

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y POTENCIAL
NUTRACÉUTICO DEL FRUTO DE *Capsicum chacoense*
Hunz “AJÍ DEL MONTE” DE ALTO PARAGUAY**

EVA EUGENIA SOLEDAD CORONEL MENDEZ

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas, Mención Química de Productos Naturales.

San Lorenzo – Paraguay

Enero – 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y POTENCIAL
NUTRACÉUTICO DEL FRUTO DE *Capsicum chacoense*
Hunz “AJÍ DEL MONTE” DE ALTO PARAGUAY**

EVA EUGENIA SOLEDAD CORONEL MENDEZ

Tutor: PROF. DR. NELSON ALVARENGA

Co-tutora: PROF. DRA. LAURA MERELES

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas, Mención Química de Productos Naturales.

San Lorenzo – Paraguay

Enero - 2021

Coronel Mendez, Eva Eugenia Soledad

Composición Química y Potencial Nutracéutico del Fruto de *Capsicum Chacoense* Hunz "Ají Del Monte" de Alto Paraguay / Eva Eugenia Soledad Coronel Mendez. - - San Lorenzo : La Autora, 2021. IX, 99 p.: fig. ; 30 cm.

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas-UNA, para la obtención del Grado de Magíster en Ciencias Químico Biológicas, Mención Química de Productos Naturales.

1. AJI DEL MONTE. 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA I. Título.

**CDD: 664.804
C822d**

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y POTENCIAL
NUTRACÉUTICO DEL FRUTO DE *Capsicum chacoense*
Hunz “AJÍ DEL MONTE” DE ALTO PARAGUAY**

EVA EUGENIA SOLEDAD CORONEL MENDEZ

Aprobado en fecha 26 de Enero de 2021.

Tribunal Examinador:

Prof. Dr. Miguel Ángel Campuzano Bublitz	FCQ/UNA
Prof. Dra. María Eugenia Flores Giubi	FCQ/UNA
Prof. Dra. Yenny Montalbetti Moreno	FCQ/UNA
Prof. Lic. (MSc.) Gloria Yaluff Miranda	IICS/UNA

Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa
Tutor

Prof. Dra. Laura Mereles Ceuppens
Co-tutora

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez
Directora de Postgrado

A Dios y la Virgen María

A mis padres Armando Coronel y Fany Mendez

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a la Mather y a San Miguel, por iluminar mi camino y darme las fuerzas necesarias para llevar a cabo mis metas.

A mis padres, Fany Méndez y Armando Coronel, por el apoyo incondicional y darme la oportunidad de formarme como profesional.

A mis hermanas Eliana y Nathalia, por brindarnos su apoyo en este proceso.

A mi abuela Bartola Galeano y mi madrina Rosana Méndez, por apoyarme siempre.

A mi abuelo Tomas Coronel (+) y mi tía Chichi (+) por iluminar mi camino, cuidarme y guiarme siempre desde arriba.

A José Duarte, por su comprensión, acompañamiento en esta etapa.

A mis perros Dylan, Kaiser, Tony y Tyson (+), por su acompañarme en las madrugadas de estudios y escritura de trabajos.

A mi co-tutora, Prof. Dra Laura Mereles por guiarme en el camino de la ciencia con amor y paciencia desde el principio y en especial para la realización de este trabajo, sin su ayuda no sería posible haber llegado hasta aquí.

A mi tutor, el Prof. Dr. Nelson Alvarenga por todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

A todo el plantel del Dpto. Bioquímica de Alimentos, la Dra. Silvia Caballero, Dra. Patricia Piris, Dra. Lourdes Wiszovaty, Dr. Javier Michajluk y la Bioq. Rocio Villalba, quienes me brindaron todo el apoyo logístico necesario para la realización de este trabajo.

Al programa PROCENCIA del CONACYT por financiar este Programa de Maestría además de todo el apoyo económico brindado para la dedicación exclusiva.

A la Cooperazione Internazionale Italiana COOPI, en la persona del Sr. Raul Polato, por proveer las muestras y reactivos necesarios para la realización de este trabajo.

Este trabajo fue realizado en el marco de la Red **Ia ValSe-Food**, **Iberoamerican Valuable Seeds** o **Valiosas Semillas Iberoamericanas** a través del Proyecto **DESARROLLO DE INGREDIENTES ALIMENTARIOS A PARTIR DE CULTIVOS ANCESTRALES IBEROAMERICANOS** de la Red CYTED.

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y POTENCIAL NUTRACÉUTICO DEL FRUTO DE *Capsicum chacoense* Hunz “AJÍ DEL MONTE” DE ALTO PARAGUAY

Autor: Eva Eugenia Soledad Coronel Mendez

Tutores: Prof. Dr. Nelson Alvarenga

Prof. Dra. Laura Mereles

RESUMEN

Capsicum chacoense o “ají del monte”, es una especie de arbusto nativo y silvestre de la ecoregión del Gran Chaco. Con el objetivo de evaluar la composición química y potencial nutraceutico del fruto de *Capsicum chacoense* Hunz, se colectaron muestras del Dpto. de Alto Paraguay, Chaco y se determinó la composición centesimal (humedad, proteínas totales, lípidos, fibra alimentaria, carbohidratos y cenizas) y minerales (Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn, Cu y P) por métodos oficiales AOAC, el perfil fitoquímico y contenido de capsaicina, dihidrocapsaicina y β -caroteno por HPLC-PDA. Se evaluó el potencial antioxidante determinando el contenido de polifenoles totales por el método de Folin Ciocalteu, carotenoides totales por espectrofotometría, así como la capacidad antioxidante total por medio de la inhibición del radical ABTS•. Se evaluó actividad antiparasitaria *in vitro* usando *Eisenia foetida* como modelo y toxicidad aguda en ratones por vía oral con dosis de 500, 1000 y 2000 mg/kg de peso corporal. Las muestras analizadas (Estancia y Ayoreo) presentaron altos niveles de fibra alimentaria (47,05-49,19g/100g), proteínas (14,43-15,60 g/100g) y potasio (1708-1733 mg/100g). En el extracto metanólico se observó la presencia de alcaloides, consecuente con los niveles de capsaicina (131,85 y 98,80 mg/100g y dihidrocapsaicina (80,75 y 63,68 mg/100g), con diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ($p < 0,05$). El contenido de fenoles totales (517,26-543,32mg GAE/100 g muestra), carotenoides totales (125,72-239,57mg/kg), β -caroteno (3,29-5,60 mg/Kg), la actividad antioxidante total *in vitro* observada (154-158mM TEAC/g SMTC), la actividad anti-helmíntica en los extractos metanólicos a las dosis ensayadas (2,5 a 40 mg/mL) así como la ausencia de efectos letales agudos (DL50) en dosis inferiores a 2000 mg/kg, demuestran que los frutos del “ají del monte” poseen un gran potencial nutraceutico de interés para la industria alimentaria y la farmacéutica.

Palabras clave: *Capsicum chacoense*; composición centesimal; capsacinoides; potencial antioxidante; actividad antihelmíntica.

**CHEMICAL COMPOSITION AND NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF
THE FRUIT OF *Capsicum chacoense* Hunz “AJÍ DEL MONTE” FROM ALTO
PARAGUAY**

Author: Eva Eugenia Soledad Coronel Mendez

Advisors: Prof. Dr. Nelson Alvarenga

Prof. Dra. Laura Mereles

SUMMARY

Capsicum chacoense (“ají del monte” in Spanish), is found natively and wildly in the Chaco region. The objective of the present work was to evaluate the chemical composition and nutraceutical potential of the fruit of *Capsicum chacoense* Hunz. For this, samples were collected from the Alto Paraguay Department. For the evaluation of the chemical composition, the centesimal composition (humidity, total proteins, lipids, dietary fiber, total carbohydrates, available sugars and ashes), and minerals (Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Mn, Cu and P) were determined by official AOAC methods. Phytochemical profile was determined by qualitative tests and content of capsaicin and dihydrocapsaicin by HPLC-PDA. For the nutraceutical potential, the antioxidant potential was evaluated with the total antioxidant capacity by the inhibition of the ABTS • radical. The content of total polyphenols was assayed with the Folin Ciocalteu reagent, total carotenoids by spectrophotometry and β -carotene by HPLC-PDA. Antiparasitic activity *in vitro* was evaluated against earthworms *Eisenia foetida* and acute oral toxicity was assayed in female mice at doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg. The samples analyzed contain high levels of dietary fiber (49.19 and 47.05 g/100 g). In the phytochemical profile, abundant amounts of alkaloids were found, such as capsaicin (131.85 and 98.80 mg/100 g for the Estancia and Ayoreo samples, respectively) and dihydrocapsaicin (80.75 and 63.68 mg /100g). The pungency level was 31,890 SHU for Estancia and 24,372 SHU for Ayoreo. The total antioxidant capacity, the content of total phenols, total carotenoids, β -carotene were respectively 154 and 158mM TEAC / g; 517.26 and 543.32 mg GAE / 100g; 125.72 and 239.57 mg / kg; 3.29 and 5.60 mg / Kg for the Estancia and Ayoreo samples, respectively. Greater anti-helminthic activity was observed with respect to the positive control used with significant differences in all the concentrations tested of the methanolic extract of *C. chacoense* fruits (2.5 to 40 mg/ mL). No acute toxic effects were observed up to the evaluated dose (2000 mg/kg). These data represent a scientific basis for future work around bioprospecting food resources of interest for conservation, food, agriculture and nutraceuticals, as well as for the pharmaceutical industry.

Keywords: *Capsicum chacoense*; capsaicinoids; antioxidant potential; anthelmintic activity.

INDICE

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Biodiversidad y bioprospección	1
1.2 Alimentos nutraceuticos y funcionales	2
1.3 Género <i>Capsicum</i>	2
1.3.1 Usos comunes y etnobotánica del <i>Capsicum</i>	6
1.3.2 Aporte nutricional de frutos del género <i>Capsicum</i>	8
1.3.3 Metabolitos secundarios del género <i>Capsicum</i>	9
1.3.4 Actividades biológicas del <i>Capsicum</i>	16
1.4 Botánica y características de <i>Capsicum chacoense</i>	20
1.4.2 Distribución geográfica de <i>C. chacoense</i>	22
1.4.3 Etnobotánica.....	23
1.4.4 Antecedentes de composición química y actividad biológica.....	24
1.4.5 Antecedentes de interés agronómico.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo general	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Diseño.....	28
3.2. Muestreo y procesamiento	29
3.3 Equipamientos y reactivos	30
3.4 Análisis de composición química	32
3.4.1. Composición centesimal	32
3.3.2 Minerales	36

3.4.3	Obtención del extracto metanólico.....	36
3.4.4	Perfil fitoquímico.....	37
3.4.5	Contenido de capsacinoides y nivel de pungencia.....	39
3.5	Toxicidad aguda.....	41
3.6	Evaluación de potencial nutraceutico	42
3.6.1	Potencial antioxidante.....	42
3.6.2	Actividad antihelmíntica <i>in vitro</i>	46
3.7	Consideraciones éticas	47
3.8	Asuntos estadísticos.....	48
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.1	Composición química	49
4.1.1	Composición centesimal y contenido de minerales.....	49
4.1.2	Perfil fitoquímico	55
4.1.3	Contenido de capsacinoides y nivel de pungencia	58
4.2	Toxicidad aguda.....	62
4.3	Potencial nutraceutico	63
4.3.1	Potencial antioxidante.....	63
4.3.2	Actividad antihelmíntica <i>in vitro</i>	68
5.	CONCLUSIONES.....	72
	ANEXOS	74
	REFERENCIAS.....	82

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Biodiversidad y bioprospección

La biodiversidad es la variabilidad biológica de una región y la relación de seres vivos entre sí, así como su relación con el medio ambiente (UNESCO, 2019). Las personas junto con sus culturas han emergido de la adaptación al medio, su conocimiento y su utilización, por lo tanto, la biodiversidad tiene dos dimensiones: la biológica y la cultural. Comprende tanto la diversidad genética, de especies, de poblaciones y de ecosistemas, como la de los múltiples procesos culturales que en diferentes épocas y contextos han caracterizado la relación del ser humano con su entorno natural (Alangui et al, 2020). La gran biodiversidad de la Región del Chaco, aún poco explorada desde el punto de vista alimentario y nutracéutico, hace de los recursos naturales de esta región un blanco importante para estudios sistemáticos de validación de usos, evaluación de su potencial nutritivo y posibles aplicaciones medicinales o en el campo de la nutracéutica (Echagüe et al., 2015).

La bioprospección de nuevas fuentes de alimentación y nutrición, así como la química y actividad biológica de productos naturales es uno de los temas de investigación actual en el área de alimentación y salud, donde la composición de alimentos y la descripción de principios activos juegan un papel fundamental para establecer el potencial beneficio para la prevención de enfermedades, el desarrollo de ingredientes activos para su aprovechamiento en alimentos elaborados y su uso en nutracéutica (Guil-layne & Guil-guerrero, 2019).

La bioprospección se entiende como el uso de la biodiversidad en la provisión de recursos para el descubrimiento, clasificación, investigación y/o formulación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas y otros componentes con potencial valor económico y biotecnológico (Silveira et al., 2019). Por tanto, la bioprospección implica buscar, recolectar y derivar materiales genéticos de muestras de biodiversidad que se pueden utilizar en productos farmacéuticos, agrícolas y productos comerciales finales de procesamiento industrial o químico (Bhattacharya, 2014).

1.2 Alimentos nutraceuticos y funcionales

El Dr. Stephen Defelice, quien combinó las palabras "nutrición" y "farmacéutico", acuñó el término "nutracéutico" en 1989. Los nutraceuticos son componentes dietéticos orales que se encuentran naturalmente en los alimentos y se cree que tienen un beneficio médico o para la salud (Souyoul et al., 2018). Se presenta en una matriz alimentaria o no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), y que, administrada en dosis superior a la existente normalmente en alimentos, presume un efecto favorable sobre la salud, mayor al que posee el alimento normal. Por ende, los productos nutraceuticos tienen la capacidad de fortalecer las condiciones saludables, sirviendo como auxiliar en el cuidado y mantenimiento de la salud, así como en la prevención de enfermedades y en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo (Perez Leonard, 2006).

Por otro lado, los alimentos funcionales como tal son aquellos en los que algunos de sus componentes afectan funciones del organismo de manera específica y positiva, promoviendo un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. Dicho efecto puede ser contribuir a la mantención de la salud y bienestar, a la disminución del riesgo de enfermar o ambas cosas (Olagnero et al., 2007). Según la IFIC (Consejo Internacional de Información sobre Alimentos) son aquellos que aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, son capaces de proporcionar un efecto positivo tanto en el mantenimiento del estado de salud como en la reducción del riesgo de padecer una enfermedad. Cuando un alimento funcional ayuda a la calidad y mantenimiento de la vida y salud o a la prevención de enfermedades por contener grandes cantidades de componentes bioactivos beneficiosos, entonces se puede llamar nutraceutico (Perez Leonard, 2006).

1.3 Género *Capsicum*

El género *Capsicum*, cuyos frutos son conocidos comúnmente como pimientos, ajíes o chiles, es uno de los 115 géneros de la familia Solanaceae, que cuenta con 40 especies aceptadas actualmente, algunos de ellos son por ejemplo el *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*, el *Capsicum*

chacoense, entre otros (The Plant List, 2013), Esta familia de plantas es nativa de América e incluye vegetales como pimiento, tomate y papa. Se cree que el ají tiene sus orígenes en el área fronteriza por las montañas del sur de Brasil al este, por Bolivia al oeste, y por Paraguay y norte de Argentina hacia el sur, como se muestra en la figura 1.1 (Bosland, 1996; Martinez Torres, 2007). Los ajíes son los cultivos más antiguos de los nativos americanos, entre 5200 y 3400 a.C, se ha encontrado que los aztecas y mayas lo utilizaban en prácticas medicinales (Heiser, 1976). Sin embargo, su cultivo por primera vez fue hace 6100 años atrás en las selvas tropicales de tierras bajas del oeste del Ecuador (Perry et al., 2007). Por otro lado, Cristóbal Colón recibe el crédito por introducir el chile a Europa y luego a África y Asia (Bosland, 1996).

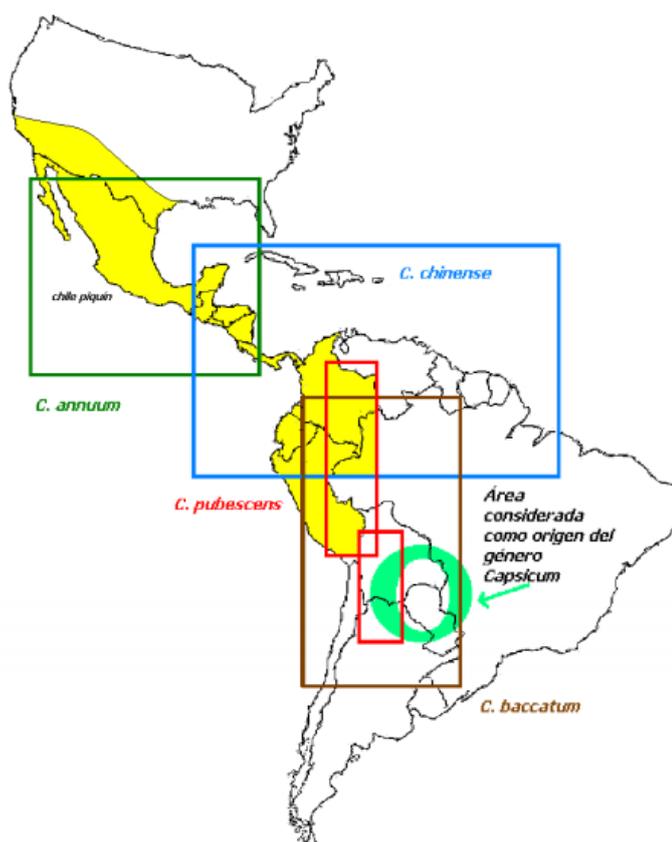


Figura 1.1. Origen del género *Capsicum* y distribución de las especies domesticadas de mayor uso (Martinez Torres, 2007).

Actualmente este género se cultiva en varias regiones del mundo (figura 1.2), incluidas las regiones tropicales, subtropicales y templadas de África, Asia y América, así como en la cuenca mediterránea, gracias a su importancia económica y al valor nutricional de los frutos. Según los últimos datos proveídos por la Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO), en el año 2018 Asia aportó el 68% de la producción mundial de ajíes, siguiéndole América con 13,7%, África 9,5% y Europa 8,8% (FAO, 2020).

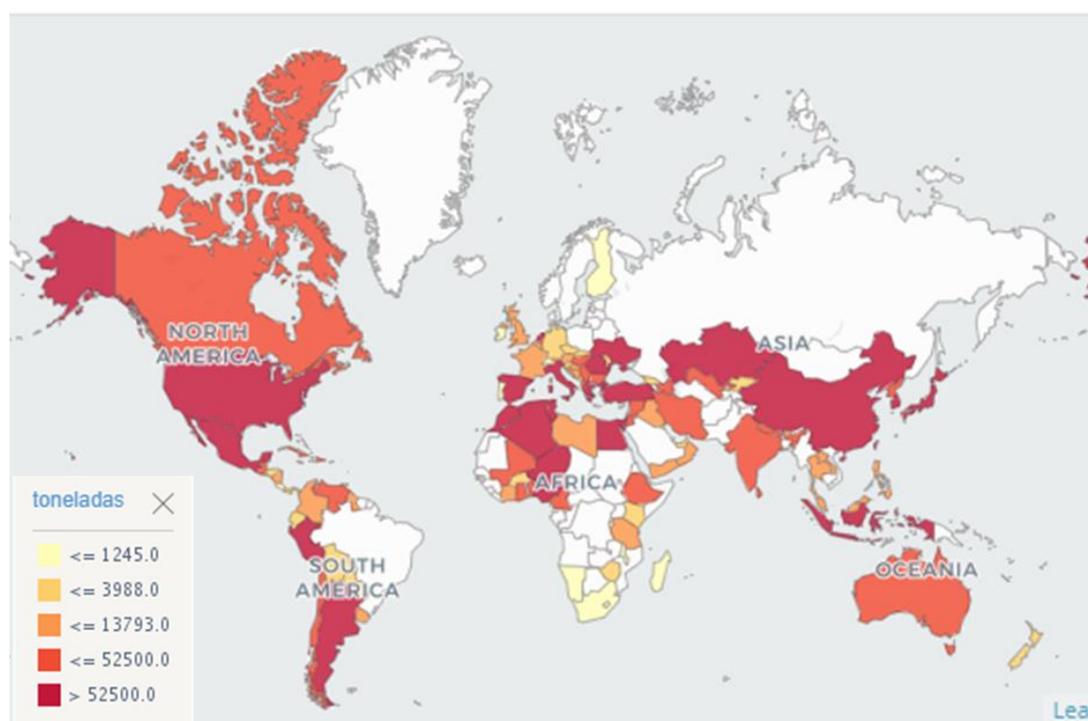


Figura 1.2. Cultivo de *Capsicum* spp en el mundo en el año 2018 (FAO, 2020).

Según datos oficiales de la FAO, el cultivo y la producción de *Capsicum* a nivel mundial ha ido en aumento, en el año 2008 se produjeron 28,1 millones de toneladas en 1,8 millones de ha y en el año 2018 se produjeron 36,8 millones de toneladas en 2 millones de ha, es decir, la producción ha aumentado 8,7 millones de toneladas en 10 años, siendo China continental el mayor productor a nivel mundial. Por otro lado, Paraguay produjo

6360 toneladas en el 2008 y para el 2018 la producción fue de 10.480 toneladas (FAO, 2020).

Las especies domesticadas y por ende las más utilizadas y estudiadas ampliamente son el *Capsicum annum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense* y *Capsicum pubescens* (figura 1.3). En América se cultivan diferentes especies con mayor frecuencia en ciertos lugares, tal como se muestra en la figura 1.1 (Khan et al., 2014a).

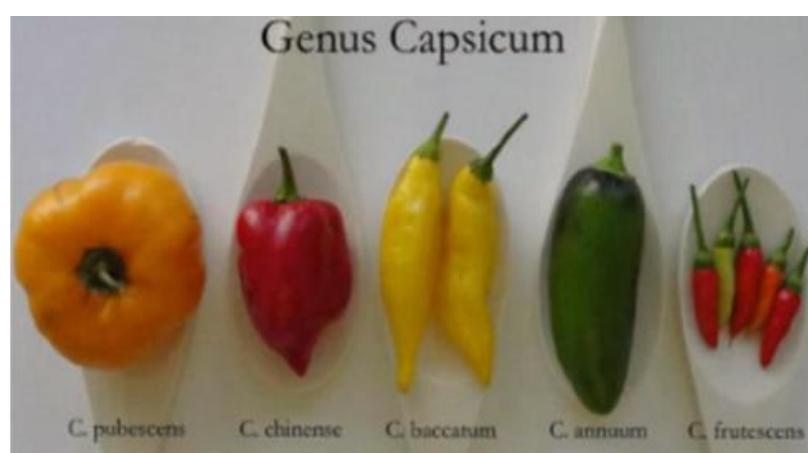


Figura 1.3. Especies de *Capsicum* domesticadas y más consumidas (Parvez, 2018)

Por otro lado existen muchas otras especies silvestres, a nivel local contamos con dos especies nativas y silvestres, conocidas como “ají o ky'yi”, cuyos nombres científicos son: *Capsicum chacoense* y *Capsicum flexuosum* (figura 1.4) (Elsam et al., 2018).

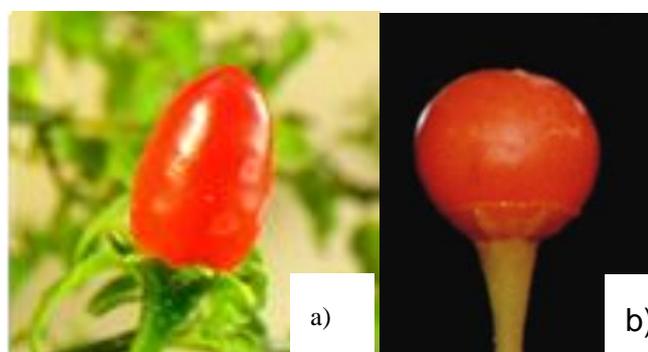


Figura 1.4. Frutos de especies de *Capsicum* nativas y silvestres del Paraguay. a) *Capsicum chacoense*; b) *Capsicum flexuosum* (García, 2011; Polini & Lopez, 2013).

1.3.1 Usos comunes y etnobotánica del *Capsicum*

Los frutos de *Capsicum* spp son utilizados principalmente en la industria alimentaria y farmacéutica, así como dentro de la medicina tradicional, tal como se resume en la tabla 1.1.

Los frutos del género *Capsicum* o “pimientos” pueden ser picantes o no, y esta propiedad de pungencia permite atribuirles diferentes usos. El pimiento es reconocido como un cultivo de hortalizas ampliamente distribuido en el mundo (Javier & Alvarez, 2018). Las variedades de pimiento dulce y picante se incluyen en la industria alimentaria, se consumen frescos o procesados, en diversas especialidades o como especias y extractos denominados oleorresinas (Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, et al., 2013).

A nivel industrial existen tres tipos de tratamientos post cosecha del pimiento o ají:

- a) El primero consiste en un producto fresco congelado, enlatado o en escabeche. Algunos de los tipos de vainas incluidos en este grupo son el pimiento, el jalapeño, el serrano, el pepperoncini, la cera amarilla y el nuevo mexicano.
- b) La segunda categoría consiste en aquellos utilizados como producto deshidratado, que son utilizados como condimentos, en algunas especies conocidos como paprika (Bosland, 1996).
- c) El tercer uso que ha tomado gran impulso en los últimos tiempos debido a la presencia de compuestos característicos, capsaicinoides y carotenoides, son la elaboración de oleorresinas, que sirven como colorantes y saborizantes en la industria alimentaria y como fuente de los alcaloides del tipo capsaicinoides en la industria farmacéutica, donde estos son utilizados como materia prima para la realización de cremas (Restrepo Gallego, 2006).

Tabla 1.1. Usos comunes y etnobotánica de frutos de *Capsicum* spp.

Uso	Descripción
Alimentación	Producto fresco congelado, enlatado o en escabeche como verdura. Secos, como condimento. Aditivo alimentario: Oleorresina como fuente de colorantes y saborizantes.
Industria Farmacéutica	Oleorresina es materia prima para extracción de compuestos capsacinoides para la elaboración de cremas tópicas.
Industrial	Oleorresina para extracción de capsacinoides para la elaboración de aerosoles de protección personal.
Medicina tradicional	Tratamiento para la artritis, el reumatismo, los dolores de estómago, las erupciones cutáneas, mordeduras de perros y picaduras de serpientes. Para aumentar el calor digestivo del estómago, alivio del edema, hemorroides, parásitos intestinales y la lepra. Como antiespasmódicos, desinfectantes pulmonares, contrairritantes y antitusivos. Tópicamente, para dolor, neuropatía, cefalea en racimos, migraña, psoriasis, neuralgia del trigémino y Herpes zoster. Para tratar la dispepsia, pérdida de apetito, flatulencia, aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares, enfermedades cardíacas y la tensión muscular.

*Elaboración propia

El uso medicinal tradicional del género *Capsicum* data de la época prehispánica de aztecas y mayas, lo cual está bien documentado en varios códices. El más importante de ellos se considera la *Libellus de Medicinabilis Indorum Herbtis* (Pequeño libro de las hierbas medicinales de los indios) escrito por el curandero indígena Martín de la Cruz en 1522 (Domínguez et al., 2015). A principios del siglo XX, los estudios de la farmacopea botánica de los habitantes indígenas mayas de Mesoamérica informaron sobre aproximadamente 32 usos diferentes de *Capsicum spp* relacionados con la salud (Cichewicz & Thorpe, 1996), incluido el tratamiento para la artritis, el reumatismo, los dolores de estómago, las erupciones cutáneas y para aliviar las mordeduras de perros y serpientes.

Sin embargo, el uso de los frutos *Capsicum* no es exclusivo de América Latina, y sus usos medicinales se han extendido por todo el mundo junto con su consumo y cultivo. Por lo tanto, los frutos de *Capsicum* se mencionan en un texto clásico de la tradición médica tibetana, el "Blue Beryll" para aumentar el calor digestivo del estómago y como medicamento para el alivio del edema, las hemorroides, los protozoos parásitos y la lepra (Basu et al., 2003). Además, en África se consideran antiespasmódicos, desinfectantes pulmonares, contrairritantes (disminución del dolor por ejercer sensación de calor) y antitusivos (Elujoba et al., 2006).

