



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Extracción de capsaicina y evaluación de su actividad antimicrobiana frente a: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Hernán Patricio Chipantiza Quinatoa

Tutora: Lic. Nahir Yerely Dugarte Jiménez, Ph.D

Ambato - Ecuador

Abril - 2017

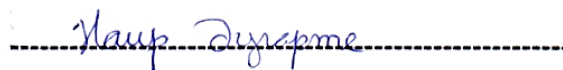
APROBACIÓN DEL TUTOR

Lic. Nahir Yerely Dugarte Jiménez, Ph.D

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 15 Febrero del 2017.



Lic. Nahir Yerely Dugarte Jiménez, Ph.D

C.I: 1753479193

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Hernán Patricio Chipantiza Quinatoa, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Hernán Patricio Chipantiza Quinatoa

C.I: 180368135-0

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:



Presidente del tribunal



Lic. Mg. Danae Fernández Rivero

C.I. 175718120-9



Lic. Mg. Yunis Pérez Betancourt

C.I. 175647274-0

Ambato, 28 de Marzo de 2017

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Hernán Patricio Chipantiza Quinatoa

C.I: 180368135-0

AUTOR

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico primero a mis padres, Marco y Narcisa, que han sido mi fortaleza, mi apoyo y quienes han confiado en mí durante este tiempo de formación académica en el que he aprendido y desarrollado diferentes aptitudes y ganado experiencia para poner en práctica mi profesión, también quiero agradecer a mi hermana Karla, porque sin ella no habría sido posible que llegue a este punto de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos por permitirme crecer profesionalmente y ser mi segundo hogar.

A la Unidad Operativa de Investigación y desarrollo (UODIDE) y todo su equipo por facilitar el desarrollo de la parte experimental de esta investigación

A la Lic. Nahir Dugarte, Ph.D y la Ing. Mirari Arancibia, Ph.D por el tiempo, paciencia y por la oportunidad de desarrollar junto a ellos el trabajo de investigación, sin su ayuda no hubiera sido posible su realización, muchas gracias.

A todos los profesores por impartirme sus conocimientos, orientándome de la mejor manera.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PÁGINAS PRELIMINARES

Contenido

APROBACIÓN DEL TUTOR	II
TUTOR II	
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	III
AUTOR III	
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	IV
DERECHOS DE AUTOR	V
AUTOR V	
DEDICATORIA.....	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	10
EL PROBLEMA.....	10
1.1. Tema de la investigación	10
1.2. Justificación	10
1.3. Objetivos	11
1.3.1. Objetivo general.....	11
1.3.2. Objetivos específicos	11
CAPÍTULO II	12
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Antecedentes investigativos.....	12
2.2. Hipótesis	14
2.3.1.1. Variable Independiente.....	15
CAPÍTULO III	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.2. Extracción de la oleoresina o extracto de ají.	17

CAPÍTULO IV.....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1. ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS	25
4.1.1. Extracción de oleorresina	25
4.1.2. RECUBRIMIENTOS	26
4.1.2.3. Color.....	28
4.1.3. Microscopía electrónica de barrido	31
4.1.4. Espectroscopía infrarroja.....	33
4.1.5. Pruebas de actividad antimicrobiana	34
CAPÍTULO V.....	36
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	36
5.1. Conclusiones.....	36
5.2. Recomendaciones	37
Referencias Bibliográficas	38

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AJÍ.....	1
TABLA 2 VALORES CORRESPONDIENTES AL PESO DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS EN LA EXTRACCIÓN Y PESO DEL EXTRACTO OBTENIDO DESPUÉS DE LA CONCENTRACIÓN EN EL ROTA VAPOR.....	20
TABLA 3 RESUMEN DE RENDIMIENTO DE EXTRACTO PARA CADA EXPERIMENTO DE LAS DOS VARIEDADES DE AJÍ.....	26
TABLA 4 VALORES DEL DIÁMETRO DE HALO DE INHIBICIÓN MEDIDO EN CM.	35

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA CAPSAICINA.	3
FIGURA 2 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL QUITOSANO.....	5
FIGURA 3 ESPECIES DE AJÍ UTILIZADAS EN EL ESTUDIO, A) AJÍ ROCOTO (CAPSICUM PUBESCENS) Y B) AJÍ TABASCO (CAPSICUM FRUTECEMS).	17
FIGURA 4 ESQUEMA DE ARMADO DEL EQUIPO UTILIZADO PARA LA EXTRACCIÓN.....	18
FIGURA 5 ESQUEMA DE ARMADO DEL EQUIPO UTILIZADO PARA LA CONCENTRACIÓN.	19
FIGURA 6. EQUIPO PORTÁTIL DE MEDICIÓN DE ESPESOR POR ULTRASONIDO	21
FIGURA 7 EQUIPO DE SECADO POR ASPERSIÓN.	22
FIGURA 8 EQUIPO DE MEDICIÓN DE COLOR.....	22
FIGURA 9 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.....	23
FIGURA 10 ESPESOR DE LAS PELÍCULAS μM	27
FIGURA 11 RENDIMIENTO DEL PROCESO DE ENCAPSULACIÓN.	28
FIGURA 12 VALORES DE LOS PARÁMETROS L^* , A^* , B^*	29
FIGURA 13 VALORES OBTENIDOS PARA EL PARÁMETRO L^* DE LOS RECUBRIMIENTOS.	30
FIGURA 14 VALORES OBTENIDOS PARA EL PARÁMETRO L^* DE LOS RECUBRIMIENTOS.	30
FIGURA 15 IMÁGENES OBTENIDAS EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO PARA LAS MUESTRAS ENCAPSULADAS, (A,B,C) PARTÍCULAS DISPERSAS DE LAS MUESTRAS, (D,E,F) DIÁMETRO DE PARTICULA.	32
FIGURA 16 IMÁGENES OBTENIDAS EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO, (A,B) VARIEDAS DE AJI ROCOTO, TABASCO. (C) CONTROL.	33
FIGURA 17 ESPECTRO OBTENIDO PARA LAS DOS VARIEDADES DE AJÍ.	34

RESUMEN

La finalidad del presente trabajo de investigación fue optimizar el proceso de extracción de capsaicina (Oleoresina) de dos variedades de ají por el método de extracción continua utilizando un equipo de extracción soxhlet modificando el número de descargas y la temperatura de concentración en el rotavapor. El número de descargas y temperatura de concentración óptimo para la variedad de ají (*Capsicum pubescens*) fue de 3 y 40 C° respectivamente, mientras que para la variedad de ají (*Capsicum frutescens*) fue de 2 y 40 C°. La capacidad de inhibición de los extractos obtenidos se evaluó en estado puro como incorporado en una matriz polimérica de quitosano en solución filmogénica, película y microencapsulado para preservar y enmascarar el extracto de ají. La actividad antimicrobiana fue mayor en Gram – (*Escherichia.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) tanto en solución filmogénica como microencapsulado. Se observó la formación de halos de menor tamaño en Gram + (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*) y en hongos no se formaron halos de inhibición.

Palabras clave: Capsaicina, actividad antimicrobiana, oleoresina, quitosano, recubrimientos

ABSTRACT

The purpose of this research was to optimize the process of extracting capsaicin (Oleoresin) from two different chilli by the continuous extraction method using a soxhlet extraction equipment modifying the number of discharges and the concentration temperature in the rotavapor. The number of discharges and the optical temperature for the variety of capsicum peppers was 3 and 40 C ° respectively, while for the variety of chilli peppers (frutescens) it was 2 and 40 C °. The ability of inhibition of the extracts obtained was evaluated in the pure state as incorporated into a chitosan polymer matrix in the resolution, film and microencapsulated film to preserve and mask the pepper extract. The antimicrobial activity was higher in Gram - (*Escherichia.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) in both the filmogenic and microencapsulated solutions. The formation of smaller halos in Gram + (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*) was observed and in fungi no halos of inhibition were formed.

Key words: Capsaicin, antimicrobial activity, oleoresin , chitosan, coatings

INTRODUCCIÓN

Capsicum

Este vegetal “capsicum” comúnmente conocido como ají viene del latino Haxi, se lo llamó también en norte américa por los aztecas como chile proveniente del náhuatl “chili”(dechile.net, 2017). El fruto del capsicum es una baya que tiene forma cónica o esférica con interior hueco y presenta 4 divisiones o compartimentos donde se alojan las semillas en los tabiques cercanos al tallo (Restrepo Gallego, 2012). El centro de origen de Capsicum spp es América del Sur. El número de especies silvestres que comprende el género Capsicum es de 20 a 23 (Castañón-Nájera, Latournerie-Moreno, Mendoza-Elos, Vargas-López, & Cárdenas-Morales, 2008). Del género han sido domesticadas C. annuum, C. chinense, C. frutescens, C. baccatum y C. pubescens (Hernández-Verdugo et al., 2012). Si bien la taxonomía del género es compleja, debido a la variabilidad de tipos existentes en las formas cultivadas y a la diversidad de criterios utilizados en su clasificación, se puede clasificar taxonómicamente de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación taxonómica del ají.

División	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Tubiflorae
Familia	Solanaceae
Genero	Capsicum

Fuente: (Elizalde, 2009)

El chile (Capsicum spp.) se puede utilizar tanto fresco como seco, también formando parte de condimentos en polvo, debido a la presencia de pigmentos se ha usado como colorante natural, posee características antioxidantes, demuestra capacidad inhibitoria del crecimiento de hongos y bacterias, en la industria farmacéutica, en cosmetología entre otros (Martín & González, 1991).

Capsicum pubescens

Esta planta se cultiva desde México hasta el Perú, pero su lugar de origen es Colombia y Perú. Crece en zonas relativamente elevadas. Para esta especie se conocen los nombres vulgares de "ají", "ají rocoto", "totsha" (Kamsá), "ají de guacamayo" y "padotú" (Andoque). Esta variedad de chile se caracteriza por ser arbustos con tallos angulados, pubescentes, purpurinos en los nudos; ramas anfractuosas. El fruto de esta planta, que es muy picante, se utiliza como condimento en comidas; la planta es cultivada en Ecuador y Perú (**Mutis y Bosio, 2004**).

Capsicum frutescens

Esta especie se cultiva en las regiones tropicales y subtropicales de América (México, Costa Rica, Guatemala, Colombia, Venezuela y Puerto Rico), es más conocido como "tabasco". Su distribución natural original es en los terrenos bajos de Sudamérica desde Brasil a América central y en la las Indias occidentales. Se desarrolla bien en un amplio rango de climas, desde cálidos a frescos y puede cultivarse desde 0 hasta los 1000 metros sobre el nivel del mar. Por lo general son arbustos pequeños, de hasta 2 m de alto, fruto inmaduro verde sin pigmentación oscura, con pulpa frecuentemente blanda y semillas de color amarillo (**Montes, 2008**).

Capsaicina generalidades

Los capsaicinoides pertenecen al grupo de compuestos llamados fenil-propanoides, están presentes en los frutos del ají (capsicum). La importancia de este compuesto es de gran utilidad en varias industrias como en la alimentaria por su sabor pungente, se puede aplicar en la medicina para disminuir dolores musculares y en ciertas aplicaciones asociadas a la diabetes, osteoartritis y soriasis; el componente activo del ají se usa como principal ingrediente en la elaboración del gas pimienta, también presenta una importante inhibición de la actividad microbiana (**Elizalde, 2009**).

