

Estudios preliminares de la fermentación de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.)

Ignacio García-Martínez, Nancy Graciela Miranda González,
Leandro Rodrigo González González y Federico Nieto Pineda

Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar
Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec

Resumen

*En la actualidad los mexicanos son grandes consumidores de chile y salsas. El chile jalapeño pertenece al género Capsicum, utilizado como especia, para elaborar platillos, también pueden emplearse secos, asados y molidos para dar color y sabor, siendo el sabor pungente determinado por el contenido de compuestos capsaicinoides. Se fermentaron muestras de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) cortadas en rodajas y empleando los microorganismos nativos de chile y la adición de 10% de sal (NaCl), con estas condiciones iniciales se esperaba un buen desarrollo de las bacterias lácticas nativas y obtener un producto fermentado. Los resultados mostraron evidencia significativa de que la fermentación después de 24 semanas no había finalizado; se recomienda la elaboración de un nuevo lote de fermentación similar al estudiado, adicionado con cultivos lácticos.*

Palabras clave: chile jalapeño, *Capsicum annuum* L., fermentación.

Abstract

Mexicans are great consumers of chili and sauces. The jalapeño pepper belongs to the Capsicum sort. It is used to spice food and to elaborate dishes. It can be used dry, roasted or powdered to color and flavor food. Its pungent flavor is determined by the capsaicinoids compound content.

*Samples of chili jalapeño (*Capsicum annuum* L.) were fermented, cut in "nachos" style slices. Native microorganisms of the sample were used with 10% of salt (NaCl) for the development of lactic bacteria and to obtain a fermented product of good quality in shorter time. The results showed significant evidence that the fermentation had not finalized after 24 weeks. The elaboration of a new similar fermentation, added with lactic cultures, is recommended.*

Keywords: jalapeno peppers, *Capsicum annuum* L., fermentation.

Introducción

En los últimos años la química de los productos naturales ha centrado su atención en la localización e identificación de compuestos aislados de plantas con actividades biológicas, que han sido utilizadas en forma tradicional, adquiriéndose valiosa información química, biológica, taxonómica, médica y agrícola.

Las estrategias científicas aplicadas al estudio de la química de los productos naturales han sido

una alternativa para la utilización de estos y han cambiado sustancialmente en pocos años. Se han utilizado técnicas y pruebas biológicas, síntesis y biosíntesis para la comprensión del metabolismo que ocurre principalmente en las fermentaciones. En consecuencia, se han elucidado estructuras químicas de importancia para varios sectores industriales. El chile, además de ser uno de los condimentos más usados en la preparación de alimentos mexicanos, se usa en medicina popular (ASERCA, 2003; 2005; García, et al., 2004).

Fermentación

Las fermentaciones son el resultado del crecimiento de bacterias, levaduras, hongos o combinaciones de estos. Los cambios que ocurren son causados por los metabolitos liberados por tales microorganismos, mismos que juegan un papel primario en la fermentación. Un organismo que comienza una fermentación se desarrollará hasta que los productos en exceso inhiban el crecimiento (Pederson, 1979; Deshpande y Salunkhe, 2000; Adams y Nout, 2001; Dokken y Schmindt, 2003).

Desde el punto de vista bioquímico, se define a la fermentación como el catabolismo (conjunto de reacciones bioquímicas que conducen a la producción de energía utilizable por la célula, normalmente ATP) anaeróbico, en el que un compuesto orgánico sirve al mismo tiempo como donador y receptor de electrones y en el que el ATP se produce por fosforilación a nivel de sustrato (producción de ATP por transferencia directa de una molécula de fosfato de alta energía desde un compuesto orgánico fosforilado hasta ADP) (Pederson, 1979; Madigan et al., 2003).