1.3.2 Aporte nutricional de frutos del género *Capsicum*

El acervo bibliográfico sobre el género *Capsicum* se concentra en especies domesticadas y con muchas variedades cultivadas en diferentes regiones del mundo sobre todo en la especie *Capsicum annuum*, en cuanto al aporte nutricional de los frutos, ya que tiene muchas variedades comestibles. En los frutos secos cuya humedad varía de 4,5 a 13,0 %, se informó la siguiente composición centesimal: proteínas de 11,7 a 21, 29%, fibra alimentaria de 18,2 a 38,8 %, lípidos totales de 2,0 a 23,6%, carbohidratos totales de 32,9 a 65,6 %, ceniza o minerales totales de 4,3 a 11,1 % (Kim et al., 2019; Otunola, Oloyede, Oladiji, & Afolayan, 2010; Simonovska, Škerget, Knez, Srbinoska, & Kavrakovski, 2016; Tripathi & Mishra, 2009; Zou, Ma, & Tian, 2015). Sin embargo, para frutos frescos con humedad de 70,9-95,6%, la composición centesimal es de 0,6 a 19,3 %, de proteínas, 1,0 a 4,7% de fibra alimentaria, 0,2 a 3,7 %, de lípidos totales, 4,6 a 6,7 % de carbohidratos totales y 1,0 a 16,3% de cenizas o minerales totales (Embaby & Mokhtar, 2011; Guil-Guerrero, Martines-Guirado, Reboloso-Fuentes, & Carrique-Perez, 2006; Ogunlade, Alebiosu, & Osasona, 2012; Simonovska, Rafajlovska, Kavrakovski, & Srbinoska, 2014).

En cuanto a su perfil lipídico de los frutos de diferentes estudios de 15 variedades de *Capsicum annuum* se describió una composición rica en ácidos grasos de cadena larga como el ácido linoleico poliinsaturado (C18:2) en 36,60 a 71,55%, seguido por ácido palmítico de 12,32 a 23,00 % y otros como ácido láurico (0,14 - 2,10%), ácido mirístico (1,33 - 3,77%), ácido palmitoleico (0,62 - 1,56%), ácido esteárico (3,15-

9,91%), ácido oleico (8,22- 12,98 %), ácido linolénico (0,55 – 19,02%) y ácido araquidónico (0,56 a 0,70%) (Ananthan, Subhash, & Longvah, 2018; El-sayed Embaby & Mohamed Mokhtar, 2011; Kim, Lee, Baek, Soo Yun, et al., 2019).

También se ha descrito el perfil de aminoácidos en frutos de *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense*, donde los rangos de aminoácidos esenciales, expresados como % de proteína, variaron de la siguiente manera: cistina del 0,97 a 5,54, histidina de 0,48 a 1,8; isoleucina de 0,48 a 4,00; leucina de 0,91 a 7,8; lisina de 1,03 a 3,5, metionina de 1,03 a 3,50; fenilalanina de 1,26 a 2,7; treonina de 0,81 a 3,2; tirosina de 0,80 a 1,50 y valina de 0,15 a 3,00. Por lo tanto, estos frutos tienen como aminoácidos limitantes a la cisteína y la metionina. Por otro lado, los aminoácidos no esenciales mayoritarios son el ácido glutámico (2,41 a 17,5 %) y ácido aspártico (2,03 a 23,00 %) (Ananthan et al., 2018; Embaby & Mokhtar, 2011; Kim et al., 2019; Zou et al., 2015).

Además, se ha descrito que estos frutos de pimiento representan una rica fuente de ácido ascórbico. Los niveles de vitamina C en los genotipos de pimiento pueden variar de 43 - 247 mg / 100 g en peso fresco y pueden contribuir desde 50% a más del 100% de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de esta vitamina (Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, et al., 2013).

Por otro lado, también se ha descrito la presencia de antinutrientes en frutos de *C. annuum*, por ejemplo el ácido fítico (2,88 g/100 g), inhibidores de tripsina (2,20 g/100 g) y taninos (2,89 mg/g) (El-sayed Embaby & Mohamed Mokhtar, 2011), los cuales interfieren con la biodisponibilidad de minerales y proteínas.

1.3.3 Metabolitos secundarios del género *Capsicum*

Los frutos de pimiento son una importante fuente de capsaicinoides, carotenoides (algunos de ellos con actividad de provitamina A) y polifenoles como los flavonoides. La cantidad y composición de estos metabolitos varían entre los genotipos y se ven afectados por muchos factores, como la madurez, los sistemas de cultivo y los métodos de procesamiento (Wahyuni, Ballester, Tikunov et al., 2013).

La presencia de algunos de estos metabolitos puede funcionar como un mecanismo de defensa general contra diversas tensiones bióticas y abióticas, por ejemplo, la pimienta

contiene polifenoles tales como O-glucósidos de feruloilo, O-pentosildihexósidos de kaempferol y O-hexosas de dihidroxiflavona que pueden actuar como fitoanticipinas o barrera química contra agresores de los frutos tras la infección con el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, que produce la antracnosis (enfermedad de algunas plantas producidas por este hongo) (Park et al., 2012). Por otro lado, se sugiere que la capsaicina actúa como uno de los mecanismos de defensa de las plantas de pimiento contra los animales frugívoros (animales que se alimentan de plantas) y hongos del género *Fusarium* (Schulze & Spiteller, 2009). La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos, como los derivados del ácido cinámico y los flavonoides, hacia los radicales libres y el oxígeno reactivo y su potencial actividad anticancerígena, como la antiproliferación, llaman la atención sobre su posible papel protector de la salud en la dieta humana (Tundis et al., 2011).

1.3.3.1 Capsaicinoides

Los capsaicinoides son compuestos tipo amidas producidas por especies de *Capsicum*, estos metabolitos secundarios son responsables del sabor fuerte y picante de las frutas, también conocido como pungencia. Los capsaicinoides consisten en compuestos que difieren en la estructura de los restos de ácido graso ramificado (acilo) unidos al anillo de benceno de vanililamina (tabla 1.2). Estos compuestos son capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina y homocapsaicina. Cualquier variación en las estructuras químicas de los capsaicinoides, incluida la estructura del resto acilo, afecta el grado y el nivel de la acidez. La capsaicina y la dihidrocapsaicina son los dos capsaicinoides principales que se encuentran en los pimientos picantes, y representan más del 90% de los capsaicinoides totales (Wahyuni, Ballester, Tikunov, et al., 2013).

Los capsaicinoides se sintetizan en la placenta de las frutas mediante una condensación enzimática de vanililamina y ácidos grasos de cadena ramificada de longitud media. La vanililamina se origina en la vía de los fenilpropanos, y el ácido graso de cadena ramificada deriva del metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (Mazourek et al., 2009). La enzima clave que conduce a la producción de los capsaicinoides son

la capsaicina sintasa (CS), una enzima aciltransferasa implicada en la condensación de vanililamina con el resto de ácidos grasos de cadena corta (Stewart et al., 2007).

Los niveles de capsaicinoides totales se pueden convertir en unidades de calor Scoville (SHU), una medida de la acidez desarrollada por Wilbur Scoville (Scoville, 1912). El número de unidades Scoville es igual a número aproximado de veces que un extracto de pimienta necesitaría ser diluido para que la especia sea imperceptible. Por definición, una parte por millón (ppm) de capsaicina tiene una acidez de 15 SHU (Horwitz, 2000). Scoville clasificó en cuatro grupos de niveles de pungencia como se puede observar en la tabla 1.3.

Los niveles de producción de capsaicinoides y la abundancia relativa de capsaicinoides en varios cultivares de pimiento están determinados, al menos en parte, por diferencias genéticas y ambientales en la expresión de genes de la ruta metabólica de la síntesis de capsaicinoides como la fenilalanina amoniaco liasa (Pal), ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4h), ácido caféico O-metiltransferasa (COMT) y los genes 3-ceto-acil-ACP sintasa (Yazawa et al., 1989). Se ha informado de un grupo de sustancias similares a los capsaicinoides no pungentes llamadas capsinoides, en el pimiento dulce; *C. annuum*, que se deriva de una variedad de pimiento picante tailandés, CH-19 (Kobata et al., 1998). Los capsinoides tienen los mismos dos componentes básicos que los capsaicinoides (un núcleo de vanililo unido a un resto de ácido graso) pero están conectados a través de un éster en lugar de un enlace amida (tabla 2.2). Sobre la base de la estructura de su resto de ácido graso, estos análogos se han denominado capsiato, dihidrocapsiato y nordihidrocapsiato (Eich, 2008). El capsiato, es similar a la capsaicina, es el compuesto principal que se encuentra en las frutas dulces de pimientos y es un millar veces menos picante que la capsaicina (Kobata et al., 1998).

Tabla 1.2. Estructuras químicas y niveles de acidez de capsaicinoides y derivados de capsinoides

Compuesto	Abundancia relativa	Scoville Heat Units	Estructura química
Capsaicina	69%	15.000.000	
Dihidrocapsaicina	22%	15.000.000	
Norhidrocapsaicina	7%	9.100.000	
Homohidrocapsaicina	1%	8.600.000	
Homocapsaicina	1%	8.600.000	
ω -hidroxicapsaicina		-	
Capsiato		-	
Dihidrocapsiato		-	
Norhidrocapsaiciato		-	

Fuente: Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, et al., 2013

Tabla 1.3. Niveles de pungencia en SHU

Nivel	Rango de SHU
Leve	0-5000
Moderado	5000-20 000
Alto	20 000-70 000
Extremadamente alto	70 000-300 000

Fuente: Eich, 2008

1.3.3.2 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo importante de pigmentos responsables de los atractivos colores de muchas flores y frutas y también juegan un papel importante en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas. Además, son componentes esenciales de la maquinaria fotosintética y están involucrados en muchos procesos relacionados con la fotosíntesis, como el ensamblaje del fotosistema, la recolección de luz, la fotoprotección, la fotomorfogénesis y el enfriamiento no fotoquímico (DellaPenna & Pogson, 2006). El género *Capsicum* es una de las fuentes más ricas de carotenoides entre cultivos de hortalizas. Los colores de los pimientos, que son verdes, rojos, amarillos, marrones, naranjas y salmónes, se derivan de los carotenoides, a excepción del pimiento con frutos morados. En el caso de los pimientos con frutos morados, las antocianinas (derivados flavonoides) contribuyen al color púrpura (Lightbourn et al., 2008).

Los frutos de pimiento inmaduros contienen clorofilas y carotenoides, como luteína, violaxantina y neoxantina. Durante la maduración, los cloroplastos se degeneran en cromoplastos y dan lugar a los carotenoides coloreados (Egea et al., 2010). Los principales carotenoides en los pimientos de frutos rojos son la capsantina y la capsorrubina (Tabla 1.4), ambos carotenoides exclusivos del género *Capsicum*. Mientras que la violaxantina, el β -caroteno, la luteína, la antheraxantina y la zeaxantina son los pigmentos más importantes en los pimientos de frutos amarillos (Tabla 1.4). Los pimientos de color marrón contienen clorofila en las frutas inmaduras y carotenoides en la fruta madura (Loizzo et al., 2015; Pugliese et al., 2014).

La variación en el color naranja en las frutas de pimiento se debe a los diferentes perfiles de carotenoides. Algunos cultivares de frutos de color naranja, por ejemplo, Numex Sunset y Habanero, contienen los mismos perfiles de carotenoides que en los pimientos rojos, pero los niveles de estos metabolitos secundarios son más bajos en los pimientos de color naranja (Guzman et al., 2011).

Tabla 1.4 Estructuras de carotenoides comunes en frutos del género *Capsicum*.

Carotenoide	Estructura
Capsantina	
Capsorrubina	
β-caroteno	
Luteína	
Zeaxantina	
Violaxantina	
Antheraxantina	

Fuente: National Center for Biotechnology Information, 2020

1.3.3.3 Flavonoides

Los flavonoides forman parte de un grupo grande de metabolitos secundarios de las plantas, que comparten el mismo esqueleto básico, el núcleo flavánico (figura 1.5), que consta de dos anillos aromáticos con seis átomos de carbono (anillos A y B)

interconectados por un heterociclo que incluye tres átomos de carbono (anillo C). Según las modificaciones del anillo C central, se pueden dividir en diferentes clases estructurales como flavanonas, isoflavonas, flavonas, flavonoles, flavan-3-oles y antocianinas (Dewick, 2009).

Hay diferentes tipos de estos metabolitos en los frutos de *Capsicum*, por ejemplo, en los frutos de *C. annuum*, se encuentran cuatro glucósidos de quercetina, a saber, quercetina 3-O-ramnosido-7-O-glucósido, quercetina 3-O-ramnosido y quercetina 3-O-glucósido-7-O-ramnosido con glucósido ramnosido unido ya sea en la posición C-3 o C-7. Además, cinco tipos de luteolina C-glucósidos; luteolina 8-C-hexosido, luteolina 6-C-hexosido, luteolina 6-C-hexosido-8-C-pentosido, luteolina 6-C-pentosido-8-C-hexosido y luteolina El 6,8-di-C-hexósido junto con dos O-glucósidos de luteolina, luteolina 7-O- (2-aposil) -glucósido y luteolina (aposil-acetil) -glucósido también se han identificado en el pericarpio de los pimientos. Además, dos apigenina C-glucósidos también se identificaron como apigenina 6-C-pentosido-8-C-hexósido y apigenina 6,8-di-C-hexósido (Wahyuni, Ballester, Tikunov, et al., 2013).

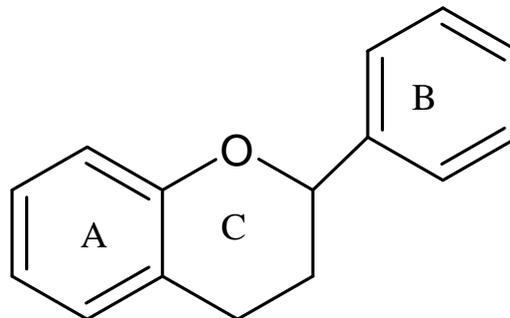


Figura 1.5. Estructura básica de los flavonoides.

1.3.3.4 Saponinas

Las saponinas son glucósidos que, incluso a bajas concentraciones, producen espuma en solución acuosa, porque tienen propiedades tensioactivas similares a jabones. El nombre proviene del latín *sapo*, que significa jabón, y los materiales vegetales que contienen saponinas se usaron originalmente para limpiar la ropa (Dewick, 2009).

Se ha reportado la presencia de saponinas en los frutos de *C. baccatum* (Von Borowski et al., 2019). Además se ha elucidado estructuras de saponinas (figura 1.6) presentes

en los frutos de *C. annuum* como capsicosido A, capsicosido B y capsicosido C, mostrando actividades antimicóticas frente a varios hongos (Iorizzi et al., 2002). Por otro lado la saponina CAY-1 fue aislada de los frutos de *C. frutescens* teniendo actividad antifúngica frente a varios hongos (De Lucca et al., 2002).

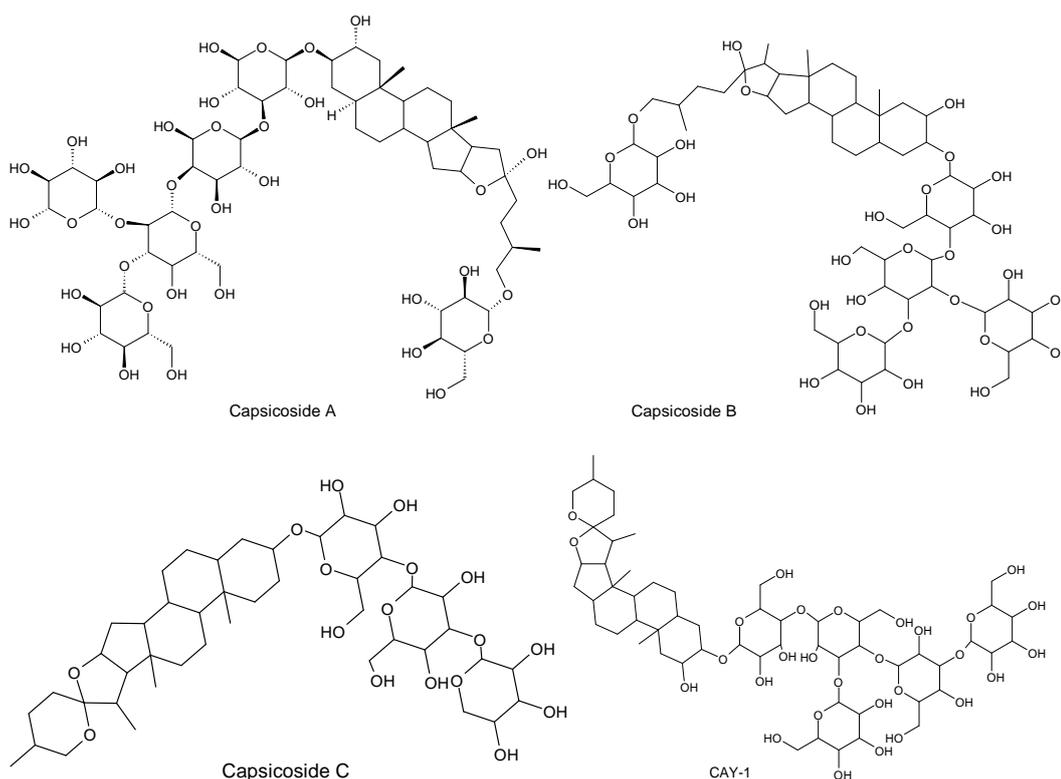


Figura 1.6. Estructuras de saponinas encontradas en frutos del género *Capsicum*. Fuente: National Center for Biotechnology Information, 2020.

1.3.4 Actividades biológicas del *Capsicum*

Las especies de *Capsicum* poseen varias actividades biológicas descritas tales como: antiinflamatoria, inmunomoduladora, antioxidante, antibacteriana, antihelmíntica, anti viral, anti reumática, anti diabética, anti cancerígena, antiulcerosa, anticoagulante, analgésica, hipocolesterolemica, hepatoprotectora, antifúngica y muchas otras (Javier & Alvarez, 2018; Khan et al., 2014a; Parvez, 2018), detalladas a continuación:

1.3.4.1 Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora

Varios autores han demostrado que la capsaicina y otros compuestos capsaisinoides tienen propiedades antiinflamatorias, como la inhibición de la producción de mediadores proinflamatorios como IL-6, TNF, PGE2 y óxido nítrico. La capsaicina muestra una inhibición significativa de la producción de PGE2 inducida por lipopolisacáridos de una manera dependiente de la dosis en la producción de moléculas inflamatorias (Zimmer et al., 2012). Por otro lado, en *Capsicum annuum* se evaluó la capacidad antiinflamatoria por inhibición de la enzima lipoxigenasa (LOX), donde un mayor porcentaje de inhibición de LOX se observó en el pimiento verde (46.12%) seguido de pimiento amarillo (44.09%) y del rojo (32.18%) (Jolayemi & Ojewole, 2014). También extractos etanólicos y butanólicos de *Capsicum baccatum* presentan una actividad antiinflamatoria significativa hacia el modelo de pleuresía inducida por carragenina en ratones (Nair & G., 2014; Zimmer et al., 2012).

Se investigaron los efectos inmunológicos de los extractos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* L.) y su picante principal capsaicina en la producción de citocinas T helper 1 (Th1) y 2 (Th2) en células de parche de Peyer (PP) murinas cultivadas *in vitro* y *ex vivo*. La administración directa de extracto de pimiento (1 y 10 µg/ml) y capsaicina (3 y 30 mM) dio como resultado la supresión de la producción de interferón (IFN) -gamma, interleucina (IL) -2, IL-4 e IL-5. Se piensa que las células dendríticas, un tipo de células clave en las respuestas inmunes, tienen el receptor de capsaicina, y el compromiso de este receptor tiene poderosas consecuencias inmunes (Takano et al., 2007).

1.3.4.2 Actividad antioxidante

Entre los metabolitos secundarios del pimiento, los carotenoides funcionan como compuestos colorantes y exhiben un papel importante para proporcionar protección contra las células y los tejidos de las especies nocivas de oxígeno reactivo (ROS), actuando como captadores de oxígeno molecular singlete, radicales peróxilo y especies de nitrógeno reactivo (RNS). No obstante, gran parte de la actividad antioxidante total está relacionado con el contenido fenólico y no solo del contenido de vitaminas y

carotenoides (Morales-Soto et al., 2013; Mudric et al., 2017). Generalmente, en *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. chinense*, la concentración de constituyentes antioxidantes (carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos y ácido ascórbico) aumenta durante la maduración del fruto junto con la actividad antioxidante determinada *in vitro* (Howard et al., 2000). La capsaicina también ha demostrado un potencial antioxidante comparable al del butilhidroxianisol (BHA), al poder proteger la oxidación de la lipoproteína humana de baja densidad (LDL), inhibir la peroxidación lipídica inducida por iones de cobre disminuyendo la formación de sustancia reactiva al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Grandgirard et al., 2002). Se han realizado estudios de actividad antioxidante *in vitro* en varias especies de *Capsicum*, donde todos demostraron poseer una alta actividad antioxidante, además de un alto contenido de fenoles totales, probablemente flavonoides (Loizzo et al., 2015; Meckelmann et al., 2015; Mudric et al., 2017). También se han realizado estudios *in vivo*, donde se evaluó la protección contra la lesión hepática inducida por tetracloruro de carbono en ratas tratadas durante 8 semanas, mostrando un efecto hepatoprotector mediante disminución de la generación de malondialdehído, inducción de sistemas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión-S-transferasa) e inhibición de la caspasa-3 activa (Hassan et al., 2012).

1.3.4.3 Actividad antibacteriana

Se ha informado que los pimientos o ajíes exhiben actividad antimicrobiana significativa contra muchos microorganismos como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Adamu et al., 2005). Se describe que el extracto metanólico de pimiento rojo es eficaz contra *Vibrio cholerae* resistente a múltiples fármacos (Yamasaki et al., 2011). Los péptidos antimicrobianos aislados del pimiento se han encontrado efectivos contra algunos tipos de levadura como *Candida cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans* (Yamasaki et al., 2011).

En un trabajo realizado por Kalia et al. (2012) encontraron que la capsaicina actúa como inhibidor de la bomba de flujo de salida NorA de *S. aureus*. Por otro lado Chatterjee et al. (2010) determinaron que el extracto metanólico del chile rojo y la

capsaicina purificada inhibe la producción de toxina (CT) en *V. cholerae*, causante de la enfermedad del cólera. En otro experimento se determinó que la capsaicina inhibió el crecimiento de *H. pylori* de una manera dependiente de la dosis a concentraciones superiores a 10 µg / mL (Jones et al., 1997).

La actividad antibacteriana de *Capsicum annuum* también se evaluó frente a bacterias patógenas aisladas del tracto urinario (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli*) a una concentración entre 5-10 mg/mL (Jones et al., 1997).

.

1.3.4.4 Actividad antihelmíntica

Recientemente se ha investigado la actividad antihelmíntica de algunas especies de *Capsicum* en diferentes modelos que utilizan gusanos análogos a los helmintos intestinales, causantes de parasitosis en humanos. Por ejemplo, Kamal et al., (2015) comprobaron una buena actividad antihelmíntica del extracto metanólico de frutos de *Capsicum frutescens* L. frente a los gusanos *Tubifex tubifex*. También Vinayaka et al., (2013) reportaron una leve actividad antihelmíntica de las hojas de *C. frutescens* utilizando la lombriz *Pheretima posthuma*.

1.3.4.5 Otras actividades

Los capsaicinoides y otros compuestos bioactivos de *Capsicum* parecen tener otros beneficios para la salud cuando se analizan en modelos animales;

- Una suplementación con capsaicina puede mejorar las actividades físicas en los animales de experimentación (rendimiento, fuerza y resistencia) al aumentar el contenido de glucógeno vivo. Además, puede mejorar algunos parámetros de fatiga relacionados con el ejercicio (Hsu et al., 2016).
- Los capsaicinoides pueden disminuir el colesterol total en plasma, reducir la formación de placa aterosclerótica y relajar la arteria aórtica aumentando la excreción fecal de esteroides en hámsteres alimentados con dietas ricas en capsaicinoides. Además, puede modular los lípidos plasmáticos y poseer una actividad vascular beneficiosa (Huang et al., 2014).

También se han realizado estudios en poblaciones dirigidas:

- La presencia de ajíes picantes en la dieta normal se ha relacionado con un mejor nivel de hierro en la población adulta de 25 a 75 años en China (Li et al., 2014).
- Un estudio dirigido a examinar varios tratamientos para la osteoartritis de rodilla en humanos mayores informó que la capsaicina, oral o localmente, reduce el dolor de la artritis reumatoide, el calor inflamatorio y la hiperalgesia química nociva (Fraenkel et al., 2004).

1.4 Botánica y características de *Capsicum chacoense*

El *Capsicum chacoense* es una especie nativa y silvestre que crece principalmente en la ecoregión del Chaco que abarca los países de Paraguay, Argentina, Bolivia y Brasil, también se ha visto crecer en otras regiones fuera del Chaco en estos mismos países. Es conocido comúnmente como “ají del monte” para la lengua castellana, sin embargo, como es consumido principalmente por los indígenas posee diferentes denominaciones dependiendo el dialecto indígena como ky'yi para los guaraníes o las personas que utilizan el idioma oficial del Paraguay (Elsam et al., 2018), “natehxet” para los Enxet (Polini & Lopez, 2013), como “pohnon” para los Toba y Pilagi (Suárez, 2019), como “quitucho” para la comunidad comechigona de Córdoba (Saur Palmieri & Geisa, 2019), como “chimaxara” para los Moqoit (Rosso & Scarpa, 2017), como “awarañinki” para los Tapiete (Montani & Scarpa, 2016).

1.4.1 Taxonomía y botánica

En el año 1950 el investigador Armando T. Hunziker, estudio exhaustivamente especies de *Capsicum* nativos de Argentina y Paraguay, en su informe explica que la especie conocida hasta entonces como *Capsicum annuum* L. var. *frutescens* pasaba a llamarse *Capsicum chacoense*, realizando una descripción botánica detallada de la especie en su dibujo como se observa en la figura 1.7 (Hunziker, 1950). Entonces la taxonomía de esta quedó de la siguiente manera:

- **Reino:** Plantae

- **Orden:** Solanales
- **Familia:** Solanaceae
- **Género:** *Capsicum*
- **Especie:** *C. chacoense* Hunz.

El *C. chacoense* es fácilmente reconocible y distinguible de otras especies, como se observa en la figura 1.8. Forma arbustos de aproximadamente 70 a 100 cm de alto, con numerosas y delgadas ramas, que se vuelven moradas y leñosas. Tiene hojas pecioladas de color verde grisáceo en forma de corazón, láminas de 2-6 x 0,5-2,5 cm, angostamente ovaladas. El brote se ramifica después del nodo 15-20, y tiene flores solitarias con corola blanca como la nieve, anteras amarillas y dientes largos de cáliz de 1,2-2 mm, con 10 apéndices lineares y fruto tipo baya de forma elíptica, que mide 1 cm en el hombro y 2-3 cm de longitud, color rojo que se ablanda cuando madura, picante, pedicelo fructífero erecto. Semillas de color castaño (Elsam et al., 2018; Hunziker, 1950; Polini & Lopez, 2013; Rosso & Scarpa, 2017).

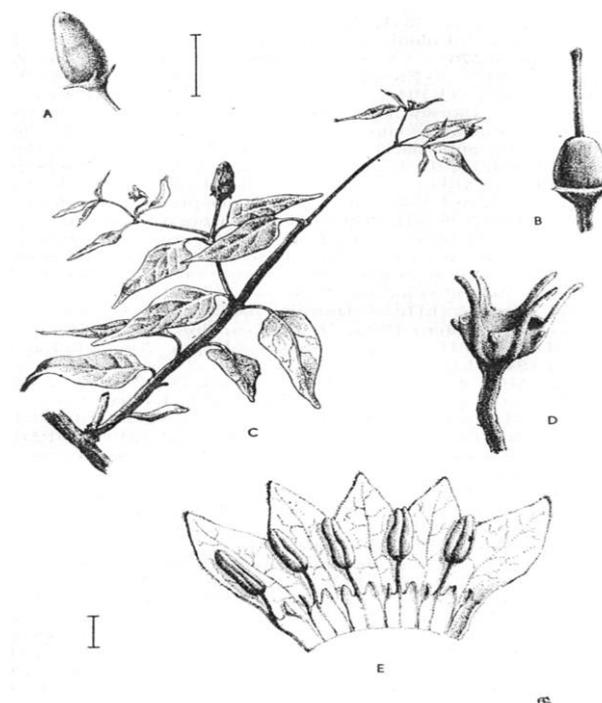


Figura 1.7. Primer dibujo botánico de *C. chacoense*. A, fruto; B, gineceo; C, ramita; D, cáliz; E, corola desplegada. Aumentos: Excepto A (que tiene su propia escala de 1 cm a su derecha), todos los dibujos deben compararse con la línea inferior, que equivale a 1 cm para C, y a 1 mm para B, D y E (Hunziker, 1950).

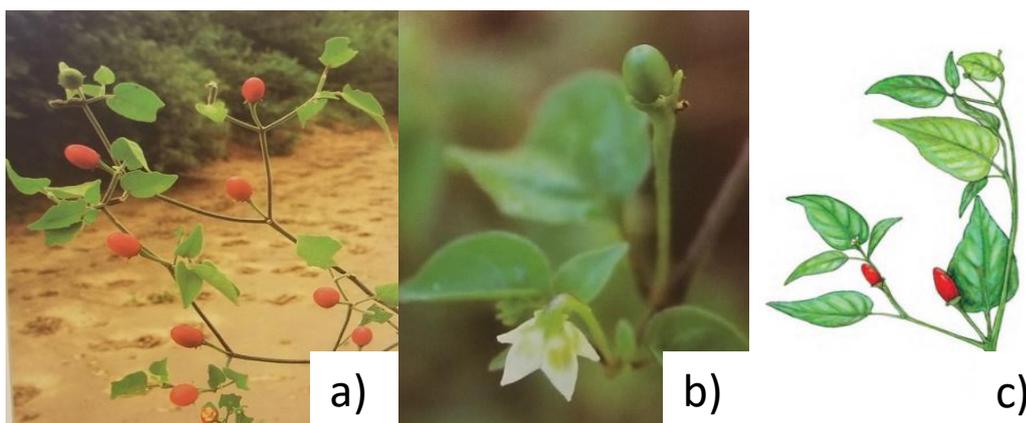


Figura 1.8. Imágenes de *Capsicum chacoense*. a) frutos maduros en el arbusto, b) flor y fruto inmaduro, c) dibujo botánico (Elsam et al., 2018; Polini & Lopez, 2013).