Propiedades

La capsaicina es el compuesto más importante dentro del grupo de capsaicinoides y es uno de los compuestos activos que produce el sabor pungente en las diversas variedades de chiles. Su fórmula es $C_{18}H_{27}NO_3$ y su estructura se muestra a continuación:

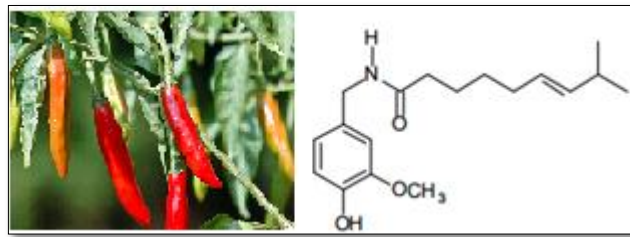


Figura 1. Estructura química de la capsaicina.

La capsaicina pura, tiene una forma de cristales blancos con punto de fusión de 64,5 °C y es volátil arriba de esta temperatura, el vapor de la capsaicina es irritante y altamente tóxico. Además, es un compuesto lipofílico, insoluble en agua a temperatura ambiente y soluble en alcoholes, acetona, benceno y cloroformo. Debido a la presencia de un anillo bencénico, los capsaicinoides pueden absorber la luz en la región ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 280 nm (**Elizalde, 2009**).

Extracción de capsaicina

La extracción de oleorresina de ají o pimentón se basa en un proceso clásico de extracción sólido-líquido o (lixiviación) del material vegetal, por medio de diferentes solventes orgánicos como: etanol, acetona, diclorometano, éter de petróleo, tricloroetileno o hexano. Por lo general es más utilizado el hexano en las extracciones debido a su afinidad con ciertos compuestos. El etanol surge como una alternativa menos riesgosa, puesto que no es tóxica para las personas. El tiempo que requiere el etanol al 95% para realizar una extracción es de aproximadamente (30-50 minutos). Para iniciar con el proceso de extracción de la oleorresina, es necesario preparar el material vegetal, separando las semillas del pericarpio y tallos de los frutos

previamente lavados. El rango de materia prima/disolvente que se utiliza comúnmente es de 0,6 Kg/L por 12 minutos para lograr hacer una extracción con resultados significativos, a partir de estos valores se puede modificar las variable para obtener diferentes valores (**Fernández-Trujillo, 2007**).

Recubrimientos

Un recubrimiento se puede considerar como una matriz continua que está formulada a partir de lípidos, proteínas o carbohidratos, en algunos casos se pueden presentar como mezclas de los materiales antes mencionados. Esta formulación les confiere propiedades fisicoquímicas diferentes e interesantes con variados usos en la industria. Uno de los carbohidratos utilizados en la elaboración de recubrimientos es el quitosano, que debido a sus características inhibitorias de crecimiento microbiano ha sido una de las alternativas más viables para detener la multiplicación de hongos y bacterias. Se puede potencializar las propiedades de un recubrimiento, pues sirven como vehículo para un variado rango de aditivos, como extractos de plantas con acción microbianas, esto les brinda mayor estabilidad y mejora el rendimiento del recubrimiento. Al formular recubrimientos con quitosano y adicionar a las formulaciones productos como extractos de plantas, se evita el desarrollo de microorganismos, se prolonga la vida útil de los productos agrícolas, y se mantienen las propiedades sensoriales de éstos (**Ramos-García et al., 2010**).

Quitosano

La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, el nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Forma parte de las conchas de los crustáceos y en el exoesqueleto de los insectos además se lo puede encontrar en las paredes celulares de ciertos hongos, levaduras y algas. No es soluble en agua o en medio ácido por lo que se requiere primero realizar un proceso de desacetilación hasta obtener quitosano finalmente (**Velásquez, 2003**).

El quitosano 2-amino-2-deoxi-B-D-glucano es un polisacárido obtenido a partir de la hidrólisis de la quitina en medio alcalino generalmente NaOH a temperaturas elevadas, el quitosano es la forma N-desacetilada de la quitina y se obtiene al sustituir los grupos acetamido por grupos amino, se compone de dos monómeros: N-acetilglucosamina y N-glucosamina esos componentes se encuentran aleatoriamente distribuidos y su porcentaje en la estructura se conoce como grado de desacetilación (% de grupos amino libres), el quitosano se solubiliza en ácidos y sus sales son hidrosolubles, además presenta mejores propiedades de reactividad y solubilidad (Velásquez, 2003), posee mejores propiedades de reactividad y solubilidad. Se obtiene al sustituir los grupos acetamido de esta por grupos amino, al tratar la quitina con álcalis fuertes (Mármol et al., 2013).

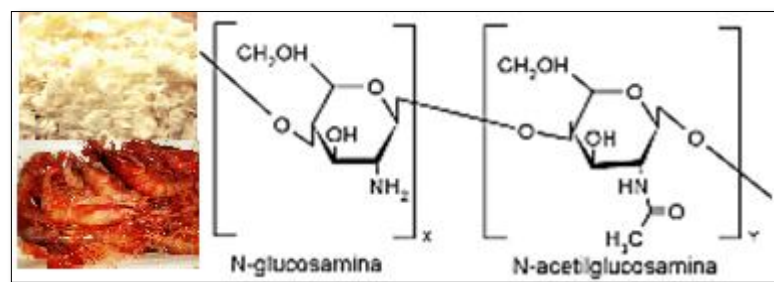


Figura 2. Estructura química del quitosano.

Microorganismos patógenos

La ingestión de alimentos o bebidas contaminados con microorganismos patógenos en altas concentraciones son la causa de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), este tipo de afecciones puede generar molestias individuales o grupales. La sintomatología que comúnmente se presenta al contraer una ETA es la siguiente: diarrea, vómito, choque séptico, hepatitis, cefaleas, fiebre, visión doble, etc (T. G. Flores & Herrera, 2005). Las ETA se producen por agentes específicos tales como: bacterias, hongos, virus y parásitos que en el interior del organismo se pueden multiplicar o pueden liarse y liberar toxinas o compuestos tóxicos, además pueden invadir la pared intestinal y de esta forma invadir otros aparatos o sistemas.

Generalmente estos microorganismos contaminan el alimento en varias etapas de la cadena alimentaria (producción, transporte, almacenamiento, elaboración, distribución y consumo). Este fenómeno no es nuevo, antiguamente la humanidad ha enfrentado diferentes enfermedades relacionadas al consumo de alimentos, actualmente han aparecido brotes de enfermedades y el aumento en la frecuencia de infectados es preocupante por lo que es importante el estudio de estos patógenos. En nuestro medio es común encontrar los siguientes agentes biológicos causantes de enfermedades: *St. aureus*, *Salmonella sp.*, *C. perfringens*, *B. cereus*, *C. jejuni*, *E. coli*, *Giardias*, *Amebas* y *Criptosporidium* (Lorenzo, Torres, & Fernández, 2001).

Bacterias

Bacillus cereus

El *bacillus cereus* es una bacteria esporulada de forma bacilar perteneciente a la familia de las Bacillaceae, miden de 1-1,2 x 3-5 μm , normalmente móvil, con flagelos peritricos. Es anaerobio facultativo, gram positiva, es patógena para el ser humano, su presencia en alimentos almacenados en refrigeración puede indicar una interrupción de la cadena de frío (Anderson & Pascual, 1999). Las cepas se asilan con frecuencia de platos de arroz, espaguetis, puré de papas, tallos de hortalizas, leche cruda y productos cárnicos. Los principales síntomas que presentan una contaminación con esta bacteria son: diarrea, cólicos, vómito y náuseas. Estos síntomas se detectan cuando existen más de 10^6 células de *B. cereus*. Además se le puede encontrar en el suelo, polvo y agua. La contaminación se produce cuando se ha ingerido alimentos que han permanecido varias horas a temperatura ambiente después de su cocción (Lorenzo et al., 2001).

Clostridium perfringens

Es una especie bacteriana perteneciente a la familia Bacillaceae y al género Clostridium. Está integrada por bacilos rectos, gruesos y a veces redondeados. Miden 0,3 µm de diámetro y 4-8 µm de largo. Son gram positivas inmóviles y esporuladas (**Anderson, 2005**). *Clostridium perfringens* es anaerobia capaz de formar esporas. Está muy extendida en el medio ambiente, suelo y las aguas residuales. Es comúnmente encontrada en los intestinos de los animales, incluidos los seres humanos, donde es patógena en ciertas circunstancias (**Petit, Gibert, & Popoff, 1999**).

Las esporas de esta bacteria son termoresistentes, soportan las temperaturas normales de preparación de alimentos. Se pueden desarrollar durante el enfriamiento lento, el almacenamiento a temperatura ambiente, recalentado inadecuado, llegando a alcanzar el número necesario para producir complicaciones en el organismo. Los principales síntomas son: cólicos, diarreas, náuseas por lo general sin vómitos y ausencia de fiebre entre las 8 y 12 horas siguientes al consumo del alimento contaminado. La transmisión se produce por la ingesta de alimentos contaminados a partir de heces o el suelo, por contacto directo con las fuentes, por las manos de los manipuladores o superficies y utensilios utilizados (**Lorenzo et al., 2001**).

Escherichia coli

Escherichia coli es un bacilo corto fimbriado, gram negativo y anaerobio facultativo, generalmente motil con flagelos peritricos, es de crecimiento rápido. Suele presentar una cápsula o microcápsula. En ocasiones las cepas producen un limo o sedimento abundante de polisacáridos (**J. A. S. Rodríguez, 2009; Sussman, 1997**). Esta bacteria se encuentra entre los agente biológicos que producen diarrea en los niños con mayor frecuencia, además es la responsable de producir la denominada “diarrea del viajero”, generalmente suele pertenecer en suministros de agua (sin purificación). Los síntomas asociados a esta bacteria suelen ser: diarrea líquida, dolores abdominales, vómitos en algunas ocasiones y puede generar deshidratación. Suele

permanecer en el organismo humano además en el interior de cerdos y bovinos, su periodo de incubación es de 10 y 72 horas luego de la ingesta de comida o agua contaminada (**Lorenzo et al., 2001**).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa aerobia, perteneciente a la familia pseudomonadaceae. Los miembros de la especie tienen un diámetro de 0,5 x 2,5 µm en promedio, utilizan flagelos polares para la motilidad (**Fick, 1992; Samadpour, 2001**), esta bacteria crece en el suelo, pantanos y hábitat marinos además en tejidos de plantas y animales. Esta bacteria es recurrente en pacientes inmunodeprimidos sometidos a hospitalización, con antecedentes de hospitalización y que han sido víctimas de quemaduras, infecciones de las vías urinarias. Esta bacteria presenta una resistencia alta por lo que su tratamiento puede presentar complicaciones (**Stover et al., 2000**). Tiene una mortalidad del 30-40% cuando se relacione a afecciones pulmonares (**Gómez et al., 2002**).

Hongos

Los hongos son organismos eucarióticos caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas, que en conjunto constituyen el micelio. Dichas estructuras representan la forma invasiva de los hongos patógenos y son las que se observan en las preparaciones histológicas del tejido infectado, aunque algunos hongos micelares pueden esporular también en el tejido invadido lo que facilita su diseminación. Sin embargo, un grupo importante también de hongos patógenos no producen hifas y se caracterizan por presentar únicamente estructuras unicelulares (levaduras) (**Guarro, 2012**)

Aspergillus niger

Aspergillus es un hongo cuyas esporas están presentes en el aire que respiramos, pero normalmente no causa enfermedad. En las personas con un sistema inmunológico debilitado, los pulmones dañados o con alergias, Aspergillus puede causar enfermedad (**Aspergillusweb, 2017**). El género Aspergillus, perteneciente al orden Eurotiales (clase Eurotiomycetes), incluye más de 250 especies, a 20 de las cuales se les atribuyen infecciones oportunistas en el hombre, aunque algunas de ellas solo ocasionalmente. Las especies de mayor interés clínico son *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus ustus*

CAPÍTULO I

1. EL PROBLEMA

1.1. Tema de la investigación

EXTRACCIÓN DE CAPSAICINA Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2. Justificación

Los microorganismos patógenos presentes en la mayor parte de ambientes, representan un gran inconveniente por el potencial peligro que generan al producir enfermedades que ponen en riesgo la salud de la población. Las plantas han sido utilizadas desde la antigüedad para prevenir y tratar algunas enfermedades sin el conocimiento de la composición y características que poseen para este efecto. Actualmente, las técnicas en biotecnología permiten caracterizar y aprovechar de manera eficiente el principio bioactivo de las plantas con potencial inhibitorio de patógenos como los producidos por un arbusto denominado capsicum.