El uso de procesos biológicos para obtener productos no es ciertamente nuevo. Desde la antigüedad, los microorganismos han estado relacionados con la preparación y el procesamiento de los alimentos. Las acciones de los microorganismos han generado diversos cambios en la propiedades organolépticas de los alimentos, lo cual ha provocado que se estudien los efectos de la incorporación de microorganismos a los procesos alimentarios, resultando alimentos y bebidas fermentadas que ahora forman parte de un importante sector de la industria alimenticia (Galicia, et al., 1996; Deshpande y Salunkhe, 2000; Dokken y Schmindt, 2003).

Fermentación de frutas y hortalizas

Encurtir es una de las formas más antiguas de conservar los alimentos; el principal microorganismo utilizado es *Lactobacillus sp.*, el cual emplea los azúcares naturales de las frutas y obtiene como producto ácido láctico. La generación y aumento de los niveles de ácido láctico proporciona un cambio en la acidez, lo que deriva en un sabor agrio y sobre todo inhibe el crecimiento de otros microorganismos (Pederson y Albury, 1954; Fleming, et al., 1983; Enachescu, 1995; Axelsson, 1998).

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas son habitantes comunes en hortalizas y frutas en descomposición, así como en productos lácteos. Principalmente son bacilos o cocos Gram positivos que producen ácido láctico como metabolito primario. Son fundamentalmente anaerobios, aunque bien podrían crecer en condiciones aeróbicas, por lo que son comúnmente llamados anaerobios aerotolerantes (Pederson y Albury, 1954; Chavasit, et al., 1991; Luh et al., 2002; Madigan et al., 2003).

Efecto del NaCl sobre las bacterias ácido lácticas

En la naturaleza, los efectos osmóticos, generados por condiciones de altas concentraciones de sales, son los más estudiados. Los microorganismos que viven bajo estas condiciones de salinidad se llaman halófilos. Dentro de ellos se encuentra el género *Lactobacillus*, cuyo crecimiento requiere de al menos una mínima concentración de sal (NaCl) (Pederson y Albury, 1954; Pederson, 1979; Axelsson, 1998; Madrid et al., 2002; Soomro et al., 2002).

Proceso tradicional de fermentación del chile

El chile jalapeño, principalmente, se procesa y consume fermentado o encurtido. Los productos encurtidos son aquellos a los que se les ha agregado ácido láctico o acético (vinagre), entre otros; la acidez de los productos fermentados se debe a la generación de ácido láctico por la acción bacteriana a partir de los azúcares presentes. El chile jalapeño se comercializa entero, sin semillas, en mitades cortadas a lo largo y en rodajas.

La fermentación tiene lugar durante 4 o 6 semanas. Tradicionalmente se realiza en tanques cerrados, con una válvula que permite disipar el gas formado durante el proceso. Posterior al período de fermentación, los chiles que originalmente eran de un verde luminoso, se han vuelto de color verde oliva; este proceso intensifica las características del chile y previene la formación de otro tipo de microorganismos que desvíen el proceso fermentativo, obteniéndose un producto estable (Fleming et al., 1988; Enachescu, 1995; Adams y Nout 2001; Luh et al., 2002).

Capsicum, características hortícolas

El chile es la principal especie hortícola en México. Se cultiva de diferentes formas y tamaños, se

consume fresco, fermentado o deshidratado; es utilizado como condimento debido principalmente a su sabor picante. Desde el punto de vista económico, *Capsicum annuum* L. es la especie de chile más importante en México y en todo el mundo. Se cultiva en todo el territorio nacional desde el nivel del mar hasta altitudes de 2,500 metros sobre el nivel del mar. En nuestro país los principales estados productores de chile son el estado de Zacatecas, Chihuahua, Sinaloa y San Luis Potosí (ASERCA, 2003; 2005; SAGARPA, 2003).

