antioxidants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/antiox8090364>
- Hassan, N. M., Yusof, N. A., Yahaya, A. F., Rozali, N. N. M., & Othman, R. (2019). Carotenoids of capsicum fruits: Pigment profile and health-promoting functional attributes. *Antioxidants*, 8(10), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox8100469>
- Hou, C., Chen, L., Yang, L., & Ji, X. (2020). An insight into anti-inflammatory effects of natural polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.315>



- Hunyadi, A. (2019). The mechanism(s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites. *Medicinal Research Reviews*, 39(6), 2505–2533. <https://doi.org/10.1002/MED.21592>
- Irivibulkovit, K., Ouanthavong, S., & Ameenoi, Y. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis Kitima. *Analitical Sciences*, 34(July), 795–800.
- Kádár, C. B., Păucean, A., Simon, E., Vodnar, D. C., Ranga, F., Rusu, I. E., Vişan, V. G., Man, S., Chiş, M. S., & Dreţcanu, G. (2022). Dynamics of Bioactive Compounds during Spontaneous Fermentation of Paste Obtained from *Capsicum* ssp.—Stage towards a Product with Technological Application. *Plants*, 11(8), 1–20. <https://doi.org/10.3390/plants11081080>
- Kamiloglu, S., Tomas, M., Ozdal, T., Yolci-Omeroglu, P., & Capanoglu, E. (2021). Bioactive component analysis. *Innovative Food Analysis*, 41–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819493-5.00002-9>
- Kebbi, U. (2015). In vitro anti-inflammatory activity of hydromethanolic seed, fruit and leave extracts of *Capsicum chinense* (red pepper). *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2(May), 57–65.
- Ma, K. C., Schenck, E. J., Pabon, M. A., & Choi, A. M. K. (2018). The role of danger signals in the pathogenesis and perpetuation of critical illness. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* (Vol. 197, Issue 3, pp. 300–309). American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1164/rccm.201612-2460PP>
- Meléndez, A. J. (2019). *Carotenoides en agroalimentación y salud*. Editorial Terracota. Mexico
- Metibemu, D. S., & Ogungbe, I. V. (2022). Carotenoids in Drug Discovery and Medicine: Pathways and Molecular Targets Implicated in Human Diseases. *Molecules*, 27(18), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules27186005>
- Mňahončáková, E., Vergun, O., Grygorieva, O., Sedláčková, V. H., Ivanišová, E., Šramková, K. F., Hružová, M., & Brindza, J. (2021). Evaluation of the

Antioxidant Potential of *Capsicum Annuum L.*, *C. Baccatum L.* and *C. Chinense Jacq.* Cultivars. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 20(2), 223–236. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2021.0941>

Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7). <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Padrón, C. (2019). Sistema de visión computarizada y herramientas de diseño gráfico para la obtención de imágenes de muestras de alimentos segmentadas y promediadas en coordenadas Cie-Lab. *Agronomía Costarricense*, 33(2), 283–301.

Pappalardo, I., Santarsiero, A., De Luca, M., Acquavia, M. A., Todisco, S., Caddeo, C., Bianco, G., Infantino, V., Martelli, G., & Vassallo, A. (2021). Exploiting the anti-inflammatory potential of white capsicum extract by the nanoformulation in phospholipid vesicles. *Antioxidants*, 10(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox10111683>

Paredes, A. C., Peche, J. Y., & Noemí, R. (2019). Index of carotenoids of bell pepper (*Capsicum annuum*) based on color measurement, using hyperspectral and digital images. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 531–539. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.10>

Rajesh, A., Doss, A., Tresina, P., & Mohan, V. (2019). Anti-Inflammatory Activity of Methanol Extract of *Niebuhrria Apetala* (Roth) Dunn – in Vitro Models. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 12(5), 278–281. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i5.32512>

Rodrigues, R. F. C., Lima, A., Melo, A. C. F. L., & Trindade, R. A. (2019). Physicochemical characterisation, bioactive compounds and in vitro antioxidant activities of commercial integral grape juices. *International Food Research Journal*, 26(2), 469–479.

Rodríguez, E., Sánchez, M., & Olmedilla, B. (2020). Assessment of carotenoid concentrations in red peppers (*Capsicum annuum*) under domestic refrigeration for three weeks as determined by HPLC-DAD. *Food Chemistry: X*, 6, 100092.