El capsicum (planta de ají) posee un efecto inhibitorio en el crecimiento de microorganismos patógenos. La capsaicina es el principal compuesto bioactivo del ají, este agente detiene el crecimiento de algunos patógenos de interés que se encuentran presentes en alimentos, por lo que es importante el estudio tanto de la extracción del metabolito como de la evaluación de su actividad antimicrobiana.

La extracción de la capsaicina se basa en la obtención de una oleorresina (OR), por medio de una extracción sólido-líquido de los frutos del capsicum, utilizando solventes orgánicos como: acetona, éter de petróleo, hexano, etanol y propano. El etanol es el solvente más adecuado debido a que no genera graves impactos sobre el medio ambiente y la salud de los operarios, además no existe el riesgo de explosiones

como en el caso del propano, la afinidad del etanol por los compuestos de interés que se desea extraer es beneficiosa al momento de la extracción. Este tipo de extracción sólido-líquido es frecuente cuando se trabaja con material vegetal y se desea obtener un metabolito de interés. La extracción Soxhlet utilizada en el presente trabajo de investigación permite la interacción del solvente con la muestra de manera óptima y no requiere filtración del solvente después de la extracción, evitando pérdidas de la muestra y del extracto. De esta manera se puede continuar con el proceso de concentrado en el rotavapor del extracto obtenido.

La capsaicina concentrada obtenida después del proceso de extracción sólido-líquido con un solvente orgánico (etanol) y posteriormente concentrada al vacío con ayuda de un rotavapor puede ser utilizada en diferentes aplicaciones industriales, ya sea pura, o formando parte de recubrimientos (cobertura, biofilm, microencapsulado) con el fin de permitir una mejor distribución del producto y asegurar la protección del agente bioactivo a través del tiempo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de la capsaicina extraída a partir de dos especies de capsicum (*Capsicum pubescens*, *Capsicum frutescens*).

1.3.2. Objetivos específicos

- 1.** Optimizar el proceso de extracción en laboratorio del principio activo de dos variedades de capsicum.
- 2.** Determinar la concentración de capsaicina que demuestre actividad antimicrobiana
- 3.** Elaborar recubrimientos de quitosano en forma de cobertura, biopelícula y microencapsulado incorporado el extracto de capsaicina.
- 4.** Determinar la actividad antimicrobiana de los recubrimientos elaborados.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos

El interés por el uso de antimicrobianos obtenidos de plantas se ha incrementado en las últimas décadas, debido a los crecientes problemas asociados al empleo de los antibióticos y el incremento de la resistencia de las bacterias. Se ha reportado que los extractos etanólicos de ají demostraron actividad antimicrobiana en experimentos frente a *Escherichia coli*. Esto posiblemente se deba a que la mayoría de los componentes activos presentes en el ají (*Capsicum* sp.) son solubles en etanol. El alcohol etílico es el solvente que puede extraer estos tipo de compuestos, ya que el agua solo es capaz de extraer sustancias con las cuales pueda hacer puentes de hidrógeno y los éteres solo extraen sustancias apolares. En cambio el alcohol puede extraer sustancias parcialmente hidrófobas que puedan tener actividad bactericida **(Colivet, Belloso, & Hurtado, 2006)**.

Por otra parte se estableció que los extractos etanólicos de capsaicina presentan actividad antimicrobiana frente a varios microorganismos entre ellos *E. coli* que resultaron ser susceptibles a los componentes en los extractos, que principalmente son compuestos con estructura polifenólica. Se ha reportado que el chile tiene actividad antimicrobiana debido a la presencia de capsaicinoides, así como ácido ascórbico y polifenoles polares, los cuales promueven lisis celular **(Monroy, González-González, García-Martínez, Totosaus, & Pérez, 2008)**. También se presentan valores positivos de actividad antimicrobiana de los resultados del efecto inhibitorio de los extractos de chile en *E. coli*, *Penicillium spp* y *L. casei*. al incrementar el diámetro del halo de inhibición. El extracto de chile Habanero, presentó el mayor efecto inhibitorio **(Cerón-Carrillo, Munguía-Pérez, García, & Santiesteban-López, 2014)**.

De la misma manera se reporta que el efecto antifungico de extractos de chile se observa en cultivos de Agar papa-dextrosa realizados en laboratorio con cepas de hongos del genero *Aspergillus* por la presencia de halos de inhibición y el crecimiento radial del hongo (Moreno-Limón, Salcedo-Martínez, Cárdenas-Ávila, Hernández-Piñero, & Núñez-González, 2012). También se han reportado valores positivos de actividad antifungica con otro hongo *Alternaria alternata*, a partir del quinto día de tratamiento con extractos de chile se observa la mayor inhibición de crecimiento con respecto al número de conidios germinados y el crecimiento del micelio, estos resultados sugieren que los extractos interactúan con la pared celular del hongo inhibiendo algunas enzimas fúngicas, con lo que se afectaría la germinación de conidios y el crecimiento del micelio (Rodríguez-Maturino et al., 2015).

En el trabajo realizado por (Moreno-Limón et al., 2012), se documenta el efecto inhibitorio del capsicum debido a la capsaicina tanto para hongos como para bacterias, en el caso de los hongos se estudió el efecto antifungico con tres variedades de ají frente a *Botrytis cinérea* con resultados del 99% de inhibición en la germinación de esporas del hongo, utilizando extractos de ají. La actividad antibacteriana de los extractos de ají en este estudio también se demostraron para *Erwinia carotovora* que no existe diferencia significativa cuando se estudia el estado de conservación del ají, el estado de madures sin embargo afecta considerablemente a la actividad antimicrobiana de los extractos, demostrando una disminución a medida que el fruto alcanza una madures avanzada (Rojas, Jesus, & Padilla Espinoza, 2007)

2.2. Hipótesis

2.2.1. EFECTO DEL NÚMERO DE DESCARGAS EN LA EXTRACCIÓN Y TEMPERATURA DE CONCENTRACIÓN SOBRE EL RENDIMIENTO DEL EXTRACTO DE CAPSAICINA

Hipótesis Nula

El efecto del número de descargas en la extracción y la temperatura de concentración no afecta el rendimiento del extracto de capsaicina.

Hipótesis Alternativa

El efecto del número de descargas en la extracción y la temperatura de concentración afecta el rendimiento del extracto de capsaicina

2.2.2. EVALUACION DE LA CONCENTRACION DE AJI CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Hipótesis nula

La concentración del extracto de capsaicina obtenido no posee actividad antimicrobiana frente a *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Hipótesis alternativa

La concentración del extracto de capsaicina obtenido posee actividad antimicrobiana frente a: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3. SEÑALAMIENTO DE VARIABLES DE LA HIPÓTESIS

2.3.1. EFECTO DEL NÚMERO DE DESCARGAS EN LA EXTRACCIÓN Y TEMPERATURA DE CONCENTRACIÓN SOBRE EL RENDIMIENTO DEL EXTRACTO DE CAPSAICINA

2.3.1.1. Variable Independiente

Número de descargas en la extracción

Una descarga 1

Dos descargas 2

Tres descargas 3

Temperatura de concentración

20 °C

30 °C

40 °C

2.3.1.2. Variable Dependiente

Rendimiento del extracto obtenido

2.3.2. EVALUACION DE LA CONCENTRACION DE AJI CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3.2.2. Variable Independiente

Concentración de extracto de ají

0,5% p/v

1,0% p/v

1,5% p/v

2,0% p/v

2.3.2.3.Variable Dependiente

Actividad antimicrobiana en halos de inhibición frente a: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron dos especies de ají: ají rocoto (*Capsicum pubescens*) y ají tabasco (*Capsicum frutescens*) (Fig. 3). En las muestras se eliminaron los tallos de los frutos y se realizó un lavado para eliminar residuos de material vegetal, tierra, productos químicos y otros contaminantes. A continuación, las muestras se cortaron en cuadros de 5 mm^2 aproximadamente. Se pesaron 60 g de cada variedad en una balanza analítica (OHASUS, Modelo PA214, EE.UU.), esta operación se realizó por triplicado.

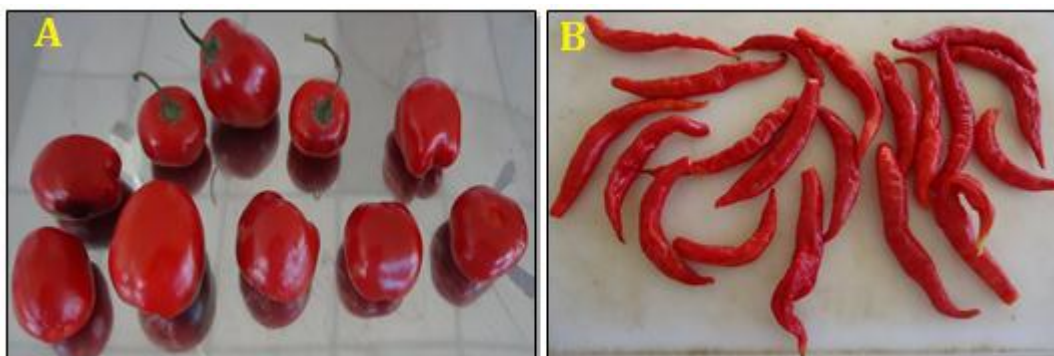


Figura 3. Especies de ají utilizadas en el estudio, A) ají rocoto (*Capsicum pubescens*) y B) ají tabasco (*Capsicum frutescens*).

3.2. Extracción de la oleorresina o extracto de ají.

Para la extracción, se utilizaron 60 g de muestra vegetal dispuestos en un dedal de papel filtro de 10 x 5 cm aproximadamente, en tres equipos de destilación Soxhlet (24/40 Kimax, EE.UU.), armados paralelamente. Se agregaron 250 ml de etanol 95% en cada uno de los balones de vidrio para la extracción. La extracción se realizó con diferente número de descargas: 2, 3 ,4 con una batería de sebelin (Quimis, Q308-16B, Brasil) a máxima temperatura (Núñez, 2008). (Fig. 4).

