



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**“ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD *in vitro* DE CAROTENOIDES Y
DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA RESOLUCIÓN AFÍN A MATRICES COMPLEJAS EN SALSAS DE CHILE
(*Capsicum annum* L.) DE ‘ÁRBOL’ Y ‘MORITA’”.**

POR:

ITB. FRANCIA GUADALUPE LÓPEZ CÁRDENAS

TESIS PROPUESTA A LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE ALIMENTOS

Director:

DRA. SONIA GUADALUPE SÁYAGO AYERDI

Co-director:

DR. BRAULIO CERVANTES PAZ




"2021, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tepic, Nayarit, **15/Julio/2021**

CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA: 116-2021


M.C. Luz del Carmen Romero Islas
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis del alumno **I.T.B. Francia Guadalupe López Cárdenas** con número de control **M19401476**, cuyo título es **"Estudio de la bioaccesibilidad *in vitro* de carotenoides y desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución afin a matrices complejas en salsas de chile (*Capsicum annum* L.) de "Árbol" y "Morita"**, a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.


Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi
(Presidente)


Dr. Braulio Cervantes Paz
(Secretario)


Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos
(Vocal)


Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®


Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos
Presidente del Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos

c.c.p. Expediente





Instituto Tecnológico de Tepic

Tepic, Nayarit, **16/julio/2021**

No. Oficio: 25-438-2021

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD *in vitro* DE CAROTENOIDES Y DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN AFÍN A MATRICES COMPLEJAS EN SALSAS DE CHILE (*Capsicum annum L.*) DE 'ÁRBOL' Y 'MORITA' " para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos de la C. ITB FRANCIA GUADALUPE LÓPEZ CÁRDENAS con numero de control **M19401476** cuenta con un nivel de **originalidad Excelente** según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican artículos en revistas indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin más por el momento envío saludos cordiales

ATENTAMENTE

*Excepción en Educación Tecnológica®
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®*

MANUEL ANGEL URIBE VÁZQUEZ
DIRECTOR



Ccp. Archivo DEPI



Av. Tecnológico #2595 Fracc. Lagos del Country
C.P. 63175
Tepic, Nayarit. Tel. 01 (311) 2119400 y 2119401
e-mail: info@ititepic.edu.mx





Tepic, Nayarit, **17/Ago/2021**

No. Oficio: 25-442-2021

Asunto: Autorización de impresión

**ITB FRANCIA GUADALUPE LÓPEZ CÁRDENAS
PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado "ESTUDIO DE LA BIOACCESIBILIDAD *in vitro* DE CAROTENOIDES Y DESARROLLO DE UN MÉTODO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN AFÍN A MATRICES COMPLEJAS EN SALSAS DE CHILE (*Capsicum annum L.*) DE 'ÁRBOL' Y 'MORITA' ".

La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.



SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ATENTAMENTE

*Excelencia en Educación Tecnológica.
Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu.*

**LUZ DEL CARMEN ROMERO ISLAS
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo DEPI.



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepic, Nayarit, el mes de Agosto del 2021, el que suscribe Francia Guadalupe López Cárdenas alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos con número de control M19401476, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección de la Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi, pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cede los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo, manifiesta que es de su conocimiento que, si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participará como coautor y de los beneficios que se deriven.

Atentamente



ITB. Francia Guadalupe López Cárdenas

AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto Tecnológico de Tepic** y al **Posgrado en Ciencias en Alimentos**, por dos años de cobijo y formación académica al brindarme la oportunidad de desarrollar y ampliar mi conocimiento académico.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada para llevar a cabo este proyecto. Registro de CVU: 1009240

A mi directora de tesis, **Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi** por aceptarme en su equipo de trabajo; por su confianza en mí y en mi trabajo; por dirigir este proyecto de tesis, entregándose con empeño y pasión a él, tanto como yo.

Al **Dr. Braulio Cervantes Paz** por todas sus aportaciones, sugerencias y apoyo para la realización del proyecto, por su disponibilidad de tiempo a lo largo de los tutoriales y en las revisiones de la tesis.

Al **Dr. Jorge Alberto Sánchez Burgos** por sus asesorías, consejos, toneladas de paciencia y disposición a colaborar en este proyecto durante estos dos años, gracias por enseñarme a cuestionar siempre el porqué de las cosas.

Al **Dr. Víctor Manuel Zamora Gasga** por su aportación como revisor en la realización de este trabajo, brindándome siempre una sonrisa para seguir adelante.

Infinitas gracias al **Dr. César Sánchez Feria**, gracias por ser mi compañero de desvelos en el laboratorio cuando parecía que las metodologías no tenían pies ni cabeza, gracias por tu apoyo y tus consejos en lo académico, profesional y personal.

A la **Dra. Alicia Paulina Cárdenas Castro**, por compartir conmigo toda su experiencia desde el primer día que ingresé al posgrado, gracias por siempre contestar hasta la duda más absurda.

Gracias por su amistad, **Gina y Suecia**, por aquellas noches de karaoke lavando material y por hacerme sentir que no estaba sola. También gracias a ti **Krisel**, tu amistad fue de lo más bonito que me dejó el posgrado, siempre juntas para reírnos de nuestras desgracias. Gracias porque junto a ustedes aprendí a ser valiente.

A mis compañeros, por su aporte en mi crecimiento académico, profesional y personal dentro y fuera del laboratorio: **Marcos, Osiris, Diana, Ángel, Carlos, Ceci, Yolz, Monse y Javi**.

RESUMEN

López Cárdenas, Francia Guadalupe. MCA. Instituto Tecnológico de Tepic. Junio 2021. Estudio de la bioaccesibilidad *in vitro* de carotenoides y desarrollo de un método por cromatografía de líquidos de alta resolución afín a matrices complejas en salsas de chile (*Capsicum annum L.*) de 'Árbol' y 'Morita'. Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi. Dr. Braulio Cervantes Paz.

El chile (*Capsicum annum L.*) es un alimento que México ha aportado al mundo, rico en compuestos bioactivos (CB), como los carotenoides (CC) que han sido estudiados ampliamente en sus frutos. Sin embargo, poco se ha indagado acerca de su comportamiento en una matriz alimenticia afín a los CC, como lo son las salsas de aceite que podrían favorecer su liberación y absorción en el tracto digestivo de quienes las consuman. De igual manera, los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) que permiten el análisis de la composición de matrices complejas son limitados, puesto que la mayoría de ellos se enfocan en el análisis de matrices simples de frutas y vegetales de forma individual. El objetivo de este estudio fue evaluar la bioaccesibilidad (BA) *in vitro* de los CC y desarrollar un método por HPLC para analizar las matrices complejas de las salsas de chile 'Árbol' y chile 'Morita'.

Se realizó una extracción acuoso-orgánica de CC en las salsas, en donde se cuantificó el contenido de carotenoides totales (CCT) y capacidad antioxidante (CAOx) por los ensayos de DPPH y FRAP, así mismo se determinó su BA. Por último, se desarrolló un método por HPLC que fuera eficiente en la separación de los CC presentes en las salsas de estudio.

Las salsas "machas" de matriz lipídica tuvieron un contenido de CCT más mayores, destacando las elaboradas con chile de 'Árbol' (7.99 mg/g BH). El tratamiento de freído de chiles por un periodo de 5 min favoreció la liberación de sus CC. Estas salsas presentaron la mayor capacidad antioxidante en ambos ensayos de CAOx. Esto se asocia al perfil y el contenido de los CC presentes en la matriz del alimento. Se ha reportado un contenido de β -caroteno significativamente mayor en chile de 'Árbol' en comparación con otras variedades, el cual es el principal carotenoide con actividad biológica. El % de BA de CC fue mayor en las salsas a base de aceite, destacando nuevamente la elaborada con chile de 'Árbol' a 140 °C (69.68%) y menor para las salsas control (10.97% y 13.02%, para 'Morita' y 'Árbol', respectivamente). Se ha reportado que la adición de lípidos durante el procesamiento de frutas y hortalizas favorece la liberación de CC, lo cual influye en la BA de CC en las salsas evaluadas. En relación al desarrollo del método analítico por HPLC, las condiciones seleccionadas (fase móvil, fase estacionaria, gradiente, flujo y temperatura) permitieron una separación eficiente de los principales CC presentes en las salsas, mostrando así, su eficacia en el análisis de matrices complejas, tanto en matrices acuosas como lipídicas. Los CC identificados en ambos grupos de salsas fueron capsantina como el CC predominante, además de la zeaxantina y el β -caroteno, principalmente.

Palabras claves: chile, carotenoides, salsas mexicanas, bioaccesibilidad, cromatografía líquida.

SUMMARY

López Cárdenas, France Guadalupe. MCA. Technological Institute of Tepic. June 2021. Study of the in vitro bioaccessibility of carotenoids and development of a high-resolution liquid chromatography method related to complex matrices in chili sauces (*Capsicum annum* L.) from 'Arbol' and 'Morita'. Dra. Sonia Guadalupe Sáyago Ayerdi. Dr. Braulio Cervantes Paz.

Chili (*Capsicum annum* L.) is a food that Mexico has contributed to the world, rich in bioactive compounds (CB), such as carotenoids (CC) that have been extensively studied in its fruits. However, little has been investigated about its behavior in a food matrix related to CC, such as oil sauces that could favor their release and absorption in the digestive tract of those who consume them. Similarly, high-performance liquid chromatography (HPLC) methods that allow the analysis of the composition of complex matrices are limited since most of them focus on the analysis of simple matrices of fruit and vegetables individually. The objective of this study was to evaluate the in vitro bioaccessibility (BA) of the CCs and to develop an HPLC method to analyze the complex matrices of the "Arbol" and "Morita" chile sauces.

An aqueous-organic extraction of CC was carried out in the sauces, where the content of total carotenoids (CCT) and antioxidant capacity (CAOx) was quantified by the DPPH and FRAP tests, as well as the determination of its BA. Finally, an HPLC method was developed that was efficient in separating the CC present in the sauces studied.

The "machas" sauces with a lipid matrix had a higher CCT content, highlighting those made with 'Arbol' chili (7.99 mg / g BH). The chili frying treatment for a period of 5 min favored the release of their CC. These sauces had the highest antioxidant capacity in both CAOx tests. This is associated with the profile and content of the CC present in the food matrix. Significantly higher content of β -carotene has been reported in 'Arbol' chili in comparison to other varieties, which is the main carotenoid with biological activity. The % of BA from CC was higher in oil-based sauces, highlighting again the sauce elaborated with 'Arbol' chili at 140 ° C (69.68%) with lower values for control sauces (10.97% and 13.02%, for 'Morita' and 'Tree', respectively). It has been reported that the addition of lipids during the processing of fruits and vegetables favors the release of CC, which influences the BA of CC in the evaluated sauces. Relating to the development of the analytical method by HPLC, the selected conditions (mobile phase, stationary phase, gradient, flow, and temperature) allowed an efficient separation of the main CC present in the sauces, thus showing their effectiveness in the analysis of complex matrices, both in aqueous and lipid matrices. The CC identified in both groups of sauces were capsanthin as the predominant CC, in addition to mainly zeaxanthin and β -carotene.

Keywords: chili, carotenoids, Mexican sauces, bioaccessibility, liquid chromatography.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
RESUMEN.....	III
SUMMARY.....	IV
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	V
ÍNDICE DE CUADROS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. LAS SALSAS EN LA COCINA MEXICANA.....	3
2.1.1. Las salsas de chile en la cocina mexicana.....	4
2.1.2. Carotenoides: Compuestos bioactivos de interés en el chile	9
2.2. MODELO DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	11
2.2.1. BIOACCESIBILIDAD DE CB	12
2.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE CAROTENOIDES	14
2.1.1. Parámetros críticos en HPLC para la separación eficiente de carotenoides.....	14
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN.....	21
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS.....	22
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS.....	23
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
6.2. PRIMERA ETAPA: ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SALSAS	24
6.2.1. Material vegetal y elaboración de las salsas	24
6.2.2. Caracterización de carotenoides (CC) presentes en las salsas	26
6.2.3. Análisis de capacidad antioxidante de carotenoides presentes en las salsas	27
6.3. SEGUNDA ETAPA: MODELO DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	28
6.3.1. Bioaccesibilidad de carotenoides	28
6.4. TERCERA ETAPA: DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	31
6.4.1. Determinación de las condiciones cromatográficas.....	31
6.4.2. Selección de las condiciones cromatográficas	31
6.4.3. Diseño experimental del método	33
6.4.4. Identificación de carotenoides por HPLC-DAD.....	35
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
7.1 . CARACTERIZACIÓN DE LAS SALSAS.....	37
7.1.1. Contenido de carotenoides totales (CCT) y capacidad antioxidante (CAOx) en salsas de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) de 'Árbol' y 'Morita'.	37
7.2. EVALUACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE CC EN SALSAS	42
7.3. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	47
7.3.1. Determinación de las condiciones cromatográficas	47
7.3.2. Selección de las condiciones cromatográficas	50

7.3.3. Diseño experimental del método	50
7.3.3. Identificación de carotenoides por HPLC-DAD.....	54
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.....	60
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 2.1. Chiles de mayor uso en la gastronomía mexicana.	6
Cuadro 6.1. Formulaciones expresadas en porcentaje (%) para la elaboración de las salsas.	25
Cuadro 7.1. Contenido de carotenoides totales (CCT) en salsas de chile 'Morita' y chile 'De Árbol' ¹	40
Cuadro 7.2. Capacidad antioxidante (CAOx) en salsas de chile 'Morita' y chile 'De Árbol' ¹	42
Cuadro 7.3. Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> de carotenoides (CC) de salsas de chile ¹	45
Cuadro 7.4. Cálculo de número de platos teóricos (N) y resolución (R _s) de cada gradiente.	51
Cuadro 7.5. Gradiente seleccionado para el análisis de CC en salsas.	54
Cuadro 7.6. Características cromatográficas, UV-Vis y áreas relativas de CC salsas de chile de 'Árbol' y 'Morita' obtenidas por HPLC-DAD.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Mapa de la diversidad de chiles en México.....	5
Figura 2.2. Salsa “macha” tradicional.....	7
Figura 6.1. Modelo de digestión <i>in vitro</i>	29
Figura 7.1. Cromatogramas representativos de cada ensayo de gradientes.. ..	49
Figura 7.2. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados (A) Número de platos teóricos, (B) Resolución.....	52
Figura 7.3. Gráfico de superficie de deseabilidad para Resolución (R_s). ..	53
Figura 7.4. Cromatograma de extractos de CC de chile ‘Morita’ (A) y de ‘Árbol’ (B) a 454 nm.. ..	56

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Grado Celsius
μL – Microlitros
μm – Micrómetros
ACN – Acetonitrilo
BA – Bioaccesibilidad
BH – Base húmeda
BHT – Butilhidroxitolueno
CAOx – Capacidad antioxidante
CB – Compuestos bioactivos
CC – Carotenoides
CCT – Carotenoides totales
CF – Compuestos fenólicos
DAD – Detector de arreglo de diodos
ET – Equivalentes de Trolox
EβC – Equivalentes de β-caroteno
FG – Fracción gástrica
FI – Fracción indigestible
FII – Fracción indigestible insoluble
FInt – Fracción intestinal
FIS – Fracción indigestible soluble
FIT – Fracción indigestible total
kDa – KiloDalton
KOH – Hidróxido de potasio

MeOH – Metanol

mg – Miligramos

min – Minutos

mL – Mililitros

mmol – Milimolar

MTBE – Metil *ter*-butil éter

N – Número de platos teóricos

pH – Potencial de hidrógeno

rpm – Revoluciones por min

R_s – Resolución

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El chile es el nombre general de la especie *Capsicum*, que pertenece a la familia *Solanaceae*. Es un alimento que México ha aportado al mundo, en la actualidad existen alrededor de 64 variedades de chile mexicano que se utilizan en diversos platillos. A nivel mundial, es uno de los frutos más populares utilizados como condimento y/o como ingrediente para proporcionar sabor, aroma y color a diversos platillos de la gastronomía mexicana, siendo la salsa su forma tradicional de consumo. Los chiles, dependiendo de la variedad, pueden presentar en su composición diversos compuestos bioactivos (CB), como son compuestos fenólicos (CF), carotenoides (CC), capsaicinoides, entre otros (Hervert-Hernández y cols., 2010; Hernández-Ortega y cols., 2012; Toledo-Aguilar y cols., 2016).

Se ha evidenciado que los CB presentan efectos benéficos en la salud humana. Sin embargo, su actividad biológica depende, no solo de su contenido en los alimentos, sino también de su liberación, absorción y bioconversión en el organismo (Ryan y cols., 2008; Duda-Chodak y cols., 2015). Diversos estudios han demostrado que, específicamente los CC, por su naturaleza lipofílica, pueden ser mejor absorbidos en presencia de lípidos, lo que sugiere que su co-ingestión con alimentos ricos en lípidos puede incrementar su absorción y aprovechamiento en el organismo (Furr y Clark, 1997; Roodenburg y cols., 2000).

Por esta razón, una de las estrategias para elucidar y tener una aproximación a resultados que brinden una respuesta acerca de la bioconversión de los CB, en particular de los CC presentes en frutos de chile de una forma simple, de fácil aplicación y bajo costo para el investigador, son los estudios *in vitro*, que se han convertido en una alternativa complementaria y preliminar a los estudios *in vivo*. Es

por ello que en el presente trabajo se propone determinar el efecto de la matriz alimenticia en la bioaccesibilidad (BA) en alimentos incluidos cotidianamente en la dieta mexicana, como lo son las salsas de chile de 'Árbol' y 'Morita', empleando un modelo de digestión gastrointestinal.

En particular, las matrices complejas ricas en compuestos lipídicos y otros compuestos bioactivos como son los CC, no siempre se logran separar mediante métodos cromatográficos y el desarrollo de una metodología afín a las muestras de este estudio, fue necesario para lograr cuantificar los CC presentes, ya que la cuantificación e identificación de estos compuestos se ha enfocado principalmente en matrices simples como son frutas y vegetales, volviendo el análisis de CC mucho más simple, por ello se planteó el desarrollo de un método que permita la óptima separación e identificación de los CC en matrices complejas, incorporando así por primera vez en el acervo científico a este alimento mexicano.

.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. LAS SALSAS EN LA COCINA MEXICANA

El Comité Intergubernamental para la Salvaguardia del Patrimonio Cultural Inmaterial de la UNESCO reconoció en el 2010 a la cocina mexicana como la primera cocina de un país en ser aceptada en la Lista Representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad (Gálvez y Salinas, 2015). Sin embargo, los estudios que se han realizado para evaluar los beneficios del consumo de la dieta tradicional mexicana en la salud son limitados, aunque en general, estos concluyen que la dieta tradicional mexicana puede brindar propiedades funcionales y ayudar en la prevención el desarrollo de diversas enfermedades crónicas no transmisibles (Santiago-Torres y cols., 2016; Avila-Nava y cols., 2017).

México ha pasado por una transición nutricional con cambios importantes en el consumo de alimentos, adecuándose a las nuevas tendencias de “fast food” y dietas occidentales (Zamora-Gasga y cols., 2017). Esto se ha asociado con una menor ingesta de alimentos balanceados y, además, con un aumento en la ingesta de azúcares añadidos, dietas altas en grasas trans y grasas saturadas, así como alimentos procesados. En consecuencia, apenas un 14 % de la población mexicana tiene hábitos nutricionales saludables, provocando que el porcentaje restante presente problemas nutricionales (del Castillo-Negrete, 2013). Los datos han demostrado una relación directamente proporcional entre el consumo de grasas saturadas y azúcares refinados con obesidad, diabetes y otras enfermedades crónico-degenerativas (Garcia y cols., 2012), que representan las principales enfermedades de la población mexicana (Soto-Estrada y cols., 2016).

Las diferencias gastronómicas entre los países de todo el mundo se definen, en gran medida, por la diversidad en el uso de especias y condimentos durante la colonización europea de América, Asia y África en los siglos XV-XVII (García-Casal, y cols., 2016). Sin embargo, son pocos los datos registrados sobre el consumo de salsas.

2.1.1. Las salsas de chile en la cocina mexicana

El chile es un excelente representante de la comida mexicana, su origen y domesticación comenzó en el continente americano, principalmente en México, Guatemala y el sur de los Estados Unidos, y ha formado parte de la dieta mexicana durante más de ocho siglos (Oboh y cols., 2007). En 2015, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) reportó que el chile fue el 8° cultivo con mayor valor generado en la agricultura nacional, desde el 2012, siendo México el segundo productor de chile verde a nivel mundial con una producción anual promedio de 3.3 millones de toneladas, de las cuales se exportaron cerca de 1.6 millones de toneladas, sin embargo, estos datos engloban únicamente la producción de chiles verdes en general, pues no existen datos que de la producción diferenciada por variedad (SIAP, 2018; FAO, 2018). De su valor comercial, el 23% se obtiene de chiles deshidratados, generando una ganancia de 6,559 millones de pesos en el 2018 (FAO,2018; SIAP, 2020).

El género *Capsicum* pertenece a la familia de las solanáceas y comprende más de 200 variedades, entre las que se encuentran principalmente: *C. annum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. baccatum* Jacq. y *C. pubescens* L. (Pino y cols., 2007, Conforti y cols., 2007), siendo *Capsicum annum* L. la especie de mayor diversidad en México por ser su centro de domesticación con al menos 64 variedades domesticadas (Figura 2.1) (Vela, 2009; SNICS, 2017).

Cuadro 2.1. Chiles de mayor uso en la gastronomía mexicana.

Nombre en fresco	Nombre en seco
Mirasol o Puya	Guajillo o Cascabel
Jalapeño o Cuaresmeño	Chipotle o Morita
Poblano	Ancho o Mulato
Chile de árbol	Chile de árbol
Chilaca	Pasilla
Güero	Chilhuacle
Serrano	Serrano
Habanero	Habanero

Fuente: (Moreno-Rojas, 2013).

El consumo de chile puede hacerse en diferentes etapas de su madurez y con diversos tipos de procesamiento, por ejemplo, frescos, enlatados o deshidratados por exposición directa al sol (Hervert-Hernández y cols., 2010), siendo este último, uno de los de mayor importancia económica, ya que permite una distribución a nivel mundial (Collera-Zúñiga y cols., 2005).

Además de los atributos sensoriales que proporcionan los chiles como color, acidez y aroma característico; se pueden considerar como un alimento funcional debido a la actividad biológica que muestran varios de sus fitoquímicos, como los capsaicinoides, CC, flavonoides y CF (Raju y cols., 2010). La existencia de diversos estudios sobre la síntesis y concentración de CB en el chile sugiere la importancia de este cultivo desde el punto de vista nutrimental y de salud (Figuroa y cols., 2015; Toledo-Aguilar y cols., 2016). Las salsas picantes son un alimento destinado a usarse como sazonzador o condimento, preparado a partir de la porción comestible del chile (fresco, deshidratado, tostado), que además puede contener frutas, verduras, semillas u otras especias o hierbas comestibles (CODEX STAN, 2011).

Una de las salsas típicas de diversas regiones de México es la salsa “macha” (Figura 2.2), elaborada principalmente a base de chile deshidratado, ajo, aceite y sal, pero esa formulación y recetas varía entre las regiones de México (Muñoz-Zurita, 2008). Las salsas mexicanas se utilizan como acompañantes de los platillos culinarios mexicanos populares y típicos como "tacos", "sopes", "tostadas", entre otros, pero sin duda, el ingrediente más importante de una salsa mexicana es el chile.

El consumo anual per cápita de este cultivo en México es de 18.1 kg, ya sean guisados, deshidratados, encurtidos, enlatados, en salsas o frescos (ASERCA, 2018), superando la ingesta de arroz y papas. Sin embargo, el único dato relacionado al consumo de salsas a nivel nacional es de salsas compradas en supermercados, el 39% de la población mexicana consume este tipo de salsas, generando un consumo anual per cápita de 4 kg/año (Ghirardelly y Carranza, 2016).



Figura 2.2. Salsa “macha” tradicional.

Fuente: Alp Aksoy.

Después de la cosecha, los chiles por lo general, tienen una vida de anaquel corta, por lo que deben consumirse en poco tiempo o procesarse para extender su vida útil. El principal proceso de conservación utilizado hoy en día es el deshidratado. Este proceso se define como la aplicación de calor en condiciones controladas para eliminar el agua normalmente presente en un alimento (Aguilar-Morales, 2012). En ese sentido, el deshidratado de chiles es el procesamiento más utilizado para su comercialización en México, posicionándose el chile de 'Árbol', el chile 'Chipotle', el chile 'Guajillo' y el chile 'Morita' como los más consumidos a nivel nacional (Collera-Zúñiga y cols., 2005; Hervert-Hernández y cols., 2010).