<https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2020.100092>

- Sadeer, N. B., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 1–39. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Samtiya, M., Aluko, R. E., Dhewa, T., & Moreno-Rojas, J. M. (2021). Potential Health Benefits of Plant Food-Derived Bioactive Components: An Overview. *Foods*, 10(4), 839. <https://doi.org/10.3390/FOODS10040839>
- Santos, N. F., Salas, R., Villanueva, C., & Hernández, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants*, 1. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.85270>
- Shah, M. A., & Mir, S. A. (2022). Plant extracts as food preservatives. *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, 127–141. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822475-5.00010-7>
- Silvar, C., Rocha, F., & Barata, A. M. (2022). Tracing Back the History of Pepper (*Capsicum annuum*) in the Iberian Peninsula from a Phenomics Point of View. *Plants*, 11(22), 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants11223075>
- Sociales, E., Astrid Carbajal-Sánchez, J., Ramírez-Durán, N., Gamboa-Angulo, M., Antonio Moreno-Pérez, P., para correspondencia, A., Antonio Moreno-Pérez Av Paseo Tollocan, P., Jesús Carranza, C., & de la Cruz, M. (2021). Estado de la información del consumo en México de antioxidantes sintéticos en alimentos ultra-procesados, basados en los productos de la canasta básica. *Estudios Sociales. Revista de Alimentación Contemporánea y Desarrollo Regional*, 31(58). <https://doi.org/10.24836/ES.V31I58.1143>
- Suleman, M. (2018). Antioxidants, its role in preventing free radicals and infectious diseases in human body. *Pure and Applied Biology*, 7(4), 380–388. <https://doi.org/10.19045/bspab.2018.700197>
- Tiwari, S. (2017). Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Reactive Oxygen Species in Plants: Boon Or Bane - Revisiting the Role of ROS*, 187–203. <https://doi.org/10.1002/9781119324928.CH10>

- Urrialde, R., Gómez, A., Pintos, B., Gómez, M., & Cifuentes, B. (2022). *Compuestos bioactivos de origen vegetal: desarrollo de nuevos alimentos*.
- Vallejo, F., & Estrada, E. (2020). El cultivo del pimentón. In *Producción de hortalizas de clima cálido* (Universida, pp. 107–108).
- Ventosa, M., Rodríguez, J., & Lidia, O. (2018). Determinación de los principales carotenoides de la guayaba (*Psidium guajava*). *Ciencia y Tecnología de Los Alimentos*, 18(1), 1–4.
- Villa, M. G., & Ochoa, N. (2020). Chili pepper carotenoids: Nutraceutical properties and mechanisms of action. *Molecules*, 25(23), 1–23. <https://doi.org/10.3390/molecules25235573>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308–322. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.09.019>
- YanHang, W., & KeWu, Z. (2019). Natural products as a crucial source of anti-inflammatory drugs: recent trends and advancements. *Traditional Medicine Research*, 257–268. <https://doi.org/10.12032/TMR20190831133>
- Yesmin, S., Arkajyoti, P., Tarannum, N., Atiqur, R., Sarkar, A., Mir, W., Emran, T. Bin, & Shafayet, S. (2020). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clinical Phytoscience*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40816-020-00207-7>

## Anexos

**Anexo A** *Escala de color CIELAB de muestras de Capsicum annum. en dos diferentes estados de madurez.*

**Tabla A1**

*Escala de color CIELAB C. annum en estado 100% maduro con coloración roja (Grupo R).*

Muestras	Escala de color CIELAB		
	L*	a*	b*
R1	35,9552	46,464	32,659
R2	38,232	43,6952	35,2513
R3	34,3824	45,1235	36,1118
R4	35,5842	44,5255	33,5697
R5	36,1710	45,5413	34,9449
R6	35,2784	45,4521	35,6731
R7	35,8808	44,5481	35,6939
R8	36,2037	44,5562	35,0964
R9	38,1118	44,8410	34,0412
R10	35,3064	43,9567	36,1118
R11	34,5962	45,6361	36,1752
<b>Promedio</b>	<b>35,9729</b>	<b>44,9399</b>	<b>35,0298</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>1,2362</b>	<b>0,8039</b>	<b>1,1532</b>

L\*=luminosidad; a\*, color rojo (valores positivos); y b\*, color amarillo (valores positivos).

