

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**CARACTERIZACIÓN QUÍMICO-NUTRICIONAL Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE DOS MUESTRAS DE *Capsicum pubescens*
("Rocoto rojo y amarillo") PROVENIENTES DE VILLA RICA (Pasco)**

BETTZABE ALCIRA VILLAVICENCIO DOMINGUEZ

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

LIMA-PERÚ

2016

Asesora

Rosario Elena Rojas Durán MD, PhD

Miembros del Jurado

José Aliaga Arauco

Graciela Untiveros Bermúdez

Luz Marina Pacheco Lechuga

Dedicatoria

El presente trabajo lo dedico a mis padres por ser mi mayor fortaleza porque pese a la distancia nunca estuvieron lejos, por sus consejos y alientos en cada etapa de mi vida; así mismo a mi hermana menor que dentro de su locura sana me brinda ánimo para seguir adelante, a mis tíos (Edgar y Olinda) por su apoyo incondicional y su tiempo para escuchar cada una de mis experiencias.

A mi abuelito Pompilio Villavicencio quién es mi ángel y me acompaña en todo momento, a mis dos abuelitas por su cariño y preocupación; a mi tío que descansa en paz y me da la fuerza necesaria para seguir adelante por mi pequeña Camila; así mismo a Bayron Ortiz Villafana quién estuvo conmigo durante toda mi carrera, dándome su apoyo incondicional, comprensión y cariño.

Agradecimiento

A mis padres por ser esa fuerza externa para seguir adelante cumpliendo cada uno de mis objetivos, a mi asesora por permitirme poder formar parte de su equipo de trabajo y orientarme constantemente, pero sobre todo por su amistad la cual valoro y respeto, a Kirti Patel por su apoyo constante y ser la “mama” que corrige para bien, por su entusiasmo y perseverancia.

Candy, Fabio y David quienes me brindaron su amistad y apoyo en cada uno de los experimentos que realicé; así mismo la orientación que me brindaron respecto al uso de equipos e instrumentos.

A la Escuela de Farmacia y Bioquímica y de manera especial al Sr. Omar por facilitarme el uso de equipos para poder llevar a cabo este trabajo, también a la Escuela de Química por prestarnos algunos equipos e instalaciones.

A mis amigos Rosa, Diana y Raúl por todo su apoyo y las experiencias vividas todos los días en el Laboratorio.

Betzabe Villavicencio Dominguez

LISTA DE TABLAS

Tabla 1:	Características fenotípicas de <i>Capsicum pubescens</i> provenientes de Villa Rica (Pasco).....	09
Tabla 2:	Análisis Proximal de frutos de <i>Capsicum pubescens</i> (base seca).....	21
Tabla 3:	Contenido de capsaicinoides en las 2 muestras de rocoto.....	23
Tabla 4:	Contenido de compuestos fenólicos totales en <i>Capsicum pubescens</i>	24
Tabla 5:	Contenido total de flavonoides en <i>Capsicum pubescens</i>	25
Tabla 6:	Actividad Antioxidante de <i>Capsicum pubescens</i>	26

LISTA DE FIGURAS

Figura1:Partes de un fruto del género Capsicum	04
Figura2:Estructura química de capsaicina y dihidrocapsaicina	04
Figura3:Estructura química de quercetina, apigenina, kaempferol y luteolina	05
Figura4:Frutos maduros de Rocoto rojo.....	09
Figura5:Frutos maduros de Rocoto amarillo.....	10
Figura 6:Curva de calibración de capsaicina.....	22
Figura 7:Curva de calibración de dihidrocapsaicina.....	22
Figura 8:Curva de calibración de ácido gálico.....	23
Figura 9:Curva de calibración de quercetina.....	24
Figura 10: Curva de calibración de luteolina.....	25
Figura 11:Curva de calibración de apigenina.....	25
Figura 12:Curva de calibración de kaempferol.....	25
Figura 13:Curva de disminución de fluorescencia en presencia de un agente generador de radicales libre.....	25

ABREVIATURAS

ADEX	: Asociación de Exportadores
AG	: Ácido gálico
AOAC	: Association of Analytical Communities
AAPH	: 2,2´azobis(2-amidinopropano)
DAD	: Diode Array Detector (Detector de Arreglo de Diodos)
EAG	: Equivalentes de ácido gálico
g	: gramo
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia)
INIA	: Instituto Nacional de Innovación Agraria
Kg	: Kilogramo
mg	: miligramo
min	: minutos
ml	: mililitro
mm	: milímetros
mM	: milimolar
µl	: microlitro
µm	: micrómetro
µM	: micromolar
nd	: no detectado
nm	: nanómetro
°C	: grados celsius
ORAC	: Oxygen Radical Absorbance Capacity
ROS	: Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)
RP-18	: Gel de sílice, Fase Reversa (18 átomos de carbono)
TBHQ	: Terbutil hidroquinona
TE	: Trolox equivalents (Equivalentes de Trolox)
tr	: trazas
t _R	: Tiempo de retención
Trolox	: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
UV	: Ultravioleta

RESUMEN

En Perú y Bolivia existe una gran diversidad de “rocotos” (*Capsicum pubescens*), los cuales se caracterizan por ser principalmente de color rojo, aunque también se encuentran rocotos amarillos, anaranjados y verdes. Son usados en ensaladas, salsas picantes y en la preparación de platillos como el rocoto relleno, uno de los platos más representativos del Perú.

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar la caracterización químico-nutricional y de actividad antioxidante de dos variedades rojo y amarillo que se cultivan en Villa Rica, Pasco.

Para ambas muestras de rocoto, el porcentaje de humedad fue alto (92%). No hubo diferencias en el contenido en base seca de proteínas (15.5%) y grasa (1.8%), pero respecto al contenido de carbohidratos, el rocoto rojo tuvo mayor porcentaje que el amarillo (55.3% versus 51.3%). En cuanto al contenido de fibra y ceniza el rocoto amarillo presentó mayor porcentaje (21 y 10.3%, respectivamente) en comparación con el rojo (18 y 9.3%, respectivamente).

El contenido de capsaicinoides (capsaicina y dihidrocapsaicina) fue determinado tanto en pulpa como en placenta + semillas por medio de HPLC. Para ambas muestras, el contenido de capsaicinoides fue menor en la pulpa, siendo la dihidrocapsaicina el capsaicinoide de mayor concentración. El contenido total de capsaicinoides del rocoto amarillo fue mayor al del rojo tanto en pulpa (101.6 vs. 35.25 µg/g muestra fresca) como en placenta + semillas (893.5 vs. 340.3 µg/g muestra fresca).