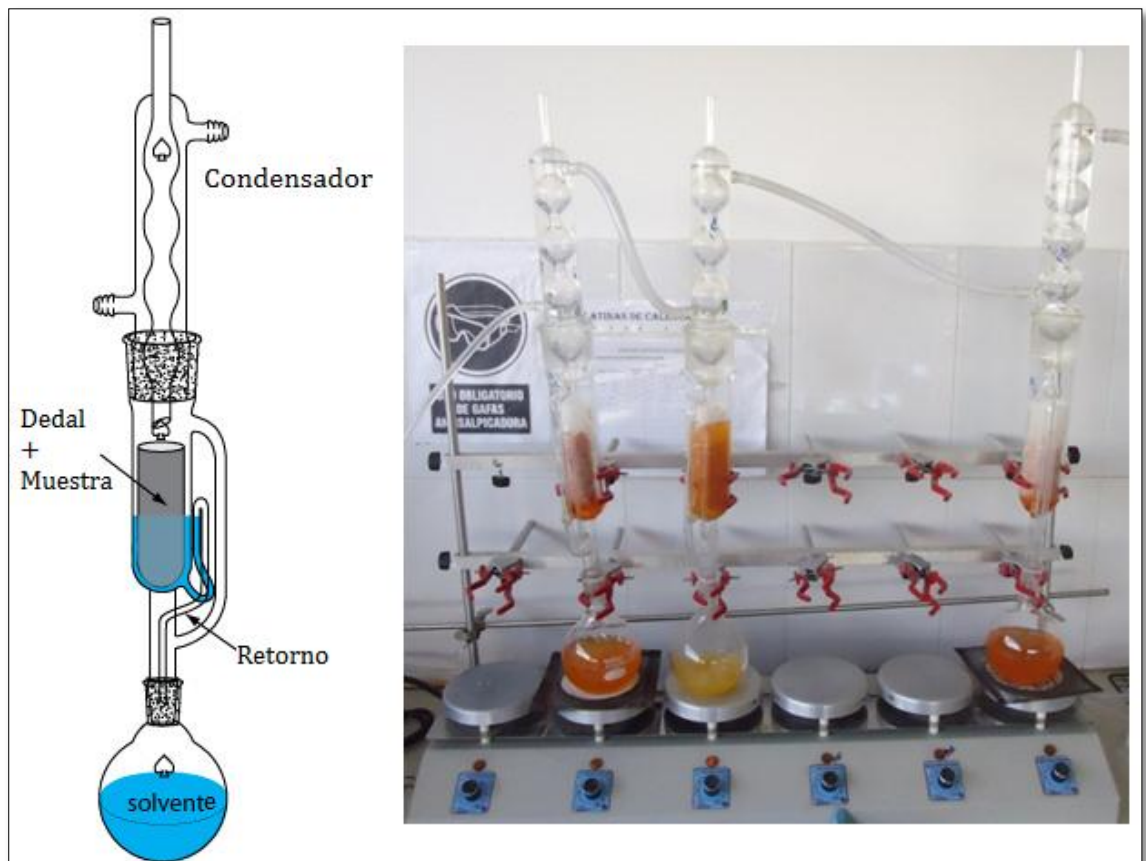


Figura 4. Esquema del equipo utilizado para la extracción.

3.3. Concentración de extracto de ají.

La concentración del extracto se realizó a temperaturas de 40 °C, 50 °C y 60 °C mediante un rotavapor (IKA, HB10, PAIS) a 64 rpm. (Fig. 5).



Figura 5. Esquema del equipo utilizado para la concentración.

3.4. Rendimiento de extracción

Para el cálculo del rendimiento de los extractos de ají obtenidos se utilizó la ecuación 1(Ec. 1)(González, 2004):

$$\mathbf{Rendimiento} = \frac{P_e}{P_o} * 100\% \text{ Ec. 1}$$

Dónde:

P_e: peso del extracto (g)

P_o: peso de material inicial (g)

Ejemplo de cálculo

Experimento realizado con la variedad de ají (*Capsicum pubescens*).

Numero de descargas = 2

Temperatura de concentración en rotavapor = 40 °C

Tabla 2. Valores correspondientes al peso de las muestras utilizadas en la extracción y peso del extracto obtenido después de la concentración en el rota vapor.

P_o (g)	P_e (g)	Rendimiento (%)
60,03	8,06	4,474
60,02		
60,02		
180,07		

$$\text{Rendimiento} = \frac{P_{\text{ext}}}{P_o} * 100\%$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{8,06}{180,07} * 100\%$$

$$\text{Rendimiento} = 4,47 \%$$

3.5. Dosis mínima inhibitoria

Para evaluar la dosis mínima inhibitoria, se realizó una dilución del extracto de ají en solución de quitosano 1% en ácido láctico 1% (p/v) (PROMECLIN) y glicerol 1% (v/v). Las concentraciones de extracto fueron: 0,5%; 1%; 1,5%; 2%. Posteriormente se impregnaron 40 µL de las soluciones en discos de papel de 5mm de diámetro y se colocaron los discos directamente en las placas previamente inoculadas con el microorganismo de estudio ($10^5 - 10^6 \text{ UFC/ml}$). Los microorganismos seleccionados fueron escogidos por el potencial riesgo que representan para la salud. El grado de inhibición de los extractos se expresó como: + (positivo) en el caso de observarse la formación de un halo y en el caso contrario como: - (negativo).

3.6. Elaboración de recubrimientos

3.6.1. Solución filmogénica

Se preparó una solución de quitosano al 1% (p/v) en ácido láctico 1% (v/v) y glicerol 1% (v/v). La mezcla se mantuvo en agitación en un agitador magnético (IKA®, RO10) por 30 min a 60 °C hasta disolución. Se añadió el extracto de ají obtenido a una concentración de 0,5% y se agitó hasta disolver el extracto de ají

3.6.2. Biopelículas

Para la elaboración de biopelículas, se agregó 25 ml de la mezcla obtenida en el apartado anterior en placas petri de poliestireno de 100x15 mm. Las cajas Petri con las soluciones se dejaron secar en la estufa de secado para laboratorio (Memmert, UN 750) a 60° C por 24 horas.

3.6.2.1. Espesor de biopelículas

Para determinar el espesor de las películas se utilizó un medidor de espesores por ultrasonido (TM-8811), (Figura 6), se realizaron 10 medidas en diferentes sitios de las biopelículas con el equipo calibrado previamente.



Figura 6. Equipo portátil de medición de espesor por ultrasonido.

3.6.3. Microencapsulación de extractos

Para la Microencapsulación del extracto de ají se utilizó **un** mini spray dryer (BUCHI, B-290) (Figura 7), se agregó el extracto de ají al 0,5 % (v/v) y como material encapsulante quitosano al 1% en ácido láctico 1 % (p/v). Para 500 ml de agua destilada los reactivos se agregaron de la siguiente manera: 5,8 mL ácido láctico, 5 g quitosano, 0,025 g de extracto de ají concentrado. Las variables del equipo fueron: $T_{entrada} = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$; $T_{salida} = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gil Garzón, Alzate Tamayo, Sánchez-Camargo, & Millán Cardona, 2011).



Figura 7. Equipo de secado por aspersión.

3.7. Color

Se utilizó el medidor portátil (Hunterlab, EZ 4500L) (Figura 8), para la medición de los parámetros, L^* (luminosidad), a^* (rojo/verde), b^* (amarillo/azul). Las mediciones se realizaron en 10 puntos diferentes para cada biopelícula, microencapsulado y solución filmogénica.



Figura 8. Equipo de medición de color.

3.8. Microscopía electrónica de barrido

Mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido se determinó el tamaño y la forma de las partículas obtenidas del microencapsulado, como también la superficie de las películas. Las muestras se colocaron en el porta muestra sobre una cinta de carbono para asegurar su fijación y posteriormente se le aplicó un baño de oro mediante un metalizador (SPI-module control, sputter-coater) al vacío. Finalmente se observaron las muestras en el microscopio electrónico de barrido (TESCAN, Vega 3- SB). (Figura 9)



Figura 9. Microscopio electrónico de barrido.

3.9. Espectroscopía infrarroja

La identificación de grupos funcionales característicos presentes en los extractos puros y los recubrimientos, se realizó por medio de espectroscopia infrarroja, se agregó una mínima cantidad de la muestra sobre una placa de seleniuro de zinc. Los datos obtenidos del equipo se analizaron mediante el software Origin 8 para la interpretación de los espectros.

3.10. Pruebas de actividad antimicrobiana

3.10.1. Prueba de difusión en disco

Para esta prueba se utilizaron discos de 5 mm de diámetro aproximadamente de papel filtro esterilizado y discos de 5 mm de diámetro de biopelícula. Los discos de papel filtro se impregnaron con 40 µL de las soluciones con extracto de ají al 0,5 %, posteriormente con ayuda de una pinza se colocaron en placas que fueron anteriormente inoculadas con los microorganismos de estudio y dispersadas con un asa de Digralsky en una Cabina de seguridad biológica - Class II, Type A2 (Labconco, USA). Para los controles se utilizó la solución sin extracto de ají.

Las películas se cortaron en forma de discos con un sacabocados de 5 mm de diámetro para realizar las pruebas correspondientes. Los microorganismos que se utilizaron en las pruebas fueron: *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Las cajas se incubaron en una incubadora de laboratorio de convección forzada (Isotherm®) a 37° C por 24 horas para bacterias y a 25° C por 24 horas para el hongo.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANALISIS E INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

4.1.1. Extracción de oleorresina

Los valores de rendimiento de oleorresina de ají obtenidos en el presente trabajo de investigación se presentan en la tabla 3, estos valores van desde 2 hasta 6% y concuerdan con los valores documentados por **(Fernández-Trujillo, 2007)**, en los que se obtuvieron rendimientos de oleorresina de capsicum que van desde 5 – 10% mediante extracción sólido-líquido con etanol. **(Restrepo Gallego, 2012)** documentan valores similares de rendimiento de oleorresina de capsicum en su investigación, en los que obtuvieron valores que van desde 2,9% a 6,1% con material vegetal fresco de ají y solventes orgánicos, utilizando el mismo método de extracción antes mencionado.

Para garantizar la máxima producción de oleorresina y obtener mayor rendimiento los frutos de ají se seleccionaron en estado maduro debido a que en la investigación de **(Restrepo Gallego, 2012)** se obtienen valores de rendimiento mayores cuando se trabajan con el ají maduro, además en la misma investigación se menciona que las variaciones en el rendimiento pueden deberse a la variabilidad de especies de ají, color del fruto y otros factores externos. Sobre el rendimiento de ají tabasco existe evidencia documentando por **(L. Rodríguez, Arango, & Urrego, 2000)**, en la que se menciona rendimientos desde el 3,65% de oleorresina obtenida por extracción soxhlet con etanol.

Para los valores obtenidos en esta investigación, la variedad influyó en el rendimiento, al utilizar ají rocoto (*capsicum pubescens*), el rendimiento fue mayor (6,18%) mientras que al utilizar el ají tabasco (*capsicum frutescens*) el rendimiento disminuyó (5,39%). El número de descargas utilizadas en la extracción para la variedad de ají rocoto fue de 3, con un tiempo aproximado de 2,5 horas, por otra parte la segunda variedad de ají necesitó de 2 descargas con un tiempo de 1,5 horas. Estos valores son similares de acuerdo a lo sugerido por **(Restrepo Gallego, Llanos**

Ríos, & Fonseca Echeverri, 2007) en trabajos similares realizados con las especies de capsicum estudiadas en esta investigación.

La temperatura óptima de concentración en el rotavapor fue de 40 °C para las dos especies de capsicum, ésta temperatura es ideal debido a que evita la degradación de los compuestos activos de la oleorresina y disminuye el riesgo en la manipulación del solvente en la recuperación al vacío (Csiktusnádi Kiss et al., 2000; Martínez, 2007).

Tabla 3. Resumen de rendimiento de extracto para cada experimento de las dos variedades de ají.