**Tabla A2**

*Escala de color CIELAB muestras 40-60% estado de madurez con coloración entre amarilla y anaranjada (Grupo A).*

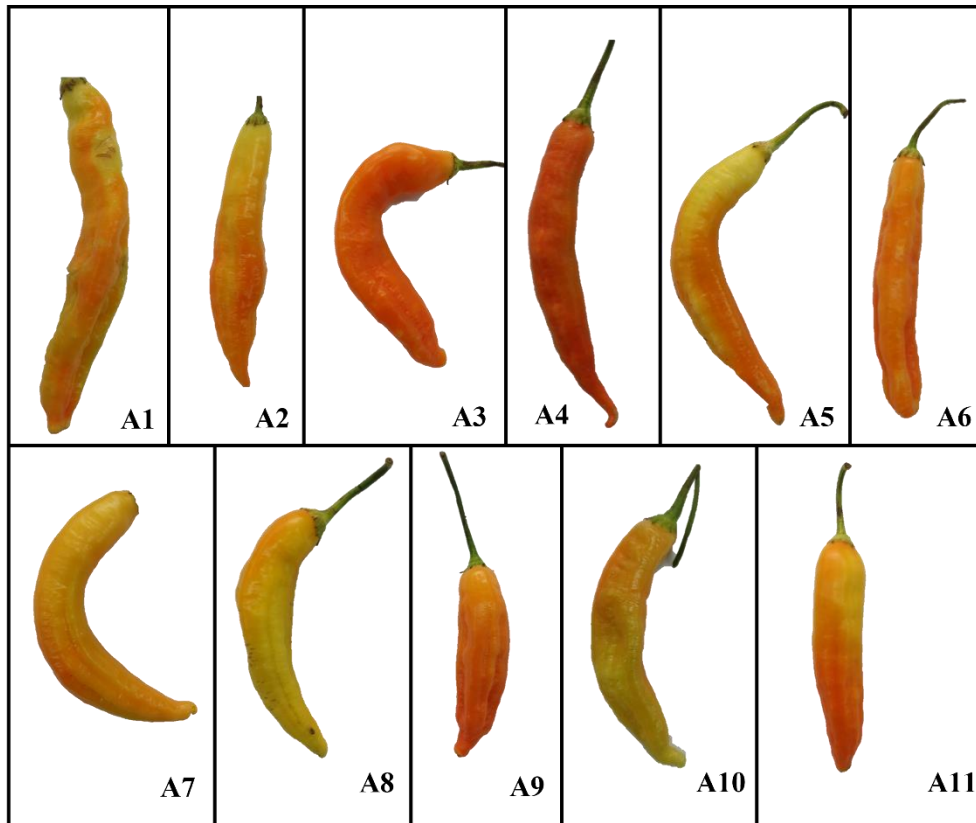
<b>Muestras</b>	<b>Escala de color CIELAB</b>		
	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
A1	49,9270	24,4937	54,1905
A2	47,2830	24,0157	52,9846
A3	49,5212	22,8473	52,1456
A4	49,5543	26,6928	53,3186
A5	48,5833	24,5380	54,5573
A6	48,5816	25,3715	54,1835
A7	48,5724	25,9053	53,0705
A8	48,9242	24,4264	53,2228
A9	46,7105	26,9609	52,1560
A10	47,0203	25,5349	52,3890
A11	47,1269	23,9882	51,3120
<b>Promedio</b>	<b>48,3459</b>	<b>24,9795</b>	<b>53,0482</b>
<b>Desviación estándar</b>	<b>1,1351</b>	<b>1,2399</b>	<b>1,0019</b>

**Nota:** . L\*=luminosidad; a\*, color rojo (valores positivos); y b\*, color amarillo (valores positivos).

**Anexo B** *Imágenes digitales obtenidas a partir de los Frutos de Capsicum annum. en dos diferentes estados de madurez.*