El contenido de polifenoles totales, determinado a través del método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, fue mayor en el rocoto amarillo (58.6 versus 46.1 mg EAG/100 g muestra fresca).

Se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para medir la concentración de 4 flavonoides (quercetina, luteolina, apigenina y kaempferol) y se pudo constatar la presencia de kaempferol en el rocoto rojo (2 µg/g muestra fresca) y en el rocoto amarillo dos flavonoides (quercitina y kaempferol) en concentraciones de 7 y 8 µg/g muestra fresca, respectivamente.

La actividad antioxidante *in vitro*, determinada a través del ensayo ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), muestra que el rocoto amarillo tiene mayor actividad que el rocoto rojo (1137.9 - 1060.1 µmol ET en 100 g muestra fresca, respectivamente).

ABSTRACT

In Peru and Bolivia there is a great diversity of "rocotos" (*Capsicum pubescens*), which are characterized by being mainly red, although yellow, orange and green rocotos are also found. They are used in salads, hot salsas and in the preparation of dishes such as stuffed rocoto, one of the most representative dishes of Peru.

This study aimed carry out the chemical-nutritional and antioxidant activity evaluation of red and yellow rocoto varieties grown in Villa Rica, Pasco.

For both samples of rocotos moisture was high (92%). There were no differences in the dry basis content of protein (15.5%) and fat (1.8%); however, on the content of carbohydrates, red rocoto had higher percentage than the yellow one (55.3% versus 51.3%). As for the content of fiber and ash, yellow rocoto had the highest percentage (21 and 10.3%, respectively) compared to red rocoto (18 and 9.3%, respectively).

Capsaicinoid (capsaicin and dihydrocapsaicin) was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in both pulp and placenta + seeds. For both samples, the capsaicinoid content was lower in the pulp, dihydrocapsaicin being the capsaicinoid with the highest concentration. The total content of capsaicinoids of yellow rocoto was higher than the red one in pulp (101.6 vs. 35.25 mg/g fresh sample) and in placenta + seeds (893.5 vs. 340.3 mg/g fresh sample).

The total polyphenol content, determined by the spectrophotometric method of Folin-Ciocalteu, was higher in yellow rocoto (58.6 versus 46.1 mg EAG/100 g fresh sample).

HPLC was used to measure the concentration of 4 flavonoids (quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol). Only Kaempferol was present in red rocoto (2 µg/g fresh sample), while yellow rocoto contained two flavonoids (quercetin and kaempferol) in concentrations of 7 and 8 µg/g fresh sample, respectively.

The antioxidant activity *in vitro*, determined by means of the ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) assay shows that yellow rocoto has greater antioxidant activity than red rocoto (1137.9 - 1060.1 µmol ET in 100 g fresh sample, respectively).

ÍNDICE

I	Introducción	1
II	Marco Teórico	4
	2.1 Aspectos Taxonómicos	
	2.1.1. Clasificación Botánica	
	2.1.2. Estudio Botánico de <i>Capsicum pubescens</i> “Rocoto”	8
	2.2 Estudios previos realizados en <i>Capsicum pubescens</i>	10
III	Objetivos	12
	3.1 General	
	3.2 Específicos	
IV	Materiales y Métodos	13
	4.1 Material Vegetal	
	4.2 Análisis Proximal	
	4.2.1 Prueba de Humedad	
	4.2.2 Determinación de Cenizas	
	4.2.3 Determinación de Proteína (Método de Kjeldahl).....	14
	4.2.4 Determinación de grasas totales	
	4.2.5 Determinación de fibras totales.....	15
	4.2.6 Determinación de porcentaje de carbohidratos.....	16
	4.3 Determinación de concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina.....	17
	4.4 Determinación de concentración de compuestos fenólicos.....	18
	4.5 Determinación de contenido de flavonoides	
	4.6 Actividad Antioxidante.....	19
V	Resultados	21
VI	Discusión	27
VII	Conclusiones	32
VIII	Referencias Bibliográficas	33

I. INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum* se originó en el Alto Perú, zona que incluye la cuenca del lago Titicaca y lo que hoy es Bolivia; desde esta zona y gracias a las corrientes de los ríos y a las aves migratorias, el ají empezó su recorrido que lo llevaría a poblar y conquistar el resto de América del Sur y Central, su expansión fue muy rápida en Europa y África, es por ello que se le conoce con diversos nombres: ají, uchu, chile, pimienta (León J. , 2000).

Por otro lado, el registro de los restos arqueológicos más antiguos que comprueban la existencia del ají en el Perú, se hallaron en la cueva Guitarrero, en la provincia de Yungay, región de Ancash. Igualmente se han identificado representaciones gráficas y esculturas de frutos de ajíes en el Obelisco de Tello, perteneciente a la cultura Chavín, con más de 2,000 años de antigüedad. Además, se afirma que el ají es uno de los frutos que más se ha dibujado en cerámicas y textiles de la cultura Nazca y Paracas (Hernández & León, 1994).

Actualmente el género *Capsicum* comprende 25 especies de las cuales cinco han sido domesticadas y dado origen a numerosos cultivares; entre estos *Capsicum chinense*, *C. annum*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. baccatum* (Gómez, 2004), así mismo se encuentran en grandes extensiones en todos los países de Asia, África, Sudamérica y Centroamérica, partes de EE.UU y el sur de Europa (Krishna, 2004) .

Es así que, en el año 2014 la exportación de *Capsicum* se ha incrementado en sus distintas presentaciones siendo Estados Unidos (conservas, secos y congelados) e Italia (frescos) los de mayor aceptación (ADEX, 2015).

Debido a esto una de las especies que ha logrado en los últimos años un aumento en su exportación es *Capsicum pubescens* “Rocoto” teniendo como principales mercados de destino a Estados Unidos, España y Chile (Sierra Exportadora, 2012). En el año 2013 el departamento con mayor producción de *Capsicum pubescens* fue Pasco, donde la producción anual fue de 14300 toneladas. El rocoto es el ingrediente principal de muchos platos típicos (rocoto relleno, ceviche), especialmente en la cocina del sur del país en Arequipa, Moquegua y

Tacna; también se usa a lo largo del país en molidos con cebolla, aceite y ajo para acompañar los platillos, desde sopas a guisos.