El proceso de deshidratado puede causar cierta pérdida de CB debido a su degradación por altas temperaturas o exposición a las luz del sol. Tradicionalmente, los chiles se deshidratan por exposición directa al sol o por tratamientos térmicos, este último implica una exposición breve a temperaturas de 70 °C, en relación al deshidratado al sol que implica periodos largos de exposición. Estos factores pueden influir en los micronutrientes, así como en el contenido y perfil de CB, como la vitamina A y E, los CF y CC (Minguez-Mosquera y cols., 1994; Kim y cols., 2004; 2009). En un estudio realizado por Cervantes-Paz y cols., (2012) se evaluó el procesamiento térmico en chiles jalapeños verdes y rojos y su efecto en el perfil de CC y clorofilas, así como su capacidad antioxidante (CAOx), concluyendo que la aplicación de tratamientos térmicos en frutos de chile puede inducir a la degradación de los CC. Sin embargo, el efecto de los tratamientos térmicos depende del perfil de los CB y la matriz del alimento.

La composición química del chile se ha estudiado ampliamente, resalta su contenido de vitamina C, CF y CC estos últimos de gran interés por los beneficios que se les han atribuido hacia la salud (Conforti y cols., 2007). Sin embargo, es necesario su estudio en matrices complejas como las salsas, forma tradicional del consumo de este fruto en México, pues son limitados los estudios publicados respecto a cómo una matriz alimenticia afín a los CC del chile podría favorecer su liberación y absorción en el organismo.

2.1.2. Carotenoides: Compuestos bioactivos de interés en el Chile

Los CB son fitoquímicos presentes en diversos alimentos los cuales son capaces de modular diversos procesos metabólicos y son responsables de una gran cantidad de beneficios a la salud. En general, los CB se encuentran principalmente en alimentos vegetales como frutas, verduras o granos (Carbonell-Capella y cols., 2014; Gil-Chávez y cols., 2013). Los CC han demostrado ser eficaces eliminadores de radicales libres y pueden ser importantes en la prevención de enfermedades degenerativas comunes, tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades hepáticas, cataratas, deterioro inmunológico y disfunciones cerebrales (Chuah y cols., 2008; Pereira y Cardoso, 2012).

Los CC comprenden moléculas que se encuentran en su forma libre y esterificada con ácidos grasos, estos se encuentran presentes como carotenos (hidrocarburos insaturados) y xantofilas (derivados oxigenados), compuestos responsables de las coloraciones naranjas, amarillas y rojas de los chiles, los carotenos como el α y β -caroteno predominan en vegetales, mientras que, en frutos, las xantofilas, como la violaxantina, zeaxantina y β -criptoxantina se encuentran en una mayor proporción (Howard y cols., 2000; Collera-Zúñiga y cols., 2005; Hill y Johnson, 2012). En Chile, se han identificado alrededor de 67 compuestos CC (Cervantes-Paz y cols., 2012; 2014; Giuffrida y cols., 2014). Los CC como la capsantina, capsorrubina y criptocapsina imparten un color rojo brillante en los frutos maduros de Chile, mientras que el color amarillo y anaranjado se atribuyen a la presencia de β -caroteno, zeaxantina, violaxantina y β -criptoxantina (Figura 2.3). La mayoría de las xantofilas en los chiles rojos se sintetizan como ésteres unidos a ácidos grasos (C_{12} , C_{14} y C_{16}), mientras que los extractos de Chile verde se caracterizan principalmente por la presencia de CC libres y clorofilas (Cervantes-Paz y cols., 2014; Giuffrida y cols., 2014). Los CC, se consideran fitoquímicos funcionales porque actúan como antioxidantes, una función que podría prevenir diversos tipos de cáncer de colon o bien, en el desarrollo de úlceras debido a su efecto protector sobre la mucosa gástrica (Britton y Khachick., 2009). Durante la etapa de maduración de los chiles,

ocurre un aumento considerable en el contenido de CC (Estrada y cols., 2002; Cervantes-Paz y cols., 2012; 2014), durante este proceso, ocurre la síntesis y degradación de ciertos pigmentos como las clorofilas a y b, la luteína y la neoxantina dando paso a un aumento considerable del β -caroteno, la violaxantina, la capsantina y la capsorrubina durante el curso de la maduración (Deepa y cols., 2007), proceso durante el cual, la mayoría de las xantofilas presentes en chiles, se esterifican con ácidos grasos (Minguez-Mosquera y Hornero-Mendez, 1994). En este mismo proceso, las proporciones de capsantina, un CC particular del chile, aumentan en las etapas avanzadas de maduración, aportando del 30 al 70% de los CCT en la mayoría de las variedades (Deli y cols., 1996).

Uno de los CC de mayor importancia científica es el β -caroteno, particularmente por su sistema de dobles enlaces conjugados, al cual se le atribuye la reactividad química y a la intensa absorción en la región visible, la cual es base para su identificación y cuantificación, dando como resultado coloraciones amarillas y naranjas en diversos frutos (Rodríguez-Amaya, 2001). Existen evidencias experimentales del potencial de los CC presentes en variedades de chile rojo para reducir el estrés oxidativo, inflamación, dolor y control de dispepsia (Spiller y cols., 2008).

Además de la maduración, el procesamiento térmico al que son sometidas las materias primas que forman parte de las salsas también puede alterar la composición de los CC y, por ende, su bioactividad, ya que estos compuestos son altamente propensos a la isomerización, oxidación y degradación en condiciones de calor (Zepka y Mercadante, 2009). Aunque, por otro lado, estos mismos factores, pueden favorecer su liberación de la matriz del alimento (Juániz y cols., 2016). Estas implicaciones dependen de muchos factores; como el tipo y la intensidad del procesamiento térmico, el genotipo del chile y la etapa de maduración (Cervantes-Paz y cols., 2014).

Al deshidratar los chiles rojos, preservar el color proporcionado por los CC es un factor importante (Kim y cols., 2004). En general, si el proceso de deshidratado no se ha realizado adecuadamente, la concentración de los CC disminuye (Cervantes-Paz y cols., 2012; 2014). Existen estudios más específicos que evaluaron el efecto del proceso de deshidratado y la temperatura sobre la concentración de CC. Entre estos estudios se encuentra el publicado por Minguez-Mosquera y cols., (1994) sobre chiles rojos 'Bola', los cuales fueron deshidratados en un horno de piedra a 30 °C durante un período de una semana y en un horno a altas temperaturas. Los autores informaron que el comportamiento de los CC varía según el tipo de tratamiento térmico como la variedad del fruto de chile, la etapa de maduración, el perfil de los CC y el tamaño de partícula de la materia prima, así como la temperatura de deshidratado, las actividades enzimáticas, entre otros (Montoya-Ballesteros y cols., 2014).

2.2. MODELO DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *in vitro*

Para ejercer sus efectos biológicos, los CB primero deben ser liberados de la matriz alimenticia, y posteriormente ser absorbidos por el organismo. En este sentido, los ensayos *in vitro* se han desarrollado como una alternativa simple y rápida en comparación a los ensayos *in vivo*, ya que estos últimos son costosos a largo plazo y con alta variabilidad entre los sujetos de estudio (Saura-Calixto y cols., 2000). En general, la digestión gastrointestinal *in vitro* es útil para evaluar la bioaccesibilidad (BA) de los compuestos con actividad biológica de los alimentos, este método unido a un proceso de diálisis se ha aplicado principalmente para estudiar la BA de los CB, así como de los micronutrientes de los alimentos (Mercado-Mercado y cols., 2018). La BA se define como la cantidad de un nutriente ingerido que está disponible para su absorción en el intestino después de la digestión (Hedrén y cols., 2002). Sin embargo, se ha determinado que no toda la cantidad de CB de los alimentos puede ser absorbida por el tracto gastrointestinal, además, los estudios en relación con la

digestión gastrointestinal de diferentes CC contenidos en salsas son nulos (Cárdenas-Castro y cols., 2019).

2.2.1. Bioaccesibilidad de CB

Los diferentes enfoques para estudiar la BA de los CB incluyen métodos *in vitro*, técnicas *ex vivo*, ensayos *in situ* y modelos *in vivo* (Garrett y cols., 2000). La BA de los CB puede modificarse debido a las interacciones con otros macronutrientes como la fibra en alimentos, proteínas o incluso los polisacáridos en productos procesados (Dupas y cols., 2006), además, cuando diferentes alimentos entran en contacto con el tracto digestivo, pueden producirse varias interacciones que interfieran o favorezcan la BA de ciertos CB (Lesser y cols., 2006). Es aquí donde radica la importancia de la investigación en lograr una absorción óptima de CB y así, maximizar sus efectos benéficos en la salud.

Se ha determinado que la matriz alimenticia y la grasa influyen en la BA y biodisponibilidad de los CC (Ryan y cols., 2008). Debido a que los CC son hidrófobos, los pasos fundamentales en la absorción de CC son la liberación eficiente de la matriz alimenticia, la presencia de sales biliares y enzimas digestivas para la formación de micelas, la absorción en las células de la mucosa y el transporte dentro del sistema linfático (Bohn, 2018).

Se ha considerado que los lípidos de la dieta son un factor importante para la estimulación del flujo de bilis hacia el intestino y la formación de micelas (Furr y Clark, 1997). Otra parte importante a considerar son los métodos de procesamiento más utilizados para los chiles, como la refrigeración, decocción, fritura o el deshidratado, pues estos procesos pueden influir en el contenido de CC y en su BA (Jiwan y cols., 2010). El procesamiento térmico es una de las formas más comunes de alterar la matriz alimenticia. En general, este tratamiento puede favorecer la liberación de la matriz (Netzel y cols., 2011). Reboul y cols., (2006) observaron que

la BA de los CC dependía de la matriz del alimento, siendo más bioaccesibles los CC en el jugo de zanahoria y en el tomate procesado en comparación con las fuentes crudas, que tuvieron una BA muy baja. En el caso de chiles, son pocos los estudios que hay y para salsas son nulos, un ejemplo de esto es el estudio realizado por Pugliese y cols., (2014b) en el cuál evaluaron los efectos de diferentes métodos de procesamiento (congelación y decocción) en la composición de CC de siete variedades de chiles. En general, el contenido de CC fue similar, tanto para los chiles frescos como para los procesados. Por lo tanto, las condiciones de procesamiento examinadas en este estudio no afectaron la BA de CC de los chiles.

La cantidad y el tipo de grasa presente es otro factor clave en la BA, esta es fundamental para la absorción de los CC (Fernández-García y cols., 2012), por lo que la solubilidad de CC en una matriz oleosa puede mejorar la BA. Victoria-Campos y cols., (2013), realizaron un estudio en el que evaluaron como el procesamiento térmico y el tipo de grasa influye en la BA de CC, concluyeron que la decocción y el asado disminuyeron la BA de la mayoría de los pigmentos libres y esterificados del chile jalapeño, sin embargo, la grasa favoreció la BA de los CC menos polares (carotenos, β -criptoxantina y xantofilas esterificadas).

No solo la cantidad de lípidos, sino también el perfil cualitativo de estos tiene influencia en la BA de CC (Goltz y Ferruzi, 2013). Los ácidos grasos monoinsaturados promueven una mayor biodisponibilidad de CC que los ácidos grasos poliinsaturados. Gleize y cols., (2013), encontraron que la BA de la luteína y la zeaxantina fue mayor con los ácidos grasos saturados que con los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados en un modelo de digestión *in vitro*. Colle y cols., (2010) también introdujeron varias modificaciones al método establecido por Hedrén y cols., (2002), añadiendo lípidos (0% a 10%) a los tomates antes de la digestión *in vitro*, observando un aumento significativo de la BA de licopeno cuando se añadió 5% de lípidos. Contrario a esto, Qian y cols., (2012) reportaron una BA nula para el β -caroteno (0%) cuando se usó aceite de naranja como el lípido portador,

probablemente porque los aceites aromatizados no contienen componentes de triacilglicerol y, por lo tanto, no se pueden digerir en ácidos grasos libres.

Por esta razón, es fundamental realizar estudios cuidadosamente controlados para determinar la BA de CB de un alimento tan imprescindible en la dieta mexicana como las salsas de chile en aceite.

2.1. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE CAROTENOIDES

En la actualidad, se han empleado diversas técnicas para cuantificar e identificar una gran cantidad de CB en alimentos que van desde la cromatografía de capa fina hasta la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) siendo esta última, la técnica más utilizado para la identificación y cuantificación de CC combinada con detectores de absorción UV-Vis (Gupta y cols., 2015). Esta técnica se fundamenta en los principios básicos de la cromatografía que tiene como fin la separación de un analito por su interacción con una fase líquida (fase móvil) que fluye a través de una fase estacionaria. El equipo de HPLC se compone de módulos como el de inyección o automuestreador, una bomba cuaternaria, horno y diversos detectores UV/Vis, principalmente. Todos los módulos se controlan mediante un software que se encarga de la gestión del sistema cromatográfico, en el que se lleva a cabo la recolección de datos para el posterior análisis de los mismos (Brown y Weston, 1997).

2.1.1. Parámetros críticos en HPLC para la separación eficiente de carotenoides

Para el análisis cromatográfico existen diversos factores a considerar para una elución eficiente de los CC, previos al análisis, como la preparación y extracción de

CC de la muestra, el proceso de saponificación en caso de ser necesario, el uso de los eluyentes en la fase móvil, la composición de la columna, el tipo de fase estacionaria, entre otros (Pérez-Gálvez y cols., 2017).

Extracción y saponificación

Antes del análisis, los CC deben extraerse de la matriz del alimento. Debido a la inestabilidad inherente de estos compuestos, es importante asegurar la mínima degradación de estos para garantizar resultados analíticos precisos (Adadi y cols., 2018). En general, se deben considerar cuatro pasos imprescindibles para minimizar la degradación de los CC durante su extracción, almacenamiento y análisis: 1) la adición de un neutralizador, como carbonato de calcio (CaCO_3), bicarbonato de sodio (NaHCO_3) o carbonato de magnesio (MgCO_3) durante la extracción para neutralizar los ácidos presentes del propio alimento, o incluso adicionados; 2) un antioxidante, como terc-butilhidroquinona (TBHQ), butil hidroxitolueno (BHT), pirogalol o palmitato de ascorbilo, añadido a los disolventes de extracción en concentraciones aproximadas de 0,1% (p/v) (Cernelic y cols., 2013); 3) minimizar el tiempo de extracción, esto para evitar la oxidación enzimática y, 4) proteger las muestras de exposición directa a la luz ultravioleta (Arimboor y cols., 2015; Adadi y cols., 2018; Saini y Keum, 2018). Los CC son generalmente menos estables en extractos que en alimentos o matrices biológicas y, por lo tanto, las muestras deben analizarse inmediatamente después de la extracción para limitar la formación de productos de su degradación (Meléndez-Martínez y cols., 2017).

Como los CC son compuestos lipofílicos, por lo general se extraen con una mezcla de disolventes orgánicos (Rodríguez-Bernaldo de Quirós y Costa, 2006). Debido al alto contenido de agua de las frutas y verduras, se necesitan disolventes miscibles en agua, para que el solvente penetre por completo al interior de la matriz, por lo general, se utiliza una mezcla de solventes de distintas polaridades para lograr los mejores resultados como acetona, tetrahidrofurano, hexano, metanol,

diclorometano, entre otros (Lee y cols., 2001; Hart y Scott, 1995; Oliveira y cols., 2003).

La saponificación se utiliza con frecuencia durante el proceso de extracción para evitar la interferencia de compuestos en el análisis de HPLC posterior, es decir, simplificar el análisis de los CC (Rodríguez- Amaya y Kimura, 2004). Esta etapa se aplica para la eliminación de los lípidos en las muestras con alto contenido graso (Mercadante, 2008; Rodríguez-Amaya, 2010). Los lípidos presentes en algunas muestras pueden modificar los tiempos de retención de los CC y acortar la vida útil de la columna cromatográfica. Sin embargo, también se eliminan aquellos CC esterificados a ácidos grasos, resultando en un análisis de CC más simple. Estos inconvenientes pueden resolverse si se lleva a cabo una saponificación previa (Meléndez-Martínez y cols., 2014; Mínguez-Mosquera, 1997; Rodríguez-Amaya, 2001). En la Figura 2.4, se muestra un ejemplo del análisis de una muestra saponificada y no saponificada, un cromatograma de extracto de jugo de naranja, en el que se observa que, en el caso del extracto no saponificado, aparecen muchos picos que tienden a aglomerarse en comparación con el extracto saponificado. Existen diversas modificaciones en las metodologías de saponificación, sin embargo, todas ellas se sustentan en dos tipos de saponificación, “fría y caliente”. En la saponificación fría o a temperatura ambiente, el extracto de CC se resuspende preferentemente con disolventes de baja polaridad, como éter dietílico, diclorometano o THF y se agrega una alícuota de una solución metanólica con hidróxido de potasio (KOH) del 10%-40%. La mezcla se deja reposar en total oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 h (Kimura, y cols. 1990; Meléndez-Martínez y cols., 2017; Cervantes-Paz y cols., 2012; 2014). En el caso del procedimiento de saponificación con temperatura, se sigue el mismo procedimiento, excepto que, en lugar de dejar la mezcla en reposo durante 16 h, esta se lleva a un proceso térmico en baño de vapor a 56°C durante 10 min (Kimura y cols., 1990). Ambos tipos de saponificación son eficientes con respecto a este tipo de compuestos. Sin embargo, un inconveniente particular de la saponificación en

caliente es el control riguroso de las condiciones. Cualquier ligero cambio, especialmente en la temperatura y el tiempo, puede alterar los resultados.

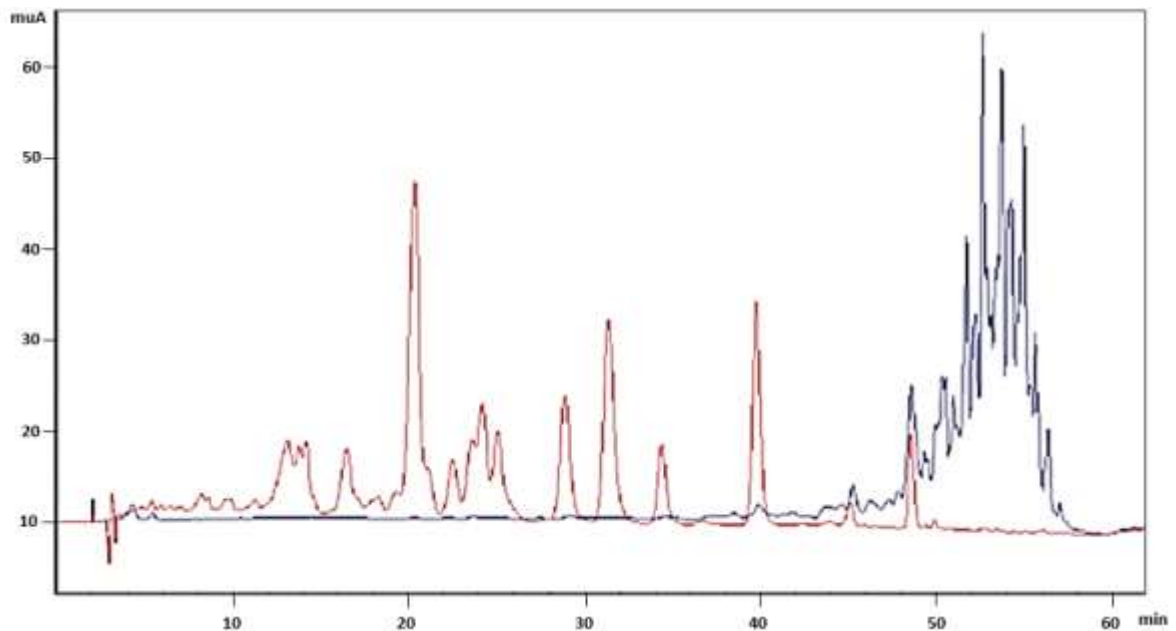


Figura 2.3. Cromatogramas a 450 nm correspondientes a un extracto de jugo de naranja antes (azul) y después de saponificar (rojo).

Fuente: Meléndez-Martínez y cols., 2017b

Fase móvil y estacionaria

Una vez realizado el proceso de extracción y saponificación en condiciones óptimas para el tipo de muestra, el siguiente punto crítico es la selección de la fase móvil. Las características más importantes a considerar en la fase móvil son su polaridad, viscosidad, volatilidad y toxicidad. Además, debe ser inerte con respecto a los CC (Giuffrida, Zoccali, y Mondello, 2020). La fase móvil debe ser compatible con el método de detección, y que la mezcla óptima de elución sea completamente clara e incolora (Pfander, 2012). También es necesario que los CC sean completamente solubles en la fase móvil utilizada para la separación cromatográfica (Amaya-Rodríguez, y cols. 2001).

La separación e identificación cromatográfica de los CC se puede llevar a cabo por HPLC en fase reversa (FR), en la cual se utiliza como fase estacionaria un material de naturaleza apolar y como fase móvil disolventes polares, como mezclas de metanol, acetonitrilo, acetona, diclorometano y agua, aunque se prefieren los sistemas no acuosos para la separación cromatográfica de los carotenos (Pfander, 2012; Minguez-Mosquera y cols., 2008). El análisis de CC también puede realizarse por fase normal (FN), en la cual la fase estacionaria es de naturaleza polar por lo que requiere una fase móvil no polar o de baja polaridad (Pérez-Gálvez y cols., 2017). Sin embargo, esta última no es eficiente en su totalidad para el análisis de estos compuestos (Sander y cols., 2000).

El mecanismo de separación cromatográfica se basa en el grado de hidrofobicidad de los CC, siendo los CC polares (xantofilas) los que muestran menor retención y posteriormente eluyen los carotenos y los ésteres de xantofilas. Una de las ventajas de la FR sobre la FN es la posibilidad del uso de agua en la composición de la fase móvil (Minguez-Mosquera y cols., 2008). Una de las primeras columnas (fase estacionaria) utilizadas para el análisis de CC, fue la columna C18 con modo isocrático o de gradiente para la separación de CC (Khachik, y otros, 1997). Sin embargo, no es eficiente en la resolución de los isómeros geométricos y resuelve de manera ineficiente los isómeros posicionales, en particular la luteína y la zeaxantina. Para maximizar la resolución cromatográfica y la selectividad, Sander y cols., (1994) desarrollaron una columna para HPLC en FR (HPLC-FR) denominada C30, para el análisis de CC y sus isómeros. Las columnas poliméricas C30 también poseen la capacidad de resolver CC en sus formas *cis* / *trans* (Rajendran y cols., 2005). Esto se debe al aumento de la selectividad debido al tamaño de los grupos enlazados con la fase de sílice que aumenta la hidrofobicidad de la fase estacionaria, permitiendo una mayor interacción con los CC (Sander y cols., 1994). Sin embargo, la desventaja de la columna C30 en relación con la columna C18 es el tiempo de análisis, en general es más largo, el tiempo de análisis por inyección suele ser de 60 minutos o más para la separación completa de los CC (Gupta y cols., 2015).

Detectores

Los detectores, que tienen la función de transformar la señal analítica en una señal eléctrica, se han diseñado y perfeccionado con el fin de incorporar celdas de flujo que permitan medir las bajas concentraciones de los analitos. Según la propiedad a estudiar, encontramos distintos tipos (Nunes y Mercadante, 2006):

- a) Basados en la propiedad de la fase móvil: detector de Índice de Refracción (IR), detectores electroquímicos y detectores de dispersión de luz.
- b) Basados en la propiedad del soluto: detector de absorbancia en Ultravioleta-Visible (UV-Vis), detector de absorbancia en Índice de Refracción (IR) y detector de fluorescencia (O'Neill y cols., 2001).

Los detectores de espectrofotometría UV-Vis son, sin duda, los más utilizados en el análisis de CC por HPLC, esto debido a las características de absorción de luz de estos pigmentos. Actualmente, el detector UV-Vis más popular es el detector de arreglo de diodos UV-Vis (DAD), que recopila datos de forma continua durante todo el análisis, facilitando así la determinación de la pureza y la identificación de compuestos desconocidos (Kopec, y cols., 2012). En un detector DAD, la radiación pasa a través de la muestra en la celda de flujo, se dispersa por una rejilla y penetra en la matriz de diodos. Cada diodo mide un rango estrecho de longitudes de onda del espectro, por lo que es posible adquirir una amplia banda de datos espectroscópicos simultáneamente. Los detectores UV-Vis son altamente sensibles, tienen una amplia gama lineal, presentan una buena estabilidad frente a los cambios de temperatura y admiten gradientes de elución de muy diferente composición (Pfander, 2012).