1.4.2 Distribución geográfica de *C. chacoense*

La especie *Capsicum chacoense* crece de forma silvestre principalmente en la ecoregión del Chaco en los países de Paraguay, Argentina y Bolivia. Aunque se ha informado de su presencia en lugares a las afueras del Chaco, como en Córdoba, Misiones en Argentina, o la Región Oriental del Paraguay (Budakert, 2006; Elsam et al., 2018; Hunziker, 1950). Su hábitat natural es el sotobosque de bosques claros, bordes de bosque, en sabanas y en sitios moderadamente modificados, sobre suelos subhúmedos o secos (Elsam et al., 2018).

En Paraguay posee un área de ocupación 224 km², encontrándose en peligro de extinción, sin embargo, el área de extensión de ocurrencia (área proyectada para esta especie) es de 297 785 Km², por lo que se considera como una especie de preocupación menor, según el criterio B de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Se encuentra ampliamente distribuido por todo el territorio paraguayo (Figura 1.9), principalmente en la Región Occidental o Chaco Paraguayo, habiendo un mayor registro en esta región en el Dpto. de Boquerón. Además se ha informado que se recolectaron ejemplares de los Departamentos de la Región Oriental: Alto Paraná, Amambay, Caazapá, Canindeyú, Central, Concepción y Paraguari (Elsam et al., 2018).

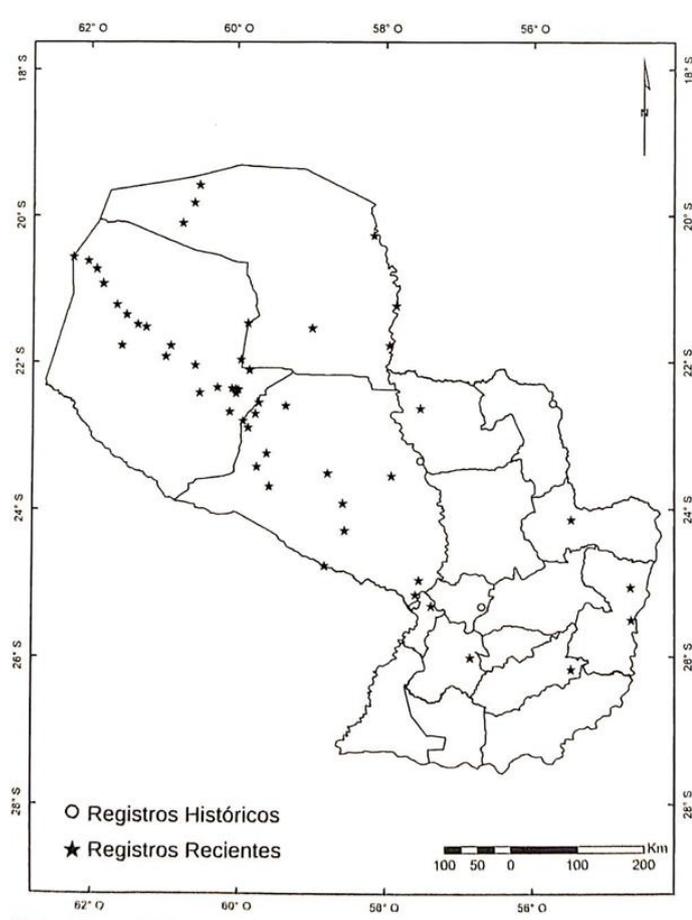


Figura 1.9. Distribución geográfica de *Capsicum chacoense* (Elsam et al., 2018).

1.4.3 Etnobotánica

Los frutos de *C. chacoense* son ampliamente utilizados en la alimentación nativa de la región, ya sean frescos o secos, como verduras o condimentos (Javier & Alvarez, 2018), estudios previos en la región chaqueña mencionan su uso como condimento para carnes, sopas de pescado y ensaladas por las tribus Enxet, Ayoreos, Tapiete y otros. Por ejemplo, Montani et al (2018) describen que el *C. chacoense* es una de las principales especies utilizadas por los Tapiete como se observa en la figura 1.10.

El principal uso descrito es como condimento, después de un secado al sol y molido artesanal de las bayas posiblemente en mortero de madera, típicos de las tribus indígenas, dando un inconfundible sabor chaqueño a las comidas (Elsam et al., 2018; Hunziker, 1950; Montani & Scarpa, 2016; Polini & Lopez, 2013; Rosso & Scarpa, 2017; Saur Palmieri & Geisa, 2019; Suárez, 2019).

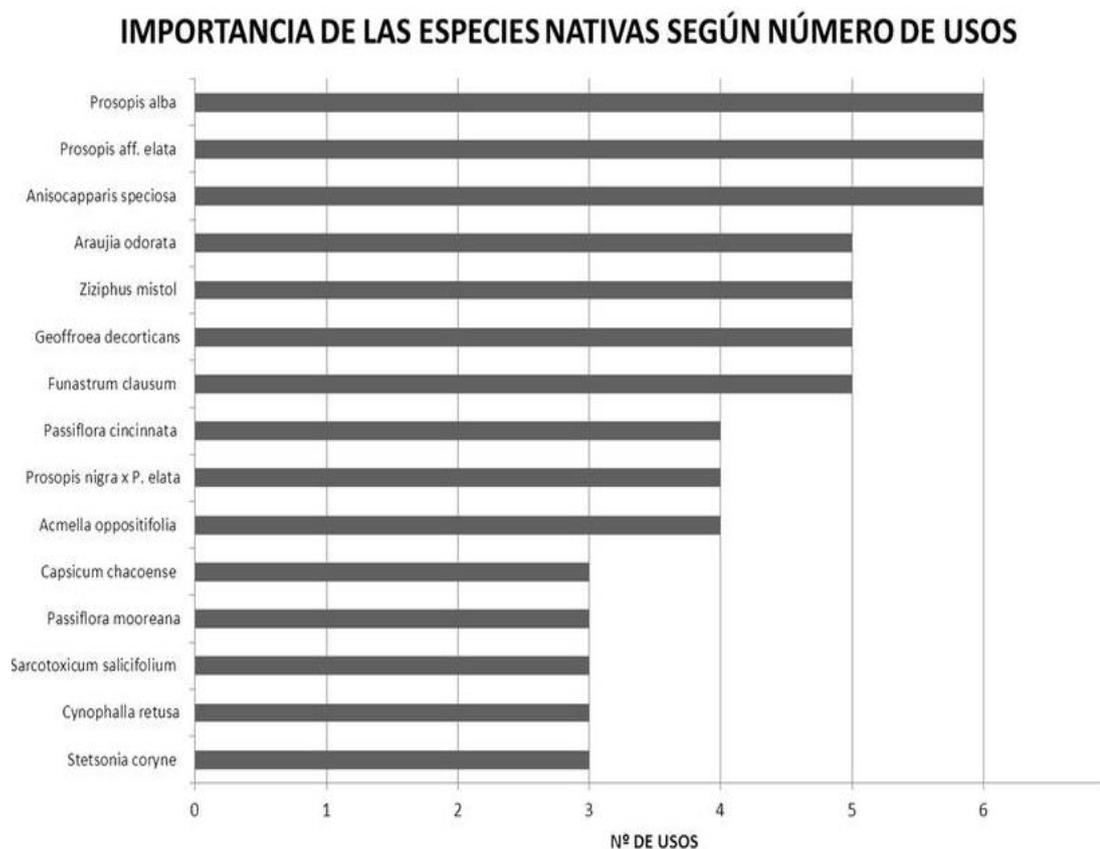


Figura 1.10. Número de usos por especie botánica por los Tapiete. (Montani & Scarpa, 2016).

En cuanto a sus aplicaciones medicinales, reportes etnobotánicos sobre la especie hacen alusión a su uso popular contra afecciones como artritis, reumatismo, dolores de estómago, erupciones en la piel y para aliviar dolores de mordeduras de perros y serpientes (Pharmacoidgy & Cichewicz, 1996) en preparaciones tipo ungüentos y una curiosa aplicación para el tratamiento de infecciones en el órgano reproductor de los caballos machos (Martínez & Barboza, 2010; Scarpa, 2000, 2004).

1.4.4 Antecedentes de composición química y actividad biológica

En *Capsicum chacoense* se ha estudiado el contenido de β -caroteno, carotenoides, polifenoles totales, flavonoides y capsacinoides como se detalla en la tabla 1.5. Sin embargo, información sobre su composición centesimal, contenido de vitamina C, y minerales son limitados en la literatura regional. Es sabido que la composición química

de los frutos puede variar dependiendo de factores ambientales y genéticos, como se ha demostrado en estudios realizados en otras especies de *Capsicum* (Maharijaya et al., 2019; Topuz & Ozdemir, 2007).

Tabla 1.5. Antecedentes de composición química de *C. chacoense*.

Determinación	Resultado	Referencia
Fenoles totales (mg GAE/ 100 g de peso fresco)	1600-2100	(Loizzo et al., 2015)
Flavonoides totales (mg/100 g peso fresco)	0,5-1,5	(Loizzo et al., 2015)
Carotenoides ($\mu\text{g/g}$ peso seco)	633	(Wall et al., 2001)
β -caroteno ($\mu\text{g/g}$ peso seco)	137-36 660	(Pugliese et al., 2014; Wall et al., 2001)
Capsaicina (mg/100 g peso fresco)	13,9-200	(Loizzo et al., 2015; López et al., 2012)
Dihidrocapsaicina (mg/100 g peso fresco)	50-60	(Loizzo et al., 2015)

Se ha descrito su actividad antioxidante midiendo la concentración efectiva media para la inhibición del radical ABTS (IC₅₀), se encontró que la IC₅₀ en el extracto metanólico de los frutos frescos del *C. chacoense* es de 138,85 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, también se encontró que los extractos metanólicos y butanólico de los frutos de *C. chacoense* poseen una actividad antiinflamatoria en el modelo de inducción de edema por carragenina en ratones (López et al., 2012).

1.4.5 Antecedentes de interés agronómico.

En investigaciones agronómicas se han descrito genes en *C. chacoense* que confieren resistencia a patógenos comunes como; *Xanthomonas euvesicatoria*, tobavirus, virus mosaico del tabaco, virus moteado suave de la pimienta, entre otros, que son insertados en el genoma de otras especies del género *Capsicum* u otras de la misma familia, para

conferir resistencia a estos patógenos (Gassmann et al., 2000; Gilardi et al., 2004; Ibiza et al., 2010; Leister et al., 2005; Tai et al., 1999).

Las plantas no pungentes (pun-2) de *C. chacoense* dominan las poblaciones en regiones secas de baja elevación y, a medida que aumenta la elevación, las plantas con estas características de pungencia predominan en las poblaciones. Recientemente, estos patrones mostraron una importante correlación con la protección contra la infección por hongos. Se ha demostrado que la proporción de plantas picantes en las poblaciones de *C. chacoense* aumenta a medida que aumenta la humedad en las regiones, mientras que la característica de acidez es menos ventajosa, observada en ambientes con poca humedad, donde el riesgo de infección por hongos es menor (Stellari et al., 2009).

El fruto de *C. chacoense* tiene un gran potencial para la alimentación, la agricultura, la industria alimentaria y la nutracéutica, sin embargo, la información sobre el aporte nutricional, perfil de metabolitos secundarios o actividad biológica de esta especie silvestre en Paraguay es escasa y los reportes aislados en la literatura actual sobre especies nativas y en especial de *Capsicum chacoense* a nivel regional, limita su utilización y aprovechamiento en la alimentación, así como en la industria farmacéutica o alimentaria. Considerando el potencial que posee esta especie como fuente de antioxidantes, actividad antibacteriana, antiparasitaria e inmunomoduladora, es de interés además caracterizar su potencial nutricional y describir su potencial uso en nutracéutica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la composición química y potencial nutracéutico del fruto de *Capsicum chacoense* Hunz de Alto Paraguay.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la composición centesimal y minerales del fruto de *C. chacoense* Hunz de Alto Paraguay.
- Determinar el perfil fitoquímico de *C. Chacoense* Hunz de Alto Paraguay.
- Determinar el contenido de capsacinoides y nivel de pungencia del fruto de *C. chacoense* Hunz de Alto Paraguay.
- Determinar la toxicidad aguda del extracto metanólico del fruto de *C. Chacoense* Hunz de Alto Paraguay
- Determinar el potencial antioxidante del fruto de *C. chacoense* Hunz de Alto Paraguay.
- Determinar la actividad antihelmíntica *in vitro* del extracto metanólico del fruto de *C. chacoense* Hunz de Alto Paraguay.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño

Se realizó un estudio descriptivo con componente analítico para la evaluación de la composición química y potencial antioxidante y la evaluación de actividades biológicas tuvo un diseño experimental (Figura 3.1).

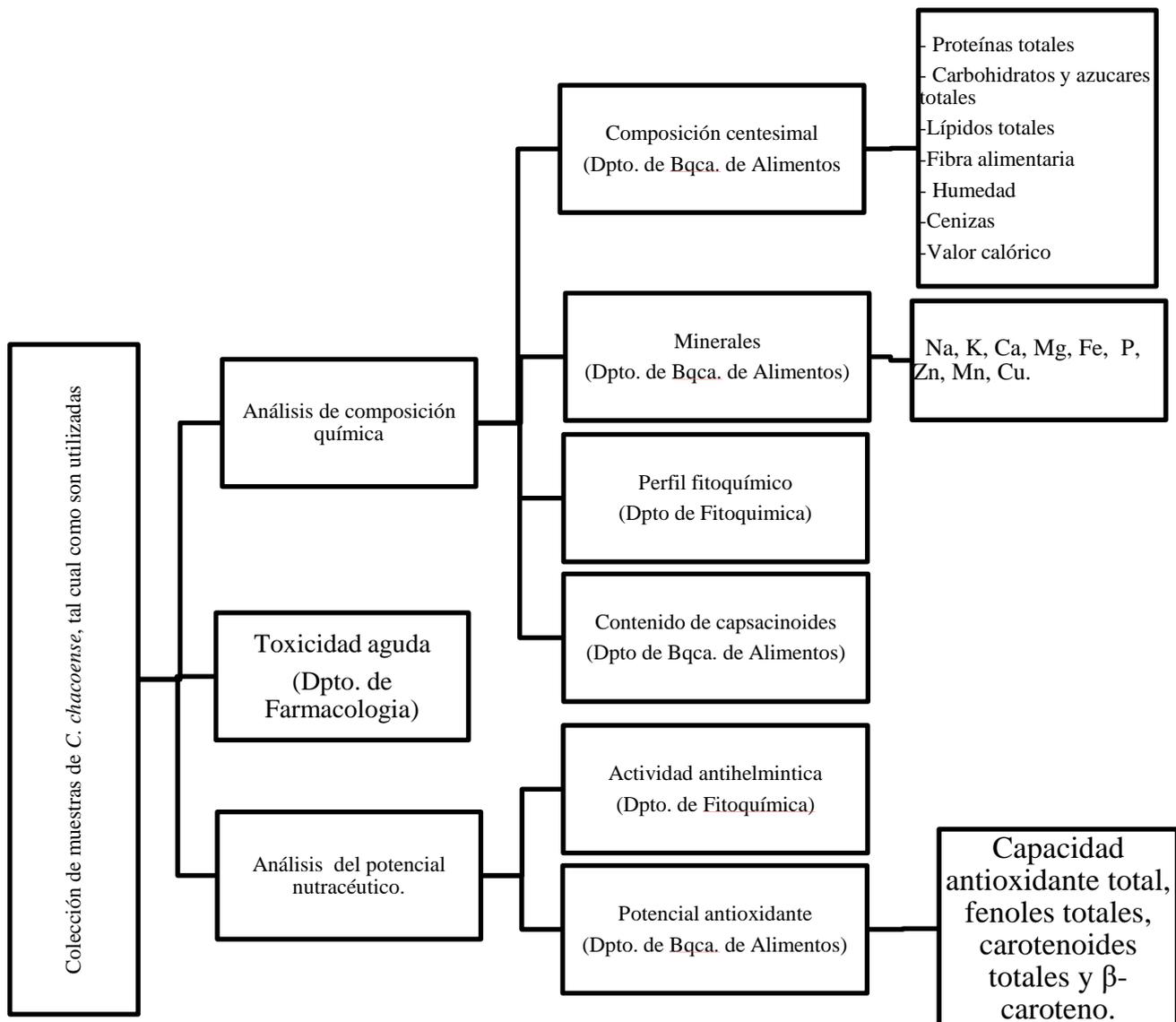


Figura 3.1. Esquema de análisis a realizar y ensayos a realizados.

3.2. Muestreo y procesamiento

Las muestras de frutos de *Capsicum chacoense* fueron colectadas de plantas silvestres, en el mes de marzo del 2019 en el Dpto. de Alto Paraguay, cuyas coordenadas geográficas (figura 3.2) fueron: S $-21^{\circ} 08,814$; W $-59^{\circ} 25,879$ para la muestra conocida como “Estancia”, ya que fue colectada alrededor de una estancia y S $-21^{\circ} 14,360$; W $-59^{\circ} 33,455$ para la muestra conocida como “Ayoreo”, ya que fue colectada alrededor de un asentamiento Ayoreo (Anexo A1).

Las muestras fueron colectadas en el marco del “*Proyecto Por Nuestro Gran Chaco Sustentable: Participación activa en modelos de gestión territorial para la conservación ambiental integrada con la producción sostenible*”, ejecutado por COOPI-Cooperazione Internazionale en consorcio con la FCQ-UNA dentro de la convocatoria de la Unión Europea “Conservación, uso sostenible y buen gobierno de la biodiversidad en cuatro biomas vulnerables en el centro de América del Sur” (EuropeAid/154653/DD/ACT/Multi).

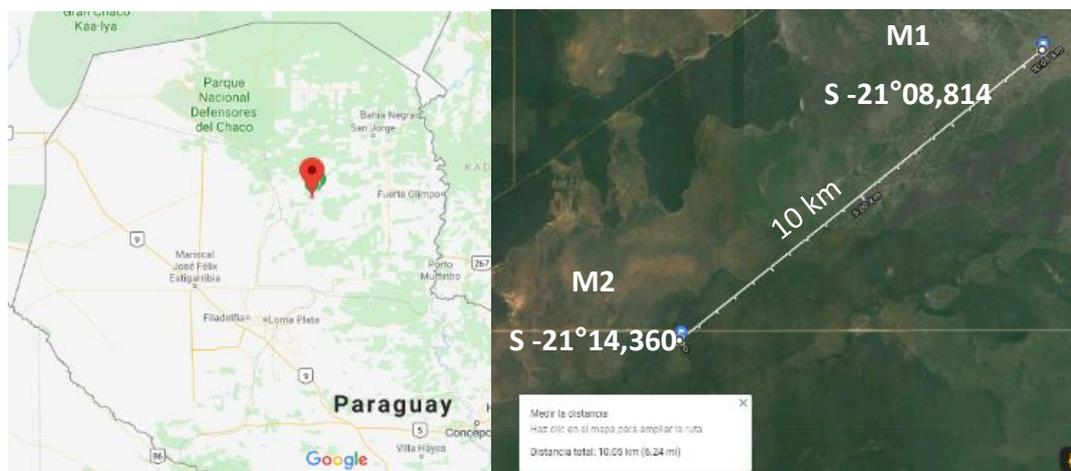


Figura 3.2. Geolocalización de los puntos de muestreo para las muestras Estancia y Ayoreo.

Paralelamente al muestreo se realizaron materiales de herbario para la identificación botánica en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas (Index Herbariorum), del Departamento de Botánica depositados bajo los códigos 57531 y 57530, para las muestras Estancia y Ayoreo respectivamente (Anexo, A2).

El muestreo fue por conveniencia, los frutos enteros (pedúnculo, pericarpio, semilla y placenta) se cosecharon manualmente de plantas silvestres y se secaron

al sol por los lugareños, procedimiento habitual utilizado por los indígenas. Las muestras secas fueron transportadas en medios adecuados en tiempo y forma a los laboratorios de la Dirección de Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas Campus Universitario, San Lorenzo, donde fueron conservadas a -20°C hasta su utilización. Para las determinaciones las muestras fueron molidas en un homogenizador de alimentos marca Severin® (Sundern, Alemania), hasta obtención de muestra con partículas finas y homogéneas. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3 Equipamientos y reactivos

Los equipamientos utilizados en el presente trabajo fueron:

- Homogenizador de alimentos tipo molinillo de café (Severin®, Sundern, Alemania).
- Congelador vertical a -20°C modelo WVG28HKDWX 280 L (Wirpool®, Brasil).
- Balanza analítica modelo XM-60 HR (Precisa®, Dietlkon, Suiza).
- Equipo Kjeldahl (Gerhardt®, Sao Paulo, Brasil).
- Equipo Soxhlet (Gerhardt®, Sao Paulo, Brasil).
- Equipo evaporador rotativo a presión reducida (Quimis®, Brasil).
- Equipo evaporador rotativo con alta presión marca® (Cole-Parmer, Ucrania).
- Baño de agua termostatzado con agitador horizontal modelo 25 (Prescision®, Ohio, USA).
- Baño ultrasónico modelo Ultrasons H-D (J.P. Selecta®, Barcelona, España).
- Estufa de convección modelo E-394/2 (Tecnal®, Sao Paulo, Brasil).
- Homogenizador vortex Automatic mixer S-100 (Taitec, Koshigaya, Japón).
- Centrífuga refrigerada Neofuge 15R (Heal Force®, China).
- Placa calefactora modelo Cole-Parmer® (Bibby Scientific, Ucrania).
- Mufla, modelo D-2804 (Naber®, Bremen, Alemania).
- Espectrofotómetro UV-Vis 1800 (Shimadzu Corporation®, Tokyo, Japón).
- Espectrómetro de absorción atómica de llama AA 6300 (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japón).

- Equipo de HPLC, con bomba modelo LC-20AT, autoinyector modelo SIL-20A, módulo de comunicaciones modelo CBM-20A, horno modelo CTO-10A, detector PDA modelo SPD-AYORE00A (Shimadzu Corporation ®, Tokyo, Japon).
- Columna C18 00G-4041-E0 tipo Luna ®, de 250x4,6 mm, 5µm y 100 Å (Phenomenex Inc., Torrance, USA).

Los reactivos utilizados fueron:

- Solventes grado HPLC; metanol y acetonitrilo marca J.T. Baker ® (Estado de México, México), trietilamina marca Sigma-Aldrich ® (Steinheim, Alemania), acetona marca Merck ® (Darmstadt, Alemania).
- Solventes grado p.a.; hexano, metanol, acetona, etanol absoluto marca J.T. Baker ® (Estado de México, México).
- Reactivo de Folin Ciocalteu marca Sigma-Aldrich ® (Switzerland), Kit de ensayo de fibra dietética de la marca Sigma-Aldrich ® (USA), ABTS marca Biochemica ® (Darmstadt, Alemania), Sal de reinakato marca Sigma-Aldrich ® (Steinheim, Alemania), DMSO marca Anedra (Buenos Aires, Argentina),
- Estándar de glucosa monohidratada marca Merck® (Darmstadt, Alemania), estándar de ácido gálico monohidratado marca Sigma-Aldrich ® (China), estándar de Trolox marca Sigma-Aldrich ® (Rusia), soluciones estándares de minerales (1000 µg/mL) de Na, K, Ca, Mg, P, Cu, Zn y Mn marca MERCK ® (Darmstadt, Alemania), estándar de β-caroteno marca Abcam (Ucrania).
- Estándar de capsaicina (CAP) marca Sigma-Aldrich ® (Switzerland), estándar de dihidrocapsaicina (DHC) marca Sigma-Aldrich ® (China), estándar de digitoxina marca Sigma-Aldrich ® (Rusia), estándar umbeliferona marca Sigma-Aldrich ® (Rusia)
- Ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico grado p.a. marca Cicarelli ® (Buenos Aires, Argentina).
- Hidróxido de Sodio grado p.a. marca Macron (Estado de México, México), sulfato de cobre grado p.a. marca Anedra (Buenos Aires, Argentina), sulfato de potasio grado p.a. marca Anedra (Buenos Aires, Argentina), carbonato de sodio anhidro marca Went Chemie (Hamburg, Alemania),

3.4 Análisis de composición química

3.4.1. Composición centesimal

El análisis de composición centesimal incluyó humedad, proteínas, lípidos totales, carbohidratos totales, azúcares solubles, fibra alimentaria, cenizas y valor calórico.

3.4.1.1 Humedad

Se determinó utilizando el método 934.01 de la AOAC (Horwitz, 2000), el cual se basa en la determinación de pérdida de masa por gravimetría de una muestra desecada. Para ello se pesó 3 gramos de muestra en capsulas metálicas previamente taradas, que fueron llevadas a 105 °C durante 5 horas.

Los cálculos se realizaron utilizando la siguiente fórmula:

$$H \left(\frac{g}{100g} \right) = 100 - \frac{(P_{c+m}) - P_c}{P_m \times 1000} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.1}$$

Donde:

P_{c+m} = peso en gramos de la capsula más muestra, después de 5 hs en estufa.

P_c = peso en gramos de la capsula vacía, previamente tarada.

P_m = peso de muestra en gramos.

3.4.1.2 Proteínas

Para la determinación del contenido de proteínas se utilizó el método Kjeldahl N° 920.152 de la AOAC (Horwitz, 2000), el cual se basa en la cuantificación del nitrógeno total. El método se divide en 3 etapas: digestión en ácido sulfúrico, destilación del amonio y su titulación por retroceso con NaOH.

El contenido de proteínas en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$Proteinas \left(\frac{g}{100g} \right) = \frac{Meq\ N \times 14,065 \times F}{Pm \times 1000} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.2}$$

Donde:

Meq N: miliequivalentes de nitrógeno en milimoles/ml

14,065: peso molecular del nitrógeno

Pm: peso de la muestra

F: factor de conversión de nitrógeno a proteínas 6,25.

3.4.1.3 Lípidos totales

El contenido de materia grasa o lípidos totales se determinó por extracción con hexano, empleando el extractor Soxhlet, de acuerdo con el método 970.51 de la AOAC (Horwitz, 2000). Se basa en una extracción semicontinua con un solvente orgánico. El disolvente se calienta, se volatiliza y condensa goteando sobre la muestra, la cual queda sumergida en el disolvente. Luego, este es sifonado al balón de calentamiento para empezar de nuevo el proceso. El contenido de grasa se cuantificó por gravimetría según la siguiente fórmula:

$$Lipidos\ totales \left(\frac{g}{100g} \right) = \frac{Pb + m - Pbv}{Pm} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.3}$$

Donde:

P_{b+m}: peso del balón más muestra extraída en g.

P_{bv}: peso del balón vacío en g.

Pm: peso de muestra en g.

3.4.1.4 Carbohidratos totales y azúcares solubles

Para la determinación de carbohidratos solubles y azúcares totales se utilizó el método colorimétrico manual de la Antrona de Clegg (Dreywood, 1946), las muestras se

sometieron previamente a una hidrólisis con ácido perclórico al 52% y agua para la determinación de carbohidratos totales y azúcares solubles, respectivamente. Posteriormente, se realizó la reacción a 100°C, con el reactivo de antrona (0,1%) en ácido sulfúrico al 76%, formando un complejo coloreado color verde, cuantificable a 630 nm. Se utilizó una curva de calibración de glucosa anhidra (Figura 3.3). Los resultados fueron expresados en g/100 g de muestra.

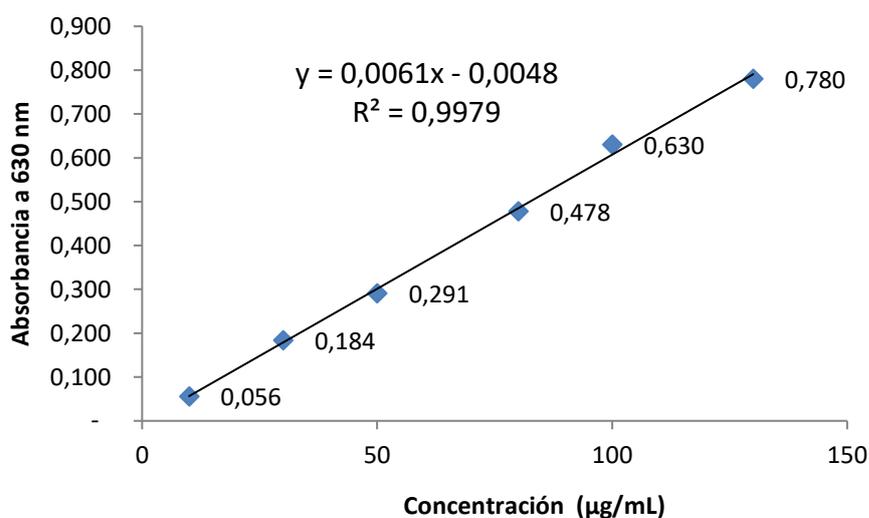


Figura 3.3. Curva de calibración de glucosa anhidra.