Parámetro rendimiento	
Experimento	Rendimiento (%)
AR-3D-40 °C	6,18 ± 0,54
AR-3D-50 °C	3,94 ± 0,38
AR-3D-60 °C	3,74 ± 0,29
AL-2D-40 °C	5,39 ± 0,51
AL-2D-50 °C	4,02 ± 0,38
AL-2D-60 °C	2,49 ± 0,27

AR variedad de ají (*capsicum pubescens*), AL variedad de ají (*capsicum frutescens*)

4.1.2. RECUBRIMIENTOS

4.1.2.1. Espesor de biopelículas

Como se puede apreciar en la figura 10 el espesor de las películas elaboradas no presentan diferencia significativa tanto para las muestras incorporadas con los extractos de ají como para el blanco. Los valores obtenidos fueron de $29,89 \pm 2,54$ μm para la película con la variedad de ají (*capsicum pubescens*), para la variedad (*capsicum frutescens*) el espesor de la película fue de $31,5 \pm 6,96$ μm , mientras que para el blanco se registró un valor de $39,08 \pm 2,99$ μm . La adición del extracto de ají no influye en el espesor de la película. Por otra parte el volumen utilizado en la preparación de las mismas y el tiempo de secado afectan directamente al espesor, a

medida que la película pierde humedad el espesor disminuye (Salazar & Valderrama Negrón, 2013).

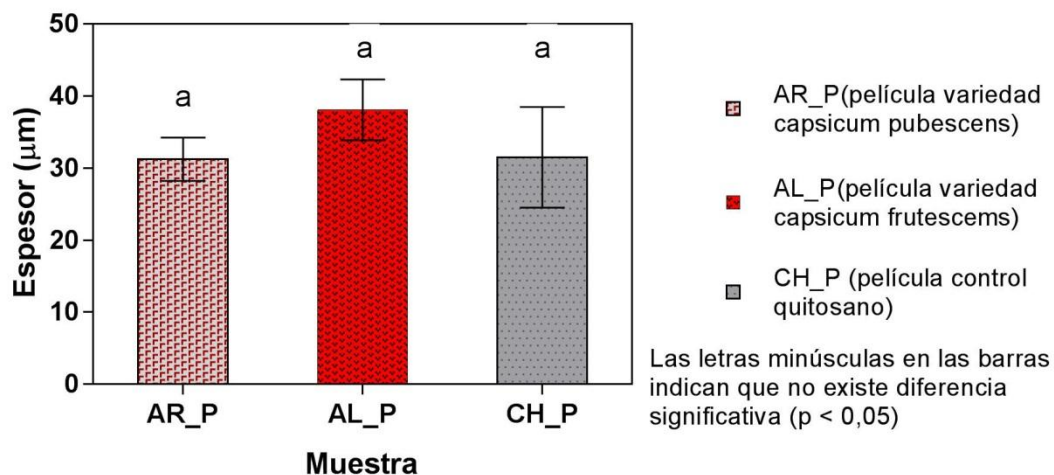


Figura 10. Espesor de las películas µm.

4.1.2.2. Microencapsulación de extractos

Los valores de rendimiento de encapsulación obtenidos fueron satisfactorios, con rendimientos de: $93,83 \pm 2,3$ % para las microcápsulas de la variedad de ají (*Capsicum pubescens*), para (*capsicum frutescens*) fue de $89,55 \pm 2,78$ % y finalmente para el control fue de $86,9 \pm 2,0$ %. La estructura del quitosano y su peso molecular favorecen de manera notable a la eficiencia del rendimiento de encapsulación (I. Flores & Jiménez, 2013). Como se observa en la figura 11 no existe diferencia significativa entre las muestras encapsuladas, en los 3 casos el rendimiento es alto. (Pulido & Beristain, 2010) establecieron valores de rendimiento similares que van desde 78% utilizando quitosano como material encapsulante. Además (López Hernández & Gómez Carril, 2008), establecen que mediante la técnica de secado por aspersión se puede alcanzar valores de rendimiento máximo de 96% llegando incluso al 100%.

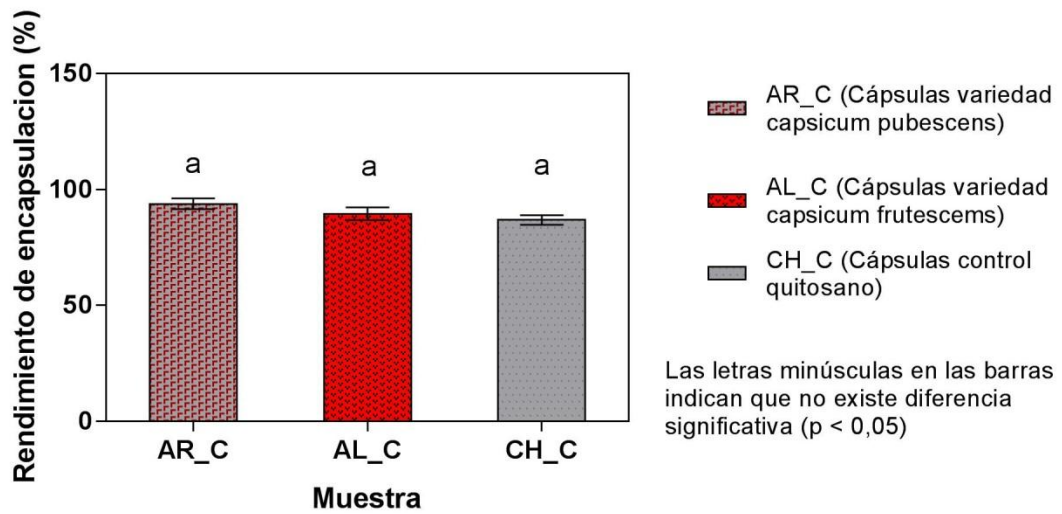


Figura 11. Rendimiento del proceso de encapsulación.

4.1.2.3. Color

En la figura 12 se pueden observar los valores de los parámetros de color obtenidos para las dos variedades de ají. No existe diferencia significativa entre las dos especies respecto al color, las dos presentan una coloración similar, con una tendencia a valores positivos del parámetro a^* (color rojo), se atribuye esta coloración a la presencia de pigmentos carotenoides en el ají con un 57% de color rojizos, un 38% de amarillos y 5% de otros (Pérez-Gálvez, Jarén-Galán, & Isabel, 2006).

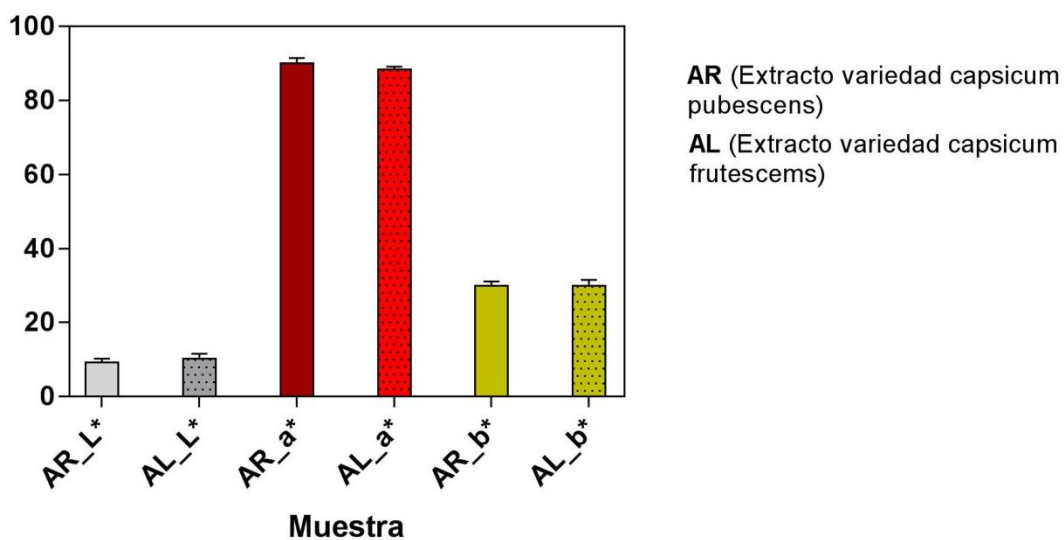


Figura 12. Valores de los parámetros L*, a*, b*.

Los valores del parámetro L* (luminosidad), se observan a continuación en la figura 13, estos valores no presentan diferencia significativa para los recubrimientos en solución filmogénica y microencapsulado tanto para el control como para las matrices adicionadas con extracto. Los valores obtenidos de L* en el blanco de las películas se deben al color blanco de la superficie utilizada para apoyar la película, debido a que esta presenta un color transparente el equipo realizó la lectura del soporte. Por otra parte se observa que disminuye el valor de L* en las películas que contienen extracto de ají. En el caso de la solución filmogénica se observan valores para L* desde 92 a 95, estos valores concuerdan con los obtenidos por **(Guzmán, 2003)** para películas de quitosano con un valor de 93,4.

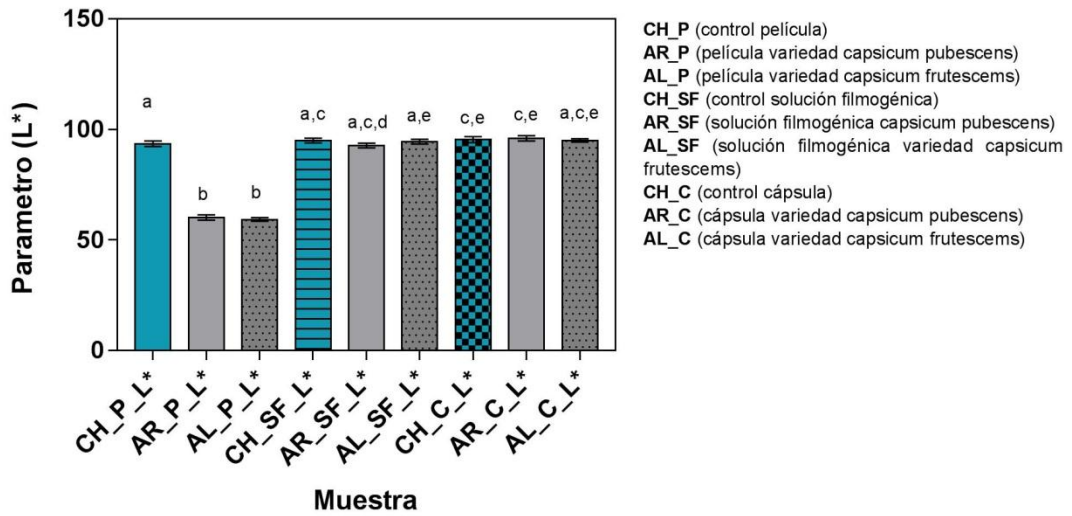


Figura 13. Valores obtenidos para el parámetro L* de los recubrimientos.

La figura 14 muestra el parámetro a* que indica una tendencia hacia el color rojo con valores positivos, aparece en las películas con extracto de ají y no se presenta de manera significativa en la solución filmogénica como tampoco en las microcápsulas. También se observan valores altos para el parámetro b* que nos sugieren una mayor tendencia hacia el amarillo, el control no presenta un valor significativo debido a su transparencia.

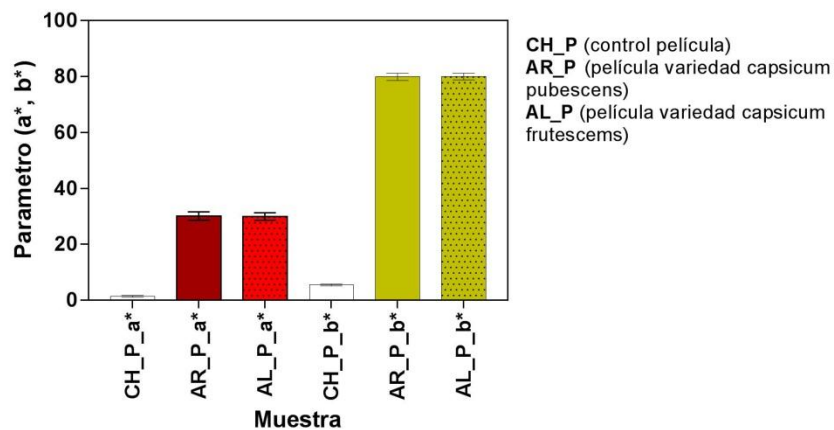


Figura 14. Valores obtenidos para el parámetro L* de los recubrimientos.