La matriz del alimento

Actualmente, la cromatografía por HPLC es, quizás, la técnica más aceptable para la separación y análisis de CC. La cromatografía por HPLC-FR con fase móvil

isocrática y un gradiente de elución se utiliza con frecuencia para el análisis de CC (Breithaupt y Schwack 2000; Schweiggert, y cols., 2005). La elección del sistema de cromatografía líquida más adecuado para una separación de CC está muy relacionada con la complejidad de la matriz a analizar (Giuffrida, y cols. 2015). Sin embargo, la mayoría de los métodos diseñados para el análisis de CC están destinados a matrices simples como lo son frutos y diversos vegetales, siendo escasos los métodos desarrollados para analizar matrices complejas en alimentos y además con altas cantidades de lípidos.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

El chile es uno de los principales ingredientes en platillos mexicanos, son el ingrediente principal de las salsas, alimento tradicional, que resulta de gran interés desde el punto de vista nutricional y de salud, debido a su elevado contenido de CC, los cuales participan en la prevención de diversas enfermedades degenerativas. Sin embargo, sólo aquellos CC que logran ser liberados de la matriz del alimento y son absorbidos durante la digestión gástrica o intestinal, son potencialmente biodisponibles para ejercer efectos beneficiosos.

Diversos estudios han analizado los ingredientes de las salsas de forma aislada o particular. Sin embargo, no se ha demostrado como la salsa “macha”, que es una matriz alimenticia afín a los CC presentes en chiles, podría favorecer su liberación y absorción durante el proceso gastrointestinal. Por esta razón, la presente propuesta pretende brindar una respuesta al creciente interés del estudio de la BA y bioconversión de CC presentes en la salsa “macha” y su parte contrastante, las salsas elaboradas a base de agua, mediante un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*. Sin embargo, los métodos de HPLC desarrollados para el análisis de CC en matrices con alto contenido lipídico son limitados, y ninguno de los que se encuentran disponibles resulta eficiente para la separación e identificación de CC en salsas con matriz lipídica. En este sentido, la matriz del alimento tiene una influencia relevante en la separación e identificación de CB por técnicas cromatográficas, por ello, es necesario el desarrollo de métodos que permitan separar, identificar y cuantificar los diferentes CC presentes en una matriz predominantemente lipídica, en este caso en salsa “macha”.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

La utilización de la salsa “macha” como una matriz alimenticia lipídica afín a los CC, la cual es una forma tradicional de consumo de chile en México, así como la aplicación de tratamientos térmicos para su elaboración, favorecerán la liberación de CC de la matriz de la salsa, con lo cual se incrementará su BA. En este sentido, el desarrollo de un método de HPLC, incluyendo un gradiente con los diferentes disolventes que constituyen la fase móvil, resultará eficaz para la separación, identificación y cuantificación de los CC presentes en salsas.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la bioaccesibilidad de los CC y desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para el análisis de CC en matrices lipídicas complejas (salsas de chile 'Árbol' y 'Morita').

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el contenido de carotenoides totales, la capacidad antioxidante y el efecto del tratamiento térmico en salsas de chile de 'Árbol' y 'Morita' preparadas a base de aceite y agua.
- Evaluar la bioaccesibilidad de los carotenoides presentes en las salsas de chile de 'Árbol' y de chile 'Morita', por medio de un modelo de digestión *in vitro*.
- Desarrollar un método cromatográfico por cromatografía de líquidos de alta resolución eficiente para la separación, identificación y cuantificación de carotenoides presentes en las salsas.

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estableció un diseño unifactorial, en el cual se consideraron como variables independientes las seis salsas elaboradas. Las variables respuesta que se consideraron en la investigación para la caracterización de las salsas fueron el contenido de carotenoides totales (CCT) y capacidad antioxidante (CAOx), y para el análisis de la bioaccesibilidad (BA) se consideró el contenido de CCT presente en la fracción intestinal (FI_{nt}), la fracción indigestible insoluble (FI_{II}) así como la fracción indigestible soluble (FI_S).

Este estudio se dividió en tres etapas que se describen a continuación:

6.2. PRIMERA ETAPA: ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SALSAS

6.2.1. Material vegetal y elaboración de las salsas

Se seleccionaron dos variedades de chile deshidratado ('Árbol' y 'Morita') de mayor uso en la gastronomía mexicana. Las materias primas utilizadas (chiles, ajo, aceite y sal) fueron adquiridas en el mercado "Nayarabastos" de la ciudad de Tepic, Nayarit. Los chiles y ajos utilizados no presentaron daños físicos.

Con cada variedad de chile se elaboraron tres salsas, dos de ellas se prepararon

con aceite de girasol y una con agua, como ingrediente predominante. Las salsas se elaboraron siguiendo una receta tradicional de salsa “macha” considerando dos temperaturas: 100 °C y 140 °C para la elaboración de las salsas de aceite, y una temperatura de 100 °C para elaborar la salsa de matriz acuosa. Las formulaciones de cada una de las salsas se muestra en el Cuadro 6.1.

Cuadro 6.1. Formulaciones expresadas en porcentaje (%) para la elaboración de las salsas.

Salsas ²	Ingredientes ¹				
	Aceite de girasol	Agua	Chile	Ajo	Sal
HMr	-	61.20	26.76	9.36	2.68
SMr T1	61.20	-	26.76	9.36	2.68
SMr T2	61.20	-	26.76	9.36	2.68
HAr	-	61.20	26.76	9.36	2.68
SAr T1	61.20	-	26.76	9.36	2.68
SAr T2	61.20	-	26.76	9.36	2.68

¹Cantidades expresadas en porcentajes.

²HMr (salsa control de chile 'Morita'), SMr T1 (salsa macha de chile 'Morita' 100 °C), SMr T2 (salsa macha de chile 'Morita' 140 °C), HAr (salsa control de chile 'De Árbol'), SAr T1 (salsa macha de chile 'De Árbol' 100 °C), SAr T2 (salsa macha de chile 'De Árbol' 140 °C)

Para la elaboración de las salsas, la cantidad total de chile, tanto de ‘Árbol’ como Morita, se dividió en tres lotes. Se utilizaron dos lotes para eleborar dos salsas con aceite como ingrediente predominante en su matriz, a las cuales se les denominó como “salsa macha”. El primer lote de chiles de cada variedad junto con el ajo se sometieron a un proceso de freído en aceite a 100 °C por 5 min y el segundo lote a 140 °C por 5 min, posteriormente se retiraron del fuego, y se agregó sal, y se trituraron y homogeneizaron (Nutribullet, NB- 101B, China) durante 3 min con intervalos de 30 segundos. El lote de chiles restante se usó para elaborar la salsa

con agua que fue considerada como “salsa control”. Para la elaboración de las salsas control, el tercer lote de chile de cada variedad junto con el ajo se sometieron a un proceso de decocción a 100 °C por 5 min, los ingredientes se retiraron del fuego, se agregó sal, y se trituraron y homogeneizaron (Nutribullet, NB- 101B, China) durante 3 min con intervalos de 30 segundos. Las salsas elaboradas se almacenaron en frascos protegidos de la luz. Las salsas se refrigeraron a 4 °C para su posterior análisis.

Las salsas fueron identificadas con las siglas HMr (salsa control de chile 'Morita' 100 °C), SMr T1 (salsa macha de chile 'Morita' 100 °C), SMr T2 (salsa macha de chile 'Morita' 140 °C), HAr (salsa control de chile 'De Árbol' 100 °C), SAr T1 (salsa macha de chile 'De Árbol' 100 °C) y SAr T2 (salsa macha de chile 'De Árbol' 140 °C).

6.2.2. Caracterización de carotenoides (CC) presentes en las salsas

Extracción y cuantificación de carotenoides totales (CCT)

La extracción de CC se realizó con el método propuesto por Cervantes-Paz y cols. (2014), con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de cada salsa, previamente homogeneizada, en tubos de teflón de 50 mL, y se agregaron 50 mg de bicarbonato de sodio, 10 mL de metanol y 7.5 mL de una solución de acetona/hexano (1:1 v/v) con 0.1% de BHT. Los tubos se agitaron (Orbital Heidolph, Reax2, Alemania) durante 1 h. Posteriormente, para la separación de los CC se agregaron 6 mL de sulfato de sodio al 10% (p/v) y 5 mL de hexano, la mezcla se colocó en agitación (15 min). Una vez transcurrido el tiempo, los tubos fueron centrifugados (6000 rpm, 5 min, 4 °C), se recuperó la fase orgánica (hexano). El proceso de lavado (separación de CC) se repitió hasta que la fase orgánica fuera incolora. La fase orgánica se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi Labortechnik, R-100, B-100, I-100-F105, Flawil, Suiza) a 35 °C. El extracto de CC obtenido fue resuspendido y aforado en 5 mL con acetona.

La cuantificación de CCT se hizo en un espectrofotómetro UV/Vis (Jenway UV/Vis, 6705, USA) a 452 nm. Se utilizó β -caroteno (C9750, Sigma-Aldrich) como estándar para la elaboración de una curva patrón para cuantificar el contenido de CCT como mg equivalentes de β -caroteno por g de muestra húmeda (mg E β C/g BH).

6.2.3. Análisis de capacidad antioxidante de carotenoides presentes en las salsas

Ensayo de eliminación de radicales 1,1'-difeníl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

La determinación de CAOx se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Prior y cols., (2005). El reactivo DPPH (D9131, Sigma Aldrich) fue disuelto en metanol grado reactivo, se utilizó a una concentración de 190 μ M. Se mantuvo en oscuridad total durante el desarrollo del ensayo. En los pocillos de la microplaca se añadieron 30 μ L del extracto de CC de cada salsa diluido previamente en 2-propanol. La microplaca se colocó en un lector de microplacas de detección múltiple (BioTek, Synergy HT, Winooski VT, EE. UU.) con el software Gen5, en el cual se realizó la adición automática del DPPH en cada pocillo. Después de 10 min de reacción, en condiciones de oscuridad, se tomaron lecturas de absorbancia a 517 nm. Se usó 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (238813, Sigma Aldrich) como estándar para elaborar una curva patrón para poder informar la actividad antioxidante como milimoles equivalentes de Trolox por g de muestra húmeda (mmol ET/g BH).

Actividad quelante: *Ensayo Ferric reducing/antioxidant power (FRAP)*

La determinación se llevó a cabo por el método propuesto por Benzie y Strain. (1996), con algunas modificaciones por Álvarez-Parrilla y cols. (2007). El reactivo

FRAP se preparó mezclando en una relación 10:1:1 (v/v/v) buffer de acetato (0.3 M, pH 3.6), solución de 2,4,6-Tripiridil-s-Triazina (TPTZ) (93285, Sigma Aldrich) (10 mM TPTZ en 40 mM HCl), y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mM); la solución fue incubada a 37 °C durante 30 min antes de su uso. En los pocillos de la microplaca se añadieron 24 μL de extracto de CC de cada salsa diluido en 2-propanol y las lecturas de absorbancia se tomaron después de 30 min de reacción. El equipo utilizado y el estándar fueron los mismos que se emplearon en el ensayo de DPPH.

6.3. SEGUNDA ETAPA: MODELO DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO*.

6.3.1. Bioaccesibilidad de carotenoides

Las salsas fueron sometidas a un ensayo de digestión *in vitro*, adaptado a partir de la metodología propuesta por Saura-Calixto y cols., (2000) (Figura 6.1).

Esta técnica simula las condiciones gastrointestinales fisiológicas, tomando en cuenta la acción enzimática, los cambios de pH y la temperatura del cuerpo humano. Este método constó de tres etapas que permitieron evaluar aquellos CC liberados de la matriz de las salsas, para así evaluar aquellos CC asociados a la FI_{nt}, FIS y FII. El modelo de digestión se describe a continuación:

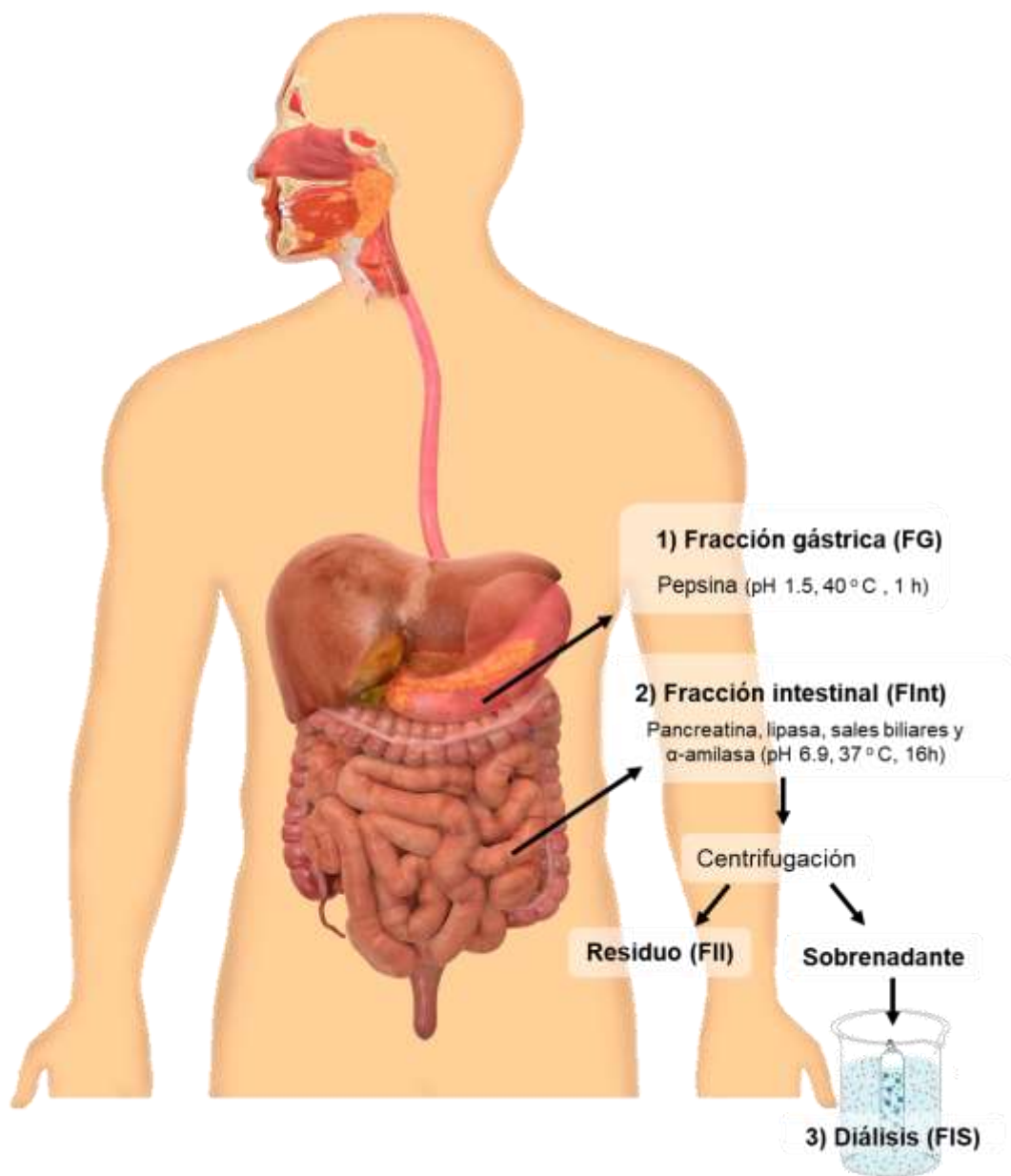


Figura 6.1. Modelo de digestión *in vitro*.

(Blancas-Benítez y cols., 2015).

Digestión gástrica: Las muestras se incubaron con 200 μ L de pepsina (300 mg/mL HCl–KCl 0.2 M buffer, pH 1.5, 40 °C, 1 h, P7000, Sigma-Aldrich), en esta etapa la muestra se consideró como la fracción gástrica (FG).

Digestión intestinal: Para la digestión de proteínas, lípidos y almidón, las muestras de la FG se sometieron a una hidrólisis con 1 mL de pancreatina (5 mg/mL en buffer

fosfato 0.1 M, pH 7.5, 37 °C, 6 h, P-1750, Sigma-Aldrich), 1 mL de lipasa (7 mg/mL en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.5, 37 °C, 6 h, L-3126, Sigma-Aldrich), 1 mL de sales biliares (17.5 mg/mL en buffer fosfato 0.1 M, pH 7.5, 37 °C, 6 h, B-8631, Sigma-Aldrich) y 1 mL de α -amilasa (120 mg/mL en buffer Tris-maleato 0,1 M, pH 6.9, 37 °C, 16 h, A6255, Sigma-Aldrich), después de este período, los CC en las muestras hidrolizadas se consideraron como la Flnt.

Diálisis: Después de la hidrólisis, las muestras se centrifugaron (15 min, 25 °C, 4000 rpm) para separar las FIS y FII. El residuo se utilizó para evaluar los CC asociados a la FII y el sobrenadante se dializó en un medio acuoso en una membrana de diálisis (48 h, 12–14 KDa, D9652, Sigma Aldrich) para simular la absorción pasiva. Los CC asociados con la FII y FIS corresponden a los CC no bioaccesibles. El contenido de CC en las diferentes fracciones: FG, Flnt, FII y FIS se evaluaron como el porcentaje de BA de CC *in vitro*, utilizando la siguiente ecuación (1):

$$BA (\%) = \frac{(F_{Int} - FIS)}{(F_{Int} + FII)} \quad \text{Ec. (1)}$$

F_{Int} : CC liberados en la fracción intestinal; FIS: CC asociados con la fracción indigestible soluble; FII: CC asociados con la fracción indigestible insoluble.

En cada fracción (Flnt, FIS y FII) se realizó la extracción de CC siguiendo el fundamento de la metodología propuesta por Cervantes-Paz y cols., (2014) con algunas modificaciones. Al sobrenadante (Flnt y FIS) y residuo (FII) obtenido de las etapas de digestión se les agregó 6 mL de solución de acetona-hexano (1:1 v/v) con 0.1% de BHT, 12 mL de sulfato de sodio al 10% y 10 mL de hexano, la mezcla se agitó (Orbital Heidolph, Reax2, Alemania) durante 15 min y posteriormente se centrifugó (6000 rpm, 5 min, 4 °C) (Hermle, Z326K, Alemania). La fase orgánica fue recuperada y evaporada a sequedad en un evaporador rotatorio (Büchi Labortechnik, R-100, B-100, I-100-F105, Flawil, Suiza) a 30 °C. El extracto obtenido

fue resuspendido se aforó a 5 mL con acetona, y se almacenó en oscuridad a 80 °C para su posterior análisis de CCT por espectrofotometría (sección 6.2.2).

6.4. TERCERA ETAPA: DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

6.4.1. Determinación de las condiciones cromatográficas

Se realizaron modificaciones en la composición del gradiente tomando en cuenta lo publicado en literatura para el análisis de CC para determinar la separación eficiente y en un tiempo óptimo para la elución de los CC de interés. De acuerdo con la literatura, los parámetros que se consideraron fueron:

1. Columna
2. Composición de la fase móvil
3. Longitud de onda de detección
4. Velocidad del flujo

Para estas pruebas, se inyectaron extractos de las salsas y estándares comerciales.

6.4.2. Selección de las condiciones cromatográficas

Las condiciones ideales para HPLC se seleccionaron inicialmente considerando aquellos gradientes en los que existiera una mayor cantidad de picos y mayor separación mediante la realización de diversas pruebas de mezclas de eluyentes en los dos tipos de matrices (agua y aceite). Las mezclas y proporciones en la fase móvil estuvieron compuestas por agua, acetonitrilo (ACN), metanol/2-propanol (60:40; v/v) (MeOH/2-POH) y metil *ter*-butil éter (MTBE), a partir de la cual se

seleccionaron los mejores gradientes. Los extractos de las salsas de las dos variedades de chile se inyectaron de forma individual, para observar los picos eluidos, sus tiempos de retención y espectros UV-Vis obtenidos en el DAD. Estos resultados permitieron establecer el orden de elución, facilitando su identificación en la mezcla.

Cuadro 6.42. Gradientes con mejor comportamiento de elución.

Gradiente	Tiempo	Eluentes (%) ¹			
		Agua (A)	ACN (B)	MeOH/2-POH (60:40; v/v) (C)	MTBE (D)
1	0	5	80	0	15
	10	5	45	0	50
	13	4	65	0	31
	16	2	80	0	18
	47	0	75	0	25
2	0	0	25	75	0
	10	0	25	30	45
	16	3	25	46	26
	20	3	25	53	19
	50	0	25	75	0
3	0	1	0	75	24
	10	2	0	62	36
	15	4	0	16	80
	30	0	0	6	94
4	0	4	0	75	21
	10	4	0	70	26
	15	1	0	60	39
	30	0	0	75	25
5	0	2	98	0	0
	10	4	71	0	25
	15	4	19	0	77
	30	0	75	0	25
6	0	1	99	0	0
	3	1	90	0	9
	10	2	95	0	3
	12.5	4	40	0	56
	15	5	5	0	90
	17	0	30	0	70
30	0	75	0	25	

7	0	0	75	0	25
	3	0	92	0	8
	10	0	17	0	83
	15	2	53	0	45
	20	4	77	0	19
	30	5	92	0	3
8	0	4	0	89	7
	15	4	0	47	49
	30	4	0	17	79
	55	4	0	7	89
9	0	4	0	90	6
	15	4	0	29	67
	33	2	0	21	77
	50	0	0	7	93
10	0	2	90	3	5
	15	2	47.5	3	47.5
	30	2	5	3	90
	35	2	90	3	5
11	0	4	85	6	5
	15	1	48	6	45
	27	0	38	6	56
	50	0	8	6	86
12	0	4	89	2	5
	15	4	68	2	26
	30	4	26	2	68
	45	4	5	2	89

¹Cantidades expresadas en porcentajes. ACN (acetonitrilo), MeOH/2-POH (60:40; v/v) (metanol/2-propanol (60:40; v/v)); MTBE (metil *ter*-butil éter)

6.4.3. Diseño experimental del método

Se realizaron pruebas diversas para conocer la influencia de los componentes de la fase móvil en la elución de los compuestos de interés. Se utilizaron como disolventes agua, acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH), 2-propanol (2-POH) y metil *ter*-butil éter (MTBE), con los cuales se probaron diversas mezclas y proporciones en la fase móvil, para seleccionar aquellas que permitieran una separación y elución óptima de los CC presentes en las salsas estudiadas. Con esta información se diseñaron diversos gradientes con todos los componentes de la fase móvil para

evaluar la elución de los CC, en donde se mantuvo constante durante el tiempo de corrida el volumen de inyección (20 µL), el flujo de eluentes (1 mL/min), la temperatura de la columna (20 °C)

Se realizó un análisis de composición central en el cual se consideraron como variables independientes los gradientes y dos compuestos constantes y predominantes que se tomaron como referencia en las salsas evaluadas. Las variables respuesta fueron el número de platos teóricos (N) y la resolución de los picos (R_s).

Para conocer la influencia de los componentes de la fase móvil en la elución de los compuestos de interés, se analizaron los mejores gradientes obtenidos en el apartado 6.4.2. Para estos gradientes, de acuerdo con Patil (2017) se calculó la eficiencia de separación considerando el número de platos teóricos (N) utilizando la siguiente Ecuación (1):

$$N = \frac{5.54 \left(\frac{t_R}{W_{0.5}} \right)^2}{L_{colm}} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde:

t_R: tiempo de retención (min)

W_{0.5}: el ancho del pico a media altura (cm)

L_{colm}: longitud de la columna (cm)

Así mismo, la información de los dos picos, que durante su elución fueran constantes y predominantes en todas las salsas analizadas, se utilizaron para calcular la resolución entre ellos, para lo cual se utilizó la Ecuación (2):

$$R_s = \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{0.5 * (W_1 + W_2)} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde:

t_{R2}: tiempo de retención del pico 2 (min)

t_{R1}: tiempo de retención del pico 1 (min)

W_1 : ancho del pico 1 en la línea base (cm)

W_2 : ancho del pico 2 en la línea base (cm)

6.4.4. Identificación de carotenoides por HPLC-DAD

Previo al análisis cromatográfico, los extractos de CC fueron sometidos a un proceso de saponificación propuesto por Cervantes-Paz y cols. (2012). Los extractos concentrados fueron resuspendidos en 30 mL de éter dietílico y se saponificaron con hidróxido de potasio en metanol al 40% (p/v) durante 16 h a 25 °C en condiciones de oscuridad. Los CC fueron extraídos de los extractos saponificados de la misma forma que se menciona el apartado 6.2.2, posteriormente se aforaron a un volumen de 5 mL con acetona HPLC (Meyer, CDMX, México) y se filtraron con un acrodisco (MF-Millipore, 0.45 μ m, 47 mm, Bedford, EE.UU.) para su inmediato análisis por HPLC-DAD.