3.4.1.5 Fibra alimentaria

Para la determinación de fibra alimentaria se utilizó un método enzimático-gravimétrico, método oficial de la AOAC Official Method 991.42 (Dreywood, 1946), a partir de la muestra homogeneizada, seca y desengrasada, resultante de la extracción por Soxhlet. Este residuo desengrasado fue triturado para favorecer la acción de las enzimas digestivas utilizadas en el método. Para la digestión se utilizó un kit enzimático de ensayo de fibra dietética de la marca Sigma ®, que contiene la alfa amilasa y amiloglicosidasa en solución y una proteasa liofilizada. Luego del tratamiento con las enzimas se midió el contenido de proteína y cenizas en los residuos. El contenido de fibra alimentaria se cuantifico con la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra alimentaria } \left(\frac{g}{100g}\right) = \frac{Pr - Vp - Pc}{Pm} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.4}$$

Donde:

P_r : peso del residuo en g.

v_b : valor de proteína con factor 6.25.

P_c : peso de ceniza en g.

P_m : peso de muestra en g.

3.4.1.6 Ceniza

Se determinó por método gravimétrico N°940.26 de la AOAC (Horwitz, 2000). El cual se basa en la pérdida de masa por gravimetría de una muestra desecada a cierta temperatura. Los crisoles se sometieron a un lavado con HCl:H₂O (1:1) durante 1 hora, se llevaron a mufla por 1 hora a 550°C y se pesaron. Posteriormente se pesaron las muestras, se calcinaron en una plancha eléctrica y fueron llevadas a la mufla a 550 °C durante toda una noche.

El contenido de cenizas en la muestra se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de ceniza} = \frac{P(c + m) - P_c}{P_m} \times 100 \quad \text{Fórmula 3.5}$$

Donde:

P_{c+m} : peso del crisol más muestra

P_c : peso del crisol vacío

P_m : peso de la muestra

3.4.1.7 Aporte calórico

El aporte calórico fue determinado de acuerdo al método de Atwater (Greenfield & Southgate, 2006), donde el contenido de proteínas y carbohidratos totales es

multiplicado 4 y el contenido de lípidos por 9. El resultado de cada uno es sumado y los resultados son expresados en Kcal/100 g de muestra.

3.3.2 Minerales

Para la determinación se utilizó el método 975.03 de la AOAC (Horwitz, 2000). Del residuo de las cenizas, estas fueron tratadas con HNO_3 para asegurar la mineralización completa. Los siguientes minerales fueron determinados en espectrómetro de absorción atómica; Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn. Por otro lado, el P fue determinado por un método colorimétrico en el espectrofotómetro.

Para cada mineral se realizó una curva de calibración (Anexo, desde A3 hasta A10) utilizando soluciones estándares con diferentes concentraciones en $\mu\text{g/mL}$, variando entre cada mineral. Los resultados se expresaron en $\text{mg}/100\text{g}$ de muestra seca, agrupados en macrominerales (Na, K, Ca, Mg y P) y microminerales (Fe, Cu, Zn y Mn).

3.4.3 Obtención del extracto metanólico

Para la obtención del extracto metanólico, se utilizó 750 mL de metanol grado HPLC por cada 100 g de muestra finamente molida. La extracción fue asistida por ultrasonido durante 30 min, luego se dejó reposar durante 15 minutos y se repitió el procedimiento 3 veces más, posteriormente se dejó el material en contacto con el solvente toda la noche. Una vez filtrada la muestra se repitió el procedimiento 2 veces más. En el tercer día se procedió a realizar la extracción con el mismo solvente por reflujo durante 15 min, repitiendo el procedimiento 2 veces más con cambios del solvente. De esta manera se utilizó todo el material vegetal. Todos los extractos individuales obtenidos fueron mezclados y concentrados en un equipo evaporador rotatorio al vacío a 40°C . Los balones fueron pesados y se determinó el rendimiento del extracto metanólico por gravimetría.

3.4.4 Perfil fitoquímico

A partir del extracto metanólico se realizaron pruebas cualitativas empleando reacciones de precipitación, coloración y cromatografía en capa fina (TLC) según una metodología descrita anteriormente (Sanabria Galindo, 1983). En la figura 3.4 se observa un esquema general para determinar presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, naftoquinonas y antraquinonas, saponinas, leucoantocianidinas, cardiotónicos, cumarinas, cardenólidos y lactonas terpénicas. En la tabla 3.1 se observa los fundamentos en los que se basa cada determinación.

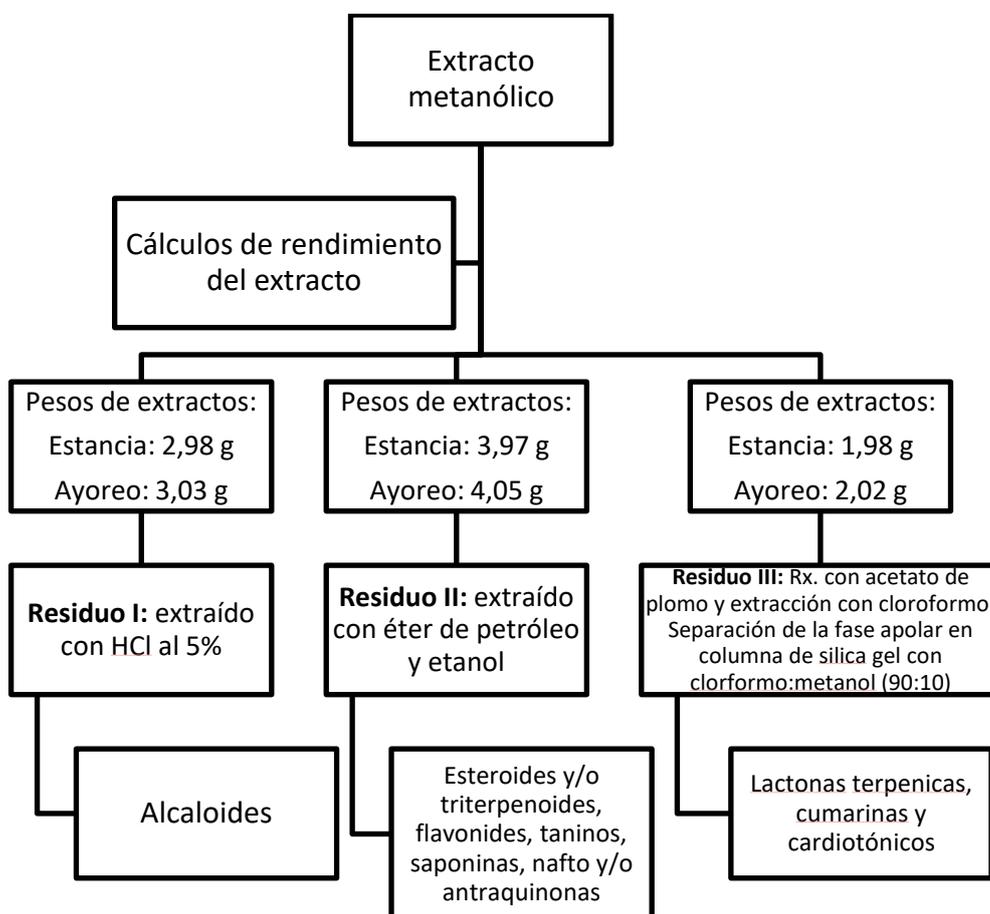


Figura 3.4. Metodología del perfil fitoquímico del extracto metanólico de los frutos de *Capsicum chacoense*. Elaboración propia en base a lo publicado en Sanabria Galindo, (1983).

Tabla 3.1 Fundamentos de la identificación de metabolitos secundarios en el perfil fitoquímico.

Compuestos	Pruebas realizadas	Fundamento
Alcaloides	Dragendorff Mayer Valser Reineckato de amonio	Formación de un precipitado o turbidez.
Esteroides y/o triterpenoides libres	T.L.C. bidimensional Revelador: Liebermann-Burchard	Separación en placa de sílica gel con fase móvil ciclohexano-acetato de etilo (95:5) y éter de petróleo-éter etílico-ácido acético (80:20:1). Un color violáceo con el revelador indica un resultado positivo.
Flavonoides	Reacción de Cianidina Reacción con HCl	Reacción con Mg que da un complejo coloreado rosado, rojo, violeta o rojo anaranjada. Formación de un complejo coloreado rojo por calor en medio ácido.
Naftoquinonas y/o antraquinonas	Reacción de Borntrager-Krauss	Formación de un compuesto coloreado rosado a rojo intenso en la capa alcalina.
Taninos	Gelatina-sal, FeCl ₃	En presencia de cloruro férrico formación de precipitados o soluciones verdes, azules o negras.
Saponinas	Espuma	Formación de espuma por agitación.
Cumarinas	T.L.C. Revelador: Reacción de Hidroxamato férrico	Separación en placa de sílica gel con fase móvil cloroformo-acetona (90:10). Revelado con hidroxilamina en etanol con NaOH y HCl con FeCl ₃ . Manchas de color anaranjado, rojo o violeta indican resultado positivo.
Cardiotónicos	T.L.C. Revelador: Reacción de Raymond	Separación en placa de sílica gel con fase móvil cloruro de metileno-metanol-agua (87:12:1). Revelado con dinitrobenceno y NaOH. Manchas de color violeta indican resultado positivo.
Lactonas terpénicas	T.L.C. Revelador: Vainillina-ácido o-fosfórico	Separación en placa de sílica gel con fase móvil cloruro de metileno-metanol-agua (87:12:1). Revelado con vainillina-ácido o-fosfórico. Manchas de color azul violáceo, rosadas, rojas, violetas, azules o verdes indican resultado positivo.

Fuente: Sanabria-Galindo (1983).

3.4.5 Contenido de capsacinoides y nivel de pungencia

Para la determinación del contenido de capsaicina (CAP) y dihidrocapsaicina (DHC) primeramente se realizó una extracción según Zheng, Hu, Hu & Fang, (2019), con algunas modificaciones. A partir de 2,5 g de muestra finamente pulverizada se agregaron 25 mL de metanol grado HPLC, se llevó a un baño de ultrasonido durante 30 min a 50°C, luego se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue transferido a un balón de vidrio. Este procedimiento se realizó 3 veces más y los sobrenadantes fueron mezclados para luego evaporar el solvente en un rotavapor a 40 °C, se llevó a volumen en matraz de 50 mL con metanol HPLC. Las extracciones se realizaron por triplicado.

La cuantificación se realizó por HPLC conforme a lo descrito por Nag et al., (2017). El sistema cromatográfico utilizado fue:

- Fase estacionaria: columna C18 de fase inversa (250cm x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å), marca Phenomenex Inc. La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el volumen de inyección fue de 20 µL.
- Fase móvil: agua (A): acetonitrilo(B) (35:65) v/v, sistema isocrático, El pH del agua se ajustó a 3,8 con ácido acético glacial al 1% (v / v). Velocidad de flujo 1,0 mL/ min
- Detector: PDA modelo SPD-M20A (Shimadzu, Japon), con monitoreo a 230 nm.

Se utilizaron curvas de calibración tanto de CAP (figura 3.5) como DHC (figura 3.6), cuyas concentraciones variaron desde 1 a 80 µg/mL, el tiempo de retención para CAP aproximado fue de 6,3 min y de DHC 8 min, tal como se observa en la figura 3.7. Los estándares fueron disueltos en metanol grado HPLC. Cada punto de la curva fue inyectado por triplicado, así como también las muestras. Tanto las muestras como los estándares fueron filtrados con filtros de nitrocelulosa de 0,22 µm de diámetro de poro, antes de la inyección. Los resultados fueron expresados en mg / 100 g de muestra.

Por otro lado, se ha determinado el nivel de pungencia de las muestras. El nivel o grado de pungencia de los frutos de *Capsicum* se midieron en Scoville Heat Units SHU (por sus siglas en inglés). Wilbur Scoville desarrolló un método en 1912 para determinar la

pungencia por medio de diluciones (Scoville, 1912), sin embargo, actualmente los capsacinoides son determinados por métodos cromatográficos y luego por medio de factores de conversión son expresados en SHU. Cada mg de capsacinoide en 1 kg de fruta es multiplicado por 15 en el caso de la capsaicina y dihidrocapsaicina, los cuales son los que aportan mayor pungencia y la norhidrocapsaicina por 7,5 conforme al método N° 995.03 de la AOAC (Horwitz, 2000).

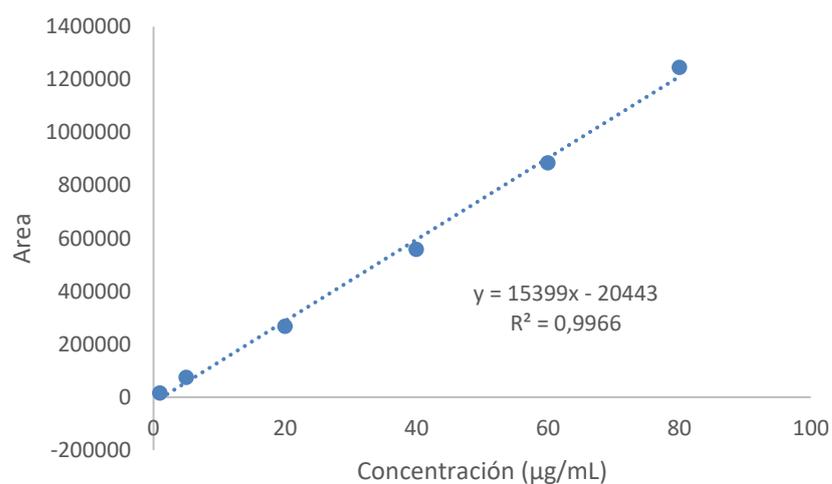


Figura 3.5. Curva de calibración de capsaicina (CAP).

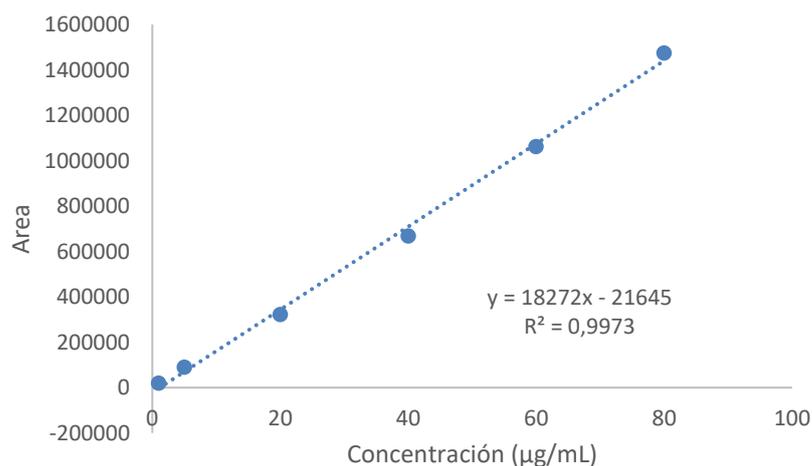


Figura 3.6. Curva de calibración de dihidrocapsaicina (DHC)

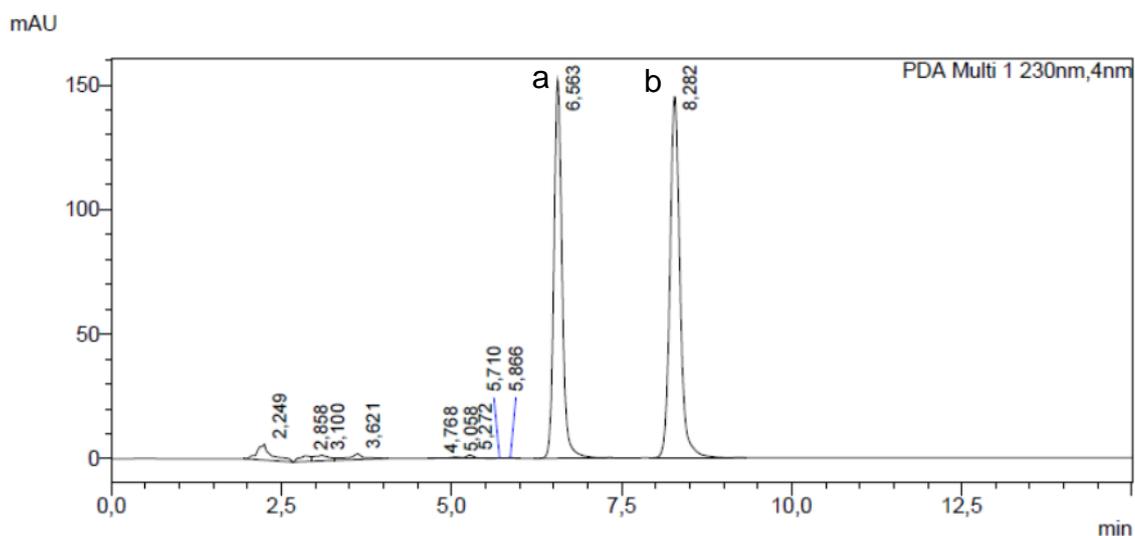


Figura 3.7. Cromatograma de soluciones estándares de CAP (a) y DHC (b) a 80 $\mu\text{g/mL}$.

3.5 Toxicidad aguda

Se realizó según el Procedimiento de dosis fija (FDP) propuesto por la Sociedad Británica de Toxicología (British Toxicology Society Working Party on Toxicity, 1984) y actualmente incluido en la Guía 420 de la OECD (2008). Se utilizaron 12 ratones hembra albinos suizos con un peso de 25-30 g (Anexo 13), que se mantuvieron en ayunas previo a realización del ensayo. Los extractos fueron disueltos en agua:propilenglicol:etanol (50:40:10) con asistencia de un baño ultrasónico. Las dosis utilizadas por vía oral fueron de 500, 1000, 2000 mg/kg de peso corporal y el blanco utilizado fue el solvente de los extractos. Los animales fueron observados para cambios de comportamiento, según lo especificado en la tabla del Anexo 14 durante las primeras dos horas para letalidad durante las primeras 24 horas y periódicamente por 14 días. Luego de 14 días de observación, todos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los órganos internos (estómago, intestino delgado, intestino grueso, riñón, hígado, bazo, corazón y pulmón) se evaluaron macroscópicamente comparándolos con los órganos correspondientes del grupo blanco (Anexo 15).

3.6. Evaluación de potencial nutracéutico

3.6.1. Potencial antioxidante

3.6.1.1 Capacidad antioxidante total (CAT)

La actividad antioxidante se determinó usando el ensayo de decoloración del radical catiónico ABTS^{•+} (Re et al., 1999). Para ello, primeramente se realizó una extracción asistida por ultrasonido con metanol:agua (60:40) y acetona:agua (70:30), como se detalla en la figura 3.8. El radical fue formado 24 h antes de la realización del ensayo, posteriormente se diluyó con etanol absoluto hasta una absorbancia de $0,7 \pm 0,02$ a 730 nm en espectrofotómetro UV (UV-1800, Shimadzu ®, Japón). Para las mediciones, se utilizó una curva de calibración de TROLOX (análogo soluble de la vitamina E) (Figura 3.9). Los resultados se expresan como μM equivalentes Trolox (TEAC) por gramo de muestra. Por otro lado, también se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los extractos obtenidos, realizando la reacción con diferentes concentraciones de extracto y así tener las diferentes curvas para cada extracto, los resultados fueron expresados en $\mu\text{g/mL}$.

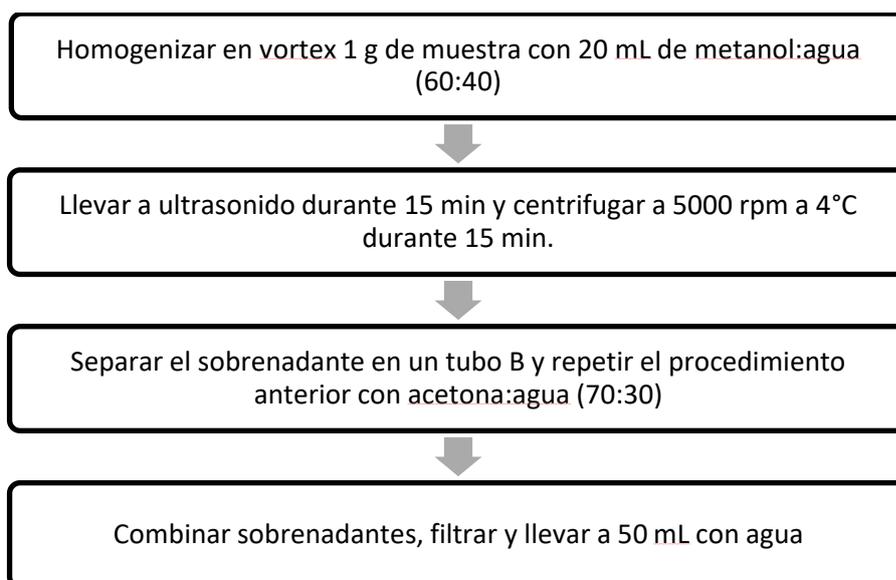


Figura 3.8. Esquema de procedimiento para obtención de extractos para determinación de capacidad antioxidante y fenoles totales.

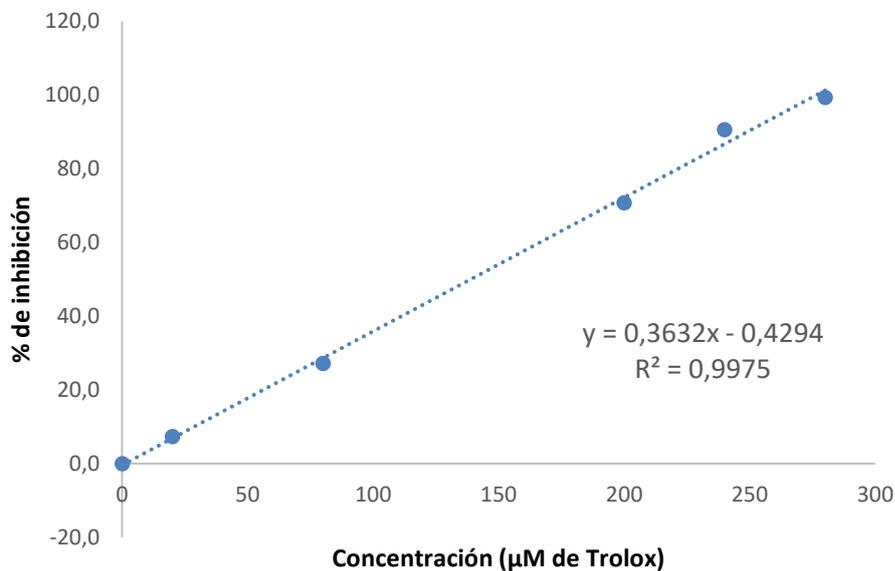


Figura 3.9. Curva de calibración de soluciones estándares de Trolox

3.5.1.2 Contenido de polifenoles totales (CPT)

Los fenoles totales se midieron espectrofotométricamente en el extracto metanólico (Figura 3.7), utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu por el método descrito por Singleton & Rossi (1965). Los polifenoles presentes en el extracto al reaccionar con el reactivo de Folin Ciocalteu, forman un complejo coloreado azul cuantificable a 765 nm. Para la cuantificación se utilizó el método de regresión lineal con una curva de calibración de ácido gálico (Figura 3.10). Los resultados se expresaron en mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de muestra (mg de GAE /100 g).

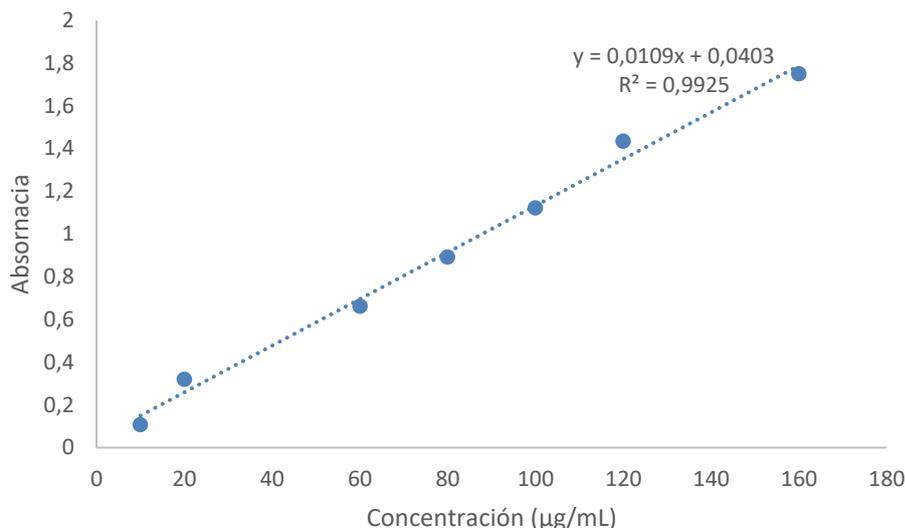


Figura 3.10. Curva de calibración de ácido gálico.

3.5.1.3 Contenido carotenoides totales

La determinación de carotenoides totales se realizó por espectrofotometría, con extracción previa, como lo descrito previamente por IICA (2018). La extracción se realizó por ultrasonido con 5mL de BHT en acetona HPLC al 1% y 2,5 g de muestra durante 10 min, manteniendo la temperatura del baño inferior a 35°C, posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 10 min., este procedimiento se repitió 5 veces, por último, se llevó a 25 mL con el solvente de extracción. La cuantificación se realizó según Sadasivam & Manikkam (1992), el extracto fue medido a 460 nm en el espectrofotómetro y se realizó una curva de calibración de β -caroteno de 1 a 10 µg/mL (Figura 3.11). Se realizaron diluciones de las muestras para que las mismas puedan ser cuantificables con la curva realizada. Las extracciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados en mg/kg de muestra tal cual.

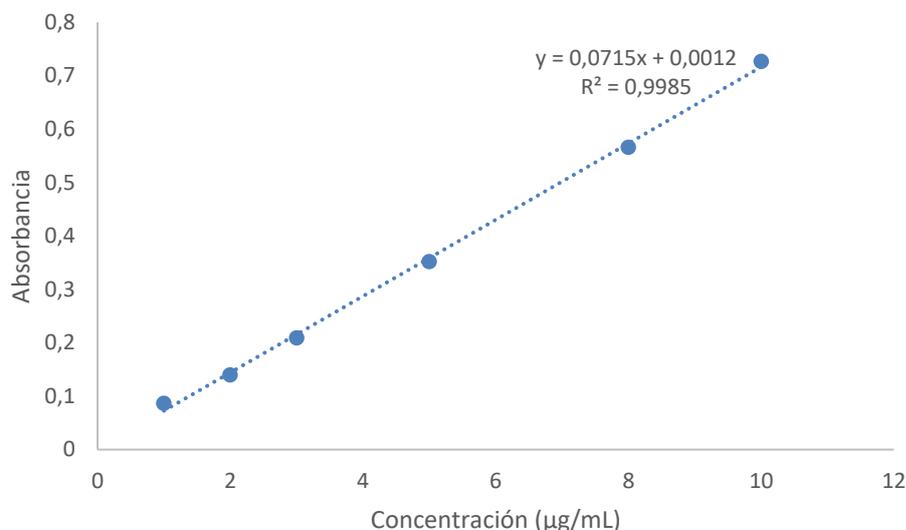


Figura 3.11. Curva de calibración de β-caroteno para determinación de carotenoides totales

3.5.1.4. Cuantificación de β-caroteno

El contenido de β-caroteno se determinó según la metodología publicada en IICA (2018), con algunas modificaciones por HPLC-PDA. Primeramente, se realizó la extracción descrita en 3.4.3. Las inyecciones fueron realizadas inmediatamente luego de cada extracción, de modo a evitar descomposición del analito. El sistema cromatográfico utilizado fue:

- Fase estacionaria: C18 (Phenomenex Inc.) (250 cm x 4,6 mm, 5 μm, 100 Å). Temperatura del horno 30 °C.
- Fase móvil: Metanol:Acetonitrilo:Trietilamina (900:100:1), modo isocrático, flujo 1,5 mL/min, volumen de inyección 20 μL
- Detector: PDA modelo SPD-M20A (Shimadzu, Japon), a 450 nm.

Se utilizó una curva de calibración de β-caroteno (figura 3.12, anexo A11) disuelto en acetona HPLC, cuyas concentraciones fueron ajustadas de 0,3 a 3 μg/mL, el cromatograma del punto más alto de la curva se observa en la Figura 3.13. Tanto las muestras como los estándares fueron filtrados con membranas de 0,45 μm antes de ser

inyectados. Todas las extracciones y las inyecciones en el HPLC se realizaron por triplicado.