Se considera a México y a Guatemala como las primeras áreas de desarrollo de esta especie. Actualmente se encuentra cultivado en diversas partes del mundo como China, Japón, Corea del Sur, Corea del Norte, Indonesia, Pakistán, Hungría, Sri Lanka, India, Estados Unidos, España, Uganda y Nigeria. El sabor picante se debe a un compuesto fenólico volátil llamado capsaicina ($C_9H_{14}O_2$), que se encuentra en el sistema vascular y en los tejidos de la placenta del fruto. La dimensión no es un criterio válido, pero en general, los frutos de menor tamaño son los más fuertes en el sabor. La sacarosa, glucosa y fructosa son los principales componentes del chile jalapeño (*C. annuum*), siendo la fructosa y glucosa los azúcares fermentables (Arancibia, 2003; SAGARPA, 2003; Agblevor et al., 2004; MAG, 2006).

Capsaicinas

A este compuesto se le asocia la sensación pungente o picante de los chiles. Por sus propiedades de estimulante de apetito se usa en alimentos preparados como dulces, embutidos, carnes, bebidas, entre otros. Algunas variedades de chile o sus extractos se emplean en el alimento para aves, promoviendo con esto la presencia de un color amarillento, tanto en la carne como en la yema de los huevos. Es irritante a la piel y a las membranas. Respecto a su biosíntesis, se ha sugerido a la fenilalanina y a la tirosina como sus precursores, siendo la *vainillin amida* el precursor más directo (Scoville, 1912; Woodbury, 1980; Valle 1986; Krajewska y Powers 1988; Alpizar et al., 2002; Estrada et al., 2002; Guzmán et al., 2004). El presente trabajo muestra una visión general de la fermentación de una variedad de chile fresco que es comúnmente llamado chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.).

Objetivo

Evaluar el comportamiento de la fermentación de *Capsicum annuum* L. como una alternativa para la obtención de nuevos productos y/o subproductos.

Método

Se emplearon muestras de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.) que se adquirieron en la Central de Abastos del Distrito Federal, lugar especializado en la comercialización de productos hortícolas. Todos los estándares utilizados durante el experimento fueron grado reactivo, Sigma Chemical Co. (St. Louis Missouri, USA). Los reactivos y disolventes empleados fueron grado analítico (J. T. Baker).

Una primera etapa se realizó para determinar cuáles eran las mejores características físicas de la muestra a fermentar, de tal forma que se emplearon tres tipos de presentación: enteros, rodajas o nachos y molidos sin adicionar agua (salsa). Se evaluó cada uno para determinar cuál presentación favorecía el proceso de fermentación, mediante una inspección visual de color y producción de biomasa microbiana. Se pesaron dos kilogramos de chile fresco (por presentación) en estado maduro, firme, sano, sin pedúnculo.

Después se realizó un primer lavado con agua corriente para eliminar la tierra y los materiales extraños como insectos, restos de fertilizantes y plaguicidas. Aprovechando la propiedad de flotación del chile se realizó una selección, eliminando los que no presentaban esta propiedad o estaban dañados, y finalizada la selección se procedió a eliminar el exceso de agua mediante un escurrido.

Ya escurridos los chiles, se pesaron 500 gramos y se cortaron y/o molieron de acuerdo a las presentaciones físicas planteadas (enteros, nachos y salsa). Cada muestra se colocó en un frasco de vidrio previamente lavado y desinfectado con hipoclorito de sodio al 3 %. Posteriormente se taparon herméticamente y se almacenaron para que se llevara a cabo la fermentación con las cepas nativas de las muestras, durante ocho semanas en la oscuridad y a temperatura ambiente.

A continuación se realizó una evaluación visual para determinar qué tratamiento presentaba ma-

por crecimiento microbiano. Se tomaron muestras representativas de cada lote de fermentación y se sembraron por estría simple en medio MRS incubándose a 37°C por 24 horas. Empleando un contador de colonias se cuantificó el número de colonias por placa y tratamiento y, finalmente, se verificó la pureza de los cultivos al microscopio (mediante tinción de Gram). El lote que mostró mayor densidad poblacional de bacterias lácticas fue la presentación en rodajas o nachos.