**Figura B1**

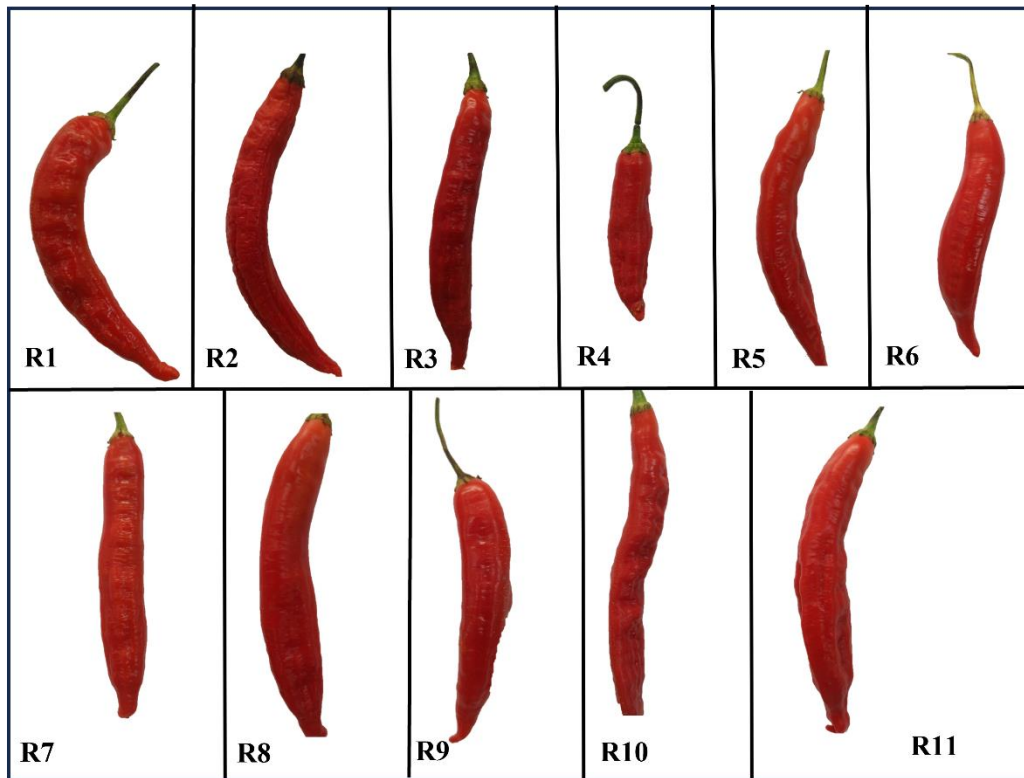
*Frutos de Capsicum annum clasificados en el grupo A.*



**Nota:** Fotografías obtenidas con iluminación natural, superficie en fondo blanco, altura de 15 cm y escala 1:2.

## Figura B2

*Frutos de Capsicum annuum clasificados en el grupo R.*



**Nota:** Fotografías obtenidas con iluminación natural, superficie en fondo blanco, altura de 15 cm y escala 1:2.



## Anexo C Cuantificación de carotenoides totales

**Tabla C1**

*Concentración de carotenoides (mg/g) de los 6 tratamientos*

Tratamientos	Concentración de carotenoides (mg/g)			Promedio
	R1	R2	R3	
T1	225,045	225,180	225,135	225,120 ± 0,069
T2	216,045	216,315	216,360	216,240 ± 0,170
T3	187,290	188,145	188,055	187,830 ± 0,470
T4	180,045	180,225	180,270	180,180 ± 0,119
T5	99,270	99,135	99,225	99,210 ± 0,069
T6	90,495	90,720	90,630	90,615 ± 0,113

*Nota:* Los valores expuestos son resultados del promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. Concentración establecida en (mg/g) miligramo de carotenoides por cada gramo peso seco. R: Réplica. T: Tratamiento. T1: 100% madurez – etanol 96%; T2: 40-60% madurez – etanol 96%; T3: 100% madurez – etanol 80%; T4: 40-60% madurez – etanol 80%; T5: 100% madurez – etanol 70%; T6: 40-60% madurez – etanol 70%.

**Tabla C2**

*Eficiencia de extracción de los 6 tratamientos*

Tratamientos	Volumen	% Humedad	% Sólidos Totales	Masa de sólidos extraído	% Eficiencia de extracción
	final extraído (mL)				
T1	21,67	11,19	88,81	0,35	77,69 ± 1,01
T2	21,90	10,46	89,54	0,34	75,81 ± 0,30
T3	21,73	19,22	80,78	0,30	66,12 ± 0,61
T4	21,83	19,28	80,72	0,29	64,57 ± 0,20
T5	21,70	27,65	72,35	0,26	57,88 ± 0,17
T6	21,77	28,01	71,99	0,26	56,95 ± 0,26

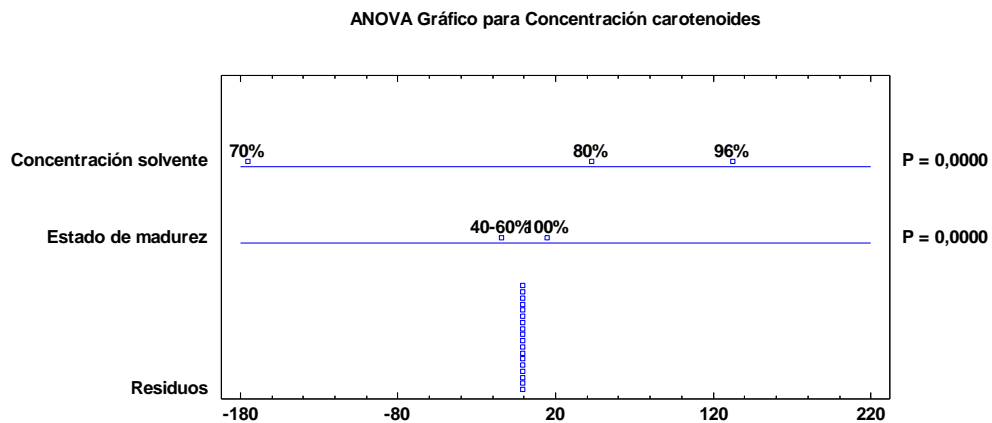
**Tabla C3***Análisis de Varianza para Concentración de carotenoides*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Estado de madurez	24720,9	1	24720,9	42186,69	0,0000
B: Concentración de etanol	108714,	2	54357,0	92761,43	0,0000
AB	15778,1	2	7889,05	13462,84	0,0000
Residuos	7,03185	12	0,585988		
Total	149220	17			