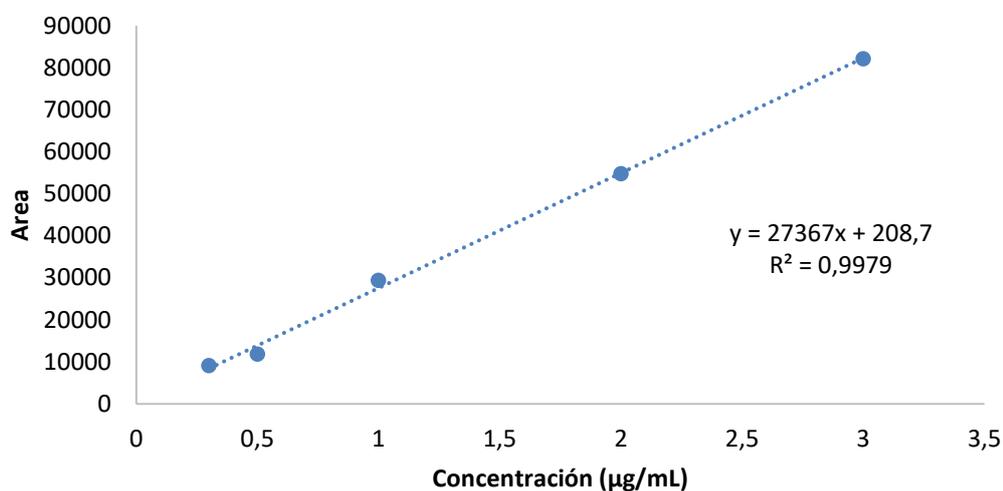


Figura 3.12. Curva de calibración de β-caroteno.

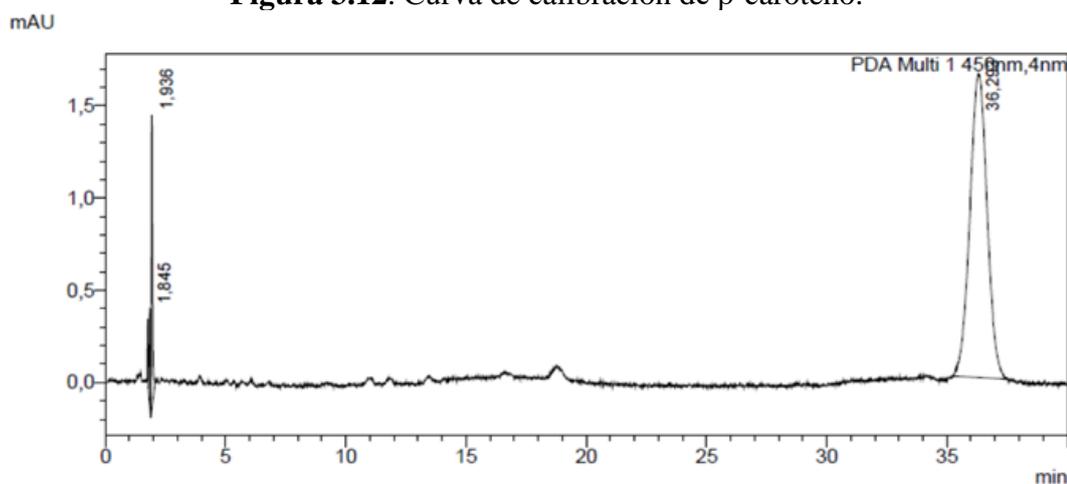


Figura 3.13. Cromatograma del estándar de β-caroteno a 3 µg/mL.

3.6.2 Actividad antihelmíntica *in vitro*

La actividad antihelmíntica del extracto, se realizó tal como describieron Cáceres, Flores-Giubi, Romero-Rodríguez, & Alvarenga, (2017). El modelo utilizado fue *E. foetida* o gusano rojo de California, de 4 a 6 cm de longitud. Se ensayaron los extractos metanólicos del fruto de *Capsicum chacoense* colectados de diferentes zonas. Las concentraciones utilizadas fueron: 2,5; 5; 10; 20 y 40 mg/mL de extracto (anexo A12),

que fueron disueltos primeramente en 500 μL de DMSO durante 30 min en baño ultrasónico y luego se agregó 9500 μL de solución fisiológica y se volvió a llevar al baño ultrasónico durante 90 min. Las lombrices fueron retiradas cuidadosamente de su compost (su habitad natural) y limpiadas con agua potable normal, posteriormente fueron distribuidas 3 individuos en cada placa de Petri (Figura 3.14). Todos los ensayos fueron repetidos en tres días diferentes, teniendo 9 réplicas en total. El tiempo de cada placa de Petri se midió de manera individual, debido a la corta duración del ensayo en algunas concentraciones. Se utilizó albendazol (10 mg/mL) como control positivo, y DMSO en solución fisiológica como control negativo. Las variables de este ensayo fueron el tiempo de parálisis y tiempo de muerte (en min). Para determinar mortalidad se pusieron en contacto con agua a las lombrices a 50 °C, donde la falta de movimiento indicaba muerte y se anotó el tiempo correspondiente.



Figura 3.14. Ensayo de actividad antihelmíntica *in vitro* con *Eisenia foetida*

3.7 Consideraciones éticas

El protocolo fue sometido a evaluación con aprobación para la ejecución por el Comité de Ética en la Investigación de la Facultad de Ciencias Químicas, con código CEI 481/19. Se contribuyó con las medidas de seguridad en todo procedimiento de laboratorio, y en las acciones que aseguren la eliminación adecuada de los residuos de

las muestras analizadas, según el Procedimiento Operativo Estándar (POE) de Salud y Seguridad Ocupacional de la Facultad de Ciencias Químicas.

Se trabajó respetando las normas establecidas por la Comisión de Ética de la Comunidad Europea (Real Decreto 17344,1201/2005, de 10 de Octubre, Sobre Protección de Los Animales Para Experimentación y Otros Fines Científicos, 2005), para el manejo de animales de laboratorio. Se aplicó el Principio de las 3R o Alternativas en el uso de Animales de Laboratorio (Reemplazo, Reducción y Refinamiento). Acabado los ensayos biológicos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y finalmente los cadáveres y órganos fueron congelados y finalmente dispuestos a una empresa especializada en desechos biológicos.

3.8 Asuntos estadísticos

Los datos fueron registrados y procesados en una planilla del programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA), donde se aplicó estadística descriptiva, además de determinar diferencias significativas se utilizó el t de Student ($p \leq 0,05$) en los casos donde se compararon dos variables y ANOVA, con test Tukey *a posteriori* ($p \leq 0,05$), en los casos donde se compararon 3 o más variables.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó la composición química y potencial nutraceutico del fruto de *Capsicum chacoense* Hunz, o “ají del monte”. Los parámetros que incluyeron a la composición química fueron su composición centesimal, contenido de minerales del fruto entero y perfil fitoquímico del extracto metanólico. En cuanto al potencial nutraceutico se evaluó el potencial antioxidante (actividad antioxidante total por ABTS, fenoles totales y β -caroteno) del fruto y la actividad antihelmíntica del extracto metanólico. Todos los análisis se realizaron en dos muestras (Estancia y Ayoreo), que se diferenciaron por la geolocalización del punto de muestreo.

4.1 Composición química

4.1.1 Composición centesimal y contenido de minerales

La composición centesimal del fruto del ají del monte se presenta en la tabla 4.1, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Sin embargo, el valor de humedad fue bajo en las dos muestras (inferior al 10%) por lo que se pueden considerar alimentos no perecederos.

Tabla 4.1. Composición centesimal de frutos de *Capsicum chacoense* Hunz.

Componentes	Estancia	Ayoreo
Humedad (g/100g)	8,62±0,07 ^a	9,70±0,02 ^b
Lípidos (g/100g)	6,46±0,03 ^a	10,42±0,37 ^b
Cenizas (g/100g)	7,07±0,06 ^a	5,50±0,15 ^b
Proteínas (g/100g)	15,60±0,46 ^a	14,43±0,51 ^b
Carbohidratos totales (g/100g)	11,35±1,46 ^a	11,41±0,66 ^a
Azúcares solubles (g/100g)	3,46±0,10 ^a	3,37±0,17 ^a
Fibra alimentaria (g/100g)	49,19±1,08 ^a	47,05±0,31 ^a
Calorías (kcal /100g)	234	219

Datos representados sobre muestra tal cual como promedio \pm DE. Letras minúsculas diferentes en cada fila indica diferencia significativa entre las medias, t de Student ($p \leq 0,05$).

Otros autores como Simonovska et al., (2014) y Tripathi & Mishra (2009) analizaron la composición centesimal del *Capsicum annuum* “pimiento” una de las especies más consumidas a nivel mundial, y reportaron valor de humedad similar (8,04%). Es de destacar que las muestras analizadas ya habían sido sometidas a un proceso de secado al sol antes que lleguen al laboratorio, método utilizado por los pobladores para el consumo en alimentación, por lo que los resultados de las muestras analizadas no son comparables con muestras frescas recién cosechadas, tal como se describen en otros estudios de composición en especies de *Capsicum* (Ogunlade et al., 2012; Simonovska et al., 2014).

La fibra alimentaria fue el componente mayoritario ($49,19 \pm 1,08$ y $47,05 \pm 0,31$ g/100 g para las muestras Estancia y Ayoreo, respectivamente), donde no se observaron diferencias significativas entre las muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Los componentes de la fibra alimentaria pueden clasificarse en solubles e insolubles, en el método utilizado son cuantificados ambos tipos, estos aunque no son considerados nutrientes propiamente dicho aportan beneficios bien conocidos para la salud, la fibra insoluble fermentada parcialmente en el colon, mejoran el tránsito intestinal y la soluble, fermentadas completamente, están asociadas a la prevención de la arteriosclerosis, diabetes y cáncer de colon (Knudsen, 2001). Datos sobre la composición centesimal o proximal del *C. chacoense* es escasa en la literatura, sin embargo, se han realizado estudios en especies del mismo género, como en frutos de *C. annuum* cultivados en India, donde se ha reportado 18,98 g/100 g de fibra cruda (Tripathi & Mishra, 2009), el mayor valor observado en este trabajo puede deberse a que han sido incluidas las semillas, lo que concuerda con lo reportado por Zou, Ma, & Tian (2015), donde se encontró que las semillas de *C. annuum* cultivados en China contienen un alto contenido de proteínas (39 g/100 g).

Como segundo componente mayoritario se encontraron las proteínas (15,60 y 14,43g/100g, para las muestras Estancia y Ayoreo respectivamente), observándose diferencias estadísticamente significativas entre ambas muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Estos valores son menores a lo reportado en otros estudios (17-18 g/100 g) realizados en *C. annum* seco (Simonovska et al., 2014; Tripathi & Mishra, 2009). Sin embargo, son mayores a lo reportado en *C. frutescens* cultivado en Nigeria (11,7 g/100

g) (Otunola et al., 2010). En un estudio realizado en India analizaron el contenido de proteína del fruto entero y las diferentes partes del fruto de *C. chinense* y encontraron que el fruto entero contenía 16,37 g/100 g de proteínas, valor similar a lo observado en este trabajo, también se ha reportado que del total de aminoácidos de *C. chinense*, el 36% son aminoácidos esenciales y tienen como aminoácidos limitantes la cisteína y metionina (Ananthan et al., 2018). Se considera que estos datos servirán de base científica para estudios futuros en esta área y evaluar el valor biológico de las proteínas de *C. chacoense*.

Las muestras analizadas presentaron un bajo contenido de carbohidratos totales solubles y azúcares solubles (Tabla 4.1) sin diferencias significativas entre ambas muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Estos resultados son menores a lo reportado en frutos desecados de *C. frutescens* para carbohidratos totales (62,9 g/100 g), sin embargo, es de destacar que estos resultados fueron calculados por diferencia, lo que incluye el contenido de la fibra alimentaria del alimento y dan un contenido mayor (Otunola et al., 2010). Por otro lado, se ha reportado que el *C. annum* posee 32,9 g/100 g de carbohidratos totales analizados por el método de antrona (Tripathi & Mishra, 2009), valores mayores a lo analizado en este estudio.

En cuanto al contenido de lípidos totales se observó un rango de 6,46 a 10,42 g/100g, con diferencias significativas entre las muestras Estancia=6,46 g/100 y Ayoreo =10,42 g/100 g (t de Student, $p \leq 0,05$). Los datos de lípidos totales en la literatura para una especie cercana, el *C. annum*, varían de 1,9 a 13,3 g/100g según el lugar de cultivo como Macedonia e India, respectivamente (Simonovska et al., 2014); Tripathi & Mishra, 2009). También se ha reportado valores superiores (12,7 g/100 g) en *C. frutescens* cultivado en Nigeria (Otunola et al., 2010), por lo que los datos observados en *C. chacoense* secos se encuentran dentro del rango reportado en la literatura para especies de *Capsicum*. En un estudio realizado en España analizaron el perfil de ácidos grasos en 10 variedades de *C. annuum* (Guil-Guerrero et al., 2006), y observaron que el ácido graso mayoritario en este aceite fue el ácido linoleico (omega 6) variando de 56 al 71 % en el aceite, esto hace interesante seguir los estudios de caracterización del perfil de ácidos grasos en el aceite de *C. chacoense* del Chaco Paraguayo, donde el

perfil de ácidos grasos puede estar influido por las condiciones áridas y de altas temperaturas en esa región.

Por otro lado, se ha observado un mayor contenido de cenizas en la muestra Estancia ($7,07 \pm 0,06 \text{ g}/100 \text{ g}$) que en la muestra Ayoreo ($5,50 \pm 0,15 \text{ g}$), existiendo diferencias significativas entre las muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Si bien los valores de cenizas en frutos pueden estar influidos por el tipo de suelo y la variedad genética, sin embargo, los valores observados se encuentran en el rango reportado en la literatura para *C. frutescens* ($4,35 \text{ g}/100 \text{ g}$) (Otunola et al., 2010) y *C. annum* ($9,68-9,79 \text{ g}/100 \text{ g}$) (Simonovska et al., 2014; Tripathi & Mishra, 2009).

En cuanto al contenido de minerales de las muestras, se destacaron el contenido de potasio entre los macronutrientes y hierro entre los micronutrientes, como se observan en las figuras 4.1 y 4.2, respectivamente.

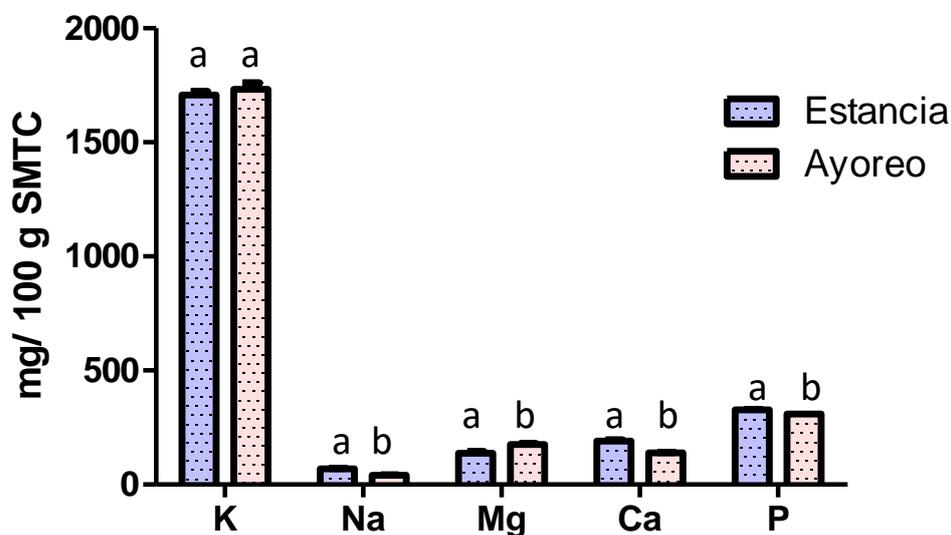


Figura 4.1. Contenido de macrominerales en frutos de *C. chacoense*. Datos representados sobre muestra tal cual como promedio \pm DE. Letras minúsculas diferentes entre barras de cada mineral, indica diferencia significativa entre las medias, t de Student ($p \leq 0,05$).

El mineral más abundante en las muestras fue el K ($1707,90 \pm 25,80$ mg/100g y $1733,26 \pm 46$ mg/100g, para las muestras Estancia y Ayoreo respectivamente) en ambas muestras sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre las medias. Se ha descrito valores mayores de K (2510 a 2910 mg/100 g) en *C. annuum* (Martinez et al., 2007), así como también valores menores (188 a 687 mg/100 g) para el mismo mineral (El-sayed Embaby & Mohamed Mokhtar, 2011; Guil-Guerrero et al., 2006; Zou et al., 2015). Como ya se ha mencionado, los valores de minerales podrían estar influenciados por la zona de muestreo, el clima y el tratamiento de los suelos.

Como la mayoría de los alimentos vegetales el *C. chacoense* presentó un bajo contenido de sodio (69,17 y 40,08 mg/100 g para las muestras Estancia y Ayoreo respectivamente) pese al suelo salado del Chaco, y se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de diferentes sitios de muestreo (t de Student, $p \leq 0,05$). Este resultado es de esperarse ya que el K es el mineral más abundante en los vegetales, no obstante, la relación comúnmente encontrada en los vegetales es 9 veces más K que Na, sin embargo, en este trabajo se encontró 25 veces más K que Na. Por otro lado, los valores de Na observados son superiores a los descritos para otras especies del género *Capsicum* (4,9 a 31,1 mg/100 g) (El-sayed Embaby & Mohamed Mokhtar, 2011; Guil-Guerrero et al., 2006; Martinez et al., 2007; Zou et al., 2015). Por lo tanto, sus relaciones de K /Na también son mayores.

Se ha observado además un buen contenido de fósforo en las muestras analizadas ($326,87 \pm 2,93$ y $309,08 \pm 0,26$ mg/100 g, para las muestras Estancia y Ayoreo, respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas en las medias (t de Student, $p \leq 0,05$). Guil-Guerrero et al., (2006), analizaron 10 variedades de *C. annuum* en estado fresco con humedad de 89-92% y encontraron que los frutos analizados contenían entre 17,4 a 37,6 mg/100 g de P, diez veces menos a lo observado en este trabajo para muestras secas, lo que explica la diferencia en el contenido de fósforo. Por otro lado Kim et al., (2019), analizaron los minerales de 12 variedades de *C. annuum* y encontraron valores similares a los de este trabajo (263,9 a 297,2 mg/100 g). Se debe tener en cuenta que la metodología utilizada para cuantificar la cantidad de P, incluyendo a los que forman parte de diversos compuestos químicos, como proteínas, péptidos, o ácido fítico, y en este último caso, el fosforo no se encuentra disponible

para los seres humanos, por lo que evaluar el contenido de fitatos en *C. chacoense* puede ser interesante en estudios futuros, así como la evaluación de su seguridad e inocuidad.

En cuanto al contenido de Ca en los frutos de *C. chacoense* analizados se encontró que fueron 190,9 y 138,4 mg/100 g, para las muestras Estancia y Ayoreo respectivamente, observándose diferencias significativas entre ambas muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Estos datos concuerdan con los rangos publicados en la literatura para especies de *Capsicum*; de 23,45 mg/100 g de Ca en frutos de *C. frutescens* (Otunola et al., 2010) a 174,71 mg/100 g en frutos de *C. annuum* (Zou et al., 2015).

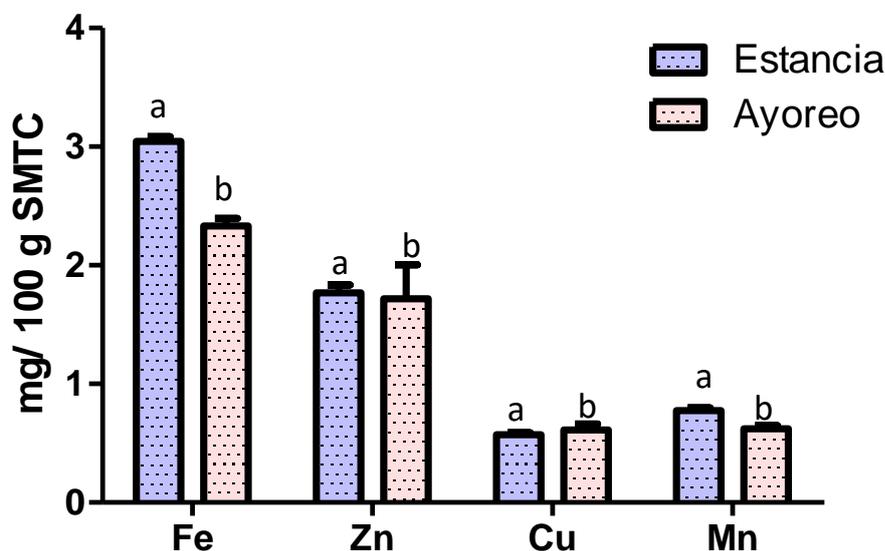


Figura 4.2. Contenido de microminerales en frutos de *C. chacoense*. Datos representados sobre muestra tal cual como promedio \pm DE. Letras minúsculas diferentes entre barras de cada mineral, indica diferencia significativa entre las medias, t de Student ($p \leq 0,05$).

Se puede observar (Figura 4.2.) que el micromineral mayoritario en ambas muestras es el Fe (3,04 y 2,33 mg/100 g), con diferencias significativas entre las muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Estos valores son similares a lo descrito en frutos de *C. frutescens* (3,39 mg/100 g) (Otunola et al., 2010) y menores a lo hallado en *C. annuum* (13,2 a 17,5 mg/100 g) (Simonovska et al., 2014).

Por otro lado, se observó un buen contenido de Zn (1,72- 1,77 mg/100 g) sin diferencias significativas entre las muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). Se describen valores variables de Zn en especies de *Capsicum* que van de 0,02 mg/100 g en *C. frutescens* (Otunola et al., 2010), a 5,07 mg/100g en *C. annuum* (Guil-Guerrero et al., 2006; Martinez et al., 2007).

De todos los minerales analizados, se observaron los menores valores en los contenidos de Cu y Mn (< 1 mg/100 g), observándose diferencias significativas (t de Student, $p \leq 0,05$) entre las muestras Estancia y Ayoreo en el contenido de Mn y no así en el contenido Cu. Estos resultados concuerdan con lo informado por varios autores en *C. annuum* y *C. frutescens* (El-sayed Embaby & Mohamed Mokhtar, 2011; Guil-Guerrero et al., 2006; Martinez et al., 2007; Otunola et al., 2010).

4.1.2 Perfil fitoquímico

A partir del extracto metanólico obtenido como se detalló en la sección 3.4.3, se obtuvieron 22,1 y 40,5 g de extracto, para las muestras Estancia y Ayoreo, teniendo un rendimiento de 19,2 y 20,2 %, respectivamente. El extracto fue fraccionado para las diferentes reacciones del perfil fitoquímico, los resultados se muestran en la Tabla 4.2.

Se observó la presencia abundante de alcaloides, así como la presencia de taninos, y en menor abundancia esteroides y/o triterpenoides libres, flavonoides y saponinas. No se observaron naftoquinonas y/o antraquinonas, cumarinas, cardiotónicos y lactonas terpénicas.

Los alcaloides fueron los metabolitos secundarios que dieron mayor abundancia, sin embargo, de acuerdo con el resultado negativo con el reactivo reineckato de amonio, estos alcaloides no son compuestos cuaternarios ni óxidos de aminas. Es ampliamente conocido que las plantas del género *Capsicum* poseen un grupo de alcaloides

característicos; los capsacinoides, derivados de la vainillilamina, que otorgan la característica picante o de pungencia de estos frutos y sus semillas. Entre ellos, se ha descrito la presencia de capsaicina y dihidrocapsaicina en los frutos de *Capsicum chacoense* (Loizzo et al., 2015).

Tabla 4.2. Perfil fitoquímico del extracto metanólico del fruto de *Capsicum Chacoense* Hunz, tanto para Estancia como para Ayoreo.

Compuestos	Pruebas realizadas	Estancia	Ayoreo
Alcaloides	Dragendorff	(+++)	(+++)
	Mayer	(+++)	(+++)
	Valser	(+++)	(+++)
	Reineckato de amonio	(-)	(-)
Esteroides y/o triterpenoides libres	T.L.C. bidimensional		
	Revelador: Liebermann-Burchard	(+)	(+)
Flavonoides	Reacción de Cianidina	(+)	(+)
	Reacción con HCl	(+)	(+)
Naftoquinonas y/o antraquinonas	Reacción de Bortrager-Krauss	(-)	(-)
Taninos	Gelatina-sal, FeCl ₃	(++)	(++)
Saponinas	Espuma	(+)	(+)
Cumarinas	T.L.C.		
	Revelador: Reacción de Hidroxamato férrico	(-)	(-)
Cardiotónicos	T.L.C.		
	Revelador: Reacción de Raymond	(-)	(-)
Lactonas terpénicas	T.L.C. Revelador: Vainillina-ácido o-fosfórico	(-)	(-)

La identificación comprendió reacciones de coloración y / o precipitación junto con cromatografía de capa fina para la detección de esteroides, triterpenos y lactonas terpénicas. +++: Abundante; ++: moderado; +: escaso; -: ausente

La presencia de taninos en el extracto metanólico analizado se evidenció con el ensayo de gelatina-sal junto con el FeCl_3 , (se obtuvo un color rojizo oscuro). Los taninos en los vegetales pueden clasificarse en hidrolizables (derivan del ácido gálico) y los no hidrolizables o complejos (estructuras rígidas derivadas de los flavonoides), ambos grupos son considerados polifenoles (Dewick, 2009). Se ha informado la presencia de varios compuestos fenólicos en frutos de *C. annuum*, como por ejemplo el ácido gálico, ácido caféico, luteolina, ácido vanílico, ácido ferúlico y varios compuestos derivados de los mismos (Mudric et al., 2017). El contenido de taninos en el extracto metanólico de los frutos de *C. frutescens* llegan al 1,77% (Otunula et al., 2010).

Para los flavonoides se realizaron las reacciones de cianidina y HCl, una reacción positiva indicó presencia en los frutos estudiados. Existen varias evidencias de la presencia de flavonoides en *Capsicum*, un estudio italiano, reportó contenido de flavonoides totales que varió de 0,5 a 12,8 mg/100 g, siendo el valor para *C. chacoense* 0,5 a 1,5 mg/100g entre cuatro diferentes especies cultivadas (*C. baccatum*, *C. annuum*, *C. chinense* y *C. chacoense*) y analizadas en estado fresco y procesado (Loizzo et al., 2015). En América, se ha descrito 0,5 a 29 mg de flavonoides totales por cada 100 g en tres especies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. baccatum*), de estos los flavonoides identificados y cuantificados fueron la quercentina y luteolina encontrando hasta 27 mg/100 g de quercentina y de 0,5 a 5 mg/100 g de luteolina (Meckelmann et al, 2013). En *C. pubescens* se ha reportado de 0 a 1,5 mg/100 de quercentina (Meckelmann et al., 2015).

Al realizar la TLC bidimensional y revelarlo con el reactivo de Liebermann-Burchard, se observó manchas de color lila, lo cual es indicativo de la presencia de esteroides y/o triterpenoides libres (Tabla 4.2).

Con la prueba de espuma se obtuvo resultado positivo para la presencia de saponinas en los extractos estudiados. Se ha reportado la presencia de saponinas en los frutos de *C. baccatum* por el mismo método utilizado en este trabajo, además de la prueba de hemólisis (Von Borowski et al., 2019), entre estas, se ha elucidado estructuras de saponinas en los frutos de *C. annuum* como capsicosido A, capsicosido B y capsicosido C, demostrando importantes actividades como antimicóticas frente a

varios a hongos (Iorizzi et al., 2002) y antifúngica de la saponina CAY-1 aislada de los frutos de *C. frutescens* (De Lucca et al., 2002).

4.1.3 Contenido de capsacinoides y nivel de pungencia

La pungencia de los frutos del género *Capsicum* es debida a la presencia de un grupo de alcaloides llamados capsacinoides. La capsaicina y la dihidrocapsaicina conforman más del 90 % del total de capsacinoides en la mayoría de los frutos de este género. En la figura 4.3 y figura 4.4 se puede observar el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina, respectivamente, en los frutos estudiados. En general se observó un mayor contenido de capsaicina (131,85 y 98,80 mg/100 g, para las muestras Estancia y Ayoreo respectivamente) que de dihidrocapsaicina (80,75 y 63,68 mg/100 g, para las muestras Estancia y Ayoreo respectivamente).

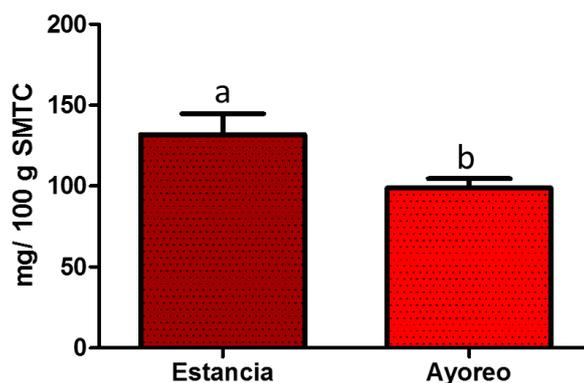


Figura 4.3. Contenido de capsaicina (mg/100g) en frutos de *Capsicum chacoense*.

Datos representados como promedio \pm DE. Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias, test de student ($p \leq 0,05$).