Tanto la solución filmogénica como las microcápsulas no presentaron valores altos en los parámetros a^* y b^* , la solución filmogénica formó una mezcla densa de viscosidad alta con un color blanco, por su parte las microcápsulas al estar constituidas por quitosano, forman una capa en la parte exterior de la microcápsula que le confiere un característico color blanco, quedando en el interior el extracto de ají, debido a esto no se observaron más variaciones en el color (**Valderrama, 2014**).

4.1.3. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido permitió observar las partículas de quitosano formadas mediante secado por aspersión con la incorporación de extracto de las dos variedades de ají. En la figura 15 se puede observar la distribución de las partículas de quitosano con un tamaño relativamente similar entre las partículas que van desde $0,82\ \mu\text{m}$ a $0,97\ \mu\text{m}$. Se puede identificar que presentan morfología esférica y superficie lisa, esta estructura ha sido observada en investigaciones anteriores que utilizan la técnica de secado por aspersión (**Arrazola, Herazo, & Alvis, 2014; Gil Garzón et al., 2011**). Los valores de diámetro de partícula obtenidos en la investigación realizada por (**Aguirre Zazzali, 2011**) fueron de $1,5\ \mu\text{m}$ utilizando quitosano como encapsulante que concuerdan con los obtenidos experimentalmente en el ensayo realizado en el laboratorio.

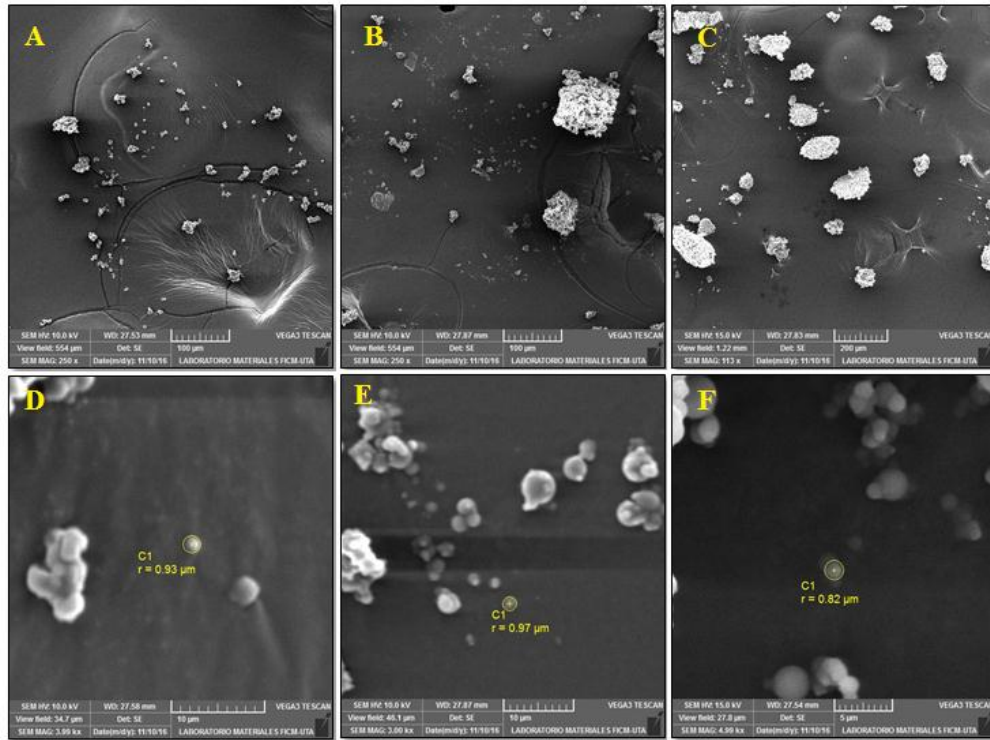


Figura 15. Imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido para las muestras encapsuladas, (a,b,c) partículas dispersas de las muestras, (d,e,f) diámetro de partícula.

En la figura 16 se pueden observar las películas formadas a partir de quitosano con el ingrediente activo (Oleorresina), la cara exterior de la película en general presentó una superficie compacta, homogénea y continua sin presencia de poros ni separación de fases, lo que significa que existió una interacción fuerte entre el extracto y el quitosano (**Gonzalez, 2013**), en el caso de las películas que contienen el extracto (Fig. 14 A y B) se puede observar una disminución de fibras de quitosano, mientras que para la película de quitosano (Fig. 16 C) las fibras aparecen en mayor proporción. La disminución de fibras de quitosano en las películas incorporadas con la oleorresina (Fig. 16 A Y B), posiblemente se deba a una interacción de los puentes hidrógeno del grupo amino de la cadena de quitosano con la oleorresina (**Salazar & Valderrama Negrón, 2013**), esto le confiere menor rigidez y favorece a la flexibilidad de la película (**Bohórquez, Enciso, & Hernández, 2016**).

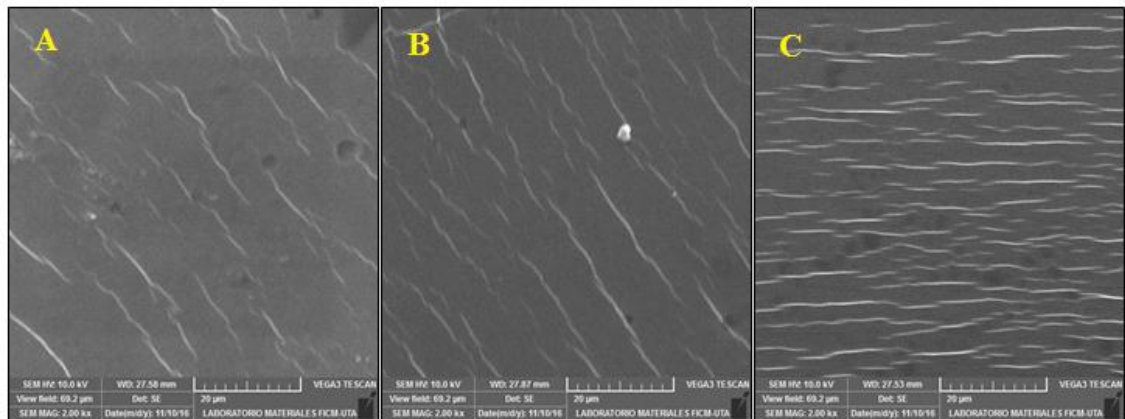


Figura 16 Imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido, (a,b) variedades de ají rocoto, tabasco. (c) control.

4.1.4. Espectroscopía infrarroja

Los picos obtenidos mediante la técnica de espectroscopia infrarroja, permitió observar los grupos funcionales característicos de los compuestos utilizados en la elaboración de los recubrimientos en un rango de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} . En la figura 17 se puede observar el espectro obtenido para las dos variedades de ají en estado puro, presentando picos similares. Los picos principales característicos para el extracto de ají según (Mejía Yáñez, 2013), están cerca de $3363,89\text{ cm}^{-1}$ producido por N-H, el pico observado a 3008 cm^{-1} producido por aromáticos para enlaces C-H aparece en el espectro obtenido, también se presenta el pico característico de amidas cerca de $1726,22\text{ cm}^{-1}$ del C=O, como también a $1654,42\text{ cm}^{-1}$ C=O para amidas secundarias, cerca $966,82\text{ cm}^{-1}$ también se observan picos producidos por sustituyentes del anillo aromático. La banda significativa para amidas secundarias también se menciona por (Pérez-Tlahuis)), con valores cercanos a los 1652 cm^{-1} también se menciona la banda característica de un grupo fenólico alrededor de 1158 cm^{-1} . Estos valores reportados en la literatura coinciden con los valores obtenidos experimentalmente y permiten confirmar la presencia de capsaicina en los extractos obtenidos.

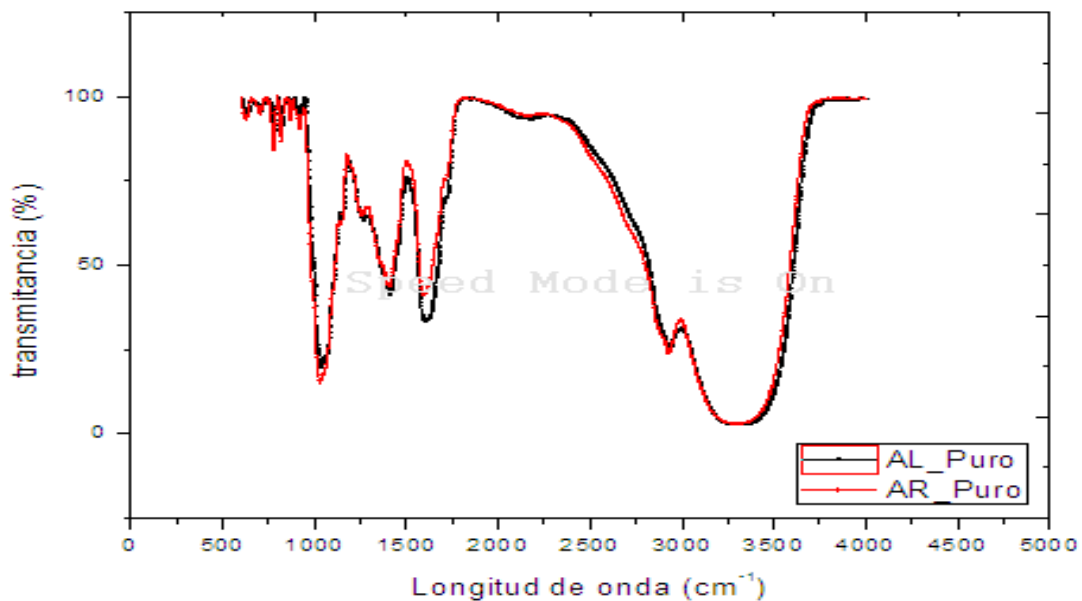


Figura 17. Espectro IR obtenido para las dos variedades de ají.

4.1.5. Pruebas de actividad antimicrobiana

Los resultados del efecto inhibitorio de los extractos de ají se presentan en la tabla 4 a medida que incrementa el diámetro del halo de inhibición, mayor es el efecto antimicrobiano (Cerón, Munguía, García, & Santiesteban, 2014). Los valores obtenidos demuestran que existe mayor intolerancia a los extractos por parte de las bacterias Gram – (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeuroginosa*) cuando se evalúa la solución filmogénica y el encapsulado, presentando un diámetro de halo mayor en comparación a las gram + (*Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*), en el caso de hongos la actividad resultó ser negativa, no se observó la formación del halo de inhibición esperado, en su lugar toda la superficie de la placa utilizada para las pruebas quedó colonizada por el hongo.(Colivet et al., 2006), establecen que al evaluar la actividad antimicrobiana con extractos etanólicos de capsicum frente a (*Escherichia coli* y *Bacillus sp.*), se observa la formación de halos de inhibición similares que van desde 1,1 a 1,6 cm de diámetro.

Por otra parte (Cerón et al., 2014) documenta valores de inhibición de 1,00 a 1,3 cm al evaluar la resistencia de *Escherichia coli* frente a extractos de ají obtenidos por la misma técnica utilizada en este trabajo de investigación. (Careaga et al., 2003) establece que el extracto de capsicum obtenido con solventes orgánicos a una concentración del 3% disminuyó la presencia de unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas aeuroginosa*.