Se realizó una segunda fermentación con los mismos parámetros que la anterior, adicionando 5 gramos de NaCl perfectamente molido y homogeneizando la mezcla. Con la incorporación de sal se esperaba el crecimiento y desarrollo de bacterias lácticas (Pederson y Albury, 1954; Chavasit et al., 1991; Axelsson, 1998).

Los frascos, cerrados herméticamente, se almacenaron durante 24 semanas en la oscuridad y a temperatura ambiente, tomándose muestras cada 4 semanas para su análisis.

Determinación de pH

Se pesaron 10 gramos de muestra fermentada, se maceraron en un mortero sin adicionar agua y se colocaron en un vaso de precipitado de 250 mL. Asimismo, se dejaron sedimentar y se tomó la lectura con un potenciómetro marca Hanna previamente calibrado. Cada muestra se trabajó por triplicado.

Análisis de azúcares solubles totales

Se utilizó la técnica de antrona (Witham et al., 1971) y la absorbancia se leyó a 600 nm. en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio UV-Visible. Cada muestra se trabajó por triplicado y la concentración de azúcares totales se estimó a partir de una curva patrón que contenía de 20 a 200 miligramos de glucosa por mL.

Determinación de la concentración de capsaicina

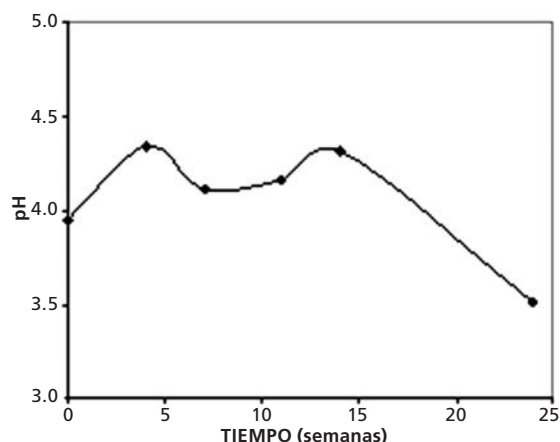
5 gramos de muestra se maceraron en un mortero adicionando 5 mL. de etanol. La mezcla se colocó en un sonicador (Ultrasonic cleaner PC620R-2, Cole Parmer) a temperatura ambiente por diez minutos, se filtró y aforó con etanol hasta un volumen de 10 mL.

Una alícuota de 2 mL se colocó en un embudo de separación, adicionando 3 mL de una solución buffer de pH = 3, 10 mL de agua destilada y 10 mL de una solución de Adogen-Tolueno. Se agitó y dejó reposar hasta que aparecieran dos fases. Se recuperó la fase orgánica para la determinación espectrofotométrica a 286 nm en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio UV-Visible. Cada muestra se trabajó por triplicado y la concentración de capsaicina se estimó a partir de una curva patrón que contenía de 0 a 0.5 miligramos de capsaicina por mL.

Resultados

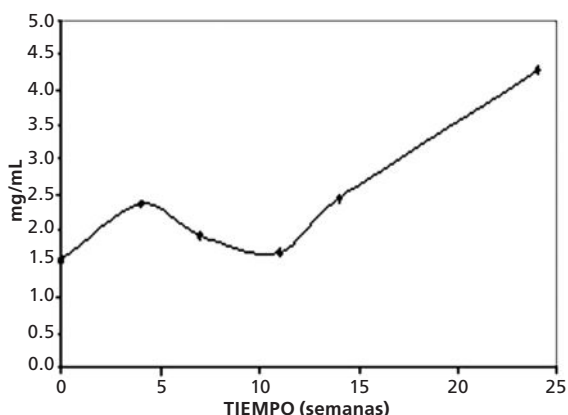
El promedio de pH fue de 4.06, en un rango de 3.51 a 4.34 durante todo el tiempo de la fermentación (figura 1). Durante las primeras semanas el pH permaneció casi constante, pero al final de la fermentación decreció hasta 3.51. Este decremento se debió al crecimiento de bacterias ácido lácticas en la masa de fermentación (Pederson 1979; Luh et al., 2002) y la producción de ácido láctico.