**Nota:** Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de carotenoides con un 95,0% de nivel de confianza.

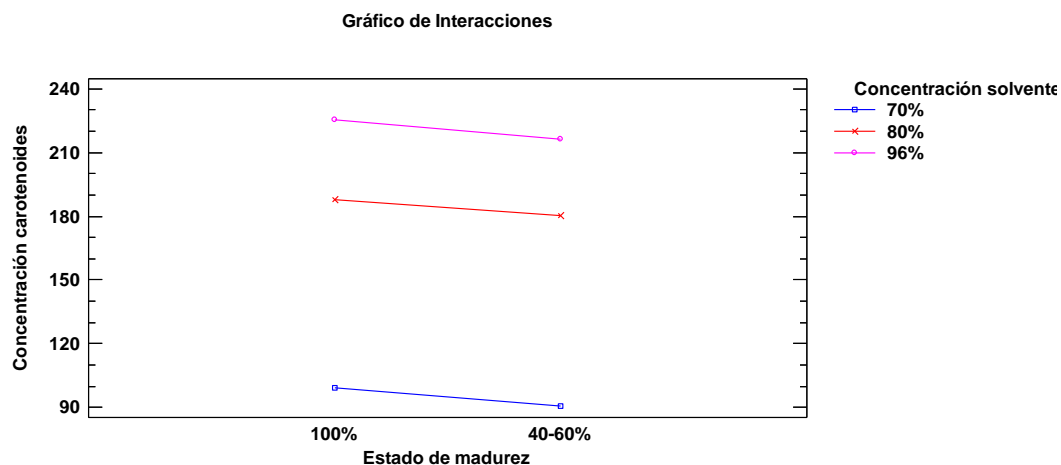
**Figura C1**

Gráfica ANOVA para concentración de carotenoides



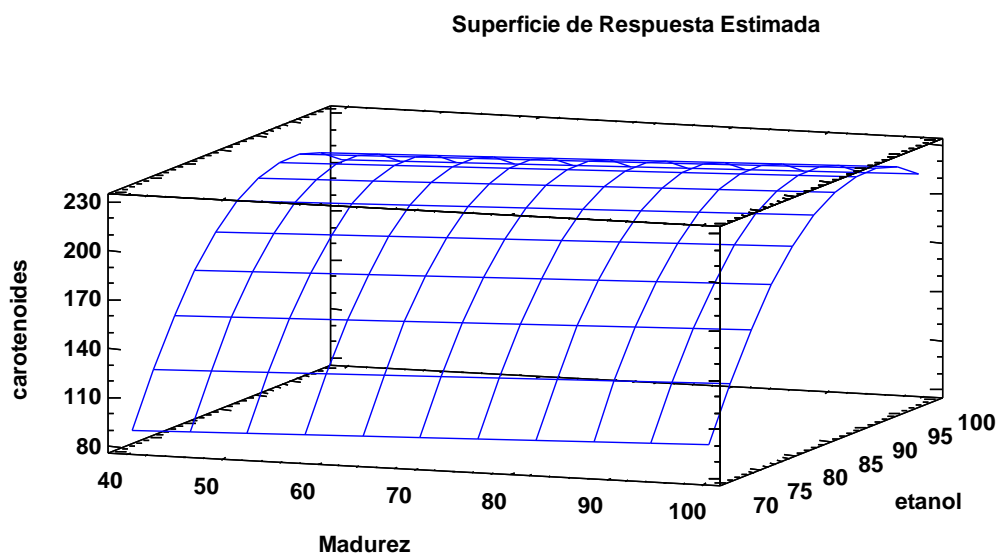
**Nota:** El ANOVA gráfico muestra los efectos de cada factor escalados de tal modo que pueden ser comparados con la variabilidad de los residuos. Para cada factor, se muestran las diferencias de los niveles medios estimados con respecto a la media global estimada. Cualquier factor que muestre una variabilidad considerablemente más grande que los residuos, seguramente es un factor importante.