En el caso de *Clostridium perfringens* (Sánchez García, 2012), ha documentado diámetros de inhibición de 1,5 cm utilizando extractos alcohólicos de capsicum; en el trabajo realizado en el laboratorio se obtuvieron valores cercanos de 0,84 a 0,94 cm. (Cichewicz & Thorpe, 1996) establecieron que para *Bacillus cereus* mediante extractos acuosos de (*capsicum pubescens*, *capsicum frutescens*) concentrados, se alcanzan halos de inhibición de diámetro de 2,7 cm, estos valores en comparación a los obtenidos experimentalmente en este trabajo son altos, debido a la concentración utilizada del extracto puro en la literatura citada, para esta investigación se obtienen valores positivos utilizando el extracto a una concentración baja de 0,5%.

Tabla 4. Valores del diámetro de halo de inhibición medido en cm.

Microorganismos	SOLUCION FILMOGENICA			ENCAPSULADO		
	AR (cm)	AL (cm)	CH (cm)	AR (cm)	AL (cm)	CH (cm)
<i>Escherichia coli</i>	1,09 ± 0,08	0,89 ± 0,03	0,85 ± 0,01	1,09 ± 0,19	1,11 ± 0,03	0,99 ± 0,15
<i>Pseudomonas aeuroginosa</i>	1,14 ± 0,19	0,89 ± 0,07	0,89 ± 0,05	1,02 ± 0,11	1,03 ± 0,14	0,96 ± 0,03
<i>Bacillus cereus</i>	0,87 ± 0,06	0,86 ± 0,04	-	0,87 ± 0,05	0,87 ± 0,03	-
<i>Clostridium perfringens</i>	0,91 ± 0,01	0,94 ± 0,01	-	0,85 ± 0,05	0,84 ± 0,01	-
<i>Aspergillus nigger</i>	-	-	-	-	-	-

AR variedad de ají (*capsicum pubescens*), AL variedad de ají (*capsicum frutescens*)

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las dos especies de ají (*Capsicum pubescens*, *Capsicum frutescens*). Las dos variedades presentaron valores similares de inhibición frente a los microorganismos gram – estudiados (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Para la variedad *Capsicum pubescens* los valores de inhibición producidos van desde $0,85 \pm 0,05$ cm a $1,14 \pm 0,19$ cm. Los valores obtenidos de inhibición para la variedad *Capsicum frutescens* oscilaron entre $0,84 \pm 0,01$ cm a $1,11 \pm 0,03$ cm. Las dos variedades de ají no presentaron la formación de halos al trabajar con hongos descartando la posibilidad de tener actividad antifúngica.

El proceso de extracción de oleoresina se optimizó para las dos especies de ají, la que demostró el mayor porcentaje de rendimiento fue *Capsicum pubescens* con un valor de 6,18%, las variables óptimas para la obtención de esta cantidad quedaron definidas en: número de descargas= 3; temperatura de concentración= 40 °C. La siguiente variedad *Capsicum frutescens* produjo un valor de rendimiento de oleoresina de 5,39%, las variables adecuadas para obtener estos valores fueron: Numero de descargas= 2; Temperatura de concentración= 40 °C.

La concentración de extracto en la que se observa actividad antimicrobiana se determinó cualitativamente mediante la técnica de difusión en agar, realizando pruebas con variación en la concentración de extracto desde 0,5% a 2%. La concentración a la que se empieza a notar la aparición de halos de inhibición fue de 0,5%, por lo que se seleccionó esta concentración para las siguientes pruebas.

Mediante diferentes técnicas se elaboró los recubrimientos de quitosano incorporando extracto de ají en su estructura. Tanto en las películas como en el microencapsulado se observó la buena calidad de las mismas por medio del microscopio electrónico de barrido. La actividad antimicrobiana de los 3 recubrimientos elaborados demostró diferencias significativas entre (solución

filmogénica, microencapsulado) y película. Entre los dos primeros recubrimientos se observó valores de inhibición similares, para la solución filmogénica se obtuvo valores que van desde $0,91 \pm 0,01$ cm a $1,14 \pm 0,19$ cm, mientras que para el microencapsulado se obtuvieron valores del rango de $0,85 \pm 0,05$ cm a $1,11 \pm 0,03$ cm. Por otra parte la película no presentó valores de inhibición en ningún caso por lo que su capacidad antibacteriana se descarta.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda ampliar la investigación utilizando otras variedades de capsicum debido a la amplia gama de especies existentes en el país, la capacidad inhibitoria se ve influida por la especie utilizada por lo que es posible que se encuentren otras plantas de ají con mayores resultados tanto en rendimiento de oleorresina como en poder antimicrobiano.

Por otra parte se puede trasladar el estudio de laboratorio a una aplicación a mayor escala, con el fin de establecer un producto comercial derivado de los valores obtenidos en este trabajo de investigación.

Referencias Bibliográficas

- Aguirre, P. J. (2011). *Preparación de micropartículas de quitosano para microencapsulación de biomoléculas*. Tesis de pregrado para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Universidad de Chile, Santiago, Chile. Recuperado de: <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131946>
- Anderson, M. R. P. (2005). *Enfermedades de origen alimentario: su prevención*. España: Editorial Díaz de Santos.
- Anderson, M. R. P., & Pascual, V. C. (1999). *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. España : Díaz de Santos.
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). *Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (Solanum melongena L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante*. Información tecnológica. scielo. 25(3), doi: 10.4067/S0718-07642014000300006
- Aspergillusweb. (15/02/2017). *What is Aspergillus?*. Pagina web. Recuperado de: <http://www.aspergillus.org.uk/>
- Bohórquez, N. V., Enciso, N. A. A., & Hernández, W. A. (2016). *Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero*. *Matéria*, 21, 141-156. Recuperado de: <http://www.scielo.br/pdf/rmat/v21n1/1517-7076-rmat-21-01-00141.pdf>
- Careaga, M., Fernandez, E., Dorantes, L., Motab, L., Jaramilloa, M. E., & Hernandez, H. (2003). *Antibacterial activity of Capsicum extract against Salmonella typhimurium and Pseudomonas aeruginosa inoculated in raw beef meat*. *Science direct*. 83, 331–335. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502003823>
- Castañón, G., Latournerie, L., Mendoza, M., Vargas, A., & Cárdenas, H. (2008). *Colección y caracterización de Chile (Capsicum spp.) en Tabasco*, México. *Phyton*, 77, 189-202. Recuperado de: <http://www.scielo.org.ar/pdf/phyton/v77/v77a16.pdf>
- Cerón, T., Munguía, R., García, S., & Santiesteban, N. A. (2014). *Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de Chile (capsicum)*. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1, 213-221. Recuperado de: <http://www.reibci.org/publicados/2014/julio/2200124.pdf>
- Cichewicz, R. H., & Thorpe, P. A. (1996). *The antimicrobial properties of Chile peppers (Capsicum species) and their uses in Mayan medicine*. *Journal of Ethnopharmacology*. 52(2), 61-70. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8735449>
- Colivet, J., Belloso, G., & Hurtado, E. (2006). *COMPARACIÓN DEL EFECTO INHIBIDOR DE EXTRACTOS DE AJÍ DULCE (Capsicum chinense) SOBRE EL CRECIMIENTO DE Escherichia coli y Bacillus sp.* *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 18(2), 168-173.
- Csiktusnádi Kiss, G. A., Forgács, E., Cserhádi, T., Mota, T., Morais, H., & Ramos, A. (2000). *Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from*

- paprika (Capsicum annuum L.) powders*. Journal of Chromatography A, 889(1-2), 41-49. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00440-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00440-4)
dechile.net. (11/02/2017). CHILE. Pagina web. Recuperado de:
<http://etimologias.dechile.net/?chile>
- Elizalde, O. (2009). *SOLUBILIDADES DE LA CAPSAICINA Y PIGMENTOS LIPOSOLUBLES (CAROTENOIDES) DEL CHILE POBLANO EN CO2 SUPERCRITICO*. (Tesis de Nivel Posgrado). Instituto Politecnico Nacional, Mexico. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/123456789/3803>
- Fernández-Trujillo, J. P. (2007). *Extracción convencional de oleorresina de pimentón dulce y picante I. Generalidades, composición, proceso e innovaciones y aplicaciones*. Grasas y aceites, 58(3), 252-263. Recuperado de:
<http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/viewFile/180/180>
- Fick, R. B. (1992). *Pseudomonas Aeruginosa the Opportunist*: Taylor & Francis. Recuperado de:
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=6FCIKeCnqikC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Pseudomonas+Aeruginosa+the+Opportunist&ots=jOJ6RK_vZ1&sig=R_j5ZR6OZYUk0jTjR5l6wsY1iEQ#v=onepage&q=Pseudomonas%20Aeruginosa%20the%20Opportunist&f=false
- Flores, I., & Jiménez, M. (2013). *Microencapsulación de compuestos activos con quitosano*. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 7(1), 48-56. Recuperado de:
<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/25055/37055>
- Flores, T. G., & Herrera, R. A. R. (2005). *Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico*. Salud Pública de México, 47, 388-390. Recuperado de:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000500010
- Gil, M. A., Alzate, L. M., Sánchez, A. d. P., & Millán, L. d. J. (2011). *Secado por aspersión: una alternativa para la conservación de los compuestos bioactivos y aromáticos del extracto de ajo (Allium sativum L.)*. Revista Lasallista de Investigación, 8, 40-52. Recuperado de:
<http://www.redalyc.org/pdf/695/69522607005.pdf>
- Gonzalez, I. D. S. (2013). *Efecto de la adición de quitosano en las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y oxígeno, brillo y microestructura en films comestibles a base de almidón de trigo. (Tesis de máster)*. Universidad Politecnica de Valencia, España-Valencia. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/handle/10251/28002>
- González, A. (2004). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*.(Tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia, Colombia- Manizales. Recuperado de:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>
- Guarro, J. (2012). *Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 30(1), 33-39. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-taxonomia-biologia-los-hongos-causantes-S0213005X11003016>

- Guzmán, G. (2003). *Efecto del tipo de agente plastificante en películas de quitosano*. (Licenciatura en Ingeniería de Alimentos), Universidad de las Américas Puebla, Mexico. Recuperado de: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/guzman_v_g/
- Gómez, J., Alcántara, M., Simarro, E., Martínez, B., Ruiz, J., Guerra, B., Valdés, M. (2002). *Bacteriemias por Pseudomonas aeruginosa: epidemiología, clínica y tratamiento. Estudio prospectivo de siete años*. Rev Esp Quimioterap, 15(4), 360-365. Recuperado de: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/15/4/360.pdf>
- Hernández, S., Porras, F., Pacheco, A., López, R. G., Villarreal, M., Parra, S., & Osuna, T. (2012). *Caracterización y variación ecogeográfica de poblaciones de chile (Capsicum annuum var. glabriusculum) silvestre del noroeste de México*. Polibotánica(33), 175-191. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682012000100011
- Lorenzo, T. D., Torres, Á. E. C., & Fernández, J. R. D. (2001). *Enfermedades transmitidas por alimentos*. Ángel E. Caballero Torres, 216. Recuperado de: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/colera/etasninos.pdf>
- López, O. D., & Gómez, M. (2008). *Preparación de microesferas mediante secado por aspersion*. Revista Cubana de Farmacia, 42. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152008000300010
- Martín, N., & González, W. (1991). *Caracterización de Acciones de Chile (Capsicum spp)*. Agronomía Mesoamericana, 2, 31-39. Recuperado de: http://www.mag.go.cr/rev_meso/v02n01_031.pdf
- Martínez, A. A. (2007). *Obtención de Oleoresina Capsicum a partir de chiles jalapeños frescos enteros*. (Licenciatura en Ingeniería Química), Universidad de las Américas Puebla, Mexico. Recuperado de: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/martinez_g_aa/capitulo5.pdf
- Mejía, F. M. (2013). *Aislamiento y Caracterización Físicoquímica de la Capsaicina de Tres Variedades de Ají. (Tesis - Licenciatura en Ciencias Químicas)*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador-Quito. Recuperado de: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/5728>
- Monroy, A., González, R., García, I., Totosa, A., & Pérez, H. M. (2008). *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE ROMERO (Rosmarinus officinalis L.) Y CHILE ANCHO (Capsicum annuum L. grossum sendt)*. Biotecnología y Bioingeniería, 1. Recuperado de: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_III/Carteles/CIII-26.pdf
- Montes, S. (2008). *Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género Capsicum que crecen y se cultivan en México*. 1. Recuperado de: http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/Capsicum/1er_Informe/Primer%20informe%20Capsicum.pdf
- Moreno, S., Salcedo, S. M., Cárdenas, M. L., Hernández, J. L., & Núñez, M. A. (2012). *Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (Capsicum annuum l. var aviculare) sobre el crecimiento in vitro de Aspergillus flavus*. Polibotánica, 191-204. Recuperado de:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682012000200009