Figura 1. Comportamiento del pH durante la fermentación de *Capsicum annuum L.*



Para la conservación de frutas y hortalizas empleando fermentaciones lácticas, la Norma Oficial Mexicana especifica un valor de pH mínimo de 4.6, de tal forma que el producto final no satisface esta especificación; pero la fermentación está inconclusa ya que se ha reportado que la fermentación dura hasta 2 años de forma natural, existiendo la posibilidad de que los cambios de pH continúen al avanzar la fermentación.

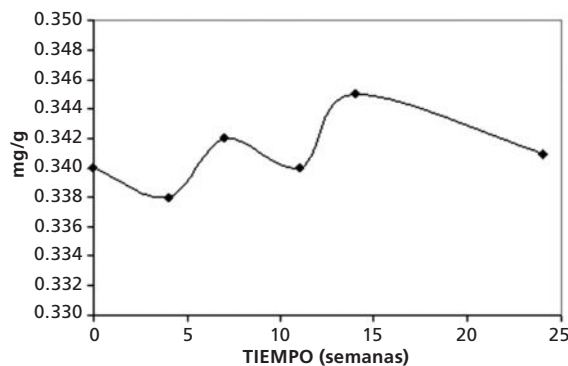
Figura 2. Evaluación de azúcares totales durante la fermentación de *Capsicum annuum* L.



En la figura 2 se observa el comportamiento de la concentración de azúcares durante la fermentación. El promedio de la concentración de glucosa durante toda la fermentación fue de 2.36 mg/mL, el cual aumentó hasta la semana 5 para decrecer al inicio de la semana 11, cuando se apreció un aumento continuo. Este comportamiento podría deberse a que en muchos productos fermentados las bacterias ácido lácticas utilizan como principal fuente del carbono los azúcares hidrosolubles (Fleming et al., 1983), pero dependiendo de las condiciones del medio, alguna ruta metabólica puede cambiar o desviarse, de tal forma que se utilice alguna fuente alterna. Luh et al. (2002) reportaron que algunos azúcares persisten durante toda la fermentación.

Para este caso, las bacterias ácido lácticas presentes pudieron no haber utilizado completamente esta fuente del carbono. Por otra parte, el aumento se debe posiblemente a la pectina presente en los chiles, que debido a la acción de enzimas específicas (pectinasas), se generan sacáridos, aun después de que la fermentación haya cesado (Arancibia 2003).

Figura 3. Evaluación de la concentración de capsaicina durante la fermentación de *Capsicum annuum* L.



El valor promedio de la concentración de capsaicina durante la fermentación fue de 0.341 miligramos por gramo de muestra, en un rango muy estrecho de 0.338 a 0.345 miligramos. La concentración de la capsaicina disminuyó escasamente cuando la fermentación inició, continuando con ligeros cambios oscilantes a través de las 24 semanas del proceso de fermentación, para finalizar con un ligero aumento al final del tratamiento (figura 3).

Para este estudio sólo se evaluó la concentración de capsaicina, pero no es el único componente que proporciona la característica de picor (pungente). Muchos estudios han reportado que el 95 % de la capacidad pungente es atribuida a la presencia de cuatro capsaicinoides derivados de la capsaicina, que son: nordihydrocapsaicina, dihydrocapsaicina, homocapsaicina y homodihydrocapsaicina (Bajaj y Gurdeep, 1979; Bajaj, 1980; Santamaria et al., 2000; Alvarado y Amador, 2005).

Discusión


Para la elaboración de salsas a nivel industrial, se utilizan chiles frescos y maduros, los cuales se fermentan antes de la producción de la salsa y se añejan en barriles de madera. El añejamiento ayuda a desarrollar algunos sabores y olor. La fermentación también es un método de conservación de alimentos para prevenir cambios indeseables en los alimentos y productos alimenticios durante el almacenaje.