En la figura 4.3, se observa un mayor contenido de capsaicina en la muestra Estancia (131,85 \pm 17,73 mg/100 g) que en la muestra Ayoreo (98,80 \pm 8,15 mg/100 g), presentando diferencias significativas entre ambos (t de Student, $p \leq 0,05$). Estos resultados son diez veces mayor a lo reportado por López et al., (2012), sobre el contenido de capsaicina en frutos de *C. chacoense* cultivados en Salta, Argentina (13,9 mg/100 g de fruta seca) lo que puede deberse a diferencias en el proceso de extracción

(diclorometano a 80°C y metanol:agua (70:30) durante 24 h en frío). Por otro lado Loizzo et al., (2015) analizaron el contenido de capsaicina en frutos de *Capsicum* frescos, hervidos y congelados provenientes de un cultivo controlado en Italia, entre ellos el de *C. chacoense*, encontrando que el estado fresco contenía más capsaicina (cerca de 210 mg/100 g), seguido por el congelado (cerca de 200 mg/100 g de fruta fresca) y por último el hervido 10 min (cerca de 100 mg/100 g), en todos los casos, contenidos mayores a los observados en este trabajo para los frutos secos de *C. chacoense*, lo que indica que el procesamiento influye en el contenido de estos alcaloides. Cabe destacar que una limitación de este trabajo fue que no se tuvo acceso a los frutos frescos y que las muestras analizadas fueron sometidas a tratamientos post cosecha (tradicionales) como secado al sol y molienda en morteros de madera. Por otro lado, a modo de comparación con uno de los “ajíes” más consumidos a nivel mundial, el *C. annuum*, que posee diferentes variedades y contenidos variables de capsaicina, se reportan desde que no se detectan a 1380 mg/100 g (Meckelmann et al., 2013; Loizzo et al., 2015).

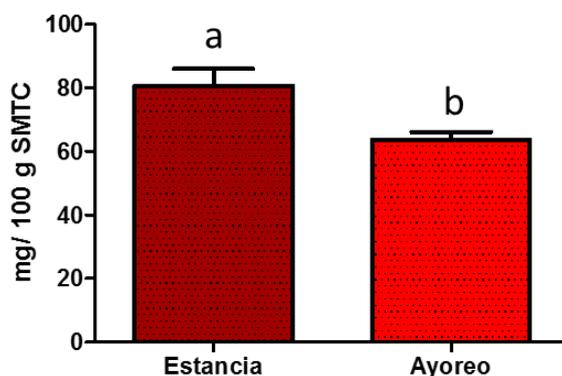


Figura 4.4. Contenido de dihidrocapsaicina (mg/100 g) en frutos de *Capsicum chacoense*.

Datos representados como promedio \pm DE. Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias, test de student ($p \leq 0,05$).

Respecto al contenido del alcaloide dihidrocapsaicina (figura 4.4), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (t de Student, $p \leq 0,05$), donde la muestra Estancia presentó mayor contenido (80,75 \pm 5,26 mg/100g) que la

muestra Ayoreo ($63,68 \pm 2,48$ mg/100g). El contenido de estos compuestos está influido principalmente por el ambiente donde se desarrolla el vegetal, la susceptibilidad a plagas o insectos y la variedad. En la literatura se reportan valores de 50 a 60 mg/100 g de dihidrocapsaicina en frutos frescos, congelados y hervidos de *C. chacoense* cultivados en condiciones controladas en Italia (Loizzo et al, 2015) rango inferior a lo observado en el presente trabajo para frutos secos, donde es de esperar que el secado concentre los componentes de la muestra por su bajo contenido de agua, sin embargo, la diferencia observada con los resultados en fresco no es muy llamativas. En América, para otras especies de *Capsicum*, cultivados en Perú, de 32 especies de *C. pubescens* la variación observada en el contenido de dihidrocapsaicina fue de 25 a 207 mg/100 g de fruto seco (Meckelmann et al., 2015). Por otro lado se ha reportado que los frutos de *C. frutescens* contienen hasta 460,2 mg/100 g (Meckelmann et al., 2013), valores superiores a los de este trabajo. Otras como *C. chinense*, *C. baccatum* poseen un mayor contenido aún mayor de dihidrocapsaicina con 95,1 a 1008,7 mg/100 g en *C. chinense* y de 78,6 a 198,8 mg/100 g en el *C. baccatum* según la parte de la fruta, conteniendo la mayor cantidad la placenta (Gavilan Guillen et al., 2018).

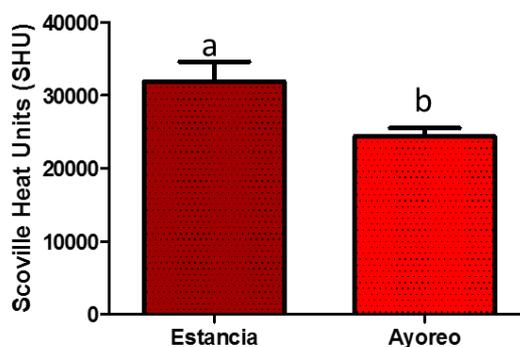


Figura 4.5. Nivel de Pungencia (SHU) de las muestras de *Capsicum chacoense*. Datos representados como promedio \pm DE. Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias, test de student ($p \leq 0,05$).

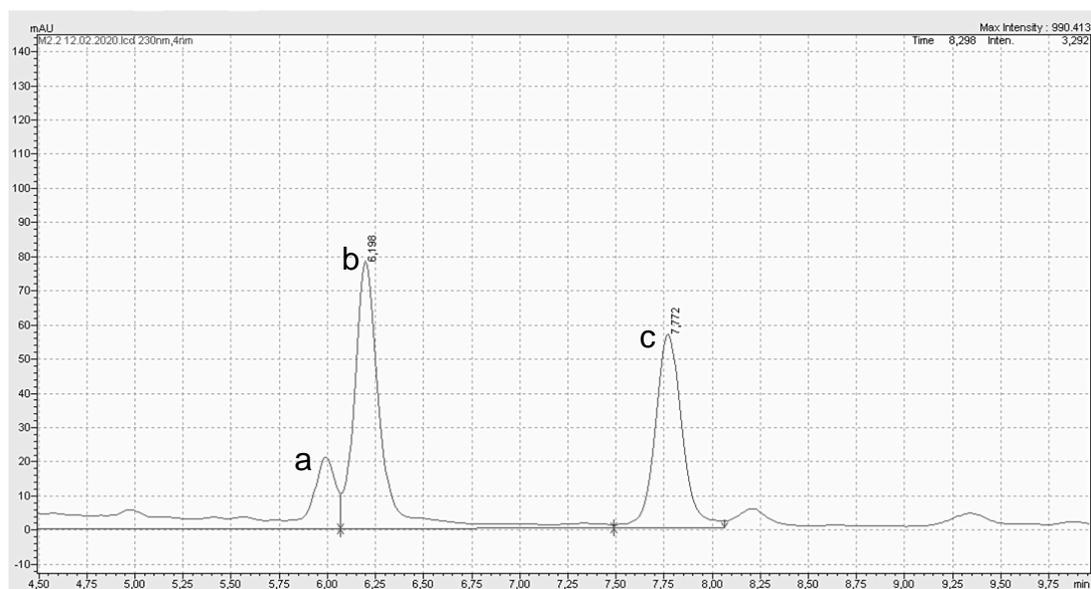


Figura 4.6. Cromatograma de capsacinoides de una muestra de *Capsicum chacoense*, donde a) pico de Norhidrocapsaicina, b) pico de Capsaicina y c) pico de Dihidrocapsaicina. FM: Acetonitrilo:Agua (pH=3,8) (65:35), detector PDA modelo SPD-M20A (Shimadzu, Japon), a 230 nm, flujo 1mL/min, inyección:20 μ L.

Al evaluar el nivel de pungencia de las muestras, se observó 31.890 SHU para la muestra Estancia y 24.372 SHU para la muestra Ayoreo (figura 4.5), con diferencias estadísticamente significativas entre las medias (t de Student, $p \leq 0,05$). Sin embargo, se podría considerar que estas muestras tienen un mayor nivel de pungencia si consideramos que no se han podido cuantificar los niveles de norhidrocapsaicina presentes, tal como se observa en el cromatograma de estos alcaloides por HPLC (Figura 4.6) y según los reportes de Horwitz (2000) y Gavilan Guillen et al., (2018) donde el pico a) corresponde al pico de norhidrocapsaicina (Anexo A16 y A17).

De acuerdo a la categoría de pungencia propuesto por Eich, (2008) los capsacinoides pueden caracterizar al alimentos como leve (0–5.000 SHU), medio (5.000–20.000 SHU), caliente o picante (20.000–70.000 SHU), extremadamente caliente o picante (70.000–300.000 SHU). Conforme a esto, las muestras analizadas se encuentran en la categoría “picante”.

El *C. chinense*, variedad “Carolina reaper”, desde el 2017 es considerado el ají más picante del mundo según el libro de Record Guinness con 1.641.183 SHU, valor muy superior a lo observado en este trabajo para *C. chacoense* (Guinness World Records, 2017). Sin embargo, existen otras variedades de *C. chinense* que se encuentran también en la categoría picante (62 000 SHU) (Gavilan Guillen et al., 2018). Por otro lado, se ha reportado que las variedades de *C. annuum* poseen menor nivel de pungencia (362,5 a 9720 SHU) comparado con las muestras de *C. chacoense* analizadas (Orellana-Escobedo, Garcia-Amezquita, Olivas, Ornelas-Paz, & Sepulveda, 2013; Topuz & Ozdemir, 2007).

Este nivel de pungencia lo hace apropiado para usos como saborizante en las comidas, además de otros usos que pueden otorgarse a sustancias con estas características como por ejemplo para usos farmacológicos, para la elaboración de cremas tópicas o industriales para elaboración de armas de protección personal.

4.2 Toxicidad aguda

Al realizar el ensayo de toxicidad aguda de las muestras Estancia y Ayoreo en ratones albinos suizos, por vía oral en dosis única del extracto metanólico de los frutos enteros de *C. chacoense*, luego de por 14 días de observación, no se observaron signos de toxicidad ni cambios bruscos de comportamiento hasta una dosis de 2000 mg/kg, los animales utilizados en el ensayo sobrevivieron en buen estado de salud, sin cambios macroscópicos en los órganos durante los 14 días que duró el ensayo.

Sin embargo, en la dosis máxima (2000 mg/kg) se observó piloerección y sialorrea desde los 20 min hasta las dos horas posteriores a la administración de los extractos de ambas muestras analizadas (Anexo A14), los cuales indican una actividad estimulante en el sistema nervioso central. En la necropsia realizada no se observaron diferencias macroscópicas en los órganos vitales con respecto al control en estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado, riñón, bazo, corazón y pulmón. Estos resultados sugieren que los extractos metanólicos de los frutos de *C. chacoense* analizados son relativamente inocuos a dosis inferiores a 2000 mg/Kg en ratones albinos suizos hembra por vía oral.

Información sobre la toxicidad aguda de los frutos de *C. chacoense* es escasa en la literatura, sin embargo, se ha informado que al incorporar frutos de *C. annuum* en el alimento de ratones B6C3F hasta un 10 % del peso de los animales no causan un efecto tóxico, similar a lo observado en este trabajo (Jang et al., 1992). No obstante, se ha informado que la DL₅₀ de extractos acetónicos (oleorresinas) de frutos de *C. frutescens* (20, 40 y 80% de oleorresina) vía oral en ratones albinos machos varió de 283 (40% y 80% oleorresinas) a 800 mg/kg (20% oleorresina) (Kumar et al., 2012) dosis dependiente. Pero por vía intraperitoneal en ratones albinos de ambos sexos se reportó una DL₅₀ menor para el extracto metanólico de frutos de *C. frutescens* igual a 190 mg/kg (Tamayo et al., 2014). Por otro lado, también se ha informado una DL₅₀ menor para el alcaloide principal del género *Capsicum*, la capsaicina, por vía oral en ratones albinos hembras, cuyo valor de DL₅₀ fue de 97,4 mg/kg (Ito, C., Miyamoto, Y., Rao, K.S., Furukawa, 2002). Esta sustancia está presente en altas concentraciones (98,8-131,8mg/100g) en los frutos analizados, sin embargo, en este estudio no se observaron efectos tóxicos en fase aguda.

4.3 Potencial nutraceutico

4.3.1 Potencial antioxidante

El potencial antioxidante de los frutos de *C. chacoense* se midió en función a la capacidad antioxidante total (Inhibición del radical ABTS·+), contenido de fenoles totales, carotenoides totales y β-caroteno como se resume en la Tabla 4.3.

En cuanto a la capacidad antioxidante total (CAT), se midió la IC₅₀ de los extractos obtenidos y los milimoles de capacidad antioxidante equivalente a Trolox (mM TEAC).

Tabla 4.3. Potencial antioxidante de muestras de *Capsicum chacoense*.

	Unidad de medida	Estancia	Ayoreo	Trolox
Capacidad antioxidante (ABTS·+)	IC ₅₀ (µg/mL)	1055±122 ^a	1090±57 ^a	139
	mM TEAC/g SMTC	154±5 ^a	158±4 ^a	*
Fenoles totales	mg GAE/100 g muestra	543,32 ± 7,30 ^a	517,26 ± 28,92 ^a	*
Carotenoides totales	mg/Kg de muestra	125,72 ± 6.26 ^a	239,57 ± 12,39 ^b	*
β-caroteno	mg/Kg de muestra	3,29 ± 0,03 ^a	5,60 ± 0,49 ^b	*

Datos representados como promedio ± DE. Letras minúsculas diferentes en cada fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias (t de Student , $p \leq 0,05$). *No aplica

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones inhibitorias (IC₅₀) de los extractos metanólicos de las muestras (t de Student, $p \leq 0,05$) y comparativamente con el control, se observó que las muestras presentaban menor actividad antioxidante que el Trolox. Cuanto menor es la IC₅₀, mayor capacidad tiene el extracto para inhibir el radical ABTS·+, la relevancia de este dato es mayor cuando se tienen diferentes extractos, por ejemplo, con diferentes solventes y se quiere evaluar cuál de ellos presenta mayor actividad, en este caso, los diferentes extractos reportados en la literatura para otras especies de *Capsicum* no son directamente comparables. Hecha esta salvedad en general los valores de IC₅₀ de extractos reportados en especies de *Capsicum* en estado fresco son menores (59 a 78 µg/mL en *C. chacoense*, 33 a 45 µg/mL en *C. chinense*, 169 a 483 µg/mL en *C. baccatum* y 26 a 226 µg/mL en *C. annuum*), lo que indica que las muestras evaluadas por Loizzo et al., (2015) en fresco presentan mayor potencial antioxidante que las muestras desecadas evaluadas en este trabajo.

Por otro lado, los valores equivalente de Trolox son mejor parámetro de comparación con otros autores, en las muestras analizadas no se observaron diferencias

significativas entre ambas (t de Student, $p \leq 0,05$) y el valor de la capacidad antioxidante total varió de $(154,35 \pm 5,08$ a $158,25 \pm 4,23$ mM TEAC/g SMTc, para las muestras Estancia y Ayoreo, respectivamente. Otros autores han reportado que en diferentes especies y variedades de cultivos controlados de *Capsicum*, la capacidad antioxidante de los extractos variaba de 180 a 920 mM TEAC/g en las muestras de *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. annuum* y *C. pubescens* (Meckelmann et al, 2013; Meckelmann et al, 2015). Estos datos pertenecen a estudios realizados en frutos de cultivos controlados, procesados de manera estandarizada, lo que refuerza la idea de que la capacidad antioxidante varía de acuerdo al procesamiento postcosecha, las condiciones de almacenamiento, sumado a la variabilidad genética propia de cada especie.

Por otro lado, el contenido de fenoles totales (tabla 4.3) igualmente no presentó diferencias significativas entre ambas muestras (t de Student, $p \leq 0,05$). En el estudio realizado por Loizzo et al., (2015) se han reportado valores mayores para los frutos frescos, congelados y hervidos de *C. chacoense* (1600 a 2100 mg GAE/100 g muestra) y comparativamente *C. annuum* presentaba el mayor valor de fenoles totales (hasta 7140 mg GAE/100g), seguido por *C. baccatum* (400 a 800 mg GAE/100g) y *C. chinense* (50-200 mg GAE/100g). Los valores observados en este trabajo (517-543 mg GAE/100g) son similares a los reportados para *C. baccatum*.

Por otro lado Mudric et al., (2017) encontraron valores muy por encima (7030 a 14920 mg GAE/100 g muestra) a lo encontrado en este trabajo en frutos de cuatro variedades de *C. annuum* cultivadas y comercializadas como paprika en Serbia. Además también se ha reportado que los frutos de *C. frutescens* contienen un mayor valor de fenoles totales (1900 a 2500 mg GAE/100 g muestra) a los de las muestras analizadas (Mudric et al., 2017). Estas diferencias claramente se explican por los tratamientos postcosecha, condiciones del cultivo, genética y factores ambientales antes mencionados. Estudios futuros sobre las condiciones óptimas del cultivo, secado, almacenamiento y extracción de componentes bioactivos de *C. chacoense* son necesarios para el aprovechamiento de estas propiedades en este tipo de frutos a nivel local.

Referente al contenido de carotenoides totales, se observó que la muestra Ayoreo tenía una mayor cantidad ($239,57 \pm 12,39$ mg/kg) que la muestra Estancia ($125,72 \pm 6,26$ mg/kg) (t de Student, $p \leq 0,05$). El contenido de carotenoides en los frutos de *Capsicum* depende principalmente de la madurez (Topuz & Ozdemir, 2007). En un estudio realizado en México por Wall, Waddell, & Bosland (2001) encontraron que el contenido de carotenoides totales en frutos enteros frescos de *C. chacoense* (52 % de humedad), provenientes de cultivos controlados fue de 633 mg/kg, superior a lo observado en este trabajo. En la literatura se reporta un amplio rango de valores para carotenoides en diferentes especies de *Capsicum* como *C. annuum* (111-10.121 mg/kg), *C. baccatum* (248-1.986 mg/kg), *C. chinense* (1991 a 5432 mg/kg), *C. frutescens* (1.334-1.999 mg/kg) y *C. annuum* (1330 mg/kg) (Tripathi & Mishra, 2009) donde los valores observados en este trabajo se encuentran dentro del rango reportado para otras especies de *Capsicum*.

En cuanto al contenido de β -caroteno, precursor de vitamina A en los vegetales, las muestras presentaron un rango variable de 3,29 a 5,60 mg/kg, donde Ayoreo igualmente presentó un contenido significativamente mayor (t de Student, $p \leq 0,05$). El contenido de β -caroteno observado representó del 2,3- 2,6 % de los carotenoides totales, sin embargo, se puede observar que las muestras presentaban otros picos en el cromatograma de carotenoides (ver Figura 4.7) los cuales no han podido ser identificados y cuantificados en este trabajo a falta de estándares de referencia.

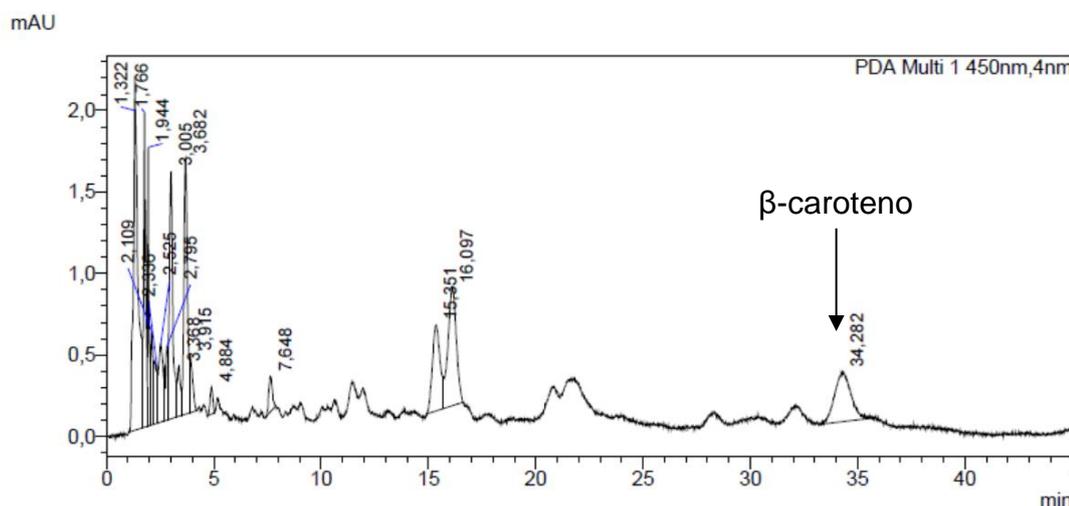


Figura 4.7. Cromatograma de carotenoides de un fruto de *Capsicum chacoense*

Diferentes autores reportan un contenido de β -caroteno mayor en frutos de *C. chacoense* (137 mg/kg) (Wall et al, 2001), 1640 a 6.820 mg/ kg en el pericarpio de frutos provenientes de un cultivo controlado y sometidos a tratamientos de congelación y hervido (Pugliese et al, 2013) donde los frutos frescos presentaban el mayor valor, seguido de los congelados y por último los hervidos, e incluso hasta 36.660 mg/kg de muestra en frutos secos de *C. chacoense* (Pugliese et al., 2014).

Dentro del perfil de carotenoides de *C. chacoense*, se han descrito compuestos como violaxantina, neoxantina, antheraxantina, luteína, capsantina, zeaxantina, β -criptoxantina y β -caroteno (Pugliese et al., 2013, 2014), siendo el mayoritario la capsantina, un carotenoide propio del género *Capsicum*. Se consideran necesarios otros estudios para identificar los carotenoides presentes en estos frutos “ají del monte”, ya que el contenido de carotenoides da un valor comercial agregado y las resinas de *Capsicum*, son utilizadas como colorantes naturales en la industria alimentaria (Restrepo Gallego, 2006), medidos en ASTA, una medida de color, establecida como estándar de calidad para su comercialización (Wahyuni, Ballester, Sudarmonowati, et al., 2013).

De acuerdo con estos resultados, el potencial antioxidante de las muestras de *C. chacoense* proveniente de frutos secos es menor a lo descrito para la misma especie por otros autores en cuando a su contenido de polifenoles, carotenoides y actividad antioxidante total por ABTS. El principal factor de estas variaciones además de la genética y las condiciones ambientales de crecimiento podría ser el tratamiento post cosecha empleado por los pobladores para los frutos de *C. chacoense*, los cuales son secados al sol mientras que las condiciones industriales del procesamiento de especies de *Capsicum* ampliamente utilizadas para su aprovechamiento nutracéutico apuntan a condiciones optimizadas (en cuanto al sistema de secado, temperatura y tiempo) para cada especie, de manera a conservar sus componentes principales como carotenoides de gran valor comercial, utilizados como colorantes naturales en alimentos.

4.3.2 Actividad antihelmíntica *in vitro*

La actividad antihelmíntica del extracto metanólico del fruto de *C. chacoense* se evaluó utilizando el modelo de *Eisenia foetida* cuyos resultados se muestran en la Figura 4.8. El fundamento de este modelo considera que los helmintos intestinales una vez paralizados pueden ser evacuados del sistema digestivo, por tanto, se evalúan las variables como tiempo de parálisis y muerte. Se puede observar que en todos los casos el tiempo de parálisis y muerte es menor al control albendazol (10 mg/mL) utilizado, con diferencias estadísticamente significativas entre el control y los extractos (ANOVA, test *a posteriori* de Tukey, $p \leq 0,05$). Estos resultados indican que los extractos presentaron una mejor actividad antihelmíntica *in vitro* que el control. Para cada día de ensayo se realizó un control negativo, el cual contenía DMSO en solución fisiológica, donde las lombrices permanecieron vivas y sin parálisis hasta la finalización del ensayo

Es de notarse que en las concentraciones mayores a 10 mg/mL no se observaron diferencias significativas (ANOVA, test *a posteriori* de Tukey, $p \leq 0,05$) con el control positivo, sin embargo, desde la concentración de 2,5 y 5 mg/mL si se observaron diferencias significativas (ANOVA, test *a posteriori* de Tukey, $p \leq 0,05$), lo que indica que pasando los 10 mg/mL los sistemas de respuesta a la toxicidad de los extractos posiblemente se han saturado, y que el potencial rango terapéutico de estos extractos se encuentra a concentraciones menores a 10 mg/mL. Por consiguiente, trabajos posteriores a este deberían realizarse a concentraciones menores a 10 mg/mL para establecer el rango de acción terapéutica, así como otros estudios en diferentes fracciones del extracto camino a la identificación del o los metabolitos responsables de la actividad antihelmíntica observada en las muestras. Por otro lado, el tiempo de parálisis y muerte del extracto obtenido de la muestra Estancia (5,80-26,27 min y 8,26-41,21 min, respectivamente) fue mayor al de la muestra Ayoreo (10,63-40,43 y 7,28-67,19 min, respectivamente).

Se han reportado también actividad antihelmíntica en el extracto metanólico de frutos de *C. frutescens* en lombrices de la especie *Tubifex tubifex*, donde encontraron que el tiempo parálisis variaba de 18,28 a 3,43 min. y el tiempo de muerte de 37,92 a 5,89

min. para las concentraciones de 2,5 a 10 mg/mL (Kamal et al., 2015), por lo que los frutos de *C. frutescens* tendrían una actividad antihelmíntica mejor a los extractos de frutos utilizados en este trabajo. Estas diferencias pueden deberse a la variabilidad biológica tanto de la especie estudiada como la especie de la lombriz utilizada.

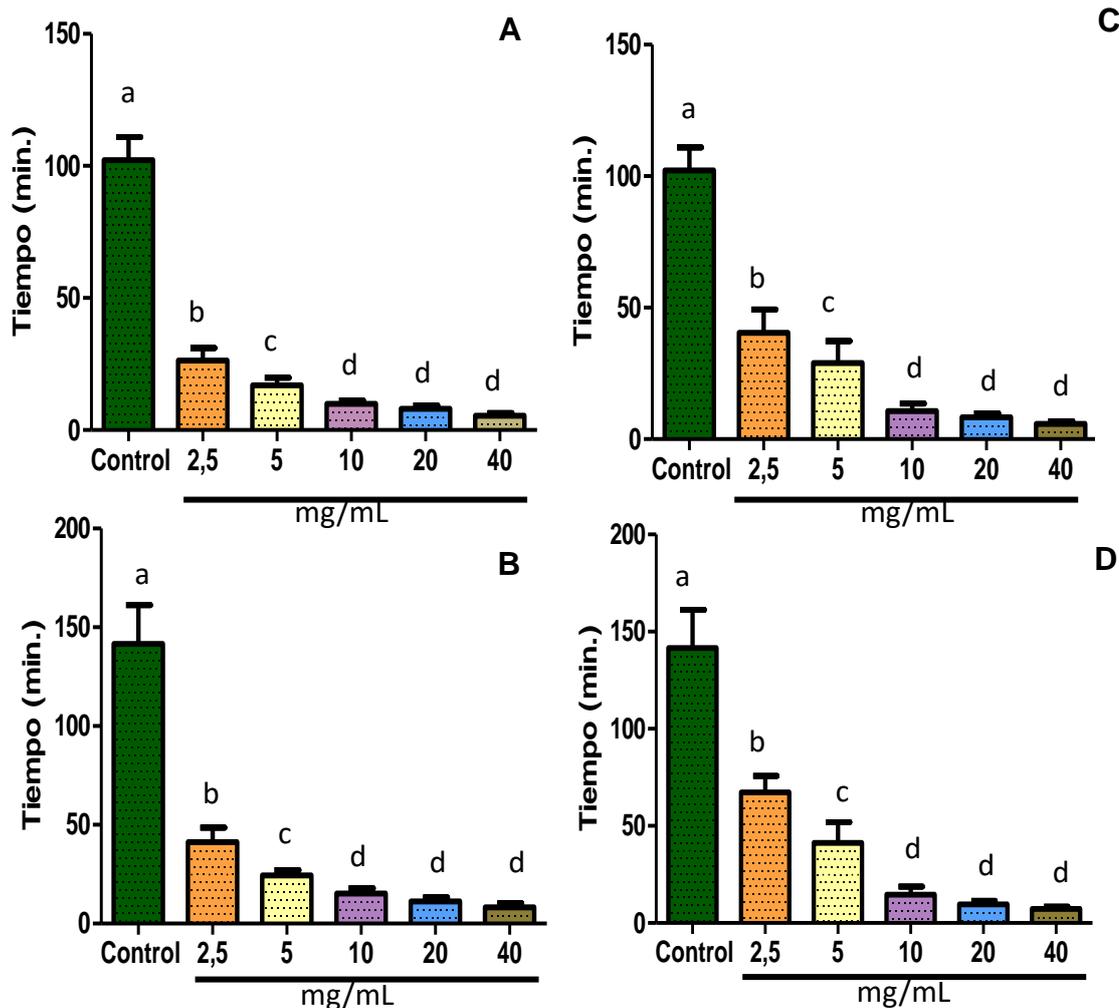


Figura 4.8. Actividad antihelmíntica *in vitro* del extracto metanólico de los frutos de *Capsicum chacoense* con *Eisenia foetida*. A) Tiempo de parálisis para el extracto metanólico de la muestra Estancia. B) Tiempo de muerte para el extracto metanólico de la muestra Estancia. C) Tiempo de parálisis para el extracto metanólico de la muestra Ayoreo. D) Tiempo de muerte para el extracto metanólico de la muestra Ayoreo. Datos representados como promedio \pm DE. Letras minúsculas diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre las medias, ANOVA, test a posteriori de Tukey ($p \leq 0,05$). Control positivo: albendazol 10 mg/mL. Control negativo: DMSO + Solución fisiológica

También se ha reportado que las hojas de *C. frutescens* presentaban actividad antihelmíntica (Vinayaka et al, 2013) frente a otro modelo de *Pheretima posthuma*, en concentraciones que iban desde 10 a 100 mg/mL, obteniendo valores muy superiores a los de este estudio, donde el tiempo de parálisis varió de 110,42 a 198,35 min, y el tiempo de muerte varió de 151,09 a 256,23 min.