- Mutis y Bosio, J. (2004). *Flora de la Real Expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada. T. 38 (1). Solanáceas (1)*. Madrid (España): Madrid : Ediciones Cultura Hispánica.
- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutiérrez, E. (2013). *Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones/Chitin and Chitosan friendly polymer. A review of their applications*. Revista Tecnocientífica URU(1), 53-58. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/235431334_Quitina_y_Quitosano_polimeros_amigables_Una_revision_de_sus_aplicaciones
- Núñez, C. (2008). *Extracciones con equipo Soxhlet*. Cemuñez. Argentina. Recuperado de: www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf
- Petit, L., Gibert, M., & Popoff, M. R. (1999). *Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. Trends in microbiology*, 7(3), 104-110. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X98014309>
- Pulido, A., & Beristain, C. I. (2010). *Encapsulación de ácido ascórbico mediante secado por aspersión, utilizando quitosano como material de pared*. Revista mexicana de ingeniería química, 9, 189-195. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382010000200007
- Pérez, A., Jarén, M., & Isabel, M. (2006). *Processing of red pepper fruits (Capsicum annum L.) for production of paprika and paprika oleoresin*. Handbook of fruits and fruit processing, 565. Recuperado de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470277737.ch30/summary>
- Pérez, M., Avila, R., Navarro, A., Padilla, A., Dávila, R. (2007). *Evaluación de la Actividad Antioxidante del Chile Jalapeño Rojo (Capsicum annum) Facultad de Ciencias Químicas*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Recuperado de: [file:///C:/Users/pc/Downloads/CNCA-2007-102%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/pc/Downloads/CNCA-2007-102%20(1).pdf)
- Ramosa, M. d. L., Bautista, S., Barrera, L. L., Bosquez, E., Alial, I., & Estrada, M. (2010). *Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas*. Revista mexicana de fitopatología, 28, 44-57. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n1/v28n1a5.pdf>
- Restrepo Gallego, M. (2012). *Oleorresinas de capsicum en la industria alimentaria*. Lasallista, 3, 43-47. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69530208>
- Restrepo Gallego, M., Llanos Ríos, N., & Fonseca Echeverri, C. E. (2007). *Composición de las oleorresinas de dos variedades de ají picante (habanero y tabasco) obtenidas mediante lixiviación con solventes orgánicos*. Revista Lasallista de Investigación, 4, 14-19. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492007000100003
- Rodríguez, A., Troncoso, R., Sánchez, A., González, D., Ruiz, E., Zamora, R., Aviles, M. (2015). *Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (Capsicum annum var. glabriusculum) en Alternaria alternata y Fusarium oxysporum*. Revista argentina de microbiología, 47(1), 72-77. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-argentina->

microbiologia-372-articulo-efecto-antifungico-extractos-fenolicos-carotenoides-S032575411500005X

- Rodríguez, J. A. S. (2009). *Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino*: Ediciones Díaz de Santos, España.
- Rodríguez, L., Arango, J., & Urrego, F. (2000). *OBTENCIÓN DE OLEORRESINAS A PARTIR DE 3 ESPECIES DE CAPSICUM sp. CULTIVADAS EN COLOMBIA (Capsicum annuum, Capsicum frutescens, Capsicum chinense)*. Recuperado de: <http://avalon.utadeo.edu.co/dependencias/publicaciones/alimentica3/oleorresinas.pdf>
- Rojas, P., Jesus, A., & Padilla Espinoza, C. (2007). *Análisis de la actividad antibacteriana de extractos de Capsicum annuum var. Longum (aji chileno) en distintas etapas de desarrollo, sobre diferentes microorganismos*.
- Salazar, M. C., & Valderrama Negrón, A. (2013). *Preparación y caracterización de películas de quitosano despolimerizado y reticulado con tripolifosfato de sodio*. Revista de la Sociedad Química del Perú, 79, 195-208. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/3719/371937632002.pdf>
- Samadpour, M. (2001). *Molecular Typing of Pseudomonas Aeruginosa in Distribution Systems*: AWWA Research Foundation and American Water Works Association.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Olson, M. V. (2000). *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen*. Nature, 406(6799), 959-964. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v406/n6799/supinfo/406959a0_S1.html
- Sussman, M. (1997). *Escherichia Coli: Mechanisms of Virulence*: Cambridge University Press.
- Sánchez García, E. (2012). *Efecto de compuestos fitoquímicos sobre microorganismos de importancia en alimentos*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado de: <http://cd.dgb.uanl.mx/handle/201504211/16191>
- Valderrama, N. (2014). *Evaluación del comportamiento de películas comestibles de quitosano almacenadas bajo condiciones controladas*. (Maestría), Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Recuperado de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/45572/>
- Velásquez, C. L. (2003). *Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos*. Revista Iberoamericana de polímeros, 4(2), 91. Recuperado de: <http://www.ehu.eus/reviberpol/pdf/ABR03/Cristobal2003.pdf>

ANEXOS

Anexo A: proceso de extracción de oleorresina, (A, B) Extracción, (C) Concentración, (D, E) Recolección de extracto puro.



Anexo B: elaboración de solución para recubrimientos



Anexo C: pruebas de actividad antimicrobiana



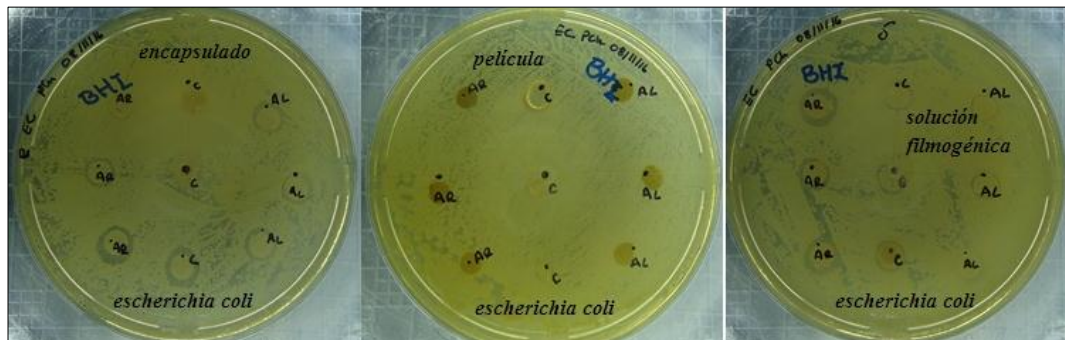
Anexo D: pruebas de actividad antimicrobiana en ambiente libre de oxígeno (jarra de anaerobiosis), *clostridium perfringens*.



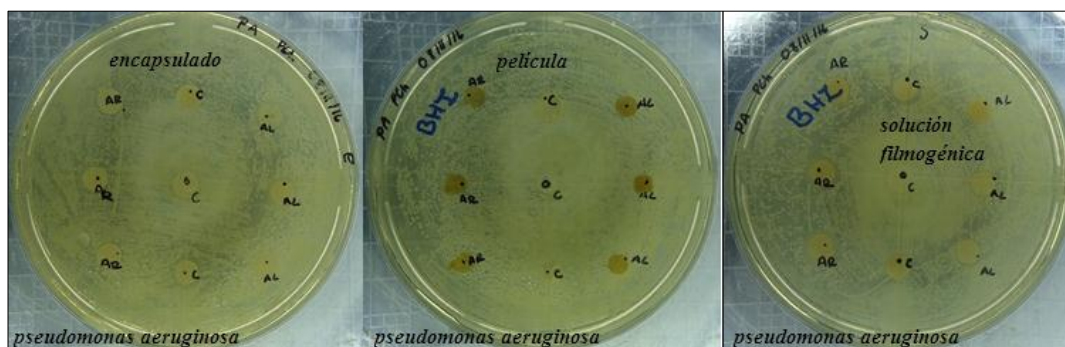
Anexo E: reactivos (a) microorganismos liofilizados, (b) quitosano, (c) ácido láctico, (d) agar papa dextrosa, (f) BHI agar, (g) agua peptonada.



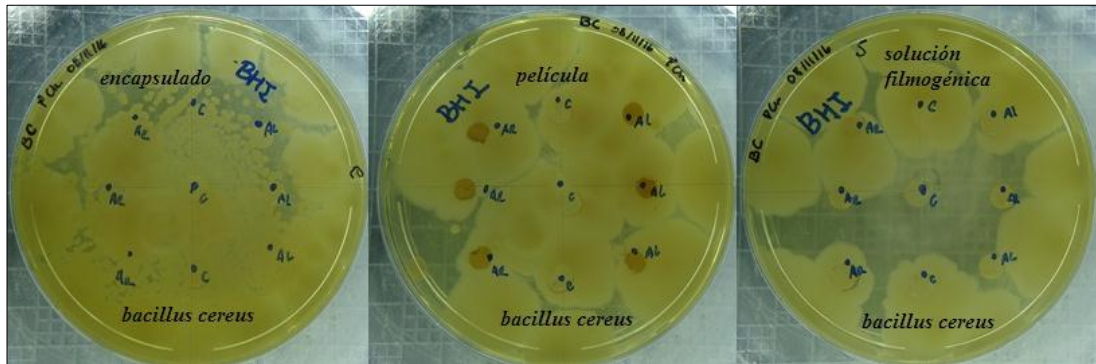
Anexo F: antibiogramas (*escherichia coli*)



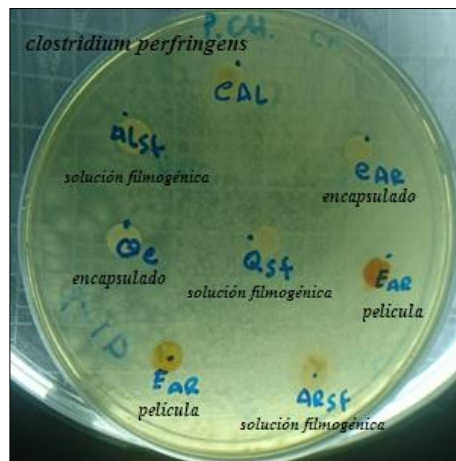
Anexo G: antibiogramas (*pseudomonas aeruginosa*)



Anexo H: antibiogramas (*bacillus cereus*)



Anexo I: antibiogramas (*clostridium perfringens*)



Anexo J: antibiogramas (*aspergillus niger*)