**Figura C2**  
Interacción entre factores



**Nota:** Esta gráfica de interacción indica la interacción entre Estado de madurez y Concentración solvente. Las 3 líneas trazadas en la gráfica representan cada uno de los niveles de Concentración solvente. Conectan las medias de mínimos cuadrados para los 2 niveles de Estado de madurez. Si no existiera ninguna interacción, estas líneas serían paralelas. Entre más fuerte sea la interacción, más diferente será la forma de las líneas.

**FIGURA C3**  
Superficie de respuesta de la concentración de carotenoides



**Nota:** Superficie de respuesta estimada de la concentración de carotenoides totales (mg/g) en base al estado de madurez y a la concentración del solvente etanol.

**Tabla C4**

*Prueba de Tukey de la influencia de los factores en la concentración de carotenoides.*

---

<b>Estado de Madurez * Concentración del solvente*</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
100% * 96%	3	225,120	A
40-60% * 96%	3	216,240	B
100% * 80%	3	187,830	C
40-60% * 80%	3	180,180	D
100% * 70%	3	99,210	E
40-60% * 70%	3	90,615	F

---

*Nota: Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## ANEXO D Evaluación actividad antioxidante.

**Tabla D1**

*Evaluación de la actividad antioxidante de los 6 tratamientos.*

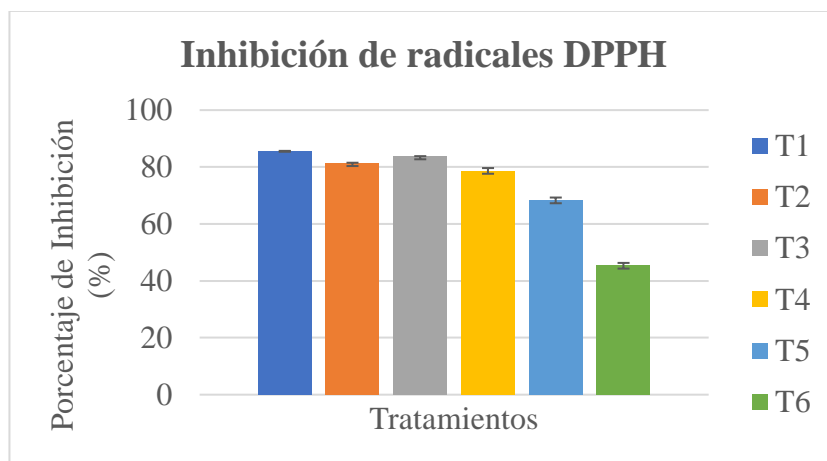
Tratamiento	% Inhibición	μmol Equivalente Trolox/L
<b>T1</b>	85,522 <sup>a</sup> ± 0,154	468,355 <sup>a</sup> ± 0,832
<b>T2</b>	81,347 <sup>c</sup> ± 0,157	445,849 <sup>b</sup> ± 0,845
<b>T3</b>	83,711 <sup>b</sup> ± 0,107	458,596 <sup>c</sup> ± 0,707
<b>T4</b>	78,634 <sup>d</sup> ± 0,103	431,225 <sup>d</sup> ± 0,682
<b>T5</b>	68,274 <sup>e</sup> ± 0,124	375,374 <sup>e</sup> ± 0,818
<b>T6</b>	45,300 <sup>f</sup> ± 0,084	251,528 <sup>f</sup> ± 0,557

*Nota.* Los valores del porcentaje de inhibición de DPPH y μmol Equivalente Trolox/L son resultado del promedio de 3 repeticiones. T1: 100% madurez – etanol 96%; T2: 100% madurez – etanol 80%; T3: 100% madurez – etanol 70%; T4: 40-60% madurez – etanol 96%; T5: 40-60% madurez.

a, b, c, d, e, f, g Los valores con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativa entre las concentraciones y la relación solvente/grado de madurez sobre la actividad antioxidante ( $p < 0,05$ ).

**Figura D1**

*Porcentajes de Inhibición de DPPH a distintas concentraciones y grados de madurez de los extractos.*



*Nota:* T1: 100% madurez – etanol 96%; T2: 40-60% madurez – etanol 96%; T3: 100% madurez – etanol 80%; T4: 40-60% madurez – etanol 80%; T5: 100% madurez-etanol 70%; T6: 40-60% madurez- etanol 70%.