La identificación de los CC se llevó a cabo por HPLC en un equipo Agilent serie 1260 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), equipado con un DAD. Los espectros UV-Vis para la identificación de los picos se registraron en un rango de λ = 190-620 nm para seleccionar la longitud de onda que proporcionó la mejor sensibilidad para cada uno de los CC eluidos. Se usó una columna de fase reversa Acclaim C30 (4.6 mm \times 150 mm, tamaño de partícula 5 μ m) y una precolumna Acclaim (4.6 mm \times 10 mm) a 20 °C. El control de los componentes del equipo, la recopilación de datos y la integración de los cromatogramas se realizaron con el software OpenLab CDS ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

Los picos eluidos (CC) se identificaron comparando sus tiempos de retención y espectros UV con los obtenidos de estándares comerciales (capsantina, β -criptoxantina y β -caroteno). Además, se realizó una comparación de las características espectrales, en aquellos compuestos en los que no se tuvo estándar

comercial para su comparación, usando la biblioteca de espectros con la que se cuenta en el Laboratorio de Fisiología y Bioquímica de Alimentos y los reportados en la literatura. Para la estimación de los CC identificados, se consideró el área relativa correspondiente de cada compuesto a su máxima longitud de onda de absorción.

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa STATISTICA, versión 12 (Statsoft. 1984-2011 Inc., Tulsa, OK, EE. UU.). Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se comprobaron mediante las pruebas de comparación de medias de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Las diferencias en las variables de respuestas se evaluaron mediante un análisis de varianza de una sola vía, seguido por una prueba de Fisher LSD para comparación de medias, cuando el ANOVA mostró un resultado significativo. El nivel de significancia estadística se estableció con un valor de $\alpha = 0.05$.

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SALSAS

7.1.1. Contenido de carotenoides totales (CCT) y capacidad antioxidante (CAOx) en salsas de chile (*Capsicum annuum* L.) de 'Árbol' y 'Morita'.

El CCT de las salsas evaluadas se muestra en el Cuadro 7.1. Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las salsas debido a los tratamientos aplicados para su elaboración. El CCT fue mayor en las salsas elaboradas con chile de "Árbol", su contenido osciló entre 6.86 a 7.90 mg E β C/g BH, destacando por su mayor contenido de CCT las salsas con matriz lipídica. En el caso de las salsas elaboradas con chile "Morita" su contenido fue menor (2.27 a 3.07 mg E β C/g BH), siendo la SMr T2 la que destacó por un mayor contenido de CCT, ya que las salsas HMr y SMr T1 fueron iguales ($p \geq 0.05$). En ambos grupos de salsas, las salsas control, elaboradas con agua como medio dispersante, tuvieron los valores más bajos de CCT. Estos resultados muestran que la variedad de chile, así como la matriz (agua o aceite) y tratamiento térmico afectaron el CCT de las salsas.

Los resultados de CCT reportados en esta investigación, para el caso de las salsas elaboradas con chile "Morita", se asemejan a lo reportado por Hervert-Hernández y cols. (2010), en frutos de chile 'De Árbol' y 'Morita' deshidratados, que reportaron valores de CCT de 3.40 y 3.47 mg/g BH, respectivamente. Las salsas elaboradas con chile de "Árbol" tuvieron un contenido mayor de CCT, este comportamiento puede atribuirse a factores como la variedad, el medio de dispersión de la matriz del alimento (aceite) que facilitó la liberación de CC de la matriz del alimento, y

posiblemente al proceso de deshidratado de los frutos de chile (Hwang y cols., 2012; Ruiz-Sola y Rodríguez-Concepción, 2012; Kidmose y cols., 2006). En el caso de las salsas elaboradas con chile “Morita”, la variedad utilizada en esta investigación pudo poseer un menor CCT que la empleada por Hervert-Hernández y cols. (2010). Otro factor que también pudo impactar de manera negativa, es el proceso de deshidratado, que en México generalmente es por exposición directa al sol, por lo tanto, la exposición a altas temperaturas y a la luz por largos periodos pudieron provocar una degradación de los CC, por lo cual se explicaría que a pesar de la presencia de un medio lipídico en las salsas el CCT sea bajo.

Otro factor importante que debe considerarse para explicar las diferencias en el CCT entre las salsas control (HAr y HMr) y las salsas “macha” (SMr T1, SMr T2, SAr T1 y SAr T2) es el tratamiento térmico al que fueron sometidos los ingredientes durante su elaboración. Se ha reportado que la decocción es un tratamiento térmico que puede reducir el CCT en frutos de chile (Kao y cols., 2012), registrándose pérdidas de CCT entre 11.6 y 40.9%, dependiendo de la variedad de chile (*Capsicum annum* L.) sometida a este tratamiento (Chuah y cols., 2008). En otro estudio realizado por Ornelas-Paz y cols. (2010), reportaron una pérdida del 3 al 53 % y del 2 al 46 % de CCT en chiles pungentes y no pungentes durante la decocción de sus frutos o asado a la parrilla, respectivamente. De igual manera, Cervantes-Paz y cols. (2014), reportaron que el proceso de decocción disminuyó la concentración de pigmentos (CC y clorofilas) totales entre 16.3 y 50 % en chiles jalapeños de color marrón.

Por el contrario, algunos estudios han demostrado que, a diferencia de tratamientos como la decocción o el asado de frutos de chile, otros tratamientos térmicos pueden favorecer la liberación de CC de su matriz (Chuah y cols., 2008), como lo es el tratamiento de fritura durante 5 min que favoreció la liberación de CC (Hwang y cols., 2012). Dado que los CC son compuestos lipofílicos, existe un cierto grado de transferencia de los CC de la matriz vegetal a la fase oleosa durante el proceso de fritura (Kidmose y cols., 2006). Lee y cols. (2003), comprobaron que el CCT en el aceite de freír aumentó (77.43%) a medida que se repetía el proceso de fritura

debido a la liberación de los CC presentes en la matriz que contenía harina de zanahoria. De igual forma, Zeb y Nisar (2017) evaluaron los efectos de un tratamiento de fritura a alta temperatura en hojas de espinaca usando aceite de girasol, reportaron un aumento en la concentración de β -caroteno 5,6-epóxido (1.44 a 6.64 mg/100g) con la aplicación del tratamiento térmico. La formación de este epóxido es imperativa durante el tratamiento térmico del β -caroteno (Zeb, 2012). Los epoxi-CC son compuestos más estables que los CC en los sistemas de modelo de estrés térmico (45, 60, 75 y 90 °C) (Hadjal y cols., 2013). Por tanto, el incremento en los CCT que se observan en las salsas “macha” pueden asociarse a la formación de estos compuestos a partir de β -caroteno y su mayor estabilidad térmica, este comportamiento coincide con la caracterización parcial realizada por Hervert-Hernández y cols. (2010), en la cual a pesar de no haber presentado diferencias entre el CCT en Chile de ‘Árbol’ y ‘Morita’ (3.40 y 3.47 mg/g BH, respectivamente), sí mostraron diferencias en el perfil cromatográfico de los CC identificados por HPLC, en la cual el Chile de ‘Árbol’ presentó un contenido de β -Caroteno, β -Criptoxantina y Zeaxantina (0.80, 0.10 y 0.10 mg/g, respectivamente) mayor a diferencia del Chile ‘Morita’ (0.20, 0.04 y 0.05 mg/g, respectivamente).

Algunos estudios han demostrado que los capsaicinoides pueden prevenir la degradación térmica de los CC en los frutos de chiles (Daood y cols., 2006) puesto que se ha evidenciado que la alteración celular por calentamiento en frutas y verduras favorece la interacción entre los CC y los capsaicinoides (Howard y cols., 1994). Sin embargo, hasta la fecha poco se ha estudiado el efecto del procesamiento térmico en el perfil de CC presentes en una matriz compleja como lo son las salsas.

Cuadro 7.1. Contenido de carotenoides totales (CCT) en salsas de chile 'Morita' y chile 'De Árbol'¹.

Salsa ²	CCT ³ (mg EβC/g BH)
HMr	2.27 ± 0.13 ^d
SMr T1	2.41 ± 0.13 ^d
SMr T2	3.07 ± 0.40 ^c
HAr	6.86 ± 0.36 ^b
SAr T1	7.58 ± 0.26 ^a
SAr T2	7.90 ± 0.23 ^a

¹Valores son la media ± desviación estándar (n=6). Letras minúsculas representan diferencias significativas por columna ($p < 0.05$).

²HMr (salsa control de chile 'Morita'), SMr T1 (salsa macha de chile 'Morita' 100 °C), SMr T2 (salsa macha de chile 'Morita' 140 °C), HAr (salsa control de chile 'De Árbol'), SAr T1 (salsa macha de chile 'De Árbol' 100 °C), SAr T2 (salsa macha de chile 'De Árbol' 140 °C)

³mg equivalentes de β-Caroteno/g base húmeda

Los resultados obtenidos de CAox en las salsas de chile de 'Árbol' y 'Morita' por los ensayos de DPPH y FRAP se muestran en el Cuadro 7.2. El ensayo DPPH identificó diferencias antioxidantes ($p \leq 0.05$) entre las salsas evaluadas. Las salsas "machas" tuvieron mayor actividad antioxidante en comparación con sus salsas control, principalmente las elaboradas con la variedad de chile de "Árbol" (11.72 y 111.17 mmol ET/g BH), entre las cuales no hubo diferencia ($p \geq 0.05$). En el caso de las salsas SMr T1 (5.55 mmol TE/g BH) y SMr T2 (6.24 mmol TE/g BH) si presentaron diferencias estadísticas entre ellas.

El ensayo de FRAP pudo identificar mayores diferencias antioxidantes ($p \leq 0.05$) en entre las salsas en comparación con el método DPPH. Aunque las salsas "machas" tuvieron mayor efecto quelante en este ensayo, se detectaron diferencias entre ellas. La salsa que presentó la mayor actividad quelante fue la SAr T2 (68.52 mmol ET/g BH), seguida de la SAr T1 (56.16 mmol ET/g BH) y la SMr T2 (36.31 mmol ET/g BH). Las salsas HAr y SMr T1 fueron iguales estadísticamente (26.51 y 26.68 mmol ET/g BH). La salsa que presentó la menor actividad quelante fue la salsa HMr

con 12.54 mmol ET/g BH. Estas variaciones pueden atribuirse a la cantidad y perfil de CC presentes en cada salsa. Cervantes-Paz y cols. (2012), reportaron que la decocción del chile jalapeño de coloración roja disminuyó la CAOx en los ensayos de DPPH y FRAP, mientras que el asado a la parrilla provocó cambios menores. Un comportamiento contrario fue reportado por Kourouma y cols. (2019), quienes después de freír pulpa de camote naranja en aceite, observaron que su CAOx, medida mediante el ensayo de DPPH, aumentó un 77.43 % en comparación con la pulpa fresca. Además de los fitoquímicos intrínsecos, los nuevos compuestos generados durante los tratamientos térmicos pueden contribuir a incrementar la CAOx (Tian y cols., 2016). Sin embargo, también puede disminuir la CAOx en algunos casos debido a la pérdida de CB durante el tratamiento térmico (Tang y cols., 2015).

Los CC forman parte del sistema de defensa antioxidante. Interactúan sinérgicamente con otros antioxidantes; las mezclas de CC son más eficaces que los compuestos individuales (Stahl y Sies, 2003). La actividad antioxidante de los CC ha sido ampliamente estudiada y asociada con los dobles enlaces conjugados en la estructura de los CC, ya que constituye un sistema reactivo rico en electrones susceptible de reaccionar con compuestos electrofílicos (Van den Berg y cols., 2000). Estos funcionan como captadores de oxígeno singlete y muchos de ellos están interrelacionados en ciclos de regeneración (Stahl y Sies, 2005).

Cuadro 7.2. Capacidad antioxidante (CAOx) en salsas de chile 'Morita' y chile 'De Árbol'¹.

Salsa ²	DPPH ³ (mmol ET/g BH)	FRAP ³ (mmol ET/g BH)
HMr	3.18 ± 0.14 ^a	12.54 ± 0.58 ^a
SMr T1	5.25 ± 0.05 ^b	26.5 ± 0.66 ^b
SMr T2	6.33 ± 0.40 ^c	36.32 ± 0.60 ^c
HAr	3.34 ± 0.01 ^a	25.17 ± 0.56 ^b
SAr T1	11.05 ± 0.10 ^d	56.14 ± 3.73 ^d
SAr T2	12.7 ± 0.11 ^e	68.52 ± 2.65 ^e

¹Valores son la media ± desviación estándar (n=3). Letras minúsculas representan diferencias significativas por columna (p<0.05).

²HMr (salsa control de chile 'Morita'), SMr T1 (salsa macha de chile 'Morita' 100 °C), SMr T2 (salsa macha de chile 'Morita' 140 °C), HAr (salsa control de chile 'De Árbol'), SAr T1 (salsa macha de chile 'De Árbol' 100 °C), SAr T2 (salsa macha de chile 'De Árbol' 140 °C)

³mg equivalentes de Trolox/g base húmeda

7.2. EVALUACIÓN DE LA BIOACCESIBILIDAD *IN VITRO* DE CC EN SALSAS

Los resultados de la BA *in vitro* de los CC en las salsas de chile de 'Árbol' y 'Morita' se muestran en el Cuadro 7.3. Durante la digestión intestinal, que es la etapa donde los CC son bioaccesibles, se evidenciaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en entre las salsas evaluadas. Las salsas "macha" elaboradas con chile de "Árbol" tuvieron bioaccesible una mayor cantidad de CC, destacando la SAr T2 (11.23 mg EβC/g BH). Las salsas HAr, SMr T1 y SMr T2 tuvieron un contenido de CC bioaccesibles semejante (2.25 a 2.92 mg EβC/g BH). La salsa HMr fue la que menor contenido bioaccesible de CC tuvo (0.54 mg EβC/g BH). Si bien las enzimas digestivas utilizadas como la pancreatina, lipasa, α-amilasa o las sales biliares actúan conjuntamente en la descomposición de los constituyentes de la matriz alimentaria, promoviendo la liberación de los CC, existen otros factores que pueden estar relacionados en la liberación y la BA de los CC (Bohn, 2015).

La aplicación de tratamientos térmicos y el proceso de homogenización mecánica a los ingredientes durante la elaboración de las salsas pudieron contribuir con el incremento de la BA de los CC en las salsas analizadas. Se ha evaluado que la cocción y la homogeneización mecánica pueden incrementar la biodisponibilidad de los CC; el mecanismo por el cual esto ocurre se debe probablemente a la liberación de los CC de la matriz alimentaria y los complejos de proteínas, ya que tanto el procesamiento térmico como la homogenización mecánica provocan la interrupción de la matriz alimentaria, la pérdida de la integridad celular y la ruptura de los complejos entre proteínas y CC, con lo cual puede incrementar su BA y biodisponibilidad durante el proceso de digestión (van het Hof y cols., 1999; Ornelas-Paz y cols., 2008; Yahia y Ornelas-Paz, 2010).

Dietz y cols., (1988) reportaron un aumento en la extracción de los CC en las zanahorias después de cocinarlas al vapor. Sin embargo, la exposición prolongada a altas temperaturas durante procesos de decocción, han mostrado una reducción en la biodisponibilidad de los CC al aumentar la oxidación y producción de más isómeros. Por lo tanto, el procesamiento térmico por periodos prolongados podría reducir el contenido de CC en las matrices alimentarias. Sin embargo, se ha observado que la aplicación de tratamientos térmicos y mecánicos no favorece la BA y la biodisponibilidad de las xantofilas (Castenmillern y West, 1997). Para seleccionar un metodo de cocción adecuado es necesario alcanzar un equilibrio óptimo entre las condiciones de extracción de CC, que permitan la liberación máxima de los CC de la matriz alimentaria y la estabilidad de estos CB (Perera y Yen, 2007).

Las fracciones de CC no bioaccesibles corresponden a la FIS y FII. En las seis salsas estudiadas se observó que el contenido de CC asociados a estas dos fracciones fue menor que los CC BA en la fracción intestinal. Esto puede explicarse en parte, debido a que los CC quedan atrapados en la fibra dietética, dificultando su liberación de la matriz alimentaria, debido a que el principal efecto fisiológico de la fibra dietética en el intestino delgado se relaciona con la disminución en la tasa de

digestión y absorción de los nutrientes y CB, además de generar un incremento de la viscosidad de la matriz (Eastwood y Morris, 1992), por lo cual se dificulta, aún más la liberación de CC.

Los valores del contenido de CC obtenidos en la FIS fueron diferentes ($p \leq 0.05$) para las salsas evaluadas. En esta fracción, las salsas SMr T1, HAr, SAr T1 y SAr T2 tuvieron el mayor contenido de CC, que fue igual ($p \geq 0.05$) entre ellas, que osciló entre 1.57 a 1.8 mg E β C/g BH. Las salsas HMr y SMr T1, por otro lado, tuvieron contenidos de CC inferiores (0.44 y 1.33 mg E β C/g BH, respectivamente). Esta fracción representa los CC que no pudieron cruzar la membrana de diálisis (12,000-14,000 KDa), asociándose así, a los compuestos propios de la matriz del alimento como lo es la fibra dietética. Las interacciones entre los CC y los componentes de la pared celular (fibras vegetales) desempeñan un papel importante en el control de la liberación de los CC de la matriz alimentaria para su absorción en el tracto gastrointestinal (Phan y cols., 2015).

El contenido de CC asociado a la FII de las salsas de chile de 'Árbol' fue mayor en comparación con las salsas de chile "Morita". Las salsas SAr T1 y SAr T2 retuvieron una mayor cantidad de CC en esta fracción (2.71 y 2.62 mg E β C/g BH, respectivamente). Mientras que en las salsas elaboradas con chile "Morita", la retención de CC fue menor y semejante ($p \geq 0.05$) entre las tres salsas. La FII corresponde a los CC asociados a la fibra dietética insoluble (González-Aguilar y cols., 2017). Es de gran importancia conocer las fracciones no digeribles, debido a que los CB que no son absorbidos en el tracto gastrointestinal, llegan al colon, y es ahí donde estos son fermentados por la microbiota colónica (Padayachee y cols., 2013), produciendo compuestos con posibles efectos biológicos favorables a la salud.

Cuadro 7.3. Bioaccesibilidad *in vitro* de carotenoides (CC) de salsas de Chile¹.

Fracción de Carotenoides	CC (mg EβC/g BH)					
	HMr ²	SMr T1 ³	SMr T2 ⁴	HAr ⁵	SAr T1 ⁶	SAr T2 ⁷
<i>Carotenoides bioaccesibles</i>						
Fracción intestinal	0.54 ± 0.01 ^d	2.37 ± 0.14 ^c	2.92 ± 0.17 ^c	2.25 ± 0.01 ^c	7.75 ± 0.23 ^b	11.23 ± 0.57 ^a
<i>Carotenoides no bioaccesibles</i>						
Fracción indigestible soluble	0.44 ± 0.00 ^c	1.8 ± 0.07 ^a	1.33 ± 0.1 ^b	1.68 ± 0.01 ^a	1.67 ± 0.04 ^a	1.57 ± 0.17 ^a
Fracción indigestible insoluble	0.36 ± 0.02 ^c	0.21 ± 0.01 ^c	0.11 ± 0.02 ^c	2.15 ± 0.06 ^b	2.71 ± 0.22 ^a	2.62 ± 0.15 ^a
Bioaccesibilidad de CC(%) ⁸	10.97 ± 0.42 ^d	21.98 ± 3.39 ^c	52.18 ± 5.67 ^b	13.02 ± 0.41 ^d	58.10 ± 1.30 ^b	69.68 ± 3.16 ^a

¹Los valores representan la media ± error estándar (n=3). Diferentes letras en la misma fila indican una diferencia significativa entre las muestras ($p < 0.05$). ²Salsa control de Chile 'Morita', ³Salsa macha de Chile 'Morita' 100 °C, ⁴Salsa macha de Chile 'Morita' 140 °C, ⁵Salsa control de Chile 'De Árbol', ⁶Salsa macha de Chile 'De Árbol' 100 °C, ⁷Salsa macha de Chile 'De Árbol' 140 °C ⁸El porcentaje de bioaccesibilidad se calculó: $\frac{(CCT_{Int}) - (CCT_{FIS})}{(CCT_{Int} + CCT_{FII})} \times 100$. Donde CCT_{Int}: Carotenoides totales de la etapa intestinal. CCT_{FIS}: Carotenoides totales de la fracción indigestible soluble, CCT_{FII}: Carotenoides totales de la fracción indigestible insoluble.

Para analizar el porcentaje de BA, es necesario tomar en cuenta el contenido de CC correspondientes a las fracciones digeribles y no digeribles. El porcentaje de BA en las 6 salsas evaluadas variaron de 10.97 a 69.68 %. Las salsas SAr T1 y SAr T2 tuvieron mayor porcentaje de BA de CC, seguidas de SMr T1 y SMr T2 con un 21.98 y 52.18 %, respectivamente. Las salsas elaboradas a base de agua presentaron menor BA de CC (10.97 y 13.02 % para HMr y HAr, respectivamente).

Los CC deben incorporarse a la fase lipídica de los contenidos gastrointestinales emulsionados y luego a las micelas. Solo la fracción reducida de CC que cumpla con estas condiciones tendrá el potencial de llegar a los enterocitos y realizar una acción biológica. Estos pasos clave del proceso de absorción de CC pueden verse favorecidos u obstaculizados por diversos factores (Cervantes-Paz y cols., 2016). Los CC debido a su naturaleza lipofílica, son mejor absorbidos en presencia de lípidos, lo que sugiere que la co-ingestión de estos con alimentos ricos en grasa podrán incrementar su absorción y aprovechamiento en el organismo (Roodenburg y cols., 2000; Furr y Clark, 1997). La grasa dietaria es el principal factor, que puede limitar o favorecer la BA de CC, ya que puede favorecer la difusión de CC desde la matriz alimentaria hasta el contenido emulsionado del tracto gastrointestinal. La presencia de lípidos también puede estimular la secreción de ácido estomacal, de sales biliares y enzimas pancreáticas en el duodeno, y de esta manera facilitar la formación de micelas. Los lípidos hidrolizados pueden competir con los CC por las proteínas transportadoras durante la absorción. La grasa en la dieta promueve la secreción de quilomicrones y, en consecuencia, la BA de CC (Yahia y Ornelas, 2010).

Los lípidos que se adiciona a las matrices de los alimentos pueden incrementar los beneficios del procesamiento de los alimentos vegetales. Colle y cols. (2013), informaron que la combinación de homogeneización a alta presión y la adición de aceite de coco, oliva o pescado aumentaron la BA del licopeno de la pulpa de tomate en comparación con muestras no tratadas con alta presión y muestras sin adición lípidos. Así mismo, la BA del licopeno de la pulpa de jitomate aumentó a medida

que la temperatura de procesamiento térmico aumentó de 60 a 140 °C, con una BA del licopeno *cis* y *trans* casi 2 veces mayor en puré tratado a 140 °C, en comparación con las muestras crudas (Colle y cols., 2010). El procesamiento térmico altera la BA de los CC. En este sentido, Bengtsston y cols., (2009) informaron que la BA del β -caroteno en zanahorias era casi un 50 % menor después del calentamiento por microondas en comparación con la ebullición y el vapor. Todos estos estudios sugieren que el efecto del procesamiento térmico sobre la BA de CC depende del tipo de CC y de la matriz de los alimentos.

Si bien se han identificado los factores que intervienen directamente en la BA de CC en la dieta, los estudios existentes son simples y no reproducen exactamente las condiciones *in vivo*. Es así que la determinación de la biodisponibilidad y BA de CC de fuentes no tradicionales o matrices alimenticias complejas es un campo de investigación importante en la actualidad.

7.3. DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

Matrices complejas ricas en compuestos lipídicos y otros compuestos bioactivos como son los CC, no siempre se logran separar mediante métodos cromatográficos y el desarrollo de una metodología afín a las muestras de este estudio, fue necesario para lograr cuantificar los CC presentes, ya que como bien se ha descrito previamente en matrices vegetales como son frutas y hortalizas, la cuantificación e identificación de CC es mucho más simple, en ese sentido, por ello se planteó el desarrollo de un método que permita la óptima separación de los CC.

7.3.1. Determinación de las condiciones cromatográficas

Columna

Se adquirió una columna de fase reversa Acclaim C30 (4.6 mm x 150 mm, tamaño de partícula 5 µm), debido a su mayor eficiencia en las separaciones de CC (Turcsi y cols., 2016; Wald y cols., 2018). Esta columna tiene mayor selectividad hacia los CC *cis-trans* en comparación con otro tipo de columnas como la C18 (Lee y cols., 2001). Por lo general, en el análisis de fase reversa, la secuencia de picos cromatográficos refleja una polaridad decreciente de los compuestos eluidos, y primero se eluyen más xantofilas polares. Sin embargo, en una columna C30, la longitud de la cadena de polieno es el parámetro esencial para el tiempo de retención observado y la separación de isómeros (Turcsi y cols., 2016).