En este estudio se evaluó el efecto de la incorporación del 10% de sal (NaCl) a la fermentación de chile jalapeño. Pocos estudios se han realizado para estudiar este efecto; sin embargo, aún permanecen sin investigarse los cambios fisicoquímicos como peso seco, pH, acidez titulable, azúcares, pectina y el total de capsaicinoides durante proceso de fermentación del chile. El proceso artesanal es muy lento. En este sentido, se propuso el incorporar 10% de sal para reducir este tiempo.

El chile jalapeño fresco tiene un pH promedio de 4. Después de 24 semanas de fermentación, el pH disminuyó a 3.5. Una concentración relativamente baja de azúcares estaba presente en la muestra recién partida. No obstante, al final de la fermentación ésta se incrementaba debido a la generación de monosacáridos a partir de polisacá-

ridos como la pectina. La muestra fresca contenía 0.34mg/g de capsaicina, aunque el contenido disminuyó levemente al inicio de la fermentación. La concentración de capsaicina se mantuvo relativamente estable a través de todo el proceso de fermentación.

Conclusión

Las características fisicoquímicas monitoreadas durante la fermentación de rodajas o nachos de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.), adicionados con el 10% de NaCl, muestran que la fermentación no ha concluido después de 24 semanas. Se puede hacer la recomendación de un nuevo diseño bajo condiciones similares y enriquecido con un cultivo de bacterias lácticas. Esto podrá ayudar a disminuir el tiempo de fermentación y obtener un producto de buena calidad. 

Referencias

Adams, M. y Nout, M.J.R. (2001). *Fermentation and food and safety*. Maryland: Aspen publishers.

Agblevor, F.A.; Murden, A. y Hames B.R. (2004). *Improved method of analysis of biomass sugars using high-performance liquid chromatography*. *Biotechnology Letters*, 26(15), 1207-1210.

Alpizar, L.E.; Trujillo, A.J. y Herrera, R.F.J. (2002). *Determinación de Capsaicinoides en Chile Habanero (Capsicum chinense Jaq), colectados en Yucatán*. Proceedings of the 16th International Pepper Conference, 65-69.

Alvarado, M.D. y Amador, M. (2005). *Comparative study of the content of capsaicinoids, oleoresins and seasoned mash in dry chili peppers from Zacatecas*. Second World Pepper Convention, 77-81.

Arancibia, R. A. (2003). *Enhanced Pectin Degradation is Associated with the Ease of Fruit Detachment in Tabasco Pepper*. PhD Dissertation. Louisiana State University. USA.

ASERCA. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (2005). *El chile verde y su trascendencia cultural*. Claridades Agropecuarias, 56, 3-17.

ASERCA. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (2003). *Producción Mundial de pimienta*. Claridades Agropecuarias, 22, 3-17.

Axelsson, L. (1998). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S. y Von Wright, A. (eds.). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Marcel Decker Inc, New York, USA.

Bajaj, K.L. (1980). *Colorimetric determination of capsaicin in Capsicum fruits*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63(6), 1314-1316.

Bajaj, K.L. y Gurdeep, K. (1979). *Colorimetric determination of capsaicin in Capsicum fruits with the Folin-Ciocalteu reagent*. *Microchimica Acta*, 71(1-2), 81-86.

Chavasit, V.; Hudson, J.M.; Torres, J.A. y Daeschel, M.A. (1991). *Evaluation of fermentative bacteria in model low salt cucumber juice brine*. *J. Food Sci.*, 56(2), 462-465.

Deshpande, S.S. y Salunkhe, D.K. (2000). *Fermented grain legumes, seeds and nuts. A global perspective*. New York: FAO Agricultural Services Bulletin No.142.

Dokken, L. y Schmindt, B. (2003). *Fermentation in the Food Industry: An Introduction to Biotechnology: Biotechnology workshop for teachers*. Wisconsin: University of Wisconsin-river Falls.