Otro aspecto importante es el análisis químico, debido a que este género se caracteriza por la presencia de un grupo de alcaloides, Capsaicinoides, los cuales producen efectos farmacológicos en el tracto gastrointestinal, el sistema respiratorio y cardiovascular (Othman et al., 2011), también producen efectos fisiológicos como por ejemplo una fuerte sensación de quemazón en contacto con los receptores del sentido en la lengua, es así que el nivel de Capsaicinoides determina el picor o agudeza del ají; no obstante uno de estos Capsaicinoides, Capsaicina, en forma sintética se utiliza en pomadas para aliviar el dolor muscular, osteoartritis, neuralgia y reumatismo.

En la naturaleza existe una amplia variedad de compuestos que presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, los cuales se denominan polifenoles y han demostrado muchos beneficios para la salud debido a sus propiedades antioxidantes y su capacidad de captar radicales libres (Quiñones et al., 2012). Los polifenoles de tipo flavonoides, como flavonoles y flavonas son los antioxidantes más potentes presentes en los alimentos vegetales. Un antioxidante previene el daño oxidativo inhibiendo la generación de especies reactivas, capturando los radicales libres o aumentando el nivel de antioxidantes endógenas protectores (Pedrola I.E., 2010).

A pesar de la importancia del rocoto en nuestra gastronomía y en la medicina tradicional, son escasas las investigaciones que tratan sobre su caracterización. El presente trabajo tuvo como objetivo realizar la caracterización químico-nutricional y de actividad antioxidante de dos variedades rojo y amarillo que se cultivan en Villa Rica, Pasco.

II. MARCO TEÓRICO

El género *Capsicum* ha sido cultivado en Centro y Sudamérica mucho antes de la llegada de Cristóbal Colón, específicamente en Perú y Bolivia (Berríos et al., 2007); es miembro de la familia de las Solanáceas, su nombre científico deriva del griego: según unos autores el nombre proviene de *Kapso* (picar), según otros de *Kapsakes* (cápsula) (López Riquelme G.O., 2003). Este género consta de 5 especies domesticadas: *Capsicum annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens* y *C. frutescens* (López Riquelme G.O., 2003).

C. pubescens “rocoto” germina más lentamente que otros ajíes y cuando el fruto está maduro, el rocoto es muy resistente a temperaturas bajas y su color cambia durante la maduración de verde a amarillo o naranja o rojo, dependiendo de la variedad de rocoto. El tiempo mínimo para la cosecha es de por lo menos 80 días y la temperatura para la germinación es de 18 °C hasta 20°C (Molina, 2014).

Por otro lado, los ajíes pueden ser segmentados por sus sabores en ajíes dulces o picantes. El ají dulce o “bell pepper” recibe este nombre debido a su bajo contenido de capsaicina. El ají picante está representado por unas 200 variedades, por ello las formas varían desde tamaños grandes hasta pequeños y el contenido de capsaicina puede variar de medio a extremadamente irritante (Berríos et al., 2007).

La pungencia de los ajíes se debe a la presencia de un grupo de sustancias de naturaleza alcaloide llamados capsaicinoides, los cuales se sintetizan y acumulan en el tejido de la placenta y son un grupo de amidas ácidas derivadas de la vainillilamina, cuya estructura química consiste en un núcleo fenólico unido mediante un enlace amida a un ácido graso. Dentro de este grupo están la capsaicina y la dihidrocapsaicina que representan más del 90% del contenido total de los capsaicinoides en los ajíes (Vázquez-Flota, 2007).

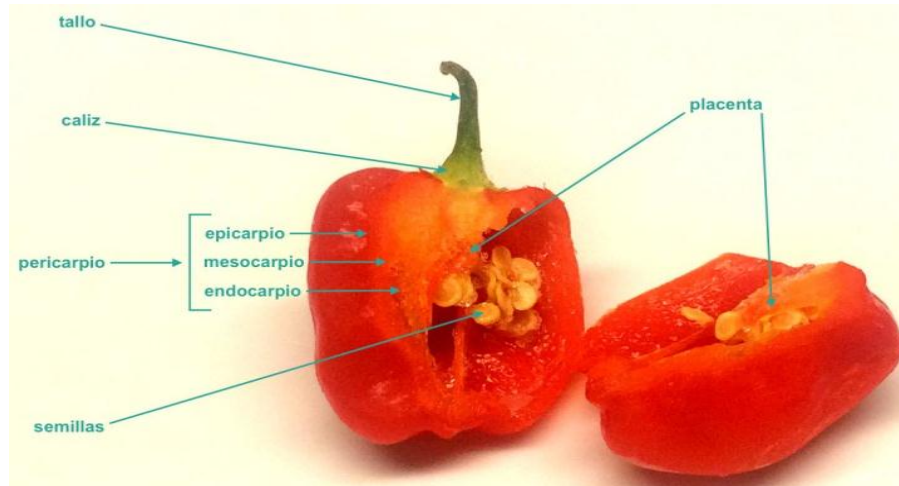


Figura 1. Partes de un fruto del género Capsicum

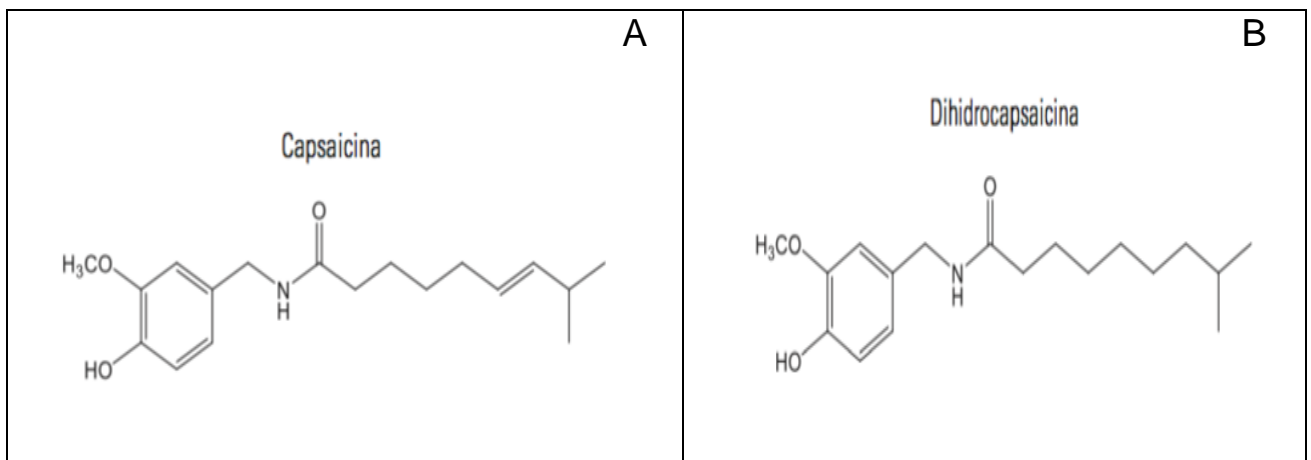


Figura 2. Estructura química de dos capsaicinoides
A: Capsaicina , B: Dihidrocapsaicina

En la actualidad existen dos métodos para expresar la pungencia de los pimientos: La Escala Scoville (prueba oral) y por la determinación de capsaicinoides usando un equipo de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia).