Composición de la fase móvil

Para una combinación eficiente de la fase estacionaria seleccionada y la fase móvil, se debe considerar el uso de un solvente polar, un solvente con menor polaridad para actuar como solubilizador y para controlar la retención ajustando la concentración del solvente, y una cantidad de un tercer solvente con hidrógeno para optimizar la selectividad (Gupta y cols., 2015).

Con base en esto y en los solventes comúnmente utilizados para el análisis de HPLC para CC, se realizaron ensayos con diversos solventes disponibles en el laboratorio de fisiología y bioquímica de alimentos. Se iniciaron las pruebas con gradientes de acuerdo a la literatura. En la Figura 7.1 se muestran los cromatogramas representativos de cada composición de gradiente. La primera composición de eluentes estuvo conformada por MeOH/2-POH (60:40 v/v), MTBE y agua (**A**), sin embargo, la mezcla y proporción de estos no fue eficaz para la separación eficiente de los compuestos presentes en las salsas con alto contenido de lípidos. El segundo ensayo de gradientes se utilizó ACN, MTBE y agua (**B**), sin embargo, no hubo una buena resolución en los cromatogramas con respecto a los ensayos de la fase anterior. En el tercer ensayo, se optó por utilizar los cuatro

eluyentes compuesta ACN, MTBE, MeOH/2-POH (60:40 v/v) y agua **(C)**, mostrando los mejores resultados.

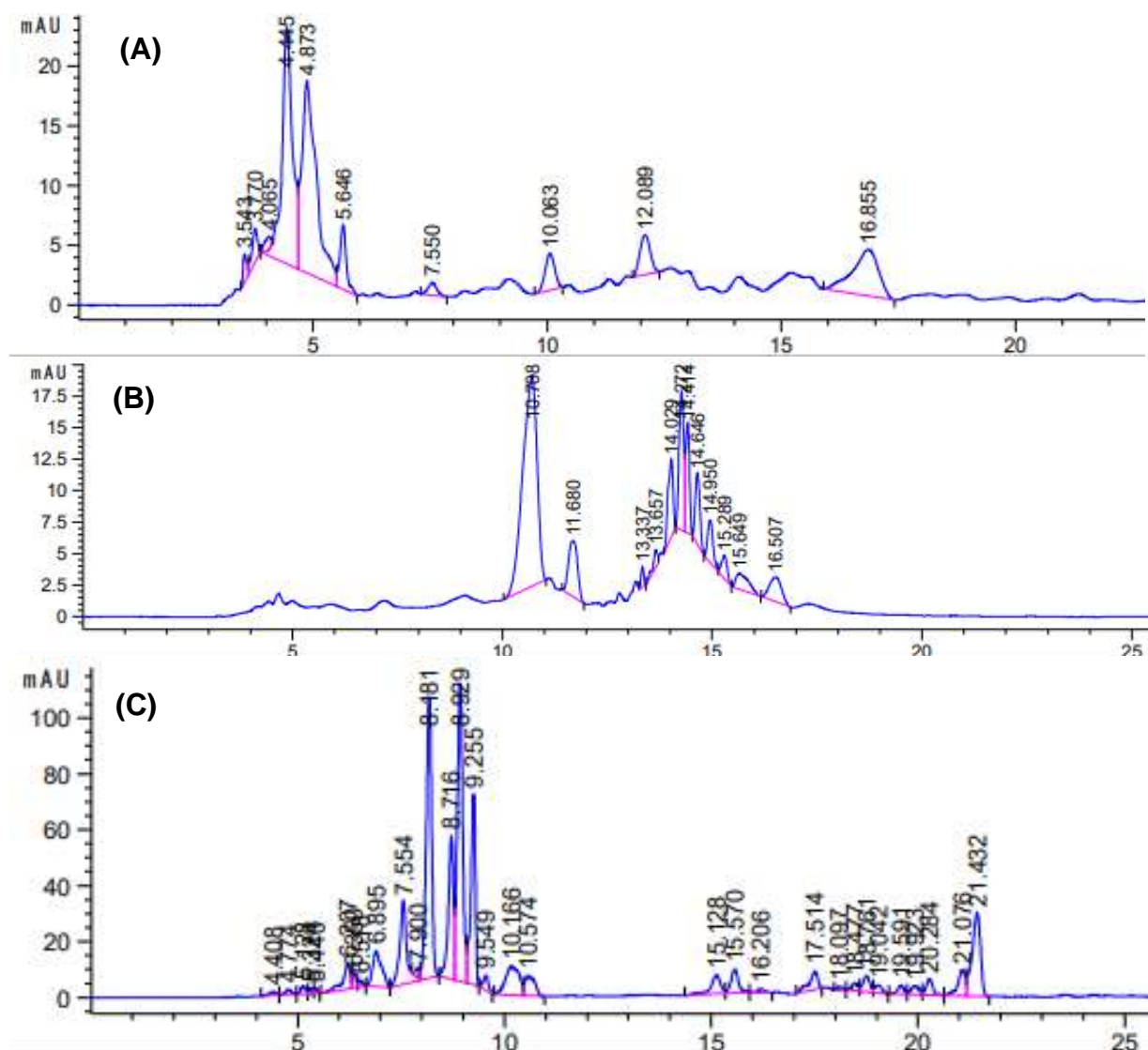


Figura 7.1. Cromatogramas representativos de cada ensayo de gradientes. **(A)** Ensayo 1: Sin acetonitrilo, **(B)** Ensayo 2: Sin Metanol/2-propanol (60:40; v/v), **(C)** Ensayo 3: Mezcla de los cuatro eluyentes.

Longitud de onda

El análisis se realizó empleando 5 diferentes longitudes de onda, 440, 445, 447, 452, 454 y 474 nm, las cuales son consideradas como las longitudes de absorción máxima de la mayoría de los CC de interés.

Velocidad del flujo y temperatura de columna

El flujo se definió en 1 mL/min por recomendaciones del fabricante para lograr una buena separación y resolución entre cada pico, además de permitir la reducción del tiempo de análisis.

7.3.2. Selección de las condiciones cromatográficas

Se realizaron diversos ensayos en la modificación del gradiente, seleccionando así la composición de la fase móvil con agua (A), ACN (B), MeOH/2-POH (60:40 v/v) (C) y MTBE (D) en diversas proporciones. Finalmente, se seleccionaron los gradientes que eluyeron la mayor cantidad de picos. Los gradientes con mayor elución de picos se muestran en el Cuadro 7.4. Los espectros de absorción UV-vis de los compuestos estudiados mostraron una mayor absorbancia a las longitudes de onda de 452, 454 y 474 nm, las cuales fueron establecidas para la cuantificación de todos los compuestos de interés.

7.3.3. Diseño experimental del método

Para el desarrollo del método se empleó un análisis de composición central con una metodología de superficie de respuesta con valores de deseabilidad, todo esto con el fin de reducir el número de gradientes experimentales, y evaluar así, los efectos del número de platos teóricos (N) y para la evaluación de la resolución de los picos

(R_s) se seleccionó la capsantina y el β -caroteno, al ser los picos con el comportamiento constante y predominantes en todas las muestras de salsas.

Cuadro 7.4. Número de platos teóricos (N) y resolución (R_s) de cada gradiente.

Gradiente	Compuesto	N ¹	R_s ²
1	β -caroteno	154235.49	84.06
	Capsantina	9650.91	
2	β -caroteno	49779.33	79.85
	Capsantina	4047.40	
3	β -caroteno	494064.05	20.41
	Capsantina	28224.73	
4	β -caroteno	52344.16	22.43
	Capsantina	31323.28	
5	β -caroteno	15559.84	18.01
	Capsantina	28239.57	
6	β -caroteno	13712.10	32.83
	Capsantina	2669.98	
7	β -caroteno	1892267.38	16.98
	Capsantina	13161.47	
8	β -caroteno	49714.61	19.55
	Capsantina	30008.78	
9	β -caroteno	97663.99	88.89
	Capsantina	61135.69	
10	β -caroteno	36427.18	101.03
	Capsantina	3450.93	
11	β -caroteno	124267.85	90.20
	Capsantina	14280.22	
12	β -caroteno	32163.08	99.58
	Capsantina	2875.61	

¹Valores expresados en porcentaje (%); ²Unidades arbitrarias

En la Figura 7.2 se muestra el diagrama de Pareto obtenido para para el N y R_s . Los efectos de los factores y sus interacciones se presentaron como los efectos estandarizados, los cuales fueron calculados por la relación entre el valor del efecto y la desviación estándar obtenida durante el análisis. La R_s fue la única variable de respuesta que presentó un efecto significativo tanto en la composición del gradiente como en cada uno de los picos de referencia, a diferencia del N, la cual no tiene una influencia directa en estos.

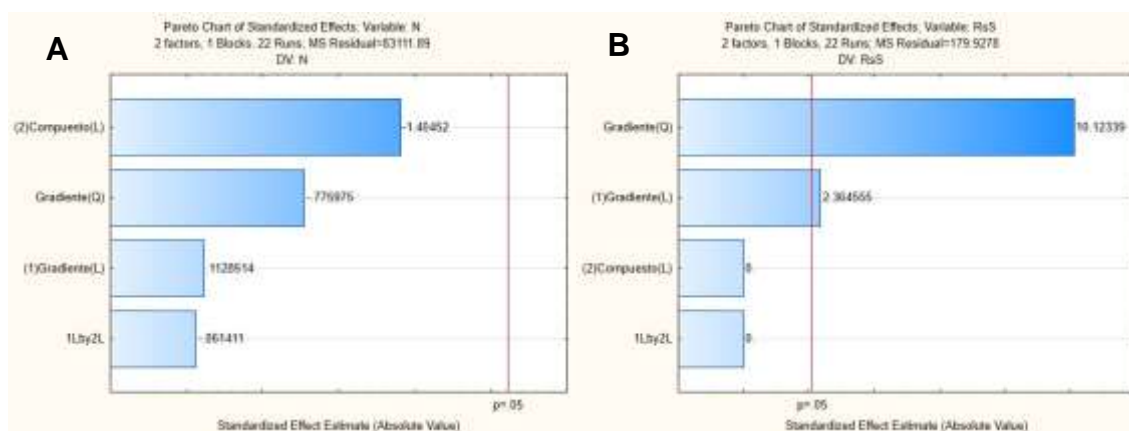


Figura 7.2. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados **(A)** Número de platos teóricos, **(B)** Resolución.

En la Figura 7.3, se muestra un gráfico de superficie de deseabilidad, en la cual se muestra la relación entre la influencia que presenta la R_s con los factores gradiente y compuestos, siendo el único que presentó diferencia estadística ($p < 0.05$) en el análisis de los efectos estandarizados, en relación con los gradientes utilizados y los compuestos que se consideraron para este estudio, en la figura se observa que estos valores solo tienen una influencia en la elución del β -Caroteno (compuesto 1), es así que considerando los valores de deseabilidad, los grupos de gradientes 1-2 y 10-12 presentaron los mayores valores.

La adición de agua en proporciones pequeñas fue el factor clave para la elución máxima de picos, ya que, al trabajar en fase reversa, la retención de los CC más

polares es baja, es por ello que se recomienda la adición de este eluyente en la fase móvil para optimizar las condiciones de la columna (Nells y De Leenheer, 1983). Esto coincide con lo reflejado en los datos obtenidos por el gráfico de superficie de deseabilidad, pues los gradientes en los cuales el agua forma parte de su composición, mostraron los mejores resultados.

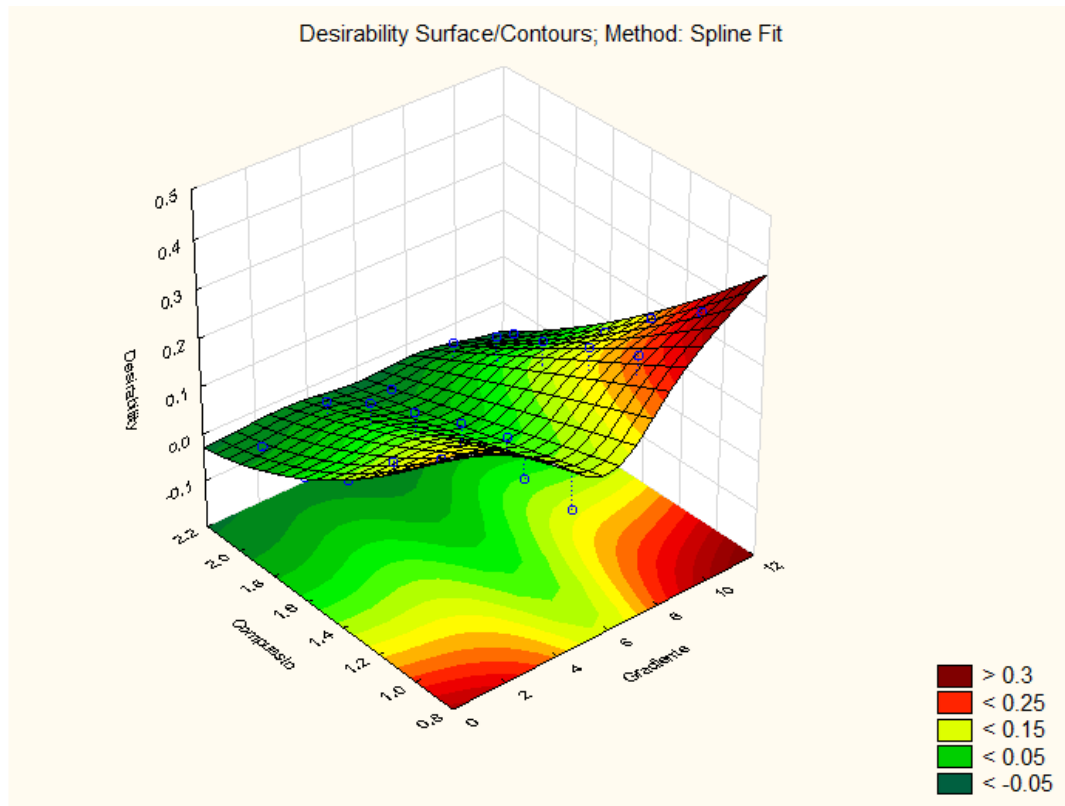


Figura 7.3. Gráfico de superficie de deseabilidad para Resolución (R_s).

Considerando los resultados del análisis de composición central, se seleccionó el gradiente 10 para realizar la identificación de los CC presentes en salsas de Chile 'De Árbol' y 'Morita', la composición de éste se muestra en el cuadro 7.5. Este gradiente presentó el mayor valor de R_s de los grupos de gradientes con mayor valor de deseabilidad, así mismo, dicho gradiente requiere menor tiempo de corrida en comparación con los otros gradientes, esto favoreciendo tanto el tiempo de análisis como en un menor gasto de eluentes y alargando la vida útil de la fase estacionaria.

Cuadro 7.5. Gradiente seleccionado para el análisis de CC en salsas.

Tiempo	Eluentes ¹			
	Agua (A)	ACN (B)	MeOH/2-POH (C)	MTBE (D)
0	2	90	3	5
15	2	47.5	3	47.5
30	2	5	3	90
35	2	90	3	5

¹Cantidades expresadas en porcentajes. ACN (acetonitrilo), MeOH/2-POH (60:40; v/v) (metanol/2-propanol (60:40; v/v)); MTBE (metil *ter*-butil éter)

7.3.3. Identificación de carotenoides por HPLC-DAD

Identificación y cuantificación de los picos predominantes

Los CC identificados y cuantificados en las salsas de Chile de 'Árbol' y 'Morita' estudiadas fueron capsantina, zeaxantina, β -criptoxantina, Isómero Zeaxantina/ β -criptoxantina y β -caroteno. Sus características cromatográficas se muestran en el Cuadro 7.5. Los cromatogramas de los extractos de CC de cada grupo de salsas evaluadas se muestran en la Figura 7.4, en el Anexo 1 y 2 se presentan los cromatogramas en las 3 longitudes de ondas de los compuestos identificados para las salsas de Chile 'Morita' y de 'Árbol', respectivamente.

En los cromatogramas de las salsas evaluadas se identificaron 5 CC. El primero de ellos se identificó como capsantina (1), que eluyó al minuto 8.3, este tiempo de retención, así como el espectro UV/Vis de este compuesto correspondieron con los obtenidos por el estándar comercial de la capsantina. El segundo CC identificado fue la zeaxantina (2), su identidad se evidenció al comparar sus características cromatográficas con los de su estándar en los trabajos publicados por Britton (1996) y Bouvier y cols. (2003), donde se reportó la forma del espectro UV/Vis de la zeaxantina, así como sus valores de máxima absorción (λ_{max}) (451 y 472 nm), que coincidieron con los de este compuesto analizado. El compuesto 3 se identificó como un isómero de la β -Criptoxantina, que es un compuesto derivado por efecto

del tratamiento térmico al que fueron sometidos los chiles deshidratados en la elaboración las salsas (Chilungo y cols., 2019). Su espectro UV/Vis fue similar al del estándar comercial de la β -Criptoxantina, así como sus λ_{\max} (424, 452, 481 nm), resultados semejantes en la identificación de este compuesto fueron reportado por Watanabe y cols. (1999). La β -criptoxantina (compuesto 4) con λ_{\max} de 427, 454 y 476 nm fue identificado por las coincidencias de su espectro de absorción y TR (min 15.527) al comparar estas características con las obtenidas por su estándar comercial. El β -caroteno, fue el último compuesto en eluir, apareciendo en el minuto 21.3, este compuesto fue identificado comparando su espectro de absorción, tiempo de retención y λ_{\max} con los de su estándar comercial. En el Anexo 2 se muestran los espectros UV-Vis de cada compuesto identificado.

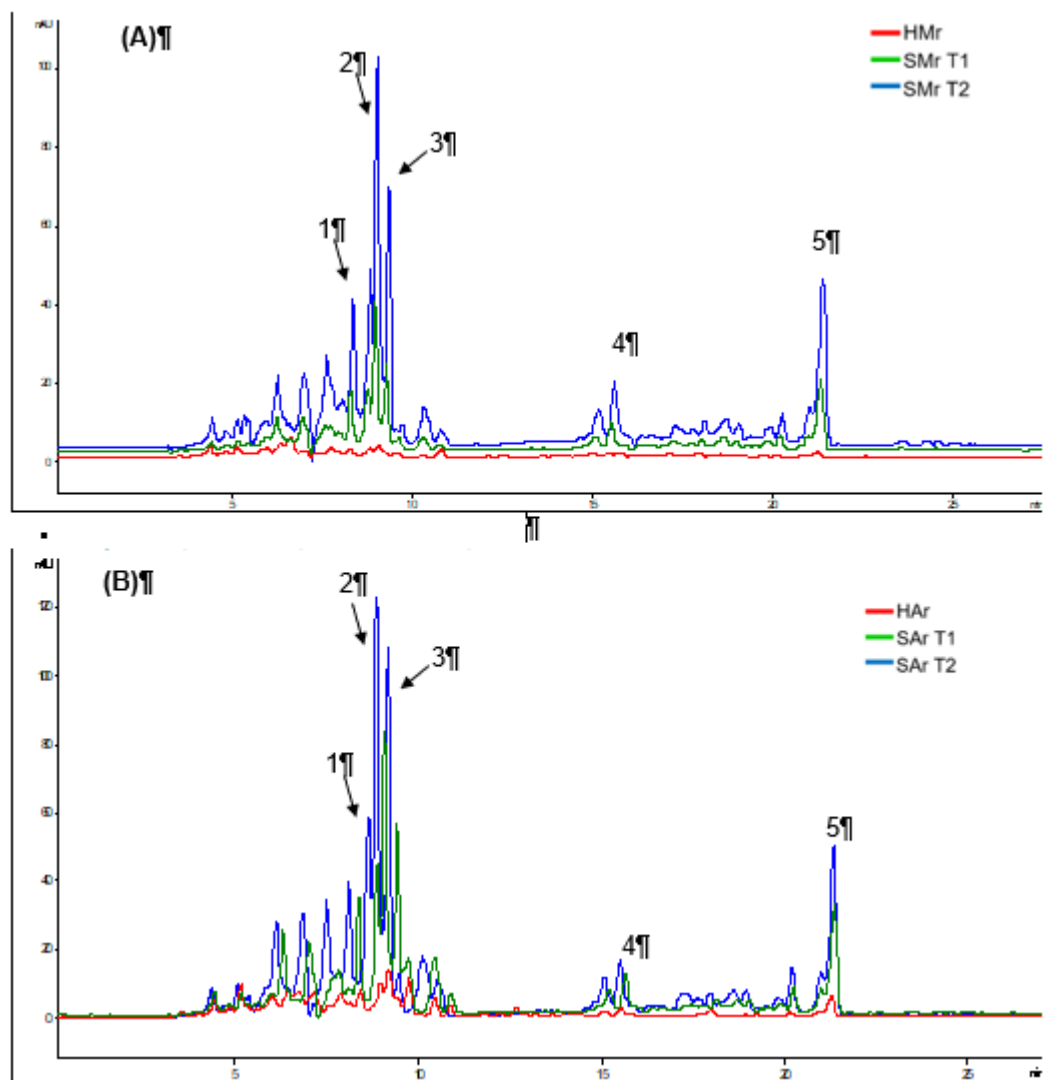


Figura 7.4. Cromatograma de extractos de CC de Chile ‘Morita’ (A) y de ‘Árbol’ (B) a 454 nm. Rojo: salsas control, verde: salsa “macha” 100 °C y azul: salsa “macha” 140°C. (1) capsantina, (2) zeaxantina, (3) Isómero, (4) β-criptoxantina y (5) β-caroteno.

En relación al contenido relativo de cada compuesto, este se realizó de manera indirecta, comparando las áreas relativas de cada compuesto identificado en el cromatograma de cada una de las salsas analizadas las cuales representan de 63.5 al 79.4% de las áreas totales de todos los compuestos eluidos. En las salsas las áreas relativas de la capsantina y la zeaxantina representaron la mayor proporción,

seguidas del β -caroteno y un isómero de la zeaxantina/ β -criptoxantina. La β -criptoxantina representó la menor área relativa en todas las salsas evaluadas.

La composición de los CC presentes es similar, en términos cualitativos, a las reportadas en otras variedades de *C. annuum* L. deshidratadas (Collera-Zúñiga y cols., 2005b; Hernández-Ortega y cols., 2012; Hervert-Hernández y cols., 2010; Pugliese y cols., 2014b). Este es un trabajo pionero, en el que se analizó la composición de CC y BA una matriz compleja como lo son las salsas oleosas. La capsantina representó la fracción mayor de las áreas relativas de los CC presentes en las salsas evaluadas, seguida de la zeaxantina. Collera-Zuñiga y cols. (2015), reportaron en Chile 'Ancho' y 'Guajillo', que el β -caroteno fue el principal componente presente seguido junto con la violaxantina. La identificación de los compuestos reportados para estas variedades coinciden con reportado en otros estudios y con los recopilados en la base de datos de contenido de carotenoides en alimentos iberoamericanos (Dias y cols., 2018),

El análisis de varianza mostró que las áreas relativas de los principales CC identificados fueron diferentes ($p < 0.05$) entre las salsas evaluadas. La salsa HMr fue la que tuvo mayor área relativa de capsantina (29.1 %), seguida de SAr T1 (32.7 %) y HAr (29.2 %), respectivamente. Las salsas restantes tuvieron áreas relativas inferiores (26.2 - 27.1 %). La Zeaxantina fue más abundante en la salsa SAr T2 (32.5 %). Entre las salsas SMr T1, SMr T2 y SAr T2 no hubo diferencia ($p \geq 0.05$) en sus áreas relativas (29.5 - 31.1 %). Las salsas HMr y HAr fueron las de menor área relativa de zeaxantina. Por otro lado, el isómero Zeaxantina/ β -criptoxantina fue mayor en las salsas HAr y SAr T2 respectivamente, en las demás salsas las áreas relativas no fueron distintas entre ellas ($p \geq 0.05$). Las salsas HMr, HAr y SMr T2 se caracterizaron por tener el mayor área relativa de β -criptoxantina (7.9 - 8.5 %), seguida de la SMr T1 (6.2 %). Las salsas SAr T1 y SAr T2 áreas relativas de β -criptoxantina inferiores (4.5 - 5.0 %). El área relativa del β -caroteno fue mayor en la salsa HAr (31.0 %), seguido de las SMr T1 y SMr T2 (22.0 - 22.2 %). La salsa que

presentaron una menor área relativa de β -caroteno fueron SAR T2, SAR T2 y HMr (11.1-17.7%).