Enachescu, D.M. (1995). *Fruit and Vegetable Processing*. Roma: FAO Agricultural Services Bulletin No. 119.

Estrada, B.; Bernal, M.A.; Diaz, J. y Merino, F. (2002). *Capsaicinoids in vegetative organs of Capsicum annuum L. in relation to fruiting*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1188-1191.

Fleming, H. P., McFeeters, R.F.; Daeschel, M.A.; Humphries, E.G. y Thompson, R.L. (1988). *Fermentation of cucumbers in aerobic tanks*. *J. Food Sci.*, 53(1), 127-133.

Fleming, H. P.; McFeeters, R.F.; Thompson, R.L. y Sanders, D.C. (1983). *Storage stability of vegetables fermented with pH control*. *J. Food Sci.*, 48(3), 975-981.

Galicia, R. R.; Garcia, R.M.; Machorro, G. S.; Reyes, J. F. y Sandoval, S. O. (1996). *Ensalada de Verduras en Escabeche Enlatada*. Proyecto Terminal, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico.

García, V.M.A.; Ruelas, C.X.; Hernández, G.M.; Rebolloso, P.O. y Reyes, V.M. (2004). *Capsaicin determination on traditional sauces from Saltillo Coahuila*. First World Pepper Convention.

Guzmán, M.S.H.; Torres, I.; González, M.; Mora, M.A.; Herrera, M.G. y Hernández, D. (2004). *Capsaicinoides en variedades de chile con diferente capacidad pungente*. First World Pepper Convention.

Krajewska, A. M. y Powers, J.J. (1988). *Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids*. *J. Food Sci.*, 53(3), 902-905.

Luh, Z.; Fleming, H.P. y McFeeters, R.F. (2002). *Effects of fruit size on fresh cucumber composition and the chemical and physical consequences of fermentation*. *J. Food Sci.*, 67(8), 2934-2939.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M. y Parker, J. (2003). *Brock, Biología de los microorganismos*, 10a edición, Madrid, Pearson-Prentice Hall.

Madrid, J.; Megias, M.D. y Hernández, F. (2002). *In vitro determination of ruminal dry matter and cell wall degradation, and production of fermentation end-products of various by-products*. *Anim. Res.*, 51, 189-199.

- MAG. Ministerio de Agricultura y Ganadería (2006). *Guía técnica para el cultivo de "chile picante"*. Gobierno de El Salvador.
- Pederson, C. S. y Albury, M.N. (1954). *The influence of salt and temperature on the microflora of sauerkraut fermentation*. Food Technology, 8(1), 1-5.
- Pederson, C.S. (1979). *Microbiology of food fermentations*. USA: Avi Publishing, Westport, CT.
- SAGARPA (2003). *Proyecciones de largo plazo para los mercados agrícolas internacionales 2002-2012*. México: Ficha técnica No. 14.
- Santamaria, R.I.; Reyes-Duarte, M.D.; Bárzana, E.; Fernando, D.; Gama, F.M.; Mota, M. y López-Munguía, A. (2000). *Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (Capsicum annum L.) using ethanol as solvent*. J. Agric Food Chem., 48(7), 3063-3067.
- Scoville, W. L. (1912). *Note on Capsicum*. J. Amer. Pharm. Assoc., 1, 453.
- Soomro, A.H.; Masud, T. y Anwaar K. (2002). *Role of lactic bacteria (LAB) in food preservation and human health- A review*. Pakistan Journal of Nutrition, 1(1), 20-24.
- Valle, V.P. (1986). *Toxicología de alimentos*. México: ECO OPS OMS.
- Woodbury, J.E. (1980). *Determination of Capsicum pungency by HPLC and spectrofluorometric detection*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63(3), 556-558.
- Witham, F.H.; Blaydes, D.F. y Devlin, R.M. (1971). *Experiments in plant physiology*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.