Las condiciones de crecimiento, la madurez al momento de la cosecha, muy poca o mucha agua, temperaturas extremas, baja fertilidad de suelo u otras condiciones de estrés pueden alterar significativamente el contenido de capsaicina (Berríos e al., 2007).

Los polifenoles se originan principalmente en las plantas y existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y alcoholes fenólicos. Los flavonoides, cuyo nombre deriva del latín “Flavus”, que significa “amarillo”, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Existen subgrupos de flavonoides y los principales son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (Quiñones et al., 2012).

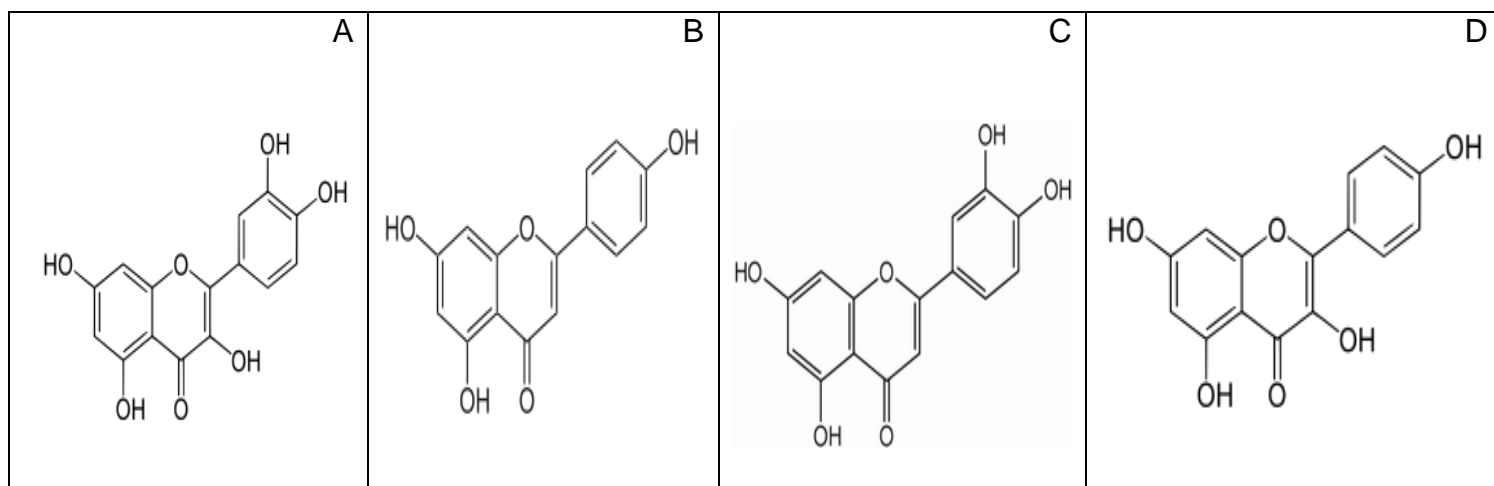


Figura 3. Estructura química de cuatro subgrupos de flavonoides
A: Quercetina , B: Apigenina, C: Luteolina, D: Kaempferol

Las principales fuentes de flavonoles son las verduras y las frutas, el té y el vino. Dentro de este subgrupo se encuentra la quercetina y el Kaempferol y ambos presentan mayor actividad para captar radicales de oxígeno. Las flavonas son los flavonoides menos abundantes en los alimentos, a este subgrupo pertenecen apigenina y luteolina (Quiñones et al., 2012).

El oxígeno que es necesario para la vida, es también indirectamente responsable de muchos efectos negativos debido a la producción de radicales libres que son tóxicos para las células. La quercetina y la miricetina, seguidas por el kaempferol, son los flavonoides que poseen mayor actividad neutralizadora de

radicales libres. El grupo fenólico que dichos compuestos poseen puede actuar directamente capturando electrones desapareados de las ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) y genera así especies menos reactivas (Quiñones et al., 2012).

Un antioxidante es una molécula capaz de disminuir, retardar o inhibir la oxidación de otras moléculas o sustratos. Los antioxidantes actúan en reacciones redox cediendo un electrón o un átomo de hidrógeno. De esta manera pueden ejercer su acción reparando un daño oxidativo. Por otro lado, se suele asociar la actividad biológica de los compuestos polifenólicos con su capacidad captadora de radicales libres que normalmente se asocia a la capacidad antioxidante (Fernández-Pachón et al., 2004).

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra (Quintanar & Calderón, 2009).

El ensayo ORAC se utiliza para medir la actividad antioxidante de alimentos; así mismo permite medir la actividad antioxidante en entornos hidrofílicos y lipofílicos de vegetales. Los radicales peróxidos generados por la descomposición térmica del AAPH reaccionan con la fluoresceína (FL) inhibiendo su fluorescencia mientras que los antioxidantes presentes en la muestra neutralizan los radicales libres retrasando la pérdida de fluorescencia. Para cada concentración de antioxidante, se cuantifican las diferentes áreas bajo la curva en todas las cinéticas restando el valor del área del blanco. Usualmente se expresa como equivalente de trolox, siendo este un análogo hidrosoluble de la vitamina E (Fernández-Pachón et al., 2004).