**Tabla D2***Análisis de Varianza para el porcentaje de inhibición de radicales DPPH.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A: Estado de madurez	519,242	1	519,242	27016,61	0,0000
B: Concentración de etanol	2619,72	2	1309,86	68152,96	0,0000
AB	337,232	2	168,616	8773,22	0,0000
RESIDUOS	0,230633	12	0,0192194		
TOTAL	3476,42	17			

*Nota:* La tabla ANOVA descompone la variabilidad del porcentaje de inhibición en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Dado que, tres valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de inhibición con un 95,0% de nivel de confianza.

**Tabla D3***Prueba de Tukey de la influencia de los factores en el porcentaje de inhibición de DPPH.*

<b>Estado de madurez* Concentración de etanol</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
100% * 96%	3	85,5218	A
100% * 80%	3	83,7114	B
40-60% * 96%	3	81,3469	C
40-60% * 80%	3	78,6341	D
100% * 70%	3	68,2737	E
40-60% * 70%	3	45,3004	F

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Tabla D4**

*Análisis de Varianza relacionado con los equivalentes Trolox correspondientes al porcentaje de inhibición de cada extracto.*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A: Estado de madurez	15089,7	1	15089,7	27022,0	0,0000
				7	
B: Concentración de etanol	76131,8	2	38065,9	68166,8	0,0000
				9	
AB	9800,41	2	4900,21	8775,09	0,0000
Residuos	6,70107	12	0,558422		
Total	101029,	17			

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que tres valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los equivalentes Trolox con un 95,0% de nivel de confianza.

**Tabla D5**

*Prueba de Tukey con los equivalentes Trolox correspondientes al porcentaje de inhibición de cada extracto.*

<b>Estado de madurez * Concentración de etanol*</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
100% * 96%	3	468,355	A
100% * 80%	3	458,596	B
40-60% * 96%	3	445,849	C
40-60% * 80%	3	431,225	D
100% * 70%	3	375,374	E
40-60% * 70%	3	251,528	F

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Tabla D6**

*Análisis de Varianza con respecto a las concentraciones de diclofenaco y el porcentaje de inhibición inflamatoria.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Concentraciones	3	6713,85	2237,95	4239,68	0,000
Error	8	4,22	0,53		
Total	11	6718,07			

**Tabla D7**

*Prueba de Tukey para las concentraciones de diclofenaco.*

<b>Concentraciones</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
1000	3	96,4693	A
500	3	70,699	B
200	3	53,453	C
100	3	31,897	D

Nota: Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Tabla D8**

*Análisis de Varianza con respecto a las concentraciones de extracto y el porcentaje de inhibición inflamatoria.*

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Concentraciones	3	3993,66	1331,22	5035,17	0,000
Error	8	2,12	0,26		
Total	11	3995,77			

**Nota:** El extracto analizado fue el que reveló un mejor porcentaje de inhibición en las pruebas de actividad antioxidante.



**Tabla D9**

*Prueba de Tukey para las concentraciones del extracto de C. annuum.*

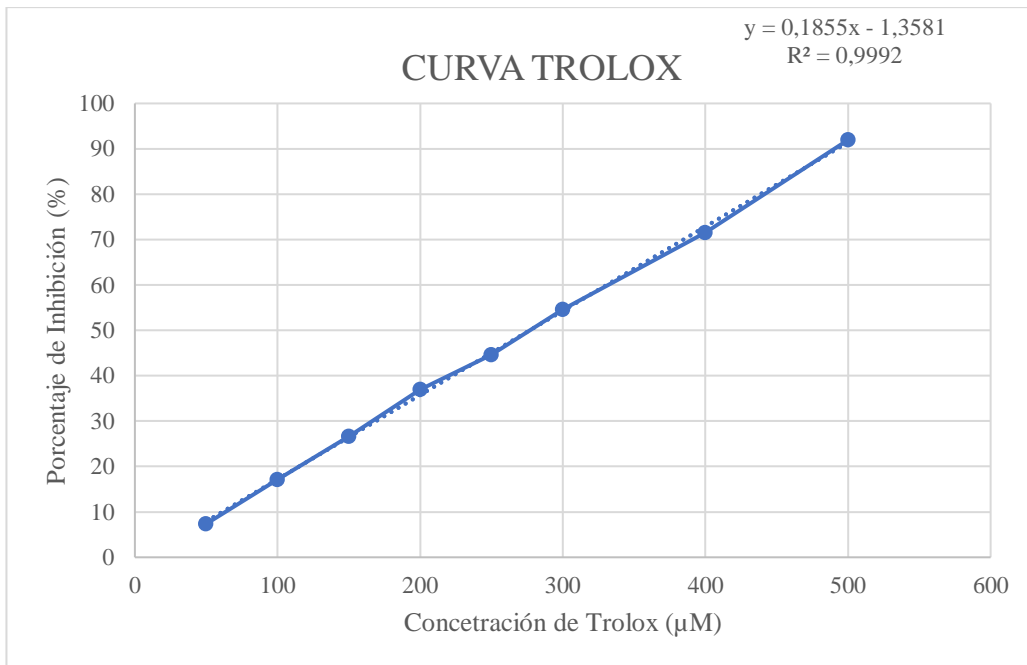
<b>Concentraciones</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
1000	3	57,957	A
500	3	36,392	B
200	3	22,226	C
100	3	8,665	D