Tanto en las salsas que se elaboraron con chile de 'Arbol' como las elaboradas con chile 'Morita' presentaron todos los CC que, en general se estudian típicamente con respecto a la dieta y la salud humana (zeaxantina, β -caroteno y β -criptoxantina) (Rodríguez-Rodríguez y cols., 2020). Con relación a las áreas relativas, el CC predominante fue la capsantina, coincidiendo con lo reportado por Arimboor y cols. (2015), independientemente de los diferentes tratamientos térmicos y matrices del alimento.

La capsantina se acumula en las membranas tilacoidales de los cromoplastos en el pericarpio maduro de los pimientos rojos y puede representar hasta el 60% de los carotenoides totales (Suzuki y Mori, 2003). En este estudio, la capsantina representa el 26.2-39.1% del total de las áreas relativas de los CC identificados. La capsantina ha mostrado actividad anti-obesidad y sensibilizante a la insulina en animales (Jo y cols., 2017) y existe un interés creciente por sus posibles efectos beneficiosos en humanos, como efecto inhibidor de la carcinogénesis de colon, fotoprotección, entre otros beneficios aplicables (Fernández-García y cols., 2016, Jo y cols., 2017, Mohd-Hassan y cols., 2019). Además, se demostró que la capsantina se encuentra entre los CC biodisponibles (Pugliese y cols., 2014a), lo cual permite expandir el panorama para continuar con la investigación de CC en estas variedades de chile, así como en las salsas "macha".

Cuadro 7.6. Características cromatográficas, UV-Vis y contenido de CC en salsas de chile de 'Árbol' y 'Morita' obtenidas por HPLC-DAD.

Pico	Identificación tentativa	t _R ¹	λ _{máx} (nm)	HMr ²	Áreas relativas (%) ²				
					SMr T1 ³	SMr T2 ⁴	HAr ⁵	SAr T1 ⁶	SAr T2 ⁷
1	Capsantina	8.3	473, 492	39.1 ± 2.0a	26.2 ± 0.9d	27.1 ± 0.2d	29.2 ± 0.5c	32.7 ± 0.2b	26.8 ± 0.4d
2	Zeaxantina	9.0	451,472	25.1 ± 1.3d	31.1 ± 0.3b	29.5 ± 0.1c	10.0 ± 0.5e	30.1 ± 0.1bc	32.5 ± 0.1a
3	Isómero Zeaxantina/ β- criptoxantina	9.3	424, 452, 481	14.1 ± 0.6dc	14.4 ± 0.3cd	13.5 ± 0.3d	21.8 ± 0.8a	15.0 ± 0.1c	19.4 ± 0.1b
4	β-criptoxantina	15.5	427 ,454,476	8.5 ± 0.7a	6.2 ± 0.3b	7.9 ± 0.1a	7.9 ± 0.2a	4.5 ± 0.2c	5.0 ± 0.1c
5	β-caroteno	21.3	435 ,452,481	11.1 ± 0.6d	22.2 ± 2.3b	22.0 ± 2.3b	31.0 ± 1.5a	17.7 ± 0.2c	16.3 ± 0.1c
%Representativo del área total				63.5	73.2	78.6	66.1	77.36	79.4

¹Tiempo de retención, ²Salsa control de chile 'Morita', ³Salsa macha de chile 'Morita' 100 °C, ⁴Salsa macha de chile 'Morita' 140 °C, ⁵Salsa control de chile 'De Árbol', ⁶Salsa macha de chile 'De Árbol' 100 °C, ⁷Salsa macha de chile 'De Árbol' 140 °C

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

El procesamiento térmico al que es sometida la matriz del alimento, influye directamente en la liberación de los carotenoides, así como en la capacidad antioxidante de las salsas de chile de 'Árbol' y 'Morita'.

La matriz alimenticia, además del procesamiento térmico, está estrechamente relacionada en las interacciones que se presentan entre los carotenoides, modificando la bioaccesibilidad de estos compuestos bioactivos.

El método cromatográfico desarrollado fue eficiente en la separación e identificación de carotenoides en las matrices oleosas y acuosas de ambos grupos de salsas evaluadas (de 'Árbol' y 'Morita'), lo cual no se logró al utilizar los métodos reportados en la literatura para el análisis de carotenoides en matrices de alimentos simples.

Se identificaron los cinco carotenoides principales presentes en las salsas elaboradas con chile de 'Árbol' y 'Morita' con base en sus características cromatográficas (espectro de absorción UV/Vis, tiempo de retención y máximos de absorción) y su comparación con estándares comerciales y referencias de la literatura. También se cuantificó de forma indirecta la presencia de estos compuestos en función de sus áreas relativas, siendo la capsantina el CC de mayor relevancia en ambos grupos de salsas.

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- Adadi, P., Barakova, N. V., & Krivoshapkina, E. F. (2018). Selected Methods of Extracting Carotenoids, Characterization, and Health Concerns: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(24), 5925–5947.
- Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios. (12 de Noviembre de 2018). *Chile verde*. Recuperado el 23 de Febrero de 2020, de Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/aserca/es/articulos/chile-verde?idiom=es>
- Aguilar-Morales, J. (2012). Métodos convencionales de conservación . En *Métodos de conservación de alimentos* (Primera ed., págs. 93-140). Edomex: Red Tercer Milenio.
- Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Amarowicz, R., & Shahidi, F. (2010). Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeno and Serrano peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 163-173.
- Arimboor, R., Natarajan, R. B., Menon, K. R., Chandrasekhar, L. P., & Moorkoth, V. (2015). Red pepper (*Capsicum annum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1258-1271.
- Association of Official Analytical Chemists & Association of Official Agricultural Chemists. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Vol. 15). Estados Unidos: Association of Official Analytical Chemists.
- Avila-Nava, A., Noriega, L. G., Tovar, A. R., Granados, O., Pérez-Cruz, C., Pedraza-Chaverri, J., & Torres, N. (2017). Food combination based on a pre-hispanic Mexican diet decreases metabolic and cognitive abnormalities and gut

- microbiota dysbiosis caused by a sucrose-enriched high-fat diet in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(1), 1-29.
- Bengtsson, A., Larsson Alminger, M., & Svanberg, U. (2009). In vitro bioaccessibility of β -carotene from heat-processed orange-fleshed sweet potato. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(20), 9693-9698.
- Blancas-Benitez, F. J., Mercado-Mercado, G., Quirós-Sauceda, A. E., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2015). Bioaccessibility of polyphenols associated with dietary fiber and in vitro kinetics release of polyphenols in Mexican 'Ataulfo'mango (*Mangifera indica* L.) by-products. . *Food & function*, 6(3), 859-868.
- Bohn, T. (2018). Non-Extractable Polyphenols and Carotenoids: Importance in Human Nutrition and Health. En *Metabolic fate of bioaccessible and non-bioaccessible carotenoids* (págs. 165-200).
- Bohn, T., McDougall, G. J., Alegría, A., Alminger, M., Arrigoni, E., Aura, A. M., . . . Santos, C. N. (2015). Mind the gap—deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites—a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Molecular nutrition & food research*, 59(7), 1307-1323.
- Bouvier, F., Suire, C., Mütterer, J., & Camara, B. (2003). Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *The Plant Cell*, 15(1), 47-62.
- Breithaupt, D. E., & Schwack, W. (2000). Determination of free and bound carotenoids in paprika (*Capsicum annuum* L.) by LC/MS. . *European Food Research and Technology*, 211(1), 0052-0055.
- Britton, G., & Khachik, F. (2009). Carotenoids in food. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Edits.), *Carotenoids* (Vol. V: Nutrition and Health, págs. 45-66). Birkhäuser Verlag.
- Brown, P. R., & Weston, A. (1997). HPLC and CE: Principles and Practice. . *Academic Press*.

- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171.
- Cárdenas-Castro, A. P., Perales-Vázquez, G., de la Rosa, L. A., Zamora-Gasga, V. M., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Alvarez-Parrilla, E., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2019). Sauces: An undiscovered healthy complement in Mexican cuisine. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1-43.
- Castenmillern, J., & West, C. (1997). Bioavailability of Carotenoids. *J. Pure & Applied. Chem.*, 69(10), 2145–2150.
- Cernelic, K., Prosek, M., Golc-Wondra, A., Rodic, Z., Simonovska, B., & Puklavec, M. (2013). Influence of synthetic antioxidants on extraction of all-trans-lutein from spinach under air and nitrogen atmosphere. *Food and Nutrition Sciences*, 4(2), 195-200.
- Cervantes-Paz, B., Victoria-Campos, C. I., & Ornelas-Paz, J. (2016). Absorption of carotenoids and mechanisms involved in their health-related properties. En *Carotenoids in Nature* (págs. 415-454). Springer, Cham.
- Cervantes-Paz, B., Yahia, E. M., Ornelas-Paz, J. D., Gardea-Béjar, A. A., Ibarra-Junquera, V., & Pérez-Martínez, J. D. (2012). Effect of heat processing on the profile of pigments and antioxidant capacity of green and red jalapeño peppers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(43), 10822-10833.
- Cervantes-Paz, B., Yahia, E. M., Ornelas-Paz, J., Victoria-Campos, C. I., Ibarra-Junquera, V., Pérez-Martínez, J. D., & Escalante-Minakata, P. (2014). Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeño peppers at intermediate stages of ripening. *Food chemistry*, 146, 188-196.
- Chilungo, S., Muzhingi, T., Truong, V. D., & Allen, J. C. (2019). Effect of processing and oil type on carotene bioaccessibility in traditional foods prepared with flour and puree from orange-fleshed sweetpotatoes. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(6), 2055-2063.

- Chuah, A. M., Lee, Y. C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L., & Matoba, T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry*, 111, 20-28.
- CODEX STAN. (2011). *CODEX STAN 306R-2011*. . Codex Alimentarius.
- Collado, M. C., Isolauri, E., & Salminen, S. &. (2009). The impact of probiotic on gut health. . *Current drug metabolism*, 10(1), 68-78.
- Colle, I. J., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Met, K., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2013). Processing tomato pulp in the presence of lipids: The impact on lycopene bioaccessibility. . *Food research international*, 51(1), 32-38.
- Colle, I., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). Effect of thermal processing on the degradation, isomerization, and bioaccessibility of lycopene in tomato pulp. *Journal of food science*, 75(9), C753-C759.
- Collera-Zúñiga, O., García Jiménez, F., & Meléndez Gordillo, R. (2005). Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annum* L. *Food Chemistry*, 90(1-2), 109–114.
- Conforti, F., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage. . *Food Chemistry*, 102(4), 1096-1104.
- Daood, H. G., Kapitaný, J., Biacs, P., & Albrecht, K. (2006). Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affect carotenoid stability in paprika (red pepper spice). *J. Sci. Food Agric*, 86, 2450–2457.
- Deepa, N., Kaur, C., George, B., Singh, B., & Kapoor, H. C. (2007). Antioxidant constituents in some sweet pepper (*Capsicum annum* L.) genotypes during maturity. *Food Science and Technology*, 40(1), 121-129.
- del Castillo-Negrete, M. (2013). El hambre en México. *Estudios ITAM*, 9(107), 72-111.
- Deli, J., Molnár, P., Matus, Z., Tóth, G., & Steck, A. (1996). Reisolation of Carotenoid 3, 6-Epoxides from Red Paprika (*Capsicum annum*). . *Helvetica Chimica Acta*, 79(5), 1435-1443.

- Dias, M. G., Camões, M. F., & Oliveira, L. (2008). Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production. *Food Chemistry*, *109*(4), 815–824. doi:doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.026
- Dietz, J., Sri Kantha, S., & Erdman, J. (1988). Reversed Phase HPLC Analysis of Alpha- and BetaCarotene from Selected Raw and Cooked Vegetables. *Plant Foods Hum. Nutr.*, *38*, 333-341.
- Duda-Chodak, A., Tarko, T., Satora, P., & Sroka, P. (2015). Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European journal of nutrition*, *54*(3), 325-341.
- Dupas, C., Marsset Baglieri, A., Ordonaud, C., Tomé, D., & Maillard, M. N. (2006). Dupas, C., Marsset Baglieri, A., Ordonaud, C., Tomé, D., & Maillard, M. N. (2006). Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: a Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Molecular nutrition & food research*, *50*(11), 1053-1060.
- Eastwood, M. A., & Morris, E. R. (1992). Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *55*(2), 436-442.
- Escobedo-Avellaneda, Z., Pérez-Pérez, M. C., Bárcenas-Pozos, M. E., & Welti-Chanes, J. (2011). Moisture adsorption isotherms of freeze-dried and air-dried Mexican red sauce. *Journal of Food Process Engineering*, *34*(6), 1931-1945.
- Faith, D. P., & Baker, A. M. (2006). Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. *Evolutionary bioinformatics*, *2*, 121.
- Faulks, R. M., & Southon, S. (2005). Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1740*(2), 95-100.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérída, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability

- from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46(2), 438-450.
- Figueroa, I. E., Martínez, M. T., Rodríguez, J. E., Cruz, O., Colinas, M. T., & Valle, S. y. (2015). Capacidad antioxidante en variedades de pimiento morrón (*Capsicum annum* L.). *Interciencia*, 40(10), 696-703.
- Francis, F. (1985). Pigments and other colourants. En F. Chemistry, *Fennema. Química de los alimentos* (Segunda ed.). NY, New York: Marcel Dekker Inc.
- Furr, H. C., & Clark, R. M. (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 8(7), 364-377.
- Gallardo-Guerrero, L., Pérez-Gálvez, A., Aranda, E., Mínguez-Mosquera, M., & Hornero-Méndez, D. (2010). Physicochemical and microbiological characterization of the dehydration processing of red pepper fruits for paprika production. *LWT-Food Science and Technology*, 43(9), 1359-1367.
- Gálvez, A., & Salinas, G. (1 de febrero de 2015). El papel del frijol en la salud nutrimental de la población mexicana. *Revista Universitaria UNAM*, 16(2), 1-16.
- Garcia, L., Gold, E. B., Wang, L., Yang, X., Mao, M., & Schwartz, A. V. (2012). The relation of acculturation to overweight, obesity, pre-diabetes and diabetes among US Mexican-American women and men. *Ethnicity & Disease*, 22(1), 58-64.
- García-Casal, M. N., Peña-Rosas, J. P., & Malavé, H. G. (2016). Sauces, spices, and condiments: definitions, potential benefits, consumption patterns, and global markets. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1379(1), 3-16.
- Garrett, D. A., Failla, M. L., & Sarama, R. J. (1999). Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 4301-4309.
- Garrett, D. A., Failla, M. L., & Sarama, R. J. (2000). Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(11-12), 574-580.

- Ghirardelly, F., & Carranza, L. (15 de Septiembre de 2016). *El alma de la cocina mexicana: la salsa*. Recuperado el 16 de Noviembre de 2019, de Katar: <https://www.kantarworldpanel.com/mx/Noticias-/El-alma-de-la-cocina-mexicana-la-salsa>
- Gil-Chávez, J. G., Villa, J. A., Ayala-Zavala, F. J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.
- Giuffrida, D., Dugo, P., Torre, G., Bignardi, C., Cavazza, A., Corradini, C., & Dugo, G. (2014). Evaluation of carotenoid and capsaicinoid contents in powder of red chili peppers during one year of storage. . *Food Research International*, 65, 163-170.
- Giuffrida, D., Zoccali, M., & Mondello, L. (2020). Recent developments in the carotenoid and carotenoid derivatives chromatography-mass spectrometry analysis in food matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 116047.
- Gleize, B., Tourniaire, F., Depezay, L., Bott, R., Nowicki, M., Albino, L., & Borel, P. (2013). Effect of type of TAG fatty acids on lutein and zeaxanthin bioavailability. . *British journal of nutrition*, 110(1), 1-10.
- Goltz, S. R., & Ferruzzi, M. G. (2013). Carotenoid bioavailability: influence of dietary lipid and fiber. En *Carotenoids and human health* (págs. 111-128). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- González-Aguilar, G. A., Blancas-Benítez, F. J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2017). Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: Molecular interactions and bioaccessibility. *Current Opinion in Food Science*, 13, 84-88.
- Goñi, I., Serrano, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Bioaccessibility of β -carotene, lutein, and lycopene from fruits and vegetables. . *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(15), 5382-5387.

- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in biotechnology*, 30(11), 591-600.
- Gupta, P., Sreelakshmi, Y., & Sharma, R. (2015). A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant methods*, 11(1), 1-12.
- Hadjal, T., Dhuique-Mayer, C., Madani, K., Dornier, M., & Achir, N. (2013). Thermal degradation kinetics of xanthophylls from blood orange in model and real food systems. *Food Chemistry*, 138, 2442–2450.
- Hart, D., & Scott, J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed on the UK. . *Food Chemistry*, 54, 101-111.
- Hartzfeld, P. W., Forkner, R., Hunter, M. D., & Hagerman, A. E. (2002). Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1785-1790.
- Hedrén, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European journal of clinical nutrition*, 56(5), 425-430.
- Hernandez, M., Rivera, J., Shamah, T., Cuevas, L., Gomez, L., & Gaona, E. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutricion de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016). Informe final de resultados*. Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, México. Recuperado el 02 de Febrero de 2020
- Hernandez-Alvarez, E., Pérez-Sacristán, B., Blanco-Navarro, I., Donoso-Navarro, E., Silvestre-Mardomingo, R., & Granado-Lorencio, F. (2015). Analysis of microsamples of human faeces: a non-invasive approach to study the bioavailability of fat-soluble bioactive compounds. . *European Journal of Nutrition*, 54(8), 1371-1378.
- Hernández-Ortega, M., Ortiz-Moreno, A., Hernández-Navarro, M. D., Chamorro-Cevallos, G., Dorantes-Alvarez, L., & Necochea-Mondragón, H. (2012).

- Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1-10.
- Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Goñi, I. (2010). Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3399-3406.
- Hill, G. E., & Johnson, J. D. (2012). The vitamin A–redox hypothesis: a biochemical basis for honest signaling via carotenoid pigmentation. . *The American Naturalist*, 180(5), E127-E150.
- Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. . *Annual review of nutrition*, 22(1), 283-307.
- Howard, L. R., Smith, R. T., Wagner, A. B., Villalon, B., & Burns, E. E. (1994). Provitamin A and ascorbic acid content of fresh pepper cultivars (*Capsicum annuum*) and processed jalapeños. *J. Food Sci*, 59, 362–365.
- Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H., & Villalon, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1713-1720.
- Hwang, I. G., Shin, Y. J., Lee, S., Lee, J., & Yoo, S. M. (2012). Effects of different cooking methods on the antioxidant properties of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Preventive nutrition and food science*, 17(4), 286.
- Jensen, L. H., Renodon-Corniere, A., Wessel, I., Langer, S. W., Søkilde, B., Carstensen, E. V., . . . Jensen, P. B. (2002). Maleimide is a potent inhibitor of topoisomerase II in vitro and in vivo: a new mode of catalytic inhibition. *Molecular pharmacology*, 61(5), 1235-1243.

- Jiwan, M. A., Duane, P., O'Sullivan, L., O'Brien, N. M., & Aherne, S. A. (2010). Content and bioaccessibility of carotenoids from organic and non-organic baby foods. *Journal of food composition and analysis*, 23(4), 346-352.
- Kao, F., Chiu, Y., Tsou, M.J., & Chiang, W. D. (2012). Effects of Chinese domestic cooking methods on the carotenoid composition of vegetables in Taiwan. *LWT-Food, Science and Technology*, 46, 485-492.
- Kaulmann, A., André, C. M., Schneider, Y. J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2016). Carotenoid and polyphenol bioaccessibility and cellular uptake from plum and cabbage varieties. . *Food chemistry*, 197, 325-332.
- Khachik, F., Spangler, C. J., Smith, J. C., Canfield, L. M., Steck, A., & Pfander, H. (1997). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Analytical chemistry*, 69(10), 1873-1881.
- Kidmose, U., Yang, R.-Y., Thilsted, S. H., Christensen, L. P., & Brandt, K. (2006). Content of carotenoids in commonly consumed Asian vegetables and stability and extractability during frying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 562–571.
- Kim, S., Park, J., & Hwang, I. (2004). Composition of main carotenoids in Korean red pepper (*Capsicum annuum* L.) and changes of pigment stability during the drying and storage process. . *Journal of Food Science*, 69(1), FCT39–FCT44.
- Kimura, I., Inoue, D., Maeda, T., Hara, T., Ichimura, A., Miyauchi, S., . . . Tsujimoto, G. (2011). Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(19), 8030-8035.
- Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D. B., & Godoy, H. T. (1990). Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamins A. *Food Chemistry*, 35(3), 187-195.
- Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Cichon, M. J., & Schwartz, S. J. (2012). Analysis methods of carotenoids. *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*, 5, 105-148.

- Kourouma, V., Mu, T., Zhang, M., & Sun, H. (2019). Effects of cooking process on carotenoids and antioxidant activity of orange-fleshed sweet potato. *LWT - Food Science and Technology*, *104*, 134-141.
- La Franco, M. R., Zhu, C., & Burri, B. J. (2014). Assessment of tissue distribution and concentration of β -cryptoxanthin in response to varying amounts of dietary β -cryptoxanthin in the Mongolian gerbil. *British Journal of Nutrition*, *111*(6), 968-978.
- Lee, H., Castle, W., & Coates, G. (2001). High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (Earlygold) grown in Florida, USA. *Journal of Chromatography A*, *93*, 371–377.
- Lee, J., Kim, M., Park, K., & Choe, E. (2003). Lipid oxidation and carotenoids content in frying oil and fried dough containing carrot powder. *Journal of food science*, *68*(4), 1248-1253.
- Lesser, S., Cermak, R., & Wolfram, S. (2006). The fatty acid pattern of dietary fat influences the oral bioavailability of the flavonol quercetin in pigs. . *British journal of nutrition*, *96*(6), 1047-1052.
- Meléndez-Martínez, A. J., Mapelli-Brahm, P., Benítez-González, A., Stinco, C. M., & Murillo, E. (2017). Consideraciones generales para el análisis de los carotenoides. En A. J. Meléndez-Martínez (Ed.), *Carotenoides en agroalimentación y salud* (págs. 32-50). México: Terracota S.A. de C.V.
- Meléndez-Martínez, A. J., Pérez Gálvez, A., Roca, M., Estévez-Santiago, R., Olmedilla-Alonso, B., Mercadante, A. Z., & Ornelas-Paz, J. D. (2017). Biodisponibilidad de carotenoides, factores que la determinan y métodos de estimación. En A. J. Meléndez-Martínez (Ed.), *Carotenoides en agroalimentación y salud* (págs. 574-608). México: Terracota S.A. de C.V.
- Mercadante, A. Z. (2008). Carotenoids in foods: sources and stability during processing and storage. En C. Socaciu (Ed.), *Food Colorants: Chemical and Functional properties* (págs. 241-276). New York: CRC Press.
- Mercado-Mercado, G., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., Alvarez-Parrilla, E., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2018). Ultrasound-assisted extraction of

- carotenoids from mango (*Mangifera indica* L. 'Ataulfo') by-products on in vitro bioaccessibility. *Food bioscience*, 21, 125-131.
- Minguez-Mosquera, M. I., & Hornero-Mendez, D. (1993). Separation and quantification of the carotenoid pigments in red peppers (*Capsicum annuum* L.), paprika, and oleoresin by reversed-phase HPLC. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10), 1616–1620.
- Minguez-Mosquera, M. I., & Hornero-Mendez, D. (1994). Changes in carotenoid esterification during the fruit ripening of *Capsicum annuum* cv. Bola. . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 640-644.
- Minguez-Mosquera, M., Hornero-Méndez, D., & Pérez-Gálvez, A. (2008). Carotenoids and provitamin A in functional foods. En W. Hurst (Ed.), *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* (págs. 277-336). New York: CRC Press.
- Montes, J. P. (19 de Enero de 2016). *Salsas mexicanas: Historia de una cultura mestiza*. Recuperado el 17 de Enero de 2020, de Revista "El Conocedor": <https://revistaelconocedor.com/salsas-mexicanas-historia-de-una-cultura-mestiza/>
- Montoya-Ballesteros, L. C., González-León, A., García-Alvarado, M. A., & Rodríguez-Jimenes, G. C. (2014). Bioactive compounds during drying of chili peppers. *Drying technology*, 32(12), 1486-1499.
- Montreau, F. R. (1972). On the analysis of total phenolic compounds in wines by the Folin-Ciocalteu method. *Connaiss. Vigne Vin*, 24, 397-404.
- Moreno-Pérez, E. C., Avendaño-Arrazate, H., Mora-Aguilar, R., Cadena-Iñiguez, J., AguilarRincón, V. H., & Aguirre-Medina, J. F. (2011). Diversidad morfológica en colectas de chile guajillo (*Capsicum annuum* L.) del centro-norte de México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(1), 23-30.
- Moreno-Rojas, K. (2013). *Chiles y salsas en México. Un sabor a identidad*. Recuperado el 23 de febrero de 2020, de Instituto Nacional de Antropología e Historia: <https://www.inah.gob.mx/reportajes/597-chiles-y-salsas-en-mexico-un-sabor-a>

- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (aTEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129, 139-148.
- Muñoz-Zurita, R. (2008). *Salsas Mexicanas* (Primera ed.). México: Larousse.
- Netzel, M., Netzel, G., Zabarás, D., Lundin, L., Day, L., Addepalli, R., . . . Seymour, R. (2011). Release and absorption of carotenes from processed carrots (*Daucus carota*) using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model. *Food Research International*, 44(4), 868-874.
- Nunes, I. L., & Mercadante, A. Z. (2006). Vantagens e desvantagens das colunas C18 e C30 para a separação de carotenóides por CLAE. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42(4), 539-546.
- Oboh, G., Puntel, R., & Rocha, J. (2007). Hot pepper (*Capsicum annum*, Tepin and *Capsicum chinense*, Habanero) prevents Fe²⁺-induced lipid peroxidation in brain—in vitro. *Food Chemistry*, 102(1), 178-185.
- Oliveira, R. R., Moraes, M. C., Castilho, R. O., Valente, A. P., Carauta, J. P., Lopes, D., & Kaplan, M. A. (2003). High-speed countercurrent chromatography as a valuable tool to isolate C-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 14(2), 96-99.
- O'Neill, M. E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., & Thurnham, D. I. (2001). A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85(4), 499-507.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *Estadísticas*. Recuperado el 20 de Marzo de 2020, de Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Ornelas-Paz, J., Cira-Chávez, L. A., Gardea-Béjar, A. A., Guevara-Arauza, J. C., Sepúlveda, D. R., Reyes-Hernández, J., & Ruiz-Cruz, S. (2013). Effect of heat treatment on the content of some bioactive compounds and free radical-

- scavenging activity in pungent and non-pungent peppers. . *Food Research International*, 50(2), 519-525.
- Ornelas-Paz, J.J., M.-B. J., Ruiz-Cruz, S., Santana-Rodríguez, V., Ibarra-Junquera, V., . . . Pérez-Martínez, J. (2010). Effect of cooking on the capsaicinoids and phenolics contents of Mexican peppers. *Food Chemistry*, 119, 1619-1625.
- Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Mikkelsen, D., & Gidley, M. J. (2013). Lack of release of bound anthocyanins and phenolic acids from carrot plant cell walls and model composites during simulated gastric and small intestinal digestion. *Food & Function*, 4(6), 906-916.
- Patil, M. P. (2017). HPLC Method Development—A Review. *Journal of Pharmaceutical Research and Education*, 1(2), 243-260.
- Pereira, R. J., & Cardoso, M. (2012). Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of biotechnology and biodiversity*, 3(4), 146-152.
- Perera, C., & Yen, G. M. (2007). Functional Properties of Carotenoids in Human Health. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 201-230.
- Pérez-Gálvez, A. P., & Garrido-Fernández, J. G. (1997). Thermodegradation of carotenoids in paprika. . *Grasas y Aceites*, 48(5), 290-296.
- Pérez-Gálvez, A., Xavier, A. A., Jarén-Galán, M., Meléndez-Mártinez, A. J., Benítez-González, A. B., Stinco, C. M., & Garrido-Fernández, J. (2017). Análisis de carotenoides por cromatografía líquida de alta resolución. En A. J. Meléndez-Martínez, & P. Tapia (Ed.), *Carotenoides en agroalimentación y salud* (Primera ed., pág. 51.77). México: Terracota, SA de CV.
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Taberner, M., Díaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274-285.
- Pfander, H. (2012). Isolation and Analysis. En G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Edits.), *Carotenoids: handbook*. Birkhäuser.
- Pino, J., González, M., Ceballos, L., Centurión-Yah, A. R., Trujillo-Aguirre, J., Latournerie-Moreno, L., & Sauri-Duch, E. (2007). Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper

- (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan. *Food Chemistry*, 104(4), 1682-1686.
- Pugliese, A., O'Callaghan, Y., Tundis, R., Galvin, K., Menichini, F., O'Brien, N., & Loizzo, M. R. (2014). In vitro assessment of the bioaccessibility of carotenoids from sun-dried chilli peppers. . *Plant foods for human nutrition*, 69(1), 8-17.
- Pugliese, A., O'Callaghan, Y., Tundis, R., Galvin, K., Menichini, F., O'Brien, N., & Loizzo, M. R. (2014). In vitro investigation of the bioaccessibility of carotenoids from raw, frozen and boiled red chili peppers (*Capsicum annum*). . *European journal of nutrition*, 53(2), 501-510.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(8), 3396-3402.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Nanoemulsion delivery systems: Influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. . *Food Chemistry*, 135(7), 1440-1447.
- Ramírez, N. U., Cervantes, O. F., Montes, H. S., Raya, P. J., Cibrián, J. A., & Andrio, E. E. (2018). Diversidad morfológica del chile piquín (*Capsicum annum* L. var. *glabriusculum*) de Querétaro y Guanajuato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(6), 1159-1170.
- Ramos-Aguilar, O., Ornelas-Paz, J., & Ruiz-Cruz, S. (2015). Effect of ripening and heat processing of the physicochemical and rheological properties of pepper pectins. *Carbohydr Polym.* 115, 112–121.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reboul, E., Richelle, M., Perrot, E., Desmoulins-Malezet, C., Pirisi, V., & Borel, P. (2006). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8749-8755.

- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Salazar, N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in microbiology*, 7(185), 1-9.
- Rodríguez-Amaya, D. B. (1999). Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 49, 38S-47S.
- Rodríguez-Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis. En *Foods* (págs. 5-10). Washington: ILSI press.
- Rodríguez-Amaya, D. B. (2010). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726-740.
- Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). *Handbook for carotenoid analysis*. Washington, EE.UU.: HavestPlus.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(2-3), 97-111.
- Rodríguez-Rodríguez, E., Sánchez-Prieto, M., & Olmedilla-Alonso, 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.
- Roodenburg, A. J., Leenen, R., van het Hof, K. H., Weststrate, J. A., & Tijburg, L. B. (2000). Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *Am. J. Clin. Nutr*, 71(5), 1187-1193.
- Ruiz-Sola, M. A., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in *Arabidopsis*: A Colorful Pathway. *The Arabi*, 10.
- Ryan, L., O'Connell, O., O'Sullivan, L., Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2008). Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(3), 127-133.
- Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103.

- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., & McClements, D. J. (2013). Modulating β -carotene bioaccessibility by controlling oil composition and concentration in edible nanoemulsions. *Food chemistry*, 139(1-4), 878-884.
- Sander, L. C., Sharpless, K. E., & Pursch, M. (2000). C30 stationary phases for the analysis of food by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 880(1-2), 189-202.
- Santiago-Torres, M., Kratz, M., Lampe, J. W., Tapsoba, J. D., Brey Meyer, K. L., Levy, L., . . . Neuhaus, M. (2016). Metabolic responses to a traditional Mexican diet compared with a commonly consumed US diet in women of Mexican descent: a randomized crossover feeding trial, 2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(2), 366-374.
- Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goni, I., & Bravo, L. (2000). In vitro determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 48(8), 3342-3347.
- Schweiggert, U., Kammerer, D. R., Carle, R., & Schieber, A. (2005). Characterization of carotenoids and carotenoid esters in red pepper pods (*Capsicum annuum* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 19(18), 2617-2628.
- Schweiggert, U., Schieber, A., & Carle, R. (2006). Effects of blanching and storage on capsaicinoid stability and peroxidase activity of hot chili peppers (*Capsicum frutescens* L.). *Innovative food science & emerging technologies*, 7(3), 217-224.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (31 de Julio de 2015). *El chile, de México para el mundo*. Recuperado el 27 de febrero de 2020, de Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/el-chile-de-mexico-para-el-mundo?tab=>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). Chile verde. En S. d. Pesquera, *Atlas Agroalimentario 2012-2018* (Primera ed., págs. 64-65).

Ciudad de México, México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.

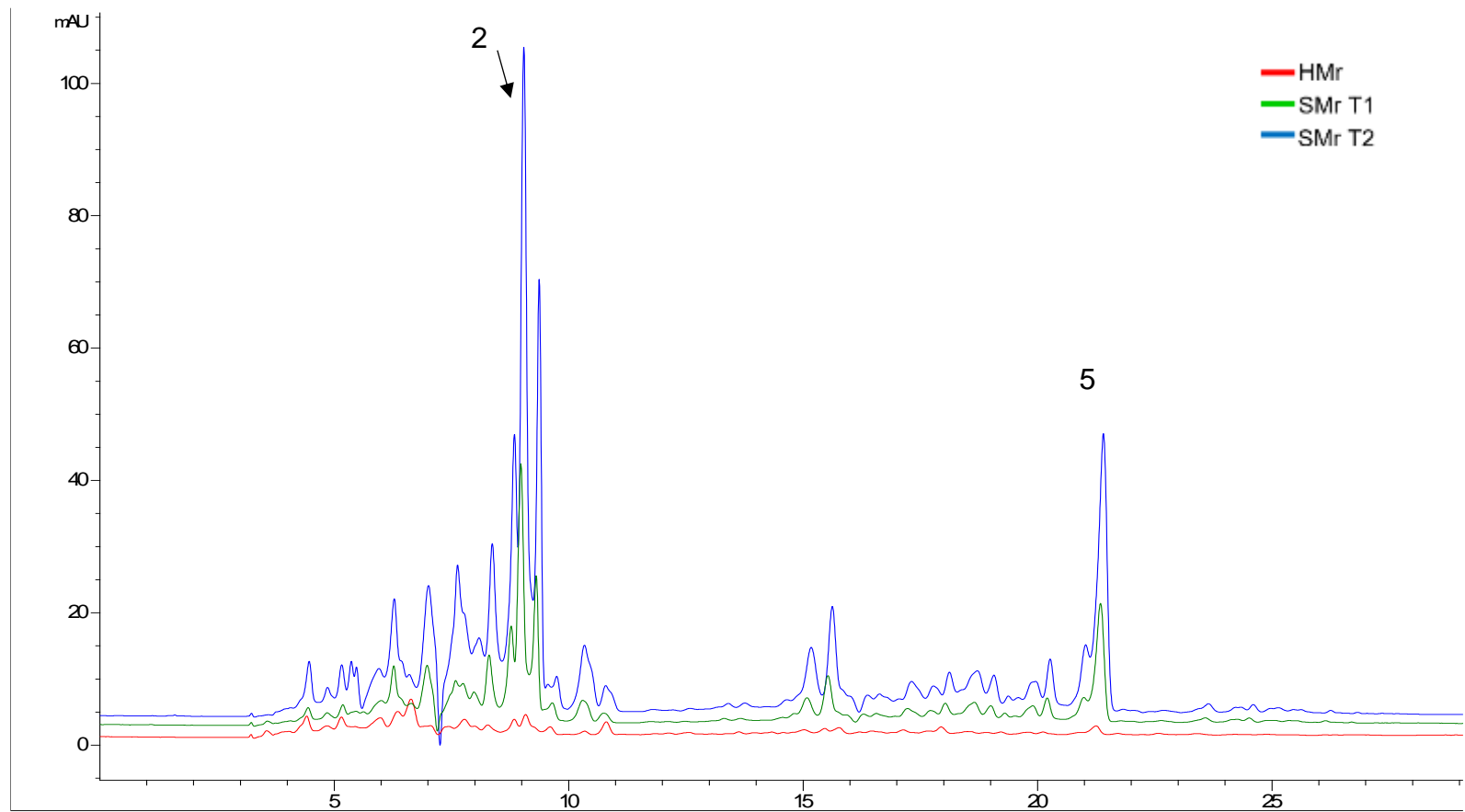
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (28 de Febrero de 2020). *Avance de Siembras y Cosechas. Resumen por estado*. Recuperado el 20 de Marzo de 2020, de Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera.: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- Singh, R. P. (2019). Glycan utilisation system in Bacteroides and Bifidobacteria and their roles in gut stability and health. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(18), 7287-7315.
- SNICS. (2017). *Carteles de diversidad de cultivos nativos de México*. Documentos, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, México. Obtenido de Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas.
- Stahl, W., & Sies, H. (2003). Antioxidant Activity of Carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 345-351.
- Stahl, W., & Sies, H. (2005). Bioactivity and Protective Effects of Natural Carotenoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 101-107.
- Tang, Y., Cai, W., & Xu, B. (2015). Profiles of phenolics, carotenoids and antioxidative capacities of thermal processed white, yellow, orange and purple sweet potatoes grown in Guilin, China. *Food Science and Human Wellness*, 4, 123–132.
- Toledo-Aguilar, R., López-Sánchez, H., Santacruz-Varela, A., Valadez-Moctezuma, E., López, P. A., Aguilar-Rincón, H., . . . Vaquera-Huerta, H. (2016). Characterization of genetic diversity of native 'Ancho' chili populations of Mexico using microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76(1), 18-26.
- Turcsi, E., Nagy, V., & Deli, J. (2016). Study on the elution order of carotenoids on endcapped C18 and C30 reverse silica stationary phases. A review of the database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 47, 101-112.

- Unlu, N. Z., Bohn, T., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2005). Carotenoid Absorption from Salad and Salsa by Humans Is Enhanced by the Addition of Avocado or Avocado Oil. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 431-436.
- van het Hof, K., Tijburg, L., Pietrzik, K., & Weststrate, J. (1999). Influence of Feeding Different Vegetables on Plasma Levels of Carotenoids, Folate and Vitamin C. Effect of Disruption of the Vegetable Matrix. *Br. J. Nutr.*, 82, 203-212.
- Vela, E. (2009). Los chiles de México. Propiedades medicinales del chile. *Revista Arqueológica Mexicana*, 32.
- Victoria-Campos, C. I., Ornelas-Paz, J. D., Yahia, E. M., & Failla, M. L. (2013). Effect of the interaction of heat-processing style and fat type on the micellarization of lipid-soluble pigments from green and red pungent peppers (*Capsicum annuum*). *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(15), 3642-3653.
- Victoria-Campos, C. I., Ornelas-Paz, J. D., Yahia, E. M., Jiménez-Castro, J. A., Cervantes-Paz, B., Ibarra-Junquera, V., . . . Escalante-Minakata, P. (2013). Effect of ripening, heat processing, and fat type on the micellarization of pigments from jalapeño peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9938-9949.
- Wald, J. P., Nohr, D., & Biesalski, H. K. (2018). Rapid and easy carotenoid quantification in Ghanaian starchy staples using RP-HPLC-PDA. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 119-127.
- Wang, A., Zhang, F., Huang, L., Yin, X., Li, H., Wang, Q., . . . Xie, T. (2010). New progress in biocatalysis and biotransformation of flavonoids. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10), 847-856.
- Wang, H., Xue, Y., Zhang, H., Huang, Y., Yang, G., Du, M., & Zhu, M. J. (2013). Dietary grape seed extract ameliorates symptoms of inflammatory bowel disease in IL 10-deficient mice. *Molecular nutrition & food research*, 57(12), 2253-2257.
- Watanabe, K., Kon, M., Takahashi, B., & Hirota, S. (1999). Cis-trans isomers of β -carotene in fresh vegetables and fruits. *Food Science and Technology Research*, 5(3), 308-310.

- West, C. E., & Castenmiller, J. J. (1998). Quantification of the "SLAMENGI" factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *International Journal for Vitamin and Nutrition research*, 68(6), 371-377.
- Wright, A. J., Pietrangelo, C., & MacNaughton, A. (2008). Influence of simulated upper intestinal parameters on the efficiency of beta carotene micellarisation using an in vitro model of digestion. *Food chemistry*, 107(3), 1253-1260.
- Xiao, J., Muzashvili, T. S., & Georgiev, M. I. (2014). Advances in the biotechnological glycosylation of valuable flavonoids. *Biotechnology advances*, 32(6), 1145-1156.
- Yahia, E. M., & Ornelas-Paz, J. D. (2010). Chemistry, stability, and biological actions of carotenoids. En *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability* (págs. 177-222). Wiley-Blackwell, Ames.
- Yamaguchi, T., Mizobuchi, T., Kajikawa, R., Kawashima, H., Miyabe, F., Terao, J., & Matoba, T. (2001). Radical-scavenging activity of vegetables and the effect of cooking on their activity. *Food Science and Technology Research*, 7(3), 250-257.
- Zamora-Gasga, V. M., Montalvo-González, E., Loarca-Piña, G., Chacón-López, A. M., Tovar, J., & Sáyago-Ayerdi, S. G. (2017). Dietary patterns, nutritional profile, and body mass index in Mexican schoolchildren: A cross-sectional study. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 67(1), 6-14.
- Zeb, A. (2012). Oxidation and formation of oxidation products of β carotene at boiling temperature. *Chem. Phys. Lipids*, 165, 277–281.
- Zeb, A., & Nisar, P. (2017). Effects of high temperature frying of spinach leaves in sunflower oil on carotenoids, chlorophylls, and tocopherol composition. *Frontiers in Chemistry*, 5, 19.
- Zepka, L. Q., & Mercadante, A. Z. (2009). Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*, 117(1), 28-34.

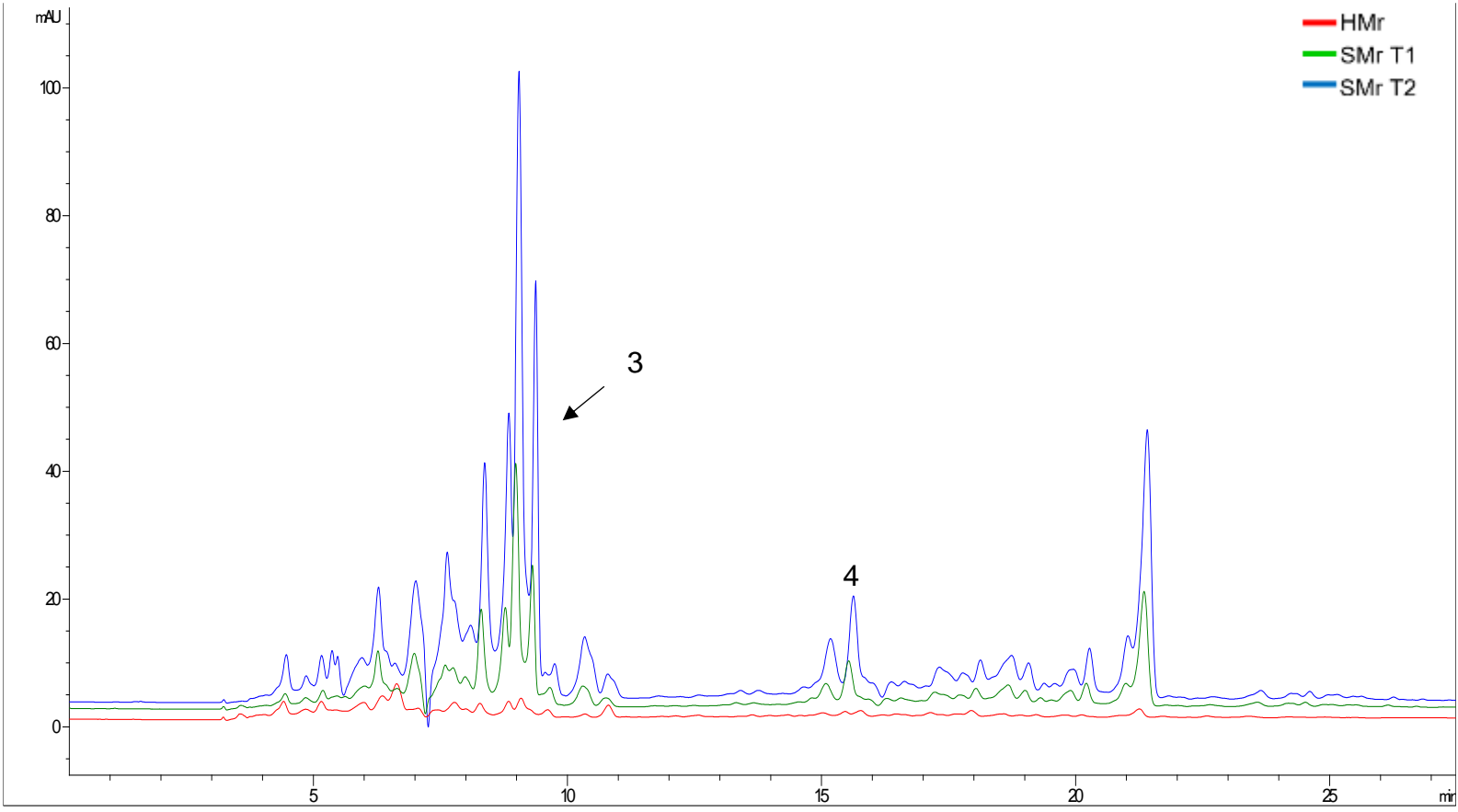
ANEXOS

ANEXO 1. Cromatogramas de salsas de chile 'Morita'.



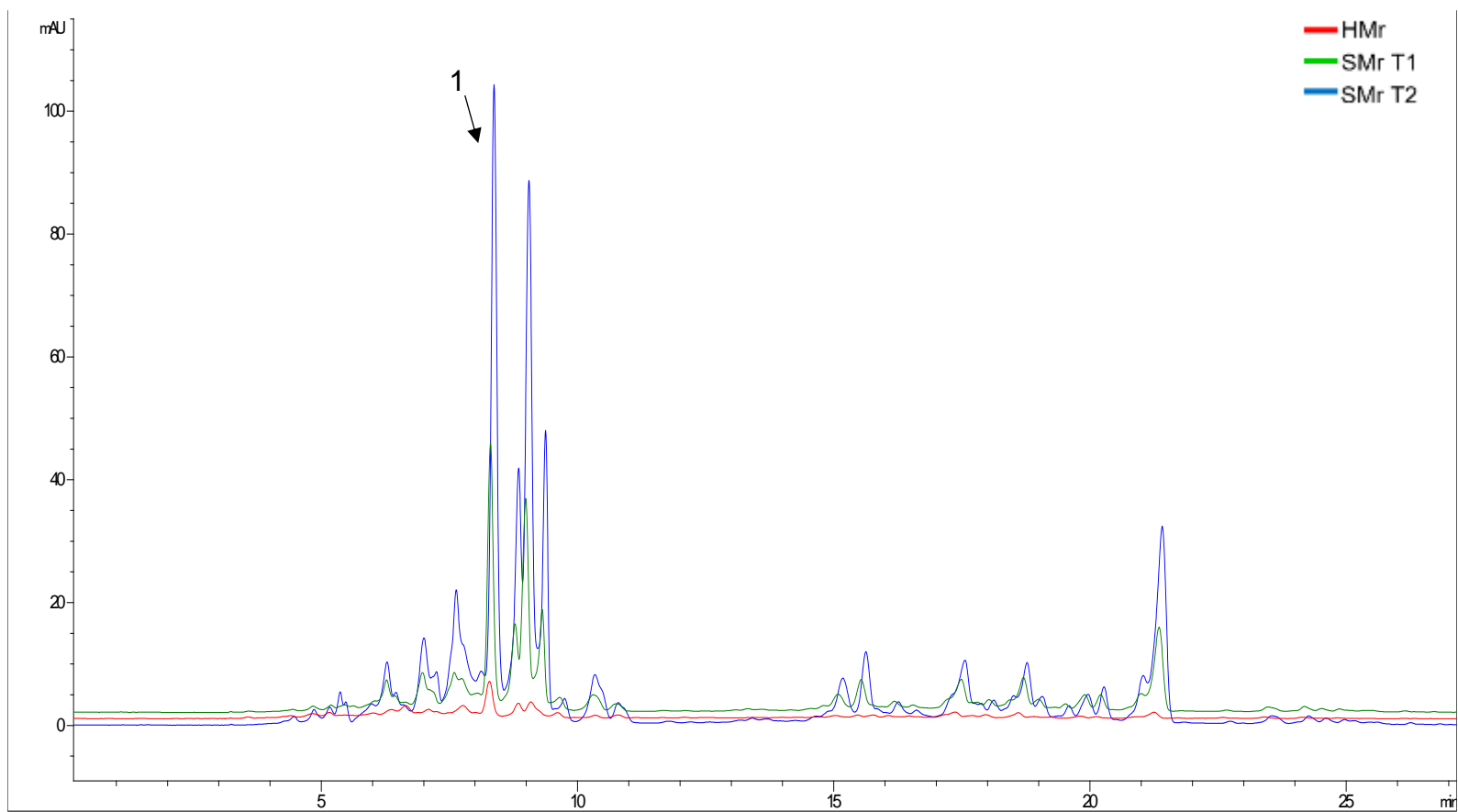
Cromatograma de extractos de CC de salsas de chile 'Morita' 452 nm.