El distrito de Villa Rica (Pasco) presenta una altitud comprendida sobre los 1470 m.s.n.m, pero cabe indicar que este distrito presenta una compleja topografía con alturas que alcanzan hasta los 2500 m.s.n.m en las que están ubicadas las cordilleras de San Matías-San Carlos y parte de Yanachaga. Su temperatura media

anual es de 21 °C, ya que el terreno de la región se caracteriza por estar en el declive de la Cordillera Andina propia de la selva alta; así mismo presenta lluvias altas en los meses de enero, febrero y marzo y un periodo relativamente seco en los meses restantes del año, como consecuencia ante esto, hace de Villa Rica una zona dedicada a la agricultura y ganadería con cultivos como el café, frutas, verduras, etc. Respecto al clima de Arequipa es variado; cálido en la costa con temperaturas entre 12°C a 29°C y presenta una altitud de 2335 msnm(Sierra Exportadora,2012).

La provincia de Jujuy en Argentina se divide en tres grandes regiones: la Puna o altiplano, la Quebrada de Humahuaca y los Valles orientales. De oeste tiende a bajar desde altitudes que van desde los 6000 msnm a los 500 msnm y el clima es mesotérmico con días fríos y nevadas en invierno (Buitrago, 2014). Por otro lado, Santa María es una provincia de Brazil y el clima es templado y cálido, la temperatura media anual es de 23 °C y la altitud es de 113 msnm. (Angélica Kuinchtner, 2001).

2.1 Aspectos Taxonómicos

2.1.1 Clasificación Botánica

Reino : Vegetal
Phyllum: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Solanales
Familia: Solanaceae
Género: *Capsicum*
Especie: *Capsicum pubescens*
Nombre común: Rocoto

2.1.2 Estudio Botánico de *Capsicum pubescens* “Rocoto”

La especie tiene caracteres distintos a los demás ajíes, empezando por sus flores y semillas; así mismo por sus paredes gruesas con alto contenido de humedad (Long Towell J, 2005).

La descripción de las características fenotípicas (Tabla 1) y clasificación botánica de las muestras fue realizada por la Ing. Mavel Marcelo Salvador del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

Tabla 1. Características fenotípicas de *C. pubescens* provenientes de Villa Rica (Pasco)

CARACTERÍSTICAS	MUESTRAS	
	Rocoto rojo	Rocoto amarillo
Altura de la planta	169.4 cm	156.0 cm
Ancho de la planta	283.8 cm	285.8 cm
Días a la floración	120 días	120 días
Días a la fructificación	155 días	150 días
Color de semilla	negro	negro
Cantidad de semilla	148 semillas	150 semillas
Color de la corola	Morado con base blanca	Morado con base blanca
Número de flores por axila	2	2
Número de flores por planta	50 flores	38 flores
Forma de fruto	Acampanulado	Acampanulado
Longitud del fruto	55.4 mm	74.8 mm
Diámetro del fruto	49.8 mm	64.4 mm
Número de frutos	34	26

En las figuras 1 y 2 se puede observar la forma, color, tamaño y apariencia de cada fruto, luego de un corte transversal y longitudinal.

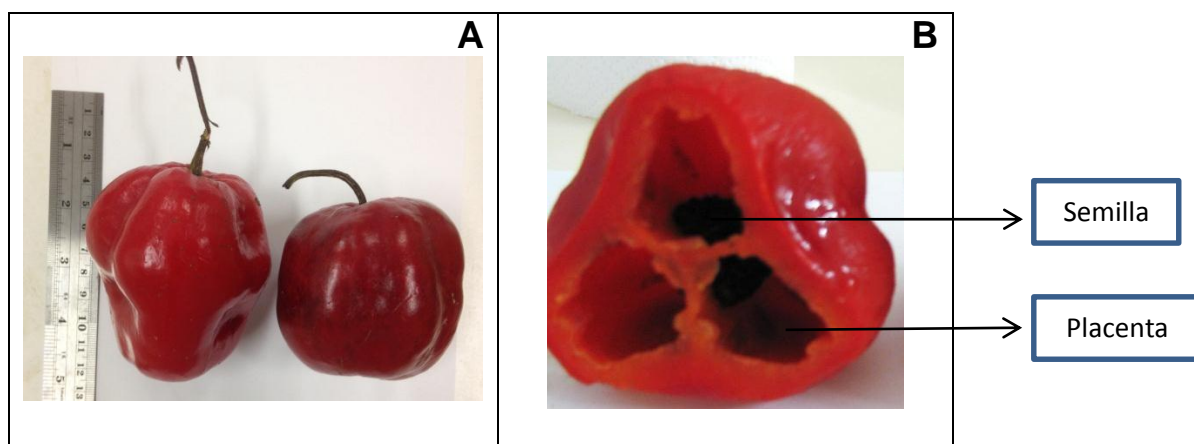


Figura 4. Frutos maduros de Rocoto rojo (*C. pubescens*)
A: Fruto entero, B: Corte transversal del fruto

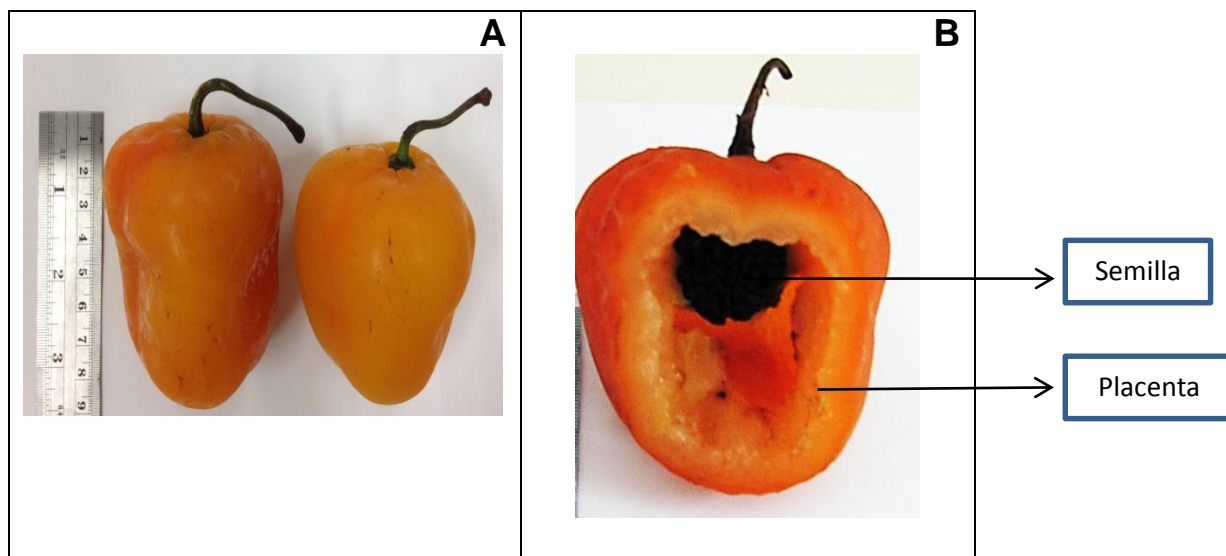


Figura 5. Frutos maduros de Rocoto amarillo
 A: Fruto entero, B: Corte longitudinal del fruto