**Nota:** Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**ANEXO E** Curva estándar de calibración Trolox (Actividad antioxidante)

**Figura E1.**

*Curva estándar de calibración de Trolox*



**ANEXO F** Absorbancias en actividad antioxidante

**Tabla F1**

*Absorbancia a 515 nm. de cada uno de los extractos al evaluar actividad antioxidante.*

Tratamientos	Réplicas				Promedio	Desviación Estándar
	1	2	3	4		
T1	0,141	0,143	0,14	0,143	0,143	0,002
Blanco	0,043	0,046	0,047	0,045	0,045	0,002
Control	0,718	0,71	0,697	0,71	0,708	0,011
T2	0,168	0,171	0,168	0,169	0,173	0,008
Blanco	0,043	0,046	0,047	0,045	0,045	0,002
Control	0,718	0,71	0,697	0,71	0,708	0,011
T3	0,153	0,155	0,152	0,146	0,152	0,004
Blanco	0,039	0,042	0,037	0,04	0,040	0,002
Control	0,686	0,689	0,692	0,7	0,692	0,006
T4	0,188	0,188	0,185	0,181	0,187	0,006
Blanco	0,037	0,037	0,036	0,04	0,039	0,003
Control	0,686	0,689	0,692	0,7	0,689	0,003
T5	0,256	0,257	0,254	0,247	0,244	0,026
Blanco	0,048	0,042	0,049	0,043	0,043	0,005
Control	0,71	0,7	0,71	0,7	0,707	0,006
T6	0,413	0,409	0,402	0,417	0,422	0,006
Blanco	0,043	0,041	0,041	0,041	0,043	0,005
Control	0,71	0,7	0,71	0,7	0,707	0,006

## ANEXO G Fotografías

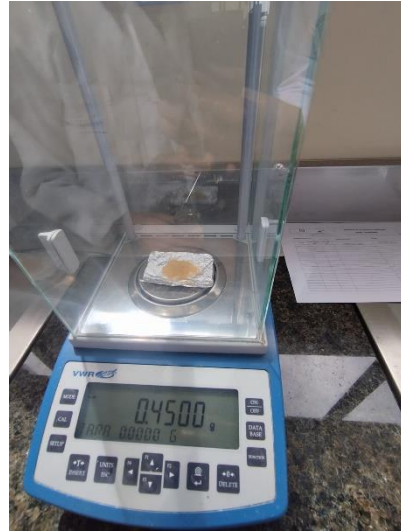
**Figura G1.**

*Peso del material vegetal seco*



**Figura G2.**

*Obtención de los extractos (vórtex)*



**Figura G3.**

*Obtención de los extractos (vortex)*



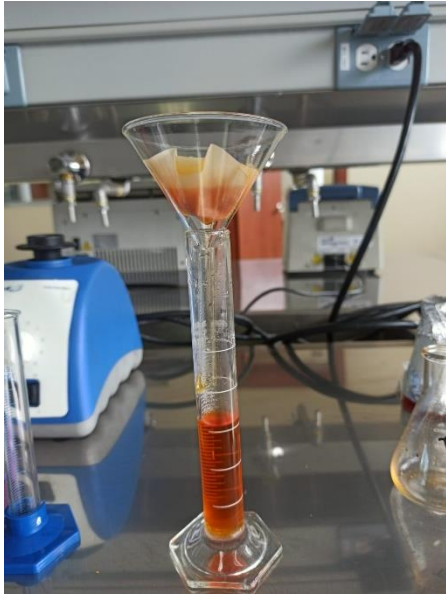
**Figura G4.**

*Obtención de los extractos (plancha)*



**Figura G5.**

*Filtrado de los extractos*



**Figura G6.**

*Conservación de los extractos*



**Figura G7**

*Extractos de *C. annuum* obtenidos*