Rojo: salsas control, **verde:** salsa "macha" 100 °C; **azul:** salsa "macha" 140°C. **(2)** zeaxantina, **(3)** Isómero Zeaxantina/ β -criptoxantina, **(5)** β -caroteno.



Cromatograma de extractos de CC de chile 'Morita' 454 nm.

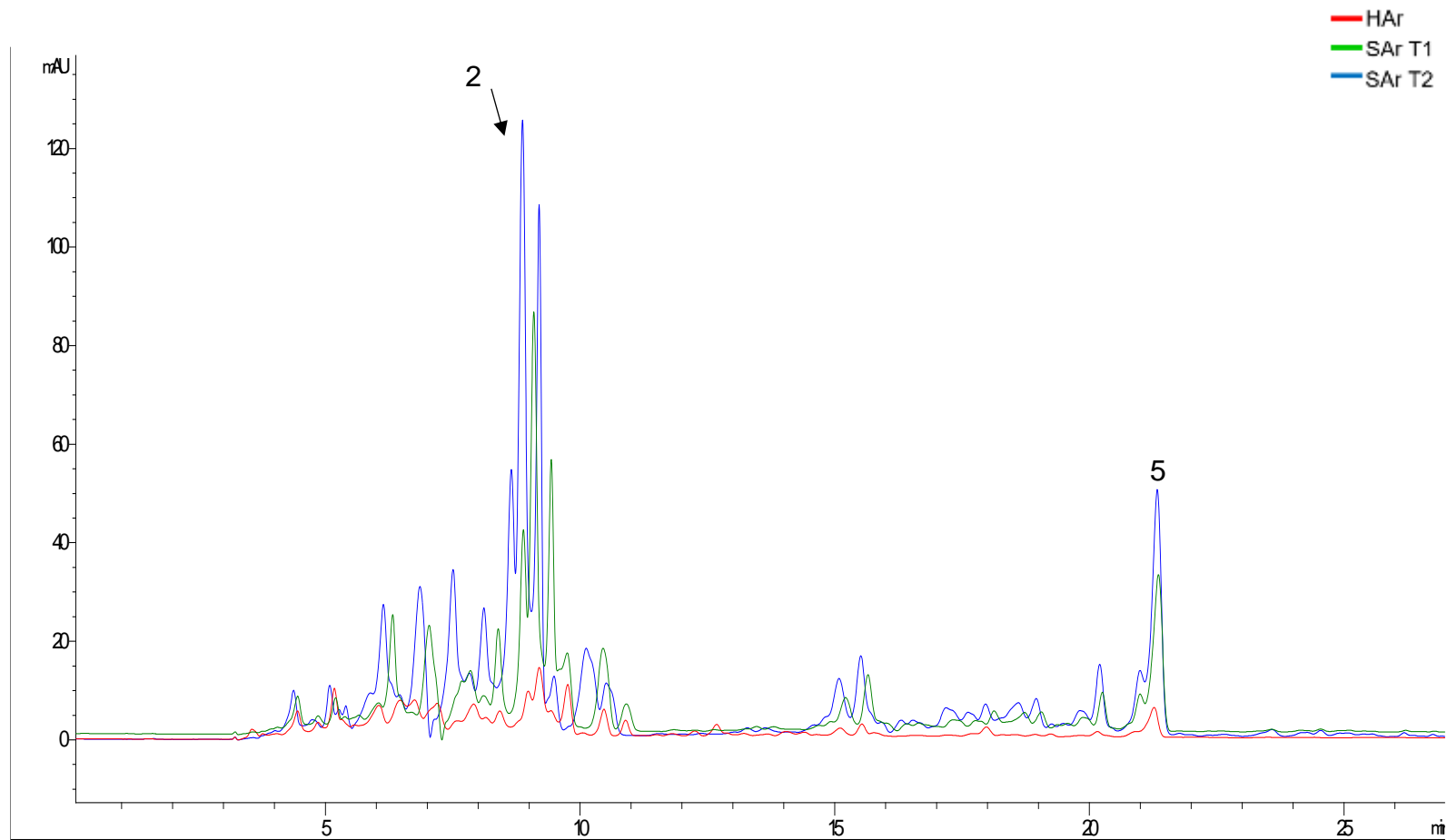
Rojo: salsas control, verde: salsa "macha" 100 °C; azul: salsa "macha" 140°C. (4) β-criptoxantina.



Cromatograma de extractos de CC de chile 'Morita' 474 nm.

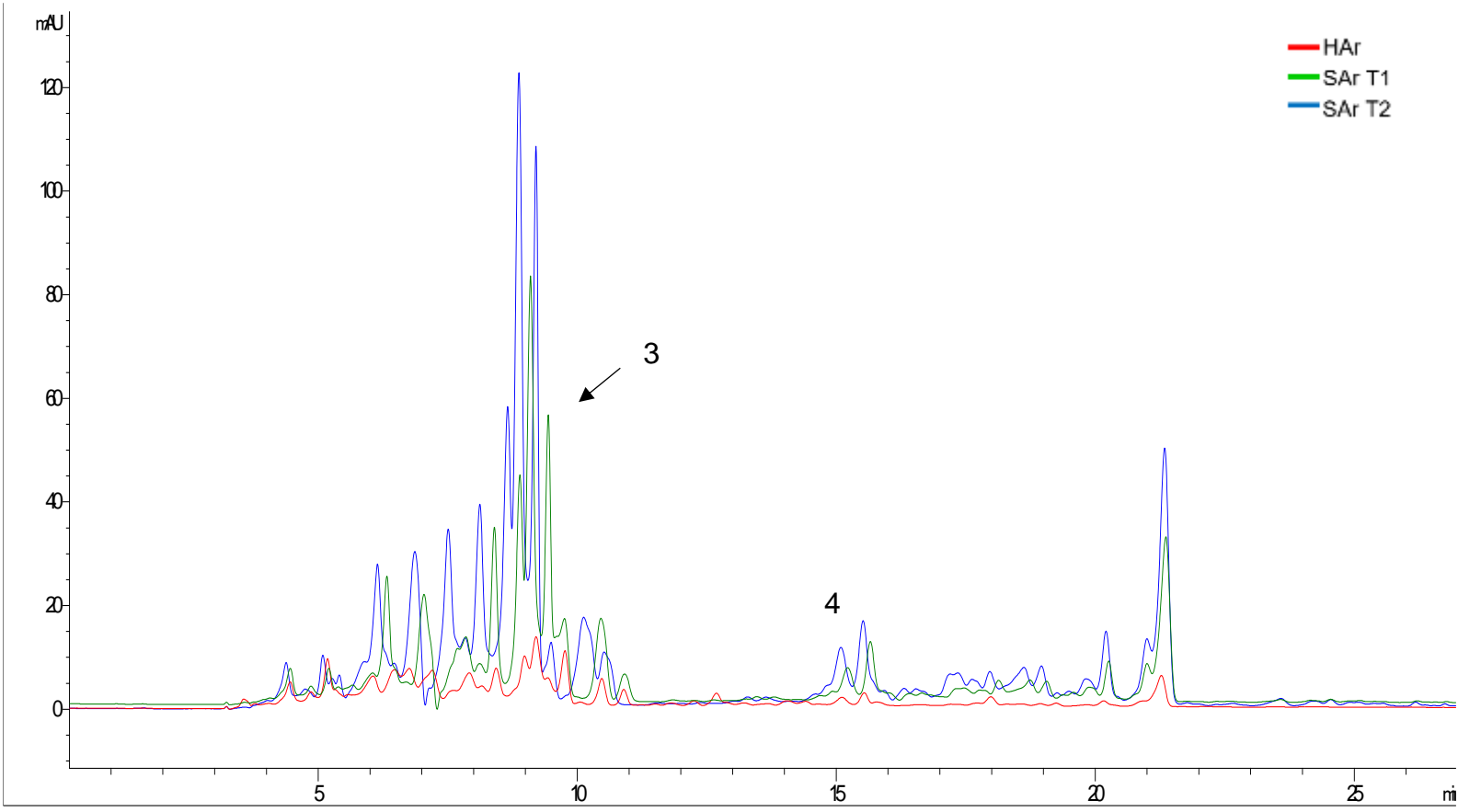
Rojo: salsas control, **verde:** salsa "macha" 100 °C; **azul:** salsa "macha" 140°C. **(1)** capsantina,

ANEXO 2. Cromatogramas de salsas de chile de 'Árbol'.



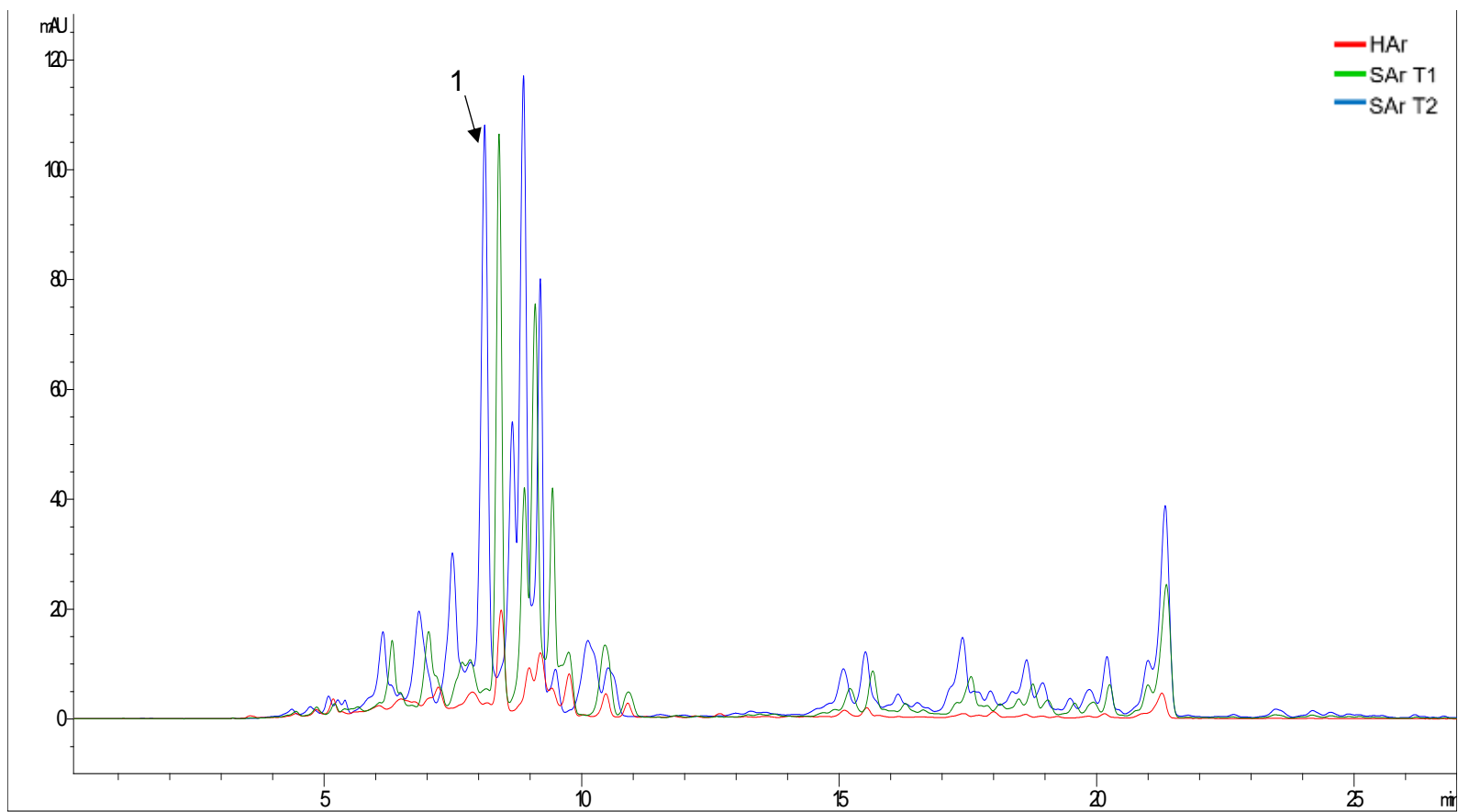
Cromatograma de extractos de CC de salsas de chile de 'Árbol' 452 nm.

Rojo: salsas control, **verde:** salsa "macha" 100 °C; **azul:** salsa "macha" 140°C. **(2)** zeaxantina, **(3)** Isómero Zeaxantina/ β -criptoxantina, **(5)** β -caroteno.



Cromatograma de extractos de CC de chile de 'Árbol' 454 nm.

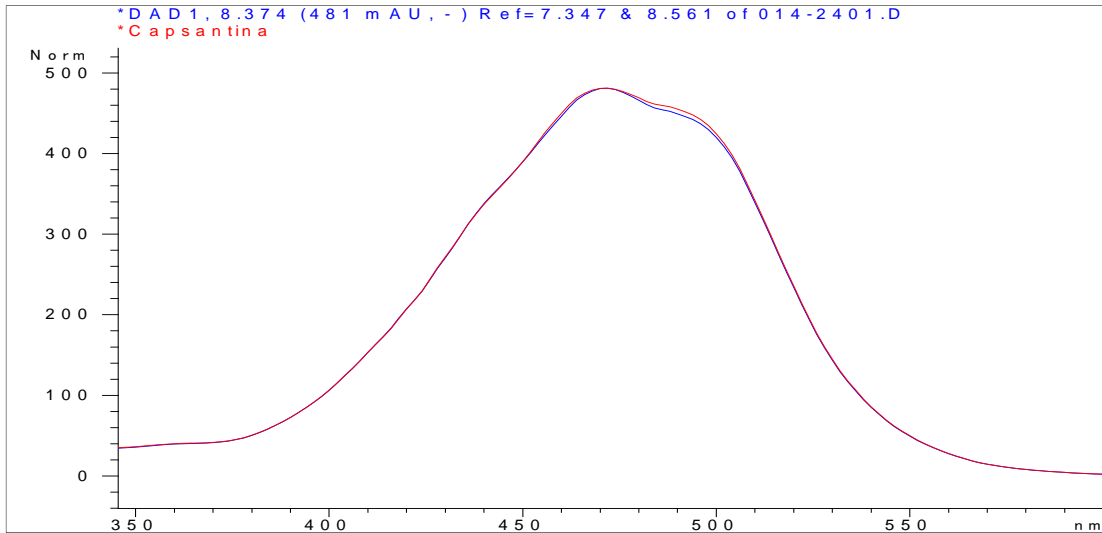
Rojo: salsas control, **verde:** salsa "macha" 100 °C; **azul:** salsa "macha" 140°C. **(4)** β-criptoxantina.



Cromatograma de extractos de CC de chile de 'Árbol' 474 nm.

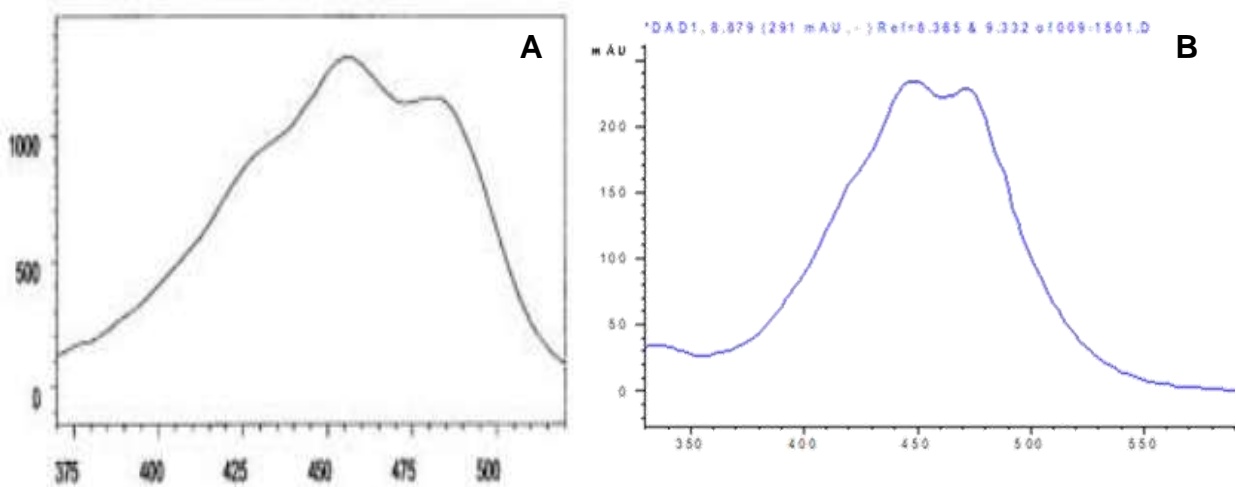
Rojo: salsas control, **verde:** salsa "macha" 100 °C; **azul:** salsa "macha" 140°C. **(1)** capsantina,

ANEXO 3. Espectros UV-Vis utilizados para la identificación de los CC en salsas de chile de 'Árbol' y chile 'Morita'.



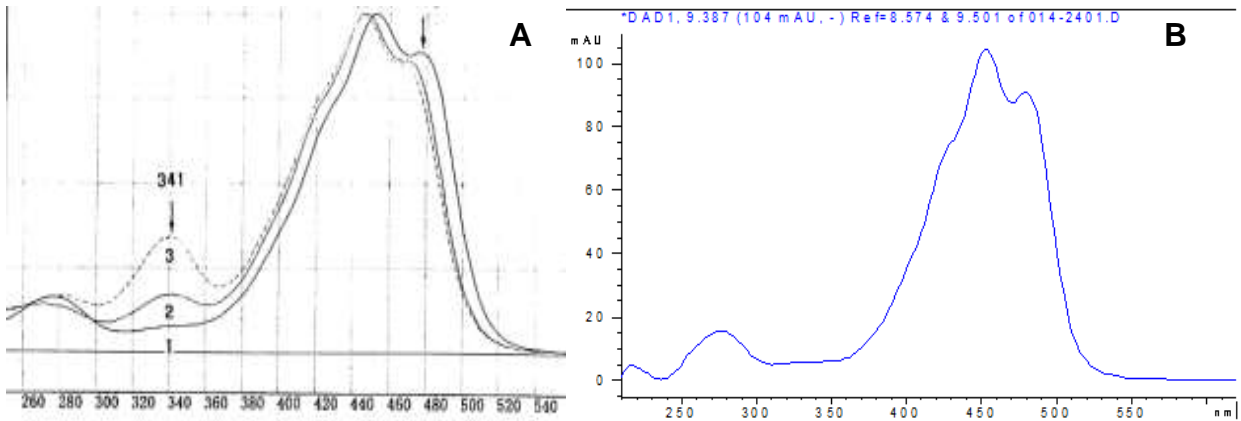
Espectro UV-Vis de estándar comercial de capsantina comparado con espectro UV-Vis de las salsas a 474 nm.

Rojo: capsantina; Azul: salsas



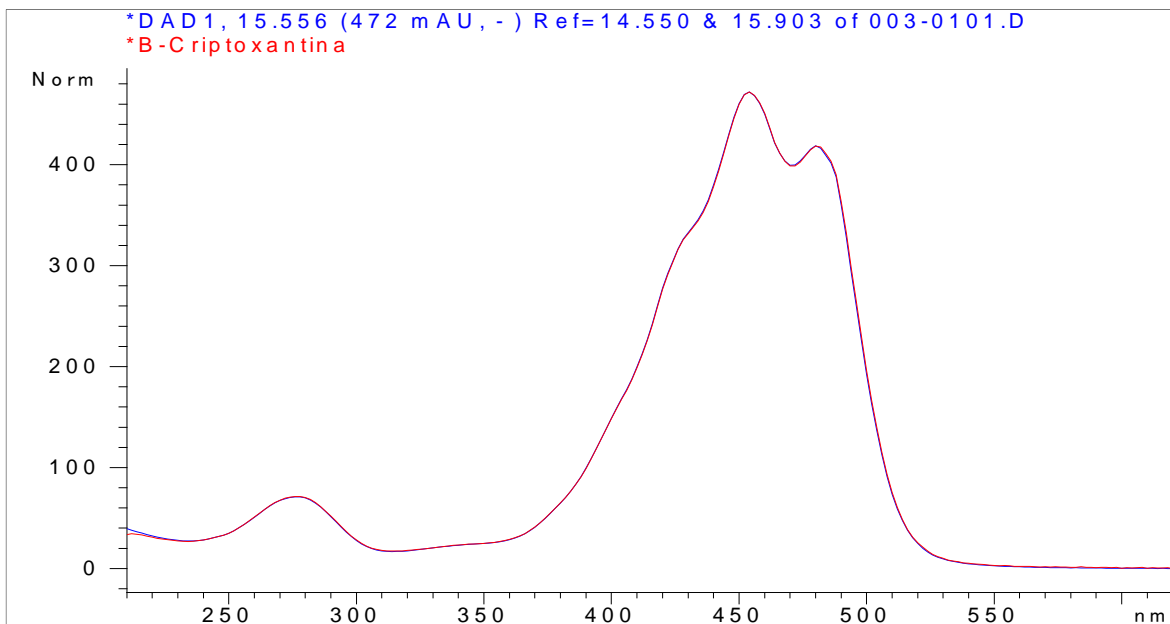
Espectro UV-Vis de la zeaxantina obtenido de (A) Bouvier y cols., (2013) comparado con espectro UV-Vis de las (B) salsas a 452 nm.

Gris: zeaxantina; Azul: salsas



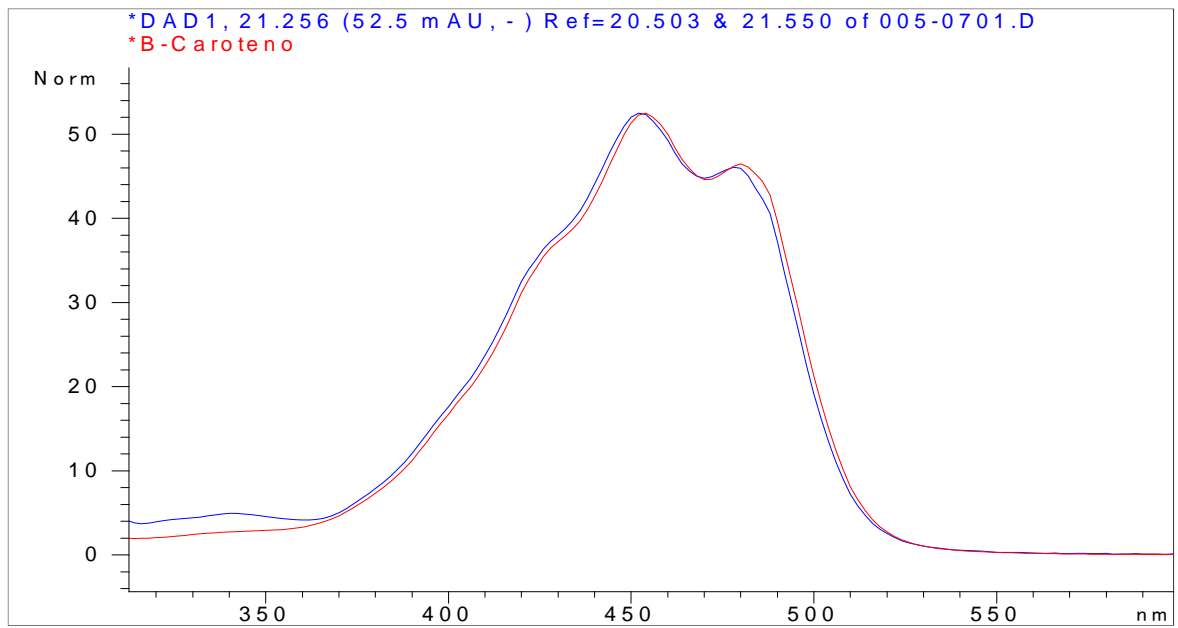
Espectro UV-Vis del isómero de la zeaxantina/ β -criptoxantina obtenido de (A) Wanatabe y cols. (1999) comparado con espectro UV-Vis de las (B) salsas a 452 nm.

(A)1: β -criptoxantina; 2: Zeaxantina (B)Azul: salsas



Espectro UV-Vis de estándar comercial de β -criptoxantina comparado con espectro UV-Vis de las salsas a 454 nm.

Rojo: β -criptoxantina; Azul: salsas



Espectro UV-Vis de estándar comercial de β -caroteno comparado con espectro UV-Vis de las salsas a 452 nm.

Rojo: β -caroteno; Azul: salsas