2.2 Estudios previos realizados en *Capsicum pubescens*

Actualmente existen varias investigaciones respecto al género *Capsicum* proveniente de Perú; una de las que abarca varios análisis es la realizada por Meckelmann et al. (2013), quien trabajó con cuatro especies: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. frutescens* provenientes del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Dichas especies fueron sometidas a diversos ensayos como: determinación del contenido de capsaicinoides, determinación del contenido total de polifenoles, actividad antioxidante, contenido de ácido ascórbico, grasas y humedad. En el año 2015 Meckelmann (2015) decide investigar la especie *Capsicum pubescens* (muestra seca) y realiza los mismos ensayos, pero en esta especie determinó además el contenido de flavonoides (quercetina, kaempferol, luteolina y apigenina).

Otros estudios realizados en *C. pubescens* se llevaron a cabo con extractos usando como solvente acetona, éter etílico y agua; también se ha podido determinar el contenido de capsaicinoides a partir de una extracción con fluido supercrítico, usando CO₂ como agente de extracción. Respecto a investigaciones genéticas, existe información sobre la herencia de capsaicinoides, lo cual es un importante aporte ya que existen diferencias de acuerdo al origen de procedencia y

condiciones ambientales; esto modifica en gran sentido los resultados que se obtienen luego de investigar una misma especie de diferentes lugares (Gamarra et al., 2010).

Debido a que *C. pubescens* “rocoto o locoto” es una especie comercial, en el mercado se puede encontrar en diversas presentaciones, es por ello que un grupo de científicos realizaron varios ensayos en un producto terminado (comercial) y determinaron el contenido total de polifenoles, flavonoides y proteína (Rivas et al., 2014).

III. OBJETIVOS

3.1 General

Conocer el potencial químico-nutricional y de actividad antioxidante de dos muestras de *Capsicum pubescens* (“rocoto rojo y amarillo”) provenientes de Villa Rica (Pasco).

3.2 Específicos

- Realizar el análisis químico-proximal (humedad, grasa, fibra, proteínas, cenizas y carbohidratos).
- Cuantificar el contenido de capsaicinoides (Capsaicina y Dihidrocapsaicina).
- Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (apigenina, luteolina, quercetina y kaempferol)
- Determinar la capacidad antioxidante *in vitro* a través del método de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Los frutos de *Capsicum pubescens* “Rocoto” fueron colectados en el distrito de Villa Rica, ubicado en la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco, el cual presenta una temperatura media anual de 21 °C y una altitud promedio de 2500 msnm.

Ambas variedades fueron colectadas en estadio maduro, con el apoyo del agricultor Joel Palomino, en el mes de mayo del 2015 a una temperatura de 20°C y una altitud de 2300msnm. El parámetro de madurez fue establecido por la Ing. Dioliza Vilchez durante la misma cosecha debido al color del fruto, ya que el estadio inmaduro es de color verde y el estadio maduro dependiendo de la variedad puede ser de color rojo, amarillo o anaranjado. Después de la colección, ambas variedades (rocoto rojo y amarillo) fueron enviadas al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) para su caracterización fenotípica con el apoyo de la Ing. Mavel Marcelo.

4.2 Análisis Proximal (AOAC, 2005)

4.2.1 Prueba de Humedad

Se utilizó el método de pérdida de peso en la estufa a 100 °C hasta peso constante. Para ello, la muestra fresca tuvo que ser picada, luego se pesó aproximadamente 2 g de la misma en una cápsula limpia y seca, la cual fue previamente pesada.

La cápsula junto con la muestra fue llevada a la estufa a 100 °C por 5 horas, para luego dejarla enfriar en el desecador durante 30 minutos, logrando así que la variación entre dos pesadas sucesivas no exceda los 5 mg.

Para el cálculo del porcentaje de humedad de la muestra, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(\text{Peso muestra fresca} - \text{peso muestra seca})}{\text{peso muestra fresca}} \times 100$$

El análisis fue realizado por triplicado en experimentos independientes.

4.2.2 Determinación de Cenizas

Los crisoles limpios fueron colocados en la estufa a 60 °C hasta que la diferencia entre pesadas no fue mayor a 5 mg. Se pesó 0.5 g de muestra seca y se pre-calcinó en un mechero, para luego calcinarla en una mufla a 600 °C por 7 horas hasta obtener cenizas blancas o grisáceas. Finalmente se dejó enfriar el crisol con las cenizas en un desecador y se registró el peso con una variación máxima de 5 mg.

Para el cálculo del porcentaje de cenizas de la muestra, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Cenizas en Base Seca (\%)} = \frac{\text{Peso de crisol con muestra (g)} - \text{peso de crisol vacío}}{\text{peso muestra seca (g)}} \times 100$$

El análisis de cenizas fue llevado a cabo por triplicado en experimentos independientes.

4.2.3 Determinación de Proteína (Método de Kjeldahl)

Se colocó 0.5 g de muestra seca en el balón de micro-Kjeldahl, se adicionó 4 g de una mezcla de sulfatos (5 g sulfato de cobre, 100 g sulfato de sodio) con 14 ml de H₂SO₄ concentrado y se llevó a cabo la ebullición por un periodo de 4 horas, luego de las cuales en el balón se obtuvo un líquido de color verde esmeralda.

Terminada la digestión, el balón fue colocado en el destilador y se programó el equipo para que añada a la solución 150 ml de H₂O destilada y 40 ml de solución saturada de NaOH 45%. En un Erlenmeyer de 250 ml de capacidad se agregó 40 ml de ácido bórico 4% y 3 gotas de verde bromocresol, este recipiente fue colocado en el equipo de tal manera que el extremo del tubo de unión quedó sumergido en la solución de ácido bórico y se observó el cambio de color (verde-azul). Finalmente se tituló el contenido del Erlenmeyer con una solución de ácido clorhídrico 0.1 N hasta viraje de color (azul-amarillo), pero en primer lugar se tituló el blanco cuyo color final sirvió de referencia para la titulación de las muestras. Los gastos para

cada muestra y para el blanco fueron anotados para el cálculo del contenido de proteínas en las muestras.