El resultado del presente trabajo sugiere que el extracto metanólico de *C. chacoense* silvestre tiene un potencial medicinal y nutracéutico para el control de infecciones por lombrices redondas, como áscaris, infecciones por anquilostomas, etc., ya que las lombrices utilizadas en el estudio tienen una semejanza anatómica y fisiológica con las lombrices intestinales.

En base a los resultados observados, se pueden establecer proyecciones para estudios futuros (Figura 4.9.) que amplíen aún más el conocimiento de esta especie silvestre, considerando que los frutos de *C. chacoense* analizados poseen una composición química interesante con potencial nutracéutico, aparentemente inocuo, lo cual está además demostrado por su uso popular como condimento, por otro lado, los resultados obtenidos sientan bases científicas para mejorar su aprovechamiento integral en base al estudio de condiciones óptimas de secado, importante para la obtención de oleorresinas de interés para la industria alimentaria en el área de producción de aditivos alimentarios naturales como saborizantes y colorantes en reemplazo de ingredientes críticos como los aditivos artificiales. La optimización del sistema de secado permitirá además preservar la actividad antioxidante y conservación de los compuestos carotenoides y capsacinoides.

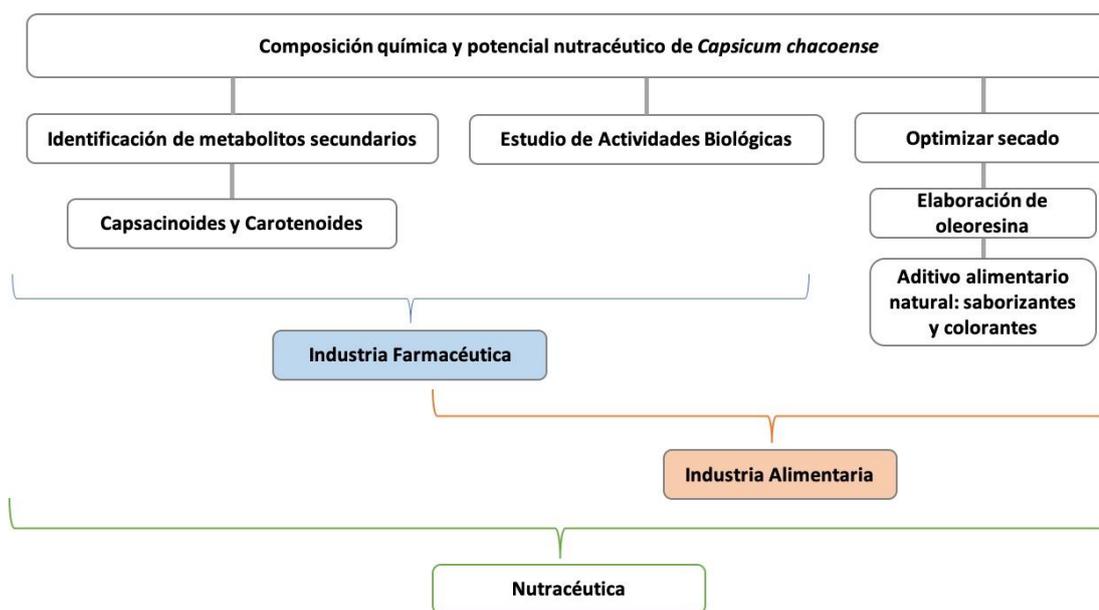


Figura 4.9. Recomendaciones y proyecciones de los resultados de la composición química y potencial nutraceutico de *C. chacoense*.

Trabajos de investigación sobre otras actividades biológicas como la actividad antibacteriana y antiviral o la capacidad de proliferación de células mononucleares, pueden ampliar el espectro de actividades interesantes para la industria farmacéutica además de la actividad antihelmíntica ya evaluada en el presente trabajo, mediante un diseño de estudios bioguiados que permitan avanzar en la identificación de los metabolitos responsables.

5. CONCLUSIONES

La composición centesimal de las muestras demostró que los frutos secos de *Capsicum chacoense* “ají del monte” contenían altos niveles de fibra alimentaria (47,05 - 49,19 g/100g), proteínas (14,43-15,60 g/100g) minerales como potasio (1708 – 1733 mg/100g), con una relación K/Na igual a 25. El micromineral más abundante fue el Fe (2,33 - 3,04 mg/100g).

En el perfil fitoquímico del extracto metanólico, en ambas muestras analizadas se observó presencia abundante de alcaloides, además de flavonoides, taninos, esteroides y/o triterpenoides libres y saponinas.

Se cuantificaron los alcaloides característicos como los capsacinoides capsaicina y dihidrocapsaicina donde la muestra Estancia presentó niveles significativamente más altos de capsaicina (131,85 mg/100g) y dihidrocapsaicina (80,75 mg/100g) con respecto a la muestra Ayoreo (98,80 mg/100g y 63,68 mg/100g, respectivamente), estos niveles fueron correlativos con los niveles de pungencia en las muestras analizadas (31.890 SHU para Estancia y 24.372 SHU para Ayoreo).

Respecto al ensayo de toxicidad aguda con los extractos metanólicos de los frutos de *C. chacoense*, no se observaron efectos letales en los animales de experimentación ensayados (ratones albinos suizos, hembras) en las condiciones de ensayo (vía oral, 14 días de observación) a una dosis de 2000 mg/kg de peso, tanto para la muestra Estancia como para la muestra Ayoreo.

El potencial antioxidante de los frutos analizados se da en función al contenido de fenoles totales (517,26 - 543,32mg GAE/100 g muestra), carotenoides totales (125,72-239,57mg/kg) y β -caroteno (3,29-5,60 mg/Kg), sumado a los resultados de actividad antioxidante total *in vitro* por el ensayo ABTS (154-158mM TEAC/g SMTC) con concentraciones efectivas (IC₅₀) de 1055-1090 μ g/mL, sugieren que los frutos del “ají del monte” poseen un gran potencial nutracéutico de interés para la industria alimentaria.

Se observó actividad anti-helmíntica de los extractos metanólicos de las muestras en el intervalo de concentraciones ensayadas (2,5 a 40 mg/mL) con diferencias

estadísticamente significativas respecto al control (albendazol 10 mg/mL), con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica.

Estos son los primeros resultados de composición centesimal, minerales, perfil fitoquímico, capsacinoides, fenoles totales, carotenoides totales, β -caroteno, capacidad antioxidante total, actividad anti helmíntica y toxicidad aguda de los frutos secos de *Capsicum chacoense*, planta nativa que crece en el territorio chaqueño y constituyen una base científica para futuros trabajos en el área de bioprospección de recursos alimenticios de interés para la alimentación, la agricultura, la medicina y la nutracéutica.

ANEXOS



A1. Plantas muestreadas. a) Estancia, b) Ayoreo

Estancia



Universidad Nacional de Asunción
Facultad de Ciencias Químicas
Herbario (FCQ)

Lupinus chavensis (Lam.)
S.A.: Bba.
Dpto.: Itapúa, Estancia Estancia
Cuerpo de Bomberos y Bomberos de la Estancia
Coord.: S 27° 08' 41" W 86° 25' 58"

Alfondo de la FCQ para el
Herbario Nacional de Asunción. Este material es propiedad
de la Universidad Nacional de Asunción.

Leg.: B. de la Cruz N. B.
Fecha: 13/04/2014
Proyecto: "Evaluación de la diversidad genética de
las variedades de L. chavensis en la zona de
estancia de la FCQ."

Ayoreo



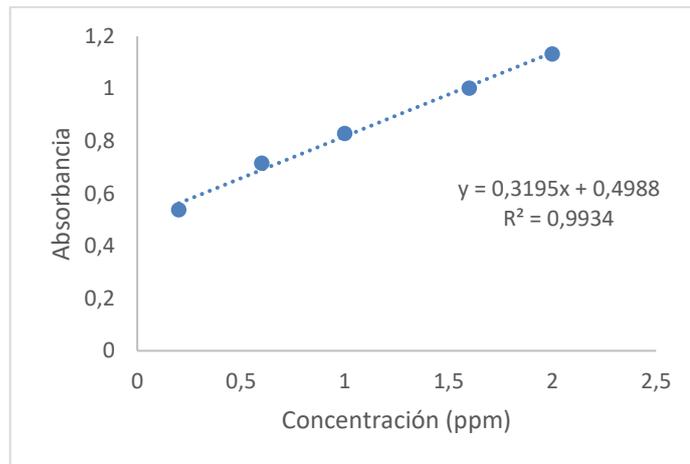
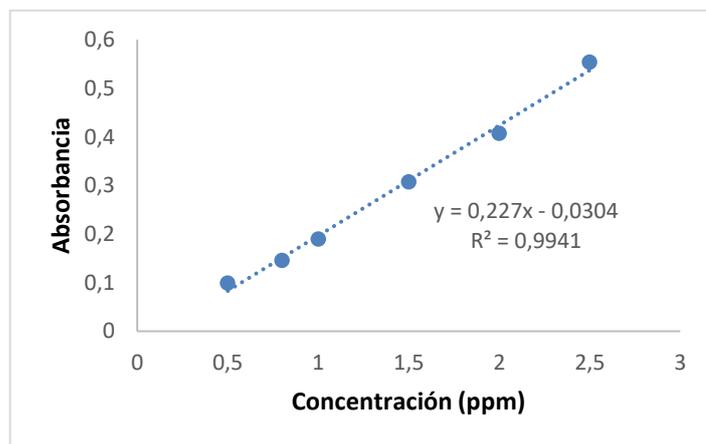
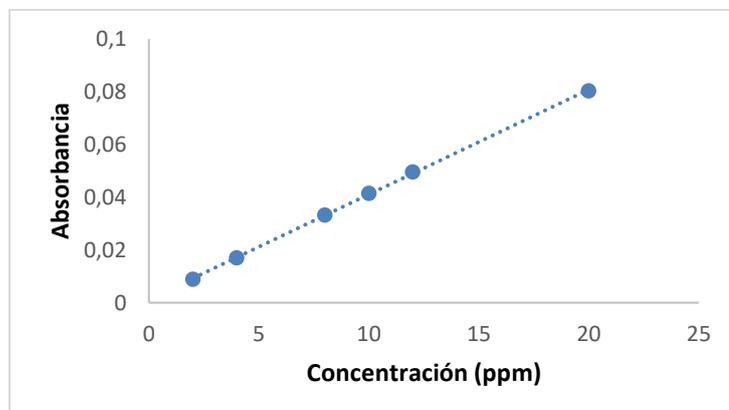
Universidad Nacional de Asunción
Facultad de Ciencias Químicas
Herbario (FCQ)

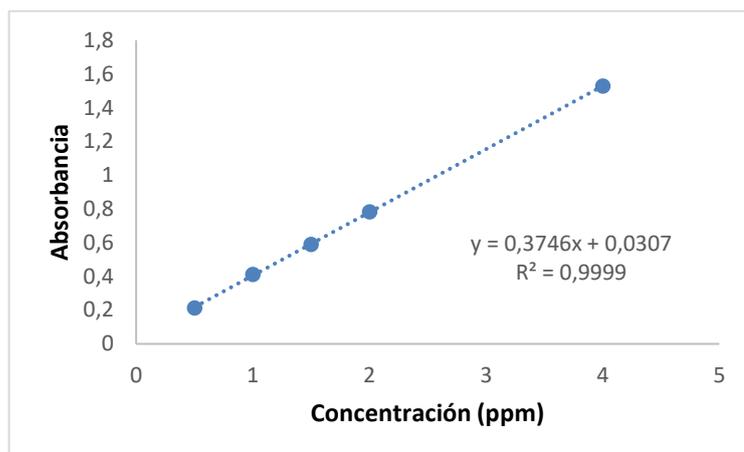
Lupinus chavensis (Lam.)
S.V.: Ayoreo, Bba.
Dpto.: Itapúa, Ayoreo
Cuerpo de Bomberos y Bomberos de la Estancia
Coord.: S 27° 14' 40" W 86° 25' 58"

Alfondo de la FCQ para el
Herbario Nacional de Asunción. Este material es propiedad
de la Universidad Nacional de Asunción.

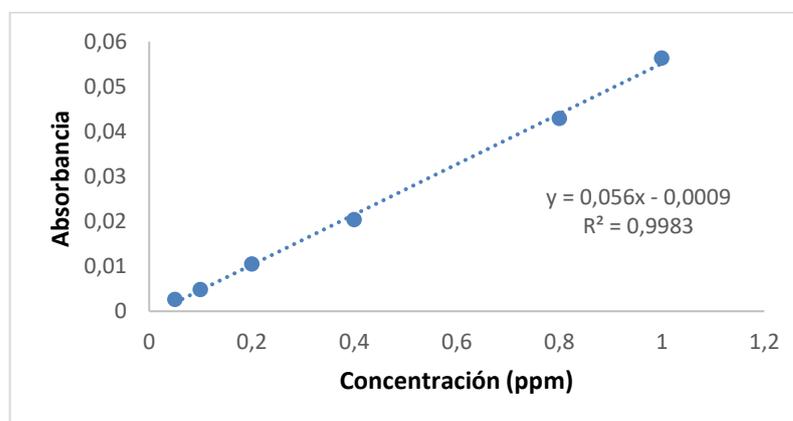
Leg.: B. de la Cruz N. B.
Fecha: 13/04/2014
Proyecto: "Evaluación de la diversidad genética de
las variedades de L. chavensis en la zona de
estancia de la FCQ."

A2. Material de herbario para las muestras Estancia y Ayoreo

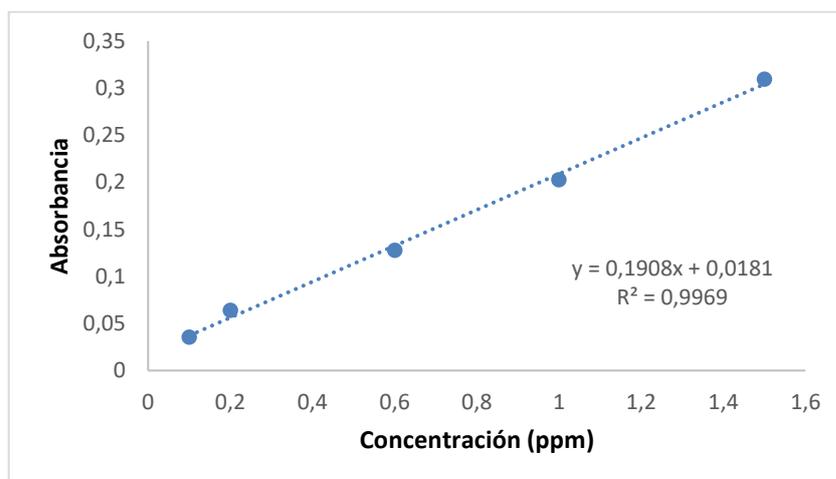
**A3.** Curva de calibración de Sodio**A4.** Curva de calibración de Potasio**A5.** Curva de calibración de Calcio



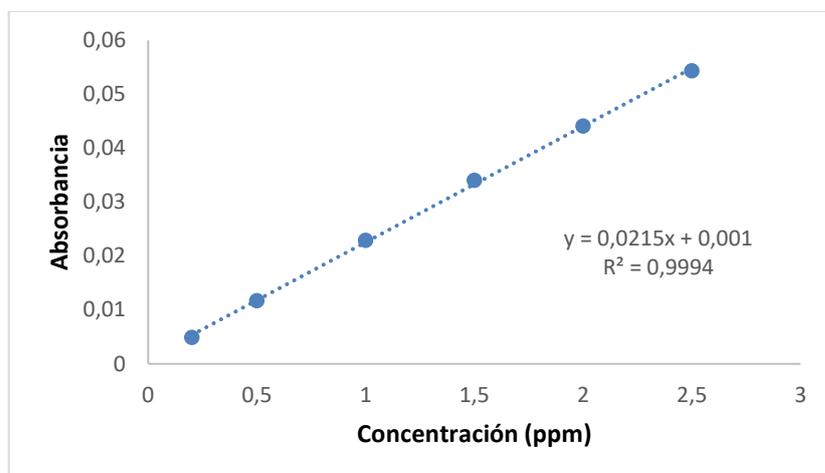
A6. Curva de calibración de Magnesio



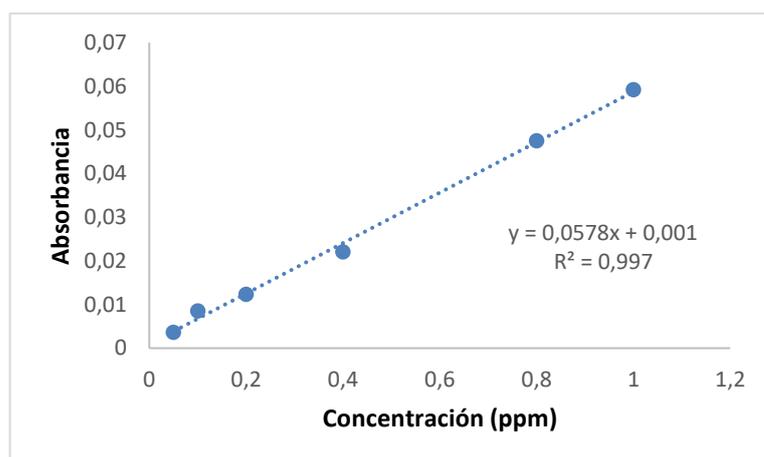
A7. Curva de calibración de Cobre



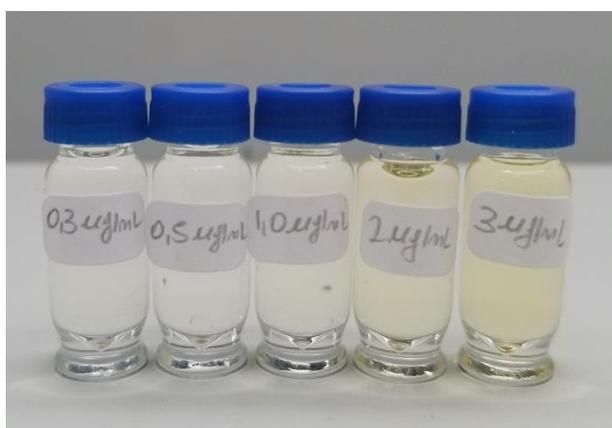
A8. Curva de calibración de Zinc



A9. Curva de calibración de Hierro



A10. Curva de calibración de Manganeseo



A11. Curva de calibración de β -caroteno



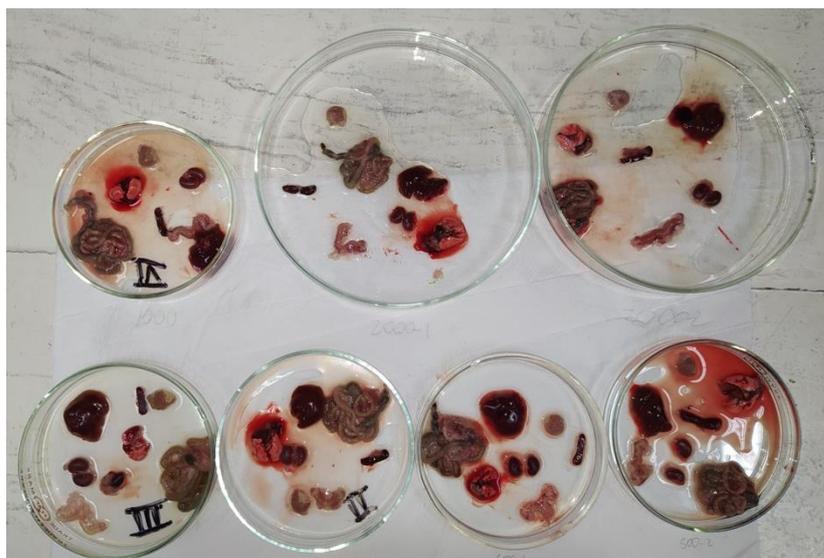
A12. Extractos metanólicos de *C. chacoense* en DMSO con solución fisiológica, control positivo (albendazol 10 mg/mL), control negativo o blanco (DMSO en solución fisiológica), utilizados en la actividad antihelmíntica *in vitro*.



A13. Ratones utilizados en el ensayo de toxicidad aguda del extracto metanólico de los frutos de *C. chacoense*.

ESTUDIO DE COMPORTAMIENTO GENERAL (GROSS BEHAVIOR)														
Fecha: 01/06/20		Muestra: Extracto metanólico C. chucupite M ₁		Animal: Ratonés		Temp: 26°C								
Concentración: 200 mg/ml		Solvente: H ₂ O: 6 lic : 6404		Sexo: Femenino		Humedad: 45%								
Dosis: 2000 mg/kg		Observaciones: M ₁		Hora de inicio: 11:00hs		Hora de determinación: 13:00hs		Realizado por: Eva Cornejo, Yenny Hernández						
Acción	PARAMETROS	CON TROL	TIEMPO DE INYECCIÓN											
			MINUTOS			HORAS		DIAS						
			5	10	20	30	60	4	8	24	48	4	7	
SISTEMAS NERVIOSOS CENTRALES	ESTIMULACIÓN	>MOTILIDAD												
		>F. Respiratoria												
		PILOERECCIÓN			X	X	X	X						
		EXOFTALMIA												
		M ESTEROTIPADOS												
		LAMER PATAS												
		RASCAR LA NARIZ												
		MORDER LA COLA												
		C. CLONICA												
		C TONICA												
	TREMOR FINO													
	T. GROSERO													
	SIALORREA					X	X	X						
	FASCICULACIONES													
	MIDRIASIS													
	ERECCIÓN DE LA COLA													
	TREMOR DE LA COLA													
	D PUPILAR													
	DEPRESIONES	DEPRESIONES	<MOTILIDAD											
			F RESPIRATORIA											
SEDACIÓN														
CATATONIA														
PTOSE PARPEBRAL														
ANALGESIA														
ANESTESIA														
PERD REFLEJO COR														
DIÁMETRO PUPILAR														
ATAXIA														
DISPNEIA														
PASIVIDAD														
ALIENACIÓN AMBIENTE														
<TONO DORSAL														
PER PRESIÓN PATA														
PARÁLISIS POST														
PALIDEZ														
OTROS	OREJA	CIANOSIS												
		HIPEREMIA												
	ORINA	AUMENTADA												
EFECTOS		REDUCIDA												
		COLORACIÓN												
		DIARREA												
EFECTOS		CONTORCIONES												
		REACCIÓN DE FUGA												
EFECTOS		AGRESIVIDAD												
		GRASNIDOS												
Firma														

A14. Tabla de estudio observacional de comportamiento de la dosis de 2000 mg/kg.



A15. Órganos de ratones utilizados en el ensayo de toxicidad aguda del extracto metanólico de los frutos de *C. chacoense* evaluados macroscópicamente.

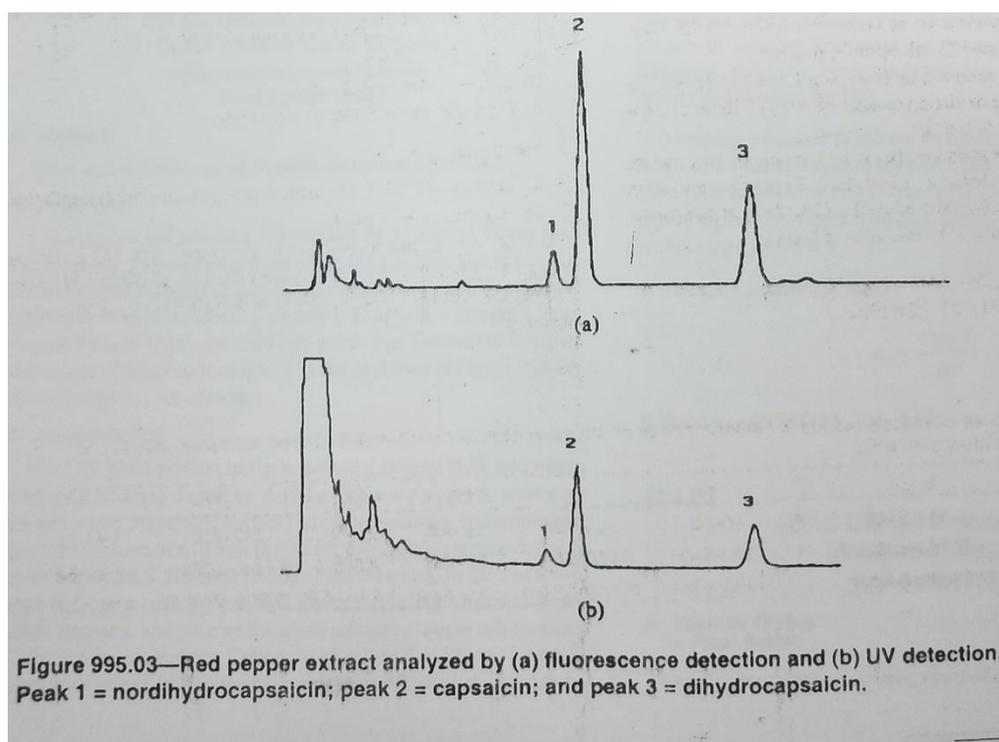


Figure 995.03—Red pepper extract analyzed by (a) fluorescence detection and (b) UV detection. Peak 1 = nordihydrocapsaicin; peak 2 = capsaicin; and peak 3 = dihydrocapsaicin.

A16. Cromatograma de capsacinoides publicados en la AOAC (2000) (Horwitz, 2000)

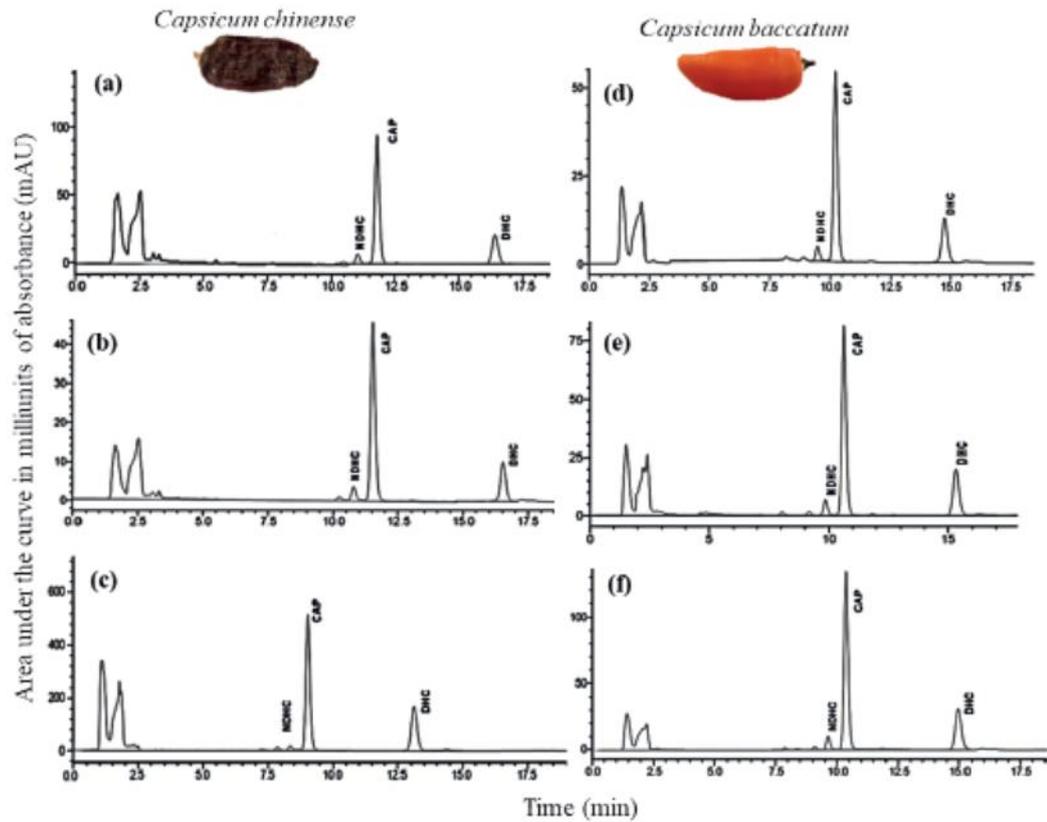


Figure 2. Chromatogram showing the capsaicinoids in the pericarp (a), seeds (b) and placenta (c) of *Capsicum chinense* fruits; and in the pericarp (d), seeds (e) and placenta (f) of *C. baccatum* fruits. NDH: nordihydrocapsaicin; CAP: capsaicin; DHC: dihydrocapsaicin. Note the high absorbance value (mAU) for the placenta of *C. chinense* and *C. baccatum* fruits (c), indicating the high concentration of capsaicin, differently from the others.

A17. Cromatograma de capsacinoides en *C. chinense* y *C. baccatum* publicados por Gavilan Guillen et al. (2018).