Para el cálculo del porcentaje de proteínas de la muestra, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína en base seca (\%)} = \frac{14 * N \text{ valor gastado (ml)} * 100 * Fp}{\text{peso muestra seca (g)} * 1000}$$

Donde:

Valor gastado = gasto muestra – gasto blanco
14 = Equivalente –gramo del Nitrógeno
N = Normalidad del ácido clorhídrico
Fp = 6.25

El análisis fue llevado a cabo por triplicado en experimentos independientes.

4.2.4 Determinación de grasas totales

Se pesó aproximadamente 1 g de muestra seca en un cartucho de papel filtro y se colocó en un equipo de soxhlet, luego se añadió 100 ml de éter de petróleo.

La extracción se realizó por 4 horas, luego el balón se llevó al rotaevaporador para eliminar el solvente. El balón con la grasa extraída fue colocado en la estufa a 40 °C por 30 minutos, después se colocó en el desecador hasta que la diferencia entre una pesada y otra no fue mayor a 5 mg.

Para el cálculo del porcentaje de grasas de la muestra, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Grasa en Base Seca (\%)} = \frac{\text{Peso balón con grasa (g)} - \text{peso balón sin grasa (g)}}{\text{peso muestra seca (g)}} \times 100$$

El análisis fue llevado a cabo por triplicado en experimentos independientes.

4.2.5 Determinación de fibras totales

Se pesó 0.5 g de muestra seca desengrasada en un vaso de 250 ml, al cual se añadió 200 ml de H₂SO₄ al 1.25%, se calentó a temperatura de ebullición y se agitó por 30 minutos en la cocinilla, luego se filtró la solución caliente a través de papel filtro y se lavó el residuo con H₂O destilada caliente hasta que se obtuvo un pH neutro. Se regresó el residuo con mucho cuidado al vaso original y se agregó 200 ml de NaOH al 1.25% caliente y se agitó por 30 minutos, luego se filtró sobre papel Whatman previamente pesado y se lavó con varias porciones de H₂O destilada caliente, hasta que el H₂O del lavado no tuvo reacción básica; así mismo, se agregó 20 ml de H₂SO₄ al 1.25% y 20 ml de alcohol, ambos calientes.

El papel Whatman (libre de cenizas) junto con el residuo del filtrado fue colocado en la estufa a 90 °C por 2 horas y luego llevado al desecador hasta que la diferencia entre una pesada y otra no fue mayor a 5 mg.

Para el cálculo del porcentaje de fibras de la muestra, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Fibra en base seca (\%)} = \frac{P2-P1}{\text{Peso muestra seca (g)}} \times 100$$

P2: Peso de papel Whatman con muestra

P1: Peso de papel Whatman

4.2.6 Determinación de porcentaje de carbohidratos

El porcentaje de carbohidratos fue calculado por diferencia, partiendo de 100 g de muestra y considerando los otros componentes de la muestra como porcentaje: grasa, fibras, proteínas y cenizas.

$$\% \text{ Carbohidrato} = 100 - (G+F+P+C)$$

Donde:

G: porcentaje de grasa total de la muestra

F: porcentaje de fibra de la muestra

P: porcentaje de proteína de la muestra
C: porcentaje de cenizas de la muestra

4.3 Determinación del contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina

La determinación de la concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina fue llevada a cabo de acuerdo al método propuesto por Juangsamoot et al. (2012).

Se pesó por separado en dos Erlenmeyers, aproximadamente 30 g de muestra fresca picada (pulpa) y en otro Erlenmeyer la cantidad de semilla presente, luego se agregó metanol y la extracción se realizó a 60 °C por 30 minutos (dos veces).

Se filtró el extracto en un balón esmerilado y se llevó al rotaevaporador para evaporar el metanol hasta casi sequedad, luego se transfirió el extracto a una fiola de 10 ml y se enrasó con metanol; se filtró una alícuota con filtro de membrana (0.45 µm Whatman) antes de inyectar al HPLC.

Por otro lado, se utilizó como patrón de referencia a los compuestos capsaicina y dihidrocapsaicina (Sigma), para los cuales se generó dos curvas de calibración utilizando una solución stock de 0.5 mg/ml en metanol a las concentraciones finales de 0.063, 0.031, 0.016, 0.008 y 0.004 mg/ml.

Se usó un sistema cromatográfico (HPLC) marca Hitachi, Elite LaChrom bomba L-2130, detector DAD L-4555, software EzChrom Elite Client/ Server versión 3.2, al que se le adiciona una columna Purospher Star® RP18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm), la fase móvil corrió a 1.5 ml/min y consistió en 50% solvente A (0.1% ácido fórmico en agua) y 50% solvente B (acetonitrilo). El detector se programó a 278 nm y la temperatura de columna fue 27 °C. Todos los solventes utilizados fueron filtrados a través de membranas de nylon con poro de 0.45 µm y 47 mm de diámetro.

El volumen de inyección fue de 20 μ l y el tiempo de corrida cromatográfica fue de 16 min por inyección.

El contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina fue calculado por la ecuación de la recta de la curva de calibración de capsaicina y dihidrocapsaicina, donde se transformó la concentración de mg/ml en μ g/g debido a que se consideró el peso del fruto que se utilizó en la extracción, por esta razón el resultado fue reportado como μ g/g de muestra fresca.

4.4 Determinación de concentración de compuestos fenólicos

La determinación del contenido de compuestos fenólicos totales se realizó de acuerdo al método propuesto por Blainski et al. (2013).

Se pesó aproximadamente 5 g de muestra fresca picada en un tubo Falcón de 50 ml y se añadió 5 ml de metanol, la extracción se realizó por 30 minutos a 45 °C con agitación en el vortex cada 10 minutos, luego se llevó a la centrifuga a 3000 rpm, 4 °C durante 10 minutos para separar el sobrenadante de la muestra y se volvió a realizar la extracción. Se transfirió el volumen final de sobrenadante a una fiola de 10 ml y se enrasó con metanol.

Se agregó a cada tubo de ensayo agua ultra pura, 20 μ l de muestra, 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteau 2 N diluido 1:10 (10%) en agua ultra pura, luego se agregó 1 ml de una solución de carbonato de sodio 7.5% en agua ultra pura y se incubó la mezcla por 15 minutos en un lugar oscuro y a temperatura ambiente. La absorbancia de cada mezcla fue leída a 730 nm en un espectrofotómetro.

Por otro lado se generó una curva estándar de ácido gálico como patrón de referencia, partiendo de una solución stock de 0.3 mg/ml en agua ultra pura para lograr las concentraciones finales de 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/ml aplicando el mismo procedimiento utilizado para la muestra.

Los resultados fueron expresados como mg de ácido gálico/100 g de muestra fresca.

4.5 Determinación de contenido de flavonoides

La determinación de contenido de flavonoides fue llevada a cabo de acuerdo al método propuesto por Miean & Mohamed (2001).

Se pesó aproximadamente 5-6 g de muestra fresca picada en un tubo Falcón de 50 ml, se añadió 20 ml de una solución del antioxidante terbutil-hidroquinona (TBHQ) (2 g/l disuelto en una solución 62.5% metanol-agua) y 5 ml de HCl 6 M, la extracción se realizó en Baño María a 90 °C por 2 horas agitando cada 30 minutos, luego se transfirió a una fiola de 25 ml y se enrasó con metanol. Se filtró una alícuota de esta solución con un filtro de membrana (0.45 µm Whatman) antes de inyectar al HPLC.

Por otro lado, se generó una curva estándar de quercetina, luteolina, apigenina y kaempferol (Sigma) como patrones de referencia, partiendo de una solución stock de 0.1 mg/ml en metanol, hasta lograr las concentraciones finales de 12.5, 6.2, 3.1, 1.5 y 0.7 µg/ml.

Se usó un sistema cromatográfico (HPLC) marca Hitachi, Elite LaChrom bomba L-2130, detector DAD L-4555, software EzChrom Elite Client/ Server versión 3.2, al que se le adiciona una columna Purospher Star® RP18 (250 mm x 4.6 mm x 5 µm), la fase móvil corrió a 1 ml/min. Se utilizó el siguiente sistema de solventes: Solvente A (0.1% ácido acético en agua) y Solvente B (0.1% ácido acético en acetonitrilo). El gradiente de elución fue: 30% B, isocrático (0 – 5 min), gradiente lineal 30 a 45% B (5 – 20 min), 45 a 100% B (20 -22 min), 100% B (22-25 min), 100 a 30% B (25 – 27 min) y finalmente 30% B (27 – 35 min). Los flavonoides fueron detectados a 360 nm. Todos los solventes utilizados fueron filtrados a través de membranas de nylon con poro de 0.45 µm y 47 mm de diámetro. El volumen de inyección fue de 20 µl y el tiempo de corrida cromatográfica fue de 35 min por inyección.

El contenido de flavonoides fue calculado por la ecuación de la recta de la curva estándar de quercetina, luteolina, apigenina y kaempferol, el resultado fue reportado como $\mu\text{g/g}$ de muestra fresca.

4.6 Actividad Antioxidante

La determinación de actividad antioxidante fue llevada a cabo de acuerdo a un método de medición de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno propuesto por Alvarez-Parrilla et al. (2011).

Se pesó aproximadamente 5 g de muestra fresca picada y se agregó 20 ml de agua destilada, luego se homogenizó con vortex y una alícuota se filtró con un filtro de membrana ($0.45 \mu\text{m}$ Whatman), después se hizo una dilución ($50 \mu\text{l}$ de muestra filtrada con $9950 \mu\text{l}$ de agua destilada).

Se trabajó con una solución Buffer 75 mM ($10.96 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $10.21 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$) pH 7.4, fluoresceína $1 \mu\text{M}$ ($10 \mu\text{l}$ de 1 mM de fluoresceína en una fiola de 10 ml con buffer pH 7.4) protegido de la luz, el agente generador de radical peróxido empleado fue 2,2'-Azobis(2-amidinopropano) dihidro-cloruro (AAPH) 250 mM (678 mg en una fiola de 10 ml con buffer pH 7.4 a $37 \text{ }^\circ\text{C}$).

Por otro lado se generó una curva de calibración de trolox, partiendo de una solución stock de 0.5 mg/ml en buffer pH 7.4 para lograr las concentraciones finales de $10, 20, 24, 30$ y $40 \mu\text{M}$. Se adicionó en estricto orden a cada pozo los siguientes componentes: $150 \mu\text{l}$ de fluoresceína ($1 \mu\text{M}$), $25 \mu\text{l}$ de Trolox y muestra diluida (pozos diferentes) y se llevó a incubar a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en la estufa por 30 minutos, luego se adicionó $25 \mu\text{l}$ de AAPH.

Se midió la intensidad de la fluorescencia cada 2 min a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm , respectivamente, hasta que el valor final de la concentración mayor de trolox ($40 \mu\text{M}$) fue 10 veces menor que su valor inicial ($60\text{-}70 \text{ min}$). El valor de ORAC fue expresado en $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ de muestra fresca y se calculó utilizando la siguiente fórmula.

$$ORAC = \frac{ABC_{AH}}{ABC_{Trolox}} \times \frac{[Trolox]}{[AH]}$$

Donde:

ABC_{AH} : Área bajo la curva en presencia de antioxidante

ABC_{Trolox} : Área bajo la curva de Trolox

[Trolox]: Concentración de Trolox

[AH]: Concentración de antioxidante

V. RESULTADOS

5.1 Análisis proximal de las muestras

En la tabla 2 se observan los resultados del análisis proximal por gramo de muestra seca, obtenidos del promedio de los resultados de cada ensayo por triplicado. Los resultados se muestran en porcentaje \pm la DE (desviación estándar).

Las dos muestras de rocoto destacan por sus altos porcentajes de carbohidratos (>50%), seguido de las fibras y proteínas.

Tabla 2. Análisis Proximal de frutos de *Capsicum pubescens* (base seca)

	Contenido (%)	
	Rocoto rojo	Rocoto amarillo
Grasa	1.76 \pm 0.03	1.84 \pm 0.02
Fibra	18.04 \pm 0.79	20.99 \pm 0.41
Proteína	15.54 \pm 0.05	15.54 \pm 0.32
Cenizas	9.34 \pm 0.07	10.33 \pm 0.13
Carbohidratos	55.29 \pm 0.72	51.31 \pm 0.23

5.2 Determinación de concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina

La determinación del contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina fue realizada con ayuda de una curva de calibración.

En las figuras 3 y 4 se muestran las curvas de calibración de capsaicina y dihidrocapsaicina, respectivamente, que fueron utilizadas para la determinación de dichos capsaicinoides en las 2 muestras de rocoto.