REFERENCIAS

- Adamu, H. M., Abayeh, O. J., Agho, M. O., Abdullahi, A. L., Uba, A., Dukku, H. U., & Wufem, B. M. (2005). An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.025>
- Alangui, W. V., Hill, R., Aumeeruddy-thomas, Y., Bridgewater, P., Thaman, R., Yao, C. Y. A., Tengo, M., Berkes, F., Carino, J., Carneiro, M., Figueroa, V. E., Diaw, M. C., Di, S., Fisher, J., Hardison, P., Ichikawa, K., Kariuki, P., Karki, M., Lyver, P. O. B., ... Perez, E. (2020). Working with indigenous , local and scientific knowledge in assessments of nature and nature ’ s linkages with people , i g. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 43, 8–20. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2019.12.006>
- Ananthan, R., Subhash, K., & Longvah, T. (2018). Capsaicinoids, amino acid and fatty acid profiles in different fruit components of the world hottest Naga king chilli (*Capsicum chinense* Jacq). *Food Chemistry*, 238, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.073>
- Basu, S. K., De, A. K., & De, A. (2003). Capsicum: Historical and botanical perspectives. In A. K. De (Ed.), *Capsicum: The genus Capsicum* (pp. 1–15). Taylor & Francis.
- Bhattacharya, S. (2014). Bioprospecting, Biopiracy and Food Security in India: The Emerging Sides of Neoliberalism. *International Letters of Social and Humanistic Sciences*, 23, 49–56. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilshs.23.49>
- Bosland, P. W. (1996). Capsicums: Innovative Uses of an Ancient Crop. In *Progress in new crops*. (J. Janick, pp. 479–487). ASHS Press.
- British Toxicology Society Working Party on Toxicity. (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicology*, 3(2), 1984.
- Budakert, G. C. (2006). PEPPER TAXONOMY AND THE BOTANICAL DESCRIPTION. *Acta Agronomica Hungarica*, 54(2), 151–166.

<https://doi.org/10.1556/AAgr.54.2006.2.5>

- Cáceres, A. L., Flores-giubi, M. E., Romero-rodríguez, M. C., & Alvarenga, N. L. (2017). In vitro anthelmintic activity and chemical composition of methanol extracts and fractions of *Croton paraguayensis* and *Vernonia brasiliensis* against *Eisenia fetida*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7(2), 71–74.
- Chatterjee, S., Asakura, M., Chowdhury, N., Neogi, S. B., Sugimoto, N., Haldar, S., Awasthi, S. P., Hinenoya, A., Aoki, S., & Yamasaki, S. (2010). Capsaicin, a potential inhibitor of cholera toxin production in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letters*, 306(1), 54–60. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01931.x>
- 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, 61–70.
- De Lucca, A. J., Bland, J. M., Vigo, C. B., Cushion, M., Selitrennikoff, C. P., Peter, J., & Walsh, T. J. (2002). CAY-1, a fungicidal saponin from *Capsicum* sp. fruit. *Medical Mycology*, 40(2), 131–137. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.2.131.137>
- DellaPenna, D., & Pogson, B. J. (2006). VITAMIN SYNTHESIS IN PLANTS: Tocopherols and Carotenoids. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 711–738. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301>
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products : a biosynthetic approach* (3ra Editio). John Wiley & Sons Ltd.
- Domínguez, F., Alonso-Castro, A. J., González-Trujano, M. E. A., Salgado-Ceballos, H., & Orozco-Suárez, S. (2015). Mexican traditional medicine: Traditions of yesterday and phytomedicines for tomorrow. In R. M. Duarte MCT (Ed.), *Therapeutic Medicinal Plants: From Lab to the Market* (pp. 10–46). CRC Press.
- Dreywood, R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical*, 8(18), 499–499.
- Echagüe, G., Díaz, V., Mendoza, L., Mongelos, P., Giménez, G., Paez, M., Laspinal, F., Castro, A., Rodríguez, M. I., Araújo, P., Castro1, W., , Ramón Marecos2 ,

- Santiago Evers², Gerardo Deluca³, A. P., & . (2015). Estado nutricional y aspectos alimentarios de mujeres indígenas del departamento de. *Revista de La Universidad Industrial de Santander*, 47(3), 271–280.
- Egea, I., Barsan, C., Bian, W., Purgatto, E., Latché, A., Chervin, C., Bouzayen, M., & Pech, J. C. (2010). Chromoplast differentiation: Current status and perspectives. *Plant and Cell Physiology*, 51(10), 1601–1611. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq136>
- Eich, E. (2008). Capsaicinoids. In S.-V. B. Heidelberg & This (Eds.), *Solanaceae and convolvulaceae: Secondary Metabolites* (pp. 282–291).
- El-sayed Embaby, H., & Mohamed Mokhtar, S. (2011). Chemical Composition and Nutritive Value of Lantana and Sweet Pepper Seeds and Nabak Seed Kernels. *Journal of Food Science*, 76(5), C736–C741. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02166.x>
- Elsam, J. D. E., Cespedes, G., Peña-Chocarro, M. del C., Mereles, F., & Mendoza, C. (2018). *Recursos Fitogenéticos del Paraguay. Sinopsis, Atlas y Estado de Conservación de los parientes silvestres de Importancia para la Alimentación y la Agricultura. Parte 1* (R. S. E. 4 (ed.)).
- Elujoba, A. A., Odeleye, O., & Ogunyemi, C. (2006). Traditional medicine development for medical and dental primary health care delivery system in Africa. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines (AJTCAM)*, 2, 46–61.
- FAO. (2020). *FAOSTAT CULTIVOS*. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>
- Fraenkel, L., Bogardus, S. T., Concato, J., & Wittink, D. R. (2004). Treatment Options in Knee Osteoarthritis. *Archives of Internal Medicine*, 164(12), 1299. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.12.1299>
- García, C. C. (2011). Fruit characteristics, seed production and pollen tube growth in the wild chilli pepper *Capsicum flexuosum*. *Flora*, 206, 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.05.008>

- Gassmann, W., Dahlbeck, D., Chesnokova, O., Minsavage, G. V, Jones, J. B., & Staskawicz, B. J. (2000). Molecular Evolution of Virulence in Natural Field Strains of *Xanthomonas campestris* pv . *vesicatoria*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 182(24), 7053–7059.
- Gavilan Guillen, N., Tito, R., & Mendoza, N. G. (2018). Capsaicinoids and pungency in *Capsicum chinense* and *Capsicum baccatum* fruits. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 48(3), 237–244.
- Gilardi, P., Garcı, I., & Serra, M. T. (2004). The coat protein of tobamovirus acts as elicitor of both L 2 and L 4 gene-mediated resistance in *Capsicum*. *Journal of General Virology*, 85(May), 2077–2085. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80017-0>
- Grandgirard, J., Poinso, D., Krespi, L., Nénon, J. P., & Cortesero, A. M. (2002). Costs of secondary parasitism in the facultative hyperparasitoid *Pachycrepoideus dubius*: Does host size matter? *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 103(3), 239–248. <https://doi.org/10.1023/A>
- Greenfield, H., & Southgate, D. A. T. (2006). *Datos de composición de alimentos* (FAO (ed.); 2da ed.). Publishers, Elsevier Science.
- Guil-Guerrero, J. L., Martines-Guirado, C., Reboloso-Fuentes, M. del M., & Carrique-Perez, A. (2006). Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *Eur Food Res Technol* (2006), 224, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0281-5>
- Guil-layne, J. L., & Guil-guerrero, J. L. (2019). Industrial Crops & Products Bioprospecting for seed oils in tropical areas for biodiesel production. *Industrial Crops & Products*, 128(June 2018), 504–511. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.044>
- Guinness World Records. (2017). *Hottest chilli pepper*. <https://www.guinnessworldrecords.com/world-records/hottest-chili>
- Guzman, Oi., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P. W., & O’Connell, M. A. (2011). Variability of Carotenoid Biosynthesis in Orange Colored *Capsicum* spp. *Plant Science*, 179(1–2), 49–59.

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.014.Variability>

- Hassan, M. H., Edfawy, M., Mansour, A., & Hamed, A. A. (2012). Antioxidant and antiapoptotic effects of capsaicin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 28(5), 428–438. <https://doi.org/10.1177/0748233711413801>
- Heiser, C. B. (1976). Peppers. In *Evolution of crop plants, Book title* (pp. 265–268).
- Horwitz, W. (2000). *Official methods of analysis of AOAC International* (17th ed.).
- Howard, L. R., Talcott, S. T., Brenes, C. H., & Villalon, B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum* species) as influenced by maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1713–1720. <https://doi.org/10.1021/jf990916t>
- Hsu, Y. J., Huang, W. C., Chiu, C. C., Liu, Y. L., Chiu, W. C., Chiu, C. H., Chiu, Y. S., & Huang, C. C. (2016). Capsaicin supplementation reduces physical fatigue and improves exercise performance in mice. *Nutrients*, 8(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu8100648>
- Huang, W., Cheang, W. S., Wang, X., Lei, L., Liu, Y., Ma, K. Y., Zheng, F., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2014). Capsaicinoids but not their analogue capsinoids lower plasma cholesterol and possess beneficial vascular activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(33), 8415–8420. <https://doi.org/10.1021/jf502888h>
- Hunziker, A. T. (1950). Estudios sobre Solanaceae . I . Sinopsis de las especies silvestres de *Capsicum* : de Argentina y Paraguay. *Instituto de Botánica Darwinion*, 9(2), 225–247.
- Ibiza, V. P., Cañizares, J., & Nuez, F. (2010). EcoTILLING in *Capsicum* species : searching for new virus resistances. *Bio Med Central Genomic*, 11, 1–15.
- Iorizzi, M., Lanzotti, V., Ranalli, G., De Marino, S., & Zollo, F. (2002). Antimicrobial furostanol saponins from the seeds of *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4310–4316. <https://doi.org/10.1021/jf0116911>

- Ito, C., Miyamoto, Y., Rao, K.S., Furukawa, H. (2002). NII-Electronic Library Service. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 57, 364–370. <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
- Jang, J., Devort, D. E., Logsdon, D. L., & Ward, J. M. (1992). (*Capsicum Annuum*) in *Male B6C3Fi Mice*. 30(9), 783–787.
- Javier, A., & Alvarez, H. (2018). Potential Phytopharmacy and Food Applications of *Capsicum* spp .: A Comprehensive Review. *Natural Product Communications*, 13(11), 1543–1556.
- Jolayemi, A. T., & Ojewole, J. A. O. (2014). Comparative anti-inflammatory properties of capsaicin and ethyl-acetate extract of *capsicum frutescens* linn [Solanaceae] in rats. *Capsaicin: Food Sources, Medical Uses and Health Implications*, 13(2), 357–361.
- Jones, N. L., Shabib, S., & Sherman, P. M. (1997). Capsaicin as an inhibitor of the growth of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*, 146(2), 223–227. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(96\)00480-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(96)00480-6)
- Kalia, N. P., Mahajan, P., Mehra, R., Nargotra, A., Sharma, J. P., Koul, S., & Khan, I. A. (2012). Capsaicin, a novel inhibitor of the NorA efflux pump, reduces the intracellular invasion of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(10), 2401–2408. <https://doi.org/10.1093/jac/dks232>
- Kamal, A. T. M. M., Ashfak, K., Chowdhury, A., Chy, H., Shill, L. K., Chowdhury, S., Hossen, A., & Habib, M. Z. (2015). Evaluation of anthelmintic activity of seeds of *Sesamum indicum* L . and fruits of *Capsicum frutescens* L . *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 2015;, 3(6), 256–259.
- Khan, F. A., Mahmood, T., Ali, M., Saeed, A., & Maalik, A. (2014a). Pharmacological importance of an ethnobotanical plant : *Capsicum annuum* L . *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.895723>
- Khan, F. A., Mahmood, T., Ali, M., Saeed, A., & Maalik, A. (2014b). Pharmacological

- importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. *Natural Product Research*, 28(16), 1267–1274.
- Kim, E. H., Lee, S. Y., Baek, D. Y., Park, S. Y., Lee, S. G., Ryu, T. H., Lee, S. K., Kang, H. J., Kwon, O. H., Kil, M., & Oh, S. W. (2019). A comparison of the nutrient composition and statistical profile in red pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) based on genetic and environmental factors. *Applied Biological Chemistry*, 62(48), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0456-y>
- Kim, E. H., Lee, S. Y., Baek, D. Y., Soo Yun, P., Lee, S. G., Ryu, T. H., Lee, S. K., Kang, H. J., Kwon, O. H., Kil, M., & Oh, S.-W. (2019). Una comparación de la composición de nutrientes y el perfil estadístico en frutos de pimiento rojo (*Capsicum annuum* L.) basado en factores genéticos y ambientales. Resumen. *Applied Biological Chemistry*, 62(48), 1–27.
- Knudsen, K. E. B. (2001). The nutritional significance of dietary fibre analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 90, 3–20.
- Kobata, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., & Watanabe, T. (1998). Novel Capsaicinoid-like Substances, Capsiate and Dihydrocapsiate, from the Fruits of a Nonpungent Cultivar, CH-19 Sweet, of Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Review Literature And Arts Of The Americas*, 46(5), 6–8.
- Kumar, P., Deb, U., & Kaushik, M. P. (2012). Evaluation of oleoresin capsicum of *Capsicum frutescens* var. Nagahari containing various percentages of capsaicinoids following inhalation as an active ingredient for tear gas munitions. *Inhalation Toxicology*, 24(10), 659–666. <https://doi.org/10.3109/08958378.2012.709547>
- Leister, R. T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O., & Staskawicz, B. J. (2005). Molecular Genetic Evidence for the Role of SGT1 in the Intramolecular Complementation of Bs2 Protein Activity in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 17, 1268–1278. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.029637.proteins>
- Li, J., Wang, R., & Xiao, C. (2014). Association between chilli food habits with iron status and insulin resistance in a chinese population. *Journal of Medicinal Food*, 17(4), 472–478. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2748>

- Lightbourn, G. J., Griesbach, R. J., Novotny, J. A., Clevidence, B. A., Rao, D. D., & Stommel, J. R. (2008). Effects of anthocyanin and carotenoid combinations on foliage and immature fruit color of *Capsicum annuum* L. *Journal of Heredity*, 99(2), 105–111. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm108>
- Loizzo, M. R., Pugliese, A., Bonesi, M., Menichini, F., & Tundis, R. (2015). Evaluation of chemical profile and antioxidant activity of twenty cultivars from *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chacoense* and *Capsicum chinense*: A comparison between fresh and processed peppers. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.042>
- López, P., Gorzalczany, S., Acevedo, C., Alonso, R., & Ferraro*, G. (2012). Chemical study and anti-inflammatory activity of *Capsicum chacoense* and *C. baccatum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22(2), 455–458.
- Maharijaya, A., Vosman, B., Pelgrom, K., Wahyuni, Y., & Vos, R. C. H. De. (2019). Genetic variation in phytochemicals in leaves of pepper (*Capsicum*) in relation to thrips resistance. *Arthropod-Plant Interactions*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11829-018-9628-7>
- Martínez, G. J., & Barboza, G. E. (2010). Natural pharmacopoeia used in traditional Toba medicine for the treatment of parasitosis and skin disorders (Central Chaco, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 132, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.049>
- Martinez, S., Curros, A., Bermudez, J., Carballo, J., & Franco, I. (2007). The composition of Arnoia peppers (*Capsicum annuum* L.) at different stages of maturity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(2), 150–161. <https://doi.org/10.1080/09637480601154095>
- Martinez Torres, H. (2007). *Etnobotánica del chile quipín (Capsicum annuum var. glabriusculum) en la Sierra Gorda y Semidesierto de Querétaro*. (Issue July).
- Mazourek, M., Pujar, A., Borovsky, Y., Paran, I., Mueller, L., & Jahn, M. M. (2009). A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology*, 150(4),

1806–1821. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136549>

Meckelmann, S. W., Jansen, C., Riegel, D. W., Zonneveld, M. Van, Ríos, L., Peña, K., & Mueller, E. (2015). Phytochemicals in native Peruvian *Capsicum pubescens* (Rocoto). *European Food Research and Technology*, 241(6), 817–825. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2506-y>

Meckelmann, S. W., Riegel, D. W., Zonneveld, M. J. Van, Llerme, R., Pen, K., Ugas, R., Quinonez, L., Mueller-seitz, E., & Petz, M. (2013). Compositional Characterization of Native Peruvian Chili Peppers (*Capsicum* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2530–2537.

Real Decreto 17344,1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales para experimentación y otros fines científicos, 34367 (2005).

Montani, M. C., & Scarpa, G. F. (2016). RECURSOS VEGETALES Y PRÁCTICAS ALIMENTARIAS ENTRE INDÍGENAS TAPIETE DEL NORESTE DE LA PROVINCIA DE SALTA, ARGENTINA. *Darwiniana*, 4(1), 12–30. <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2016.41.684>

Morales-Soto, A., Gómez-Caravaca, A. M., García-Salas, P., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). High-performance liquid chromatography coupled to diode array and electrospray time-of-flight mass spectrometry detectors for a comprehensive characterization of phenolic and other polar compounds in three pepper (*Capsicum annuum* L.) samples. *Food Research International*, 51(2), 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.022>

Mudric, S. Z., Gašić, U. M., Dramicamin, A. M., Z˘.Ciric, I., Milojkovic´-Opsenica, D. M., Popovic´-Đordevic, J. B., Momirovic, N. M., & Tešić, Z. L. (2017). The polyphenolics and carbohydrates as indicators of botanical and geographical origin of Serbian autochthonous clones of red spice paprika. *Food Chemistry*, 217, 705–715. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.038>

Nag, M., Chanda, J., Biswas, R., Al-dhabi, N. A., & Duraipandiyan, V. (2017). Validation of Capsaicin in Indian *Capsicum* Species Through RP-HPLC. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(2), 337–342. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.2.40>

- Nair, Y. L., & G., M. (2014). Capsaicinoids in the Hottest Pepper Bhut Jolokia and its Antioxidant and Antiinflammatory Activities. *Natural Product Communications*, 9(8), 91–94. <https://doi.org/10.1177/1934578x1801300928>
- National Center for Biotechnology Information. (2020, September). *PubChem*. NCBI. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- OECD. (2008). Test No. 425: acute oral toxicity: up-and-down procedure. In *OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4* (Issue 425, p. 2008). <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264071049>
- Ogunlade, I., Alebiosu, A. A., & Osasona, A. I. (2012). Proximate , mineral composition , antioxidant activity , and total phenolic content of some pepper varieties (*Capsicum* species). *International Formulae Group.*, 6(5), 2221–2227.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati1, M. (2007). Alimentos funcionales : fibra , prebióticos , probióticos y simbióticos. *DIAETA*, 25(121), 20–33.
- Orellana-Escobedo, L., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Ornelas-Paz, J. J., & Sepulveda, D. R. (2013). Capsaicinoids content and proximate composition of Mexican chili peppers (*Capsicum* spp .) cultivated in the State of Chihuahua. *CyTA - Journal of Food ISSN:*, 11(2), 179–184. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.716082>
- Otunola, G. A., Oloyede, O. B., Oladiji, A. T., & Afolayan, A. J. (2010). Comparative analysis of the chemical composition of three spices – *Allium sativum* L . *Zingiber officinale* Rosc . and *Capsicum frutescens* L . commonly consumed in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 9(41), 6927–6931. <https://doi.org/10.5897/AJB10.183>
- Park, S., Jeong, W. Y., Lee, J. H., Kim, Y. H., Jeong, S. W., Kim, G. S., Bae, D. W., Lim, C. S., Jin, J. S., Lee, S. J., & Shin, S. C. (2012). Determination of polyphenol levels variation in *Capsicum annuum* L. cv. Chelsea (yellow bell pepper) infected by anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 130(4), 981–985. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.026>

- Parvez, M. (2018). CURRENT ADVANCES IN PHARMACOLOGICAL ACTIVITY AND TOXIC EFFETCS OF VARIOUS CAPSICUM SPECIES. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(5), 1900–1912. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(5\).1900-12](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(5).1900-12)
- Perez Leonard, H. (2006). Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar Cuba Pérez*, XL(3), 20–28.
- Perry, L., Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, D. M., Piperno, D. R., Berman, M. J., Cooke, R. G., Rademaker, K., Ranere, A. J., Raymond, J. S., Sandweiss, D. H., & Scaramelli, F. (2007). Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science*, 315, 986–988. <https://doi.org/10.1126/science.1136914>
- Pharmacoidgy, E.-, & Cichewicz, H. (1996). The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 8741(1984), 61–70.
- Polini, G., & Lopez, R. R. (2013). *Comer del monte. Plantas útiles del Chaco Central* (Cooperazione Internazionale (COOPI) - Paraguay (ed.)).
- Pugliese, A., Callaghan, Y. O., Tundis, R., Galvin, K., Menichini, F., Brien, N. O., & Loizzo, M. R. (2014). In vitro Assessment of the Bioaccessibility of Carotenoids from Sun-Dried Chilli Peppers. *Plant Foods Hum Nutr*, 69, 8–17. <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0397-2>
- Pugliese, A., Rosa, M., Tundis, R., Callaghan, Y. O., Galvin, K., Menichini, F., & Brien, N. O. (2013). The effect of domestic processing on the content and bioaccessibility of carotenoids from chili peppers (*Capsicum* species). *Food Chemistry*, 141(3), 2606–2613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.046>
- Re, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(98), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Restrepo Gallego, M. (2006). Oleorresinas de capsicum en la industria alimentaria. *Revista Lasallista de Investigación*, 3(2), 43–47.
- Rosso, C. N., & Scarpa, G. F. (2017). Etnobotánica de la alimentación entre los indígenas moqoit actuales de la provincia del chaco (Argentina) y comparación con fuentes históricas de los siglos XVIII y XX. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 52(4), 827–840.
- Sadasivam, S., & Manikkam, A. (1992). *Carotenes*. In *Biochemical methods for agricultural sciences* (Wiley East).
- Sanabria Galindo, A. (1983). *Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae* (Universidad).
- Saur Palmieri, V., & Geisa, M. G. (2019). M. G. Geisa - Plantas comestibles en comunidades comechingonas las Plantas comestibles empleadas por las comunidades comechingonas de san marcos sierras (Córdoba, Argentina). Primeras aproximaciones. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 54, 295–310.
- Scarpa, G. F. (2000). PLANTS EMPLOYED IN TRADITIONAL VETERINARY MEDICINE BY THE CRIOLLOS OF THE NORTHWESTERN ARGENTINE CHACO. *Darwiniana*, 38(3–4), 253–265.
- Scarpa, G. F. (2004). Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(December 2003), 115–135. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.12.003>
- Schulze, B., & Spiteller, D. (2009). Capsaicin: Tailored chemical defence against unwanted “frugivores.” *ChemBioChem*, 10(3), 428–429. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800755>
- Scoville, W. (1912). Note on capsicums. *American Pharmaceutical Association*, 453–454.
- Silveira, A. M., Faustino, S. M. M., & Cunha, A. C. (2019). Bioprospection of biocompounds and dietary supplements of microalgae with immunostimulating activity: A comprehensive review. *PeerJ*, 2019(10).

<https://doi.org/10.7717/peerj.7685>

- Simonovska, J., Rafajlovska, V., Kavrakovski, Z., & Srbinoska, M. (2014). NUTRITIONAL AND BIOACTIVE COMPOUNDS IN HOT FRUITS OF CAPSICUM ANNUUM L . FROM MACEDONIA. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 33(1), 97–104.
- Simonovska, J., Škerget, M., Knez, Ž., Srbinoska, M., & Kavrakovski, Z. (2016). PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOACTIVE COMPOUNDS OF STALK FROM HOT FRUITS OF CAPSICUM ANNUUM L . *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 35(2), 199–208. <https://doi.org/10.20450/mjce.2016.944>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>
- Souyoul, S. A., Saussy, K. P., & Lupo, M. P. (2018). Nutraceuticals : A Review. *Dermatology and Therapy*. <https://doi.org/10.1007/s13555-018-0221-x>
- Stellari, G. M., Mazourek, M., & Jahn, M. M. (2009). Contrasting modes for loss of pungency between cultivated and wild species of Capsicum. *Heredity*, 104(5), 460–471. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.131>
- Stewart, C., Mazourek, M., Stellari, G. M., O’Connell, M., & Jahn, M. (2007). Genetic control of pungency in *C. chinense* via the Pun1 locus. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 979–991. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl243>
- Suárez, M. E. (2019). Medicines in the forest: ethnobotany of wild medicinal plants in the pharmacopeia of the Wichí people of Salta province (Argentina). *Journal of Ethnopharmacology*, 231, 525–544. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.026>
- Tai, T. H., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M. C., Stall, R. E., & Staskawicz, B. J. (1999). Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Plant Biology*, 96(24), 14153–14158.
- Takano, F., Yamaguchi, M., Takada, S., Shoda, S., Yahagi, N., Takahashi, T., & Ohta,

- T. (2007). Capsicum ethanol extracts and capsaicin enhance interleukin-2 and interferon-gamma production in cultured murine Peyer ' s patch cells ex vivo. *Life Sciences*, *80*, 1553–1563. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.01.031>
- Tamayo, A. B., Abanes, M. A. D., Biscocho, C. J. D., & Comia, N. J. A. (2014). *Hepatoprotective activity of methanolic extract of Capsicum frutescens (siling labuyo) against isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats*. *8*, 109–127.
- The Plant List. (2013). *Capparaceae*. <Http://Www.Theplantlist.Org>. <https://doi.org/http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Capparaceae/>
- Topuz, A., & Ozdemir, F. (2007). Assessment of carotenoids , capsaicinoids and ascorbic acid composition of some selected pepper cultivars (*Capsicum annuum* L .) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2007.03.007>
- Tripathi, S., & Mishra, H. N. (2009). NUTRITIONAL CHANGES IN POWDERED RED PEPPER UPON IN VITRO INFECTION OF ASPERGILLUS FLAVUS. *Brazilian Journal of Microbiology*, *40*, 139–144.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F., Bonesi, M., Conforti, F., Statti, G., de Luca, D., de Cindio, B., & Menichini, F. (2011). Comparative Study on the Chemical Composition, Antioxidant Properties and Hypoglycaemic Activities of Two *Capsicum annuum* L. Cultivars (*Acuminatum* small and *Cerasiferum*). *Plant Foods for Human Nutrition*, *66*(3), 261–269. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0248-y>
- UNESCO. (2019). *Biodiversidad*. <https://es.unesco.org/themes/educacion-desarrollo-sostenible/diversidad>
- Vinayaka, K., Nandini, K., RakShitha, M., Marti, S., Ramya, J., Shruthi, V., Kekuda, T. P., & Raghavendra, H. (2013). Proximate Composition , Antibacterial and Anthelmintic Activity of *Capsicum frutescens* (L .) Var . Longa (Solanaceae) Leaves. *Pharmacognosy Journal*, *2*(12), 486–491.
- Von Borowski, R. G., Zimmer, K. R., Leonardi, B. F., Trentin, D. S., Silva, R. C., de

- Barros, M. P., Macedo, A. J., Gnoatto, S. C. B., Gosmann, G., & Zimmer, A. R. (2019). Red pepper *Capsicum baccatum*: source of antiadhesive and antibiofilm compounds against nosocomial bacteria. *Industrial Crops and Products*, *127*(June 2018), 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.011>
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Tikunov, Y., de Vos, R. C. H., Pelgrom, K. T. B., Maharijaya, A., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2013). Metabolomics and molecular marker analysis to explore pepper (*Capsicum* sp.) biodiversity. *Metabolomics*, *9*(1), 130–144. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0432-6>
- Wahyuni, Y., Ballester, A., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., & Bovy, A. G. (2013). Secondary Metabolites of *Capsicum* Species and Their Importance in the Human Diet. *Journal of Natural Products*, *76*, 783–793.
- Wall, M. M., Waddell, C. A., & Bosland, P. W. (2001). Variation in β -Carotene and Total Carotenoid Content in Fruits of *Capsicum*. *HORT SCIENCE*, *36*(4), 746–749.
- Yamasaki, S., Asakura, M., Neogi, S. B., Hinenoya, A., & Iwaoka, E. (2011). Inhibition of virulence potential of *Vibrio cholerae* by natural compounds. *Indian Journal of Medical Research*, *133*(2), 232–239.
- Yazawa, S., Suetom, N., Okamoto, K., & Naniki, T. (1989). Content of Capsaicinoids and Capsaicinoid-like Substances in Fruit of Pepper (*Capsicum annuum* L.) Hybrids Made with Δ^1 -THC-19 Sweet Δ^1 -THC as a Parent. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *58*(3), 601–607. <https://doi.org/10.2503/jjshs.58.601>
- Zheng, W., Hu, L., Hu, D., & Fang, Y. (2019). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* (*Capsicum annuum*) Products by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection (HPLC-FLD). *Agricultural Biotechnology*, *8*(1), 185–187.
- Zimmer, A. R., Leonardi, B., Miron, D., Schapoval, E., Oliveira, J. R. De, & Gosmann, G. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*,

139(1), 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.11.005>

Zou, Y., Ma, K., & Tian, M. (2015). Chemical composition and nutritive value of hot pepper seed (*Capsicum annuum*) grown in Northeast Region of China. *Food Science and Technology*, 35(4), 659–663. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6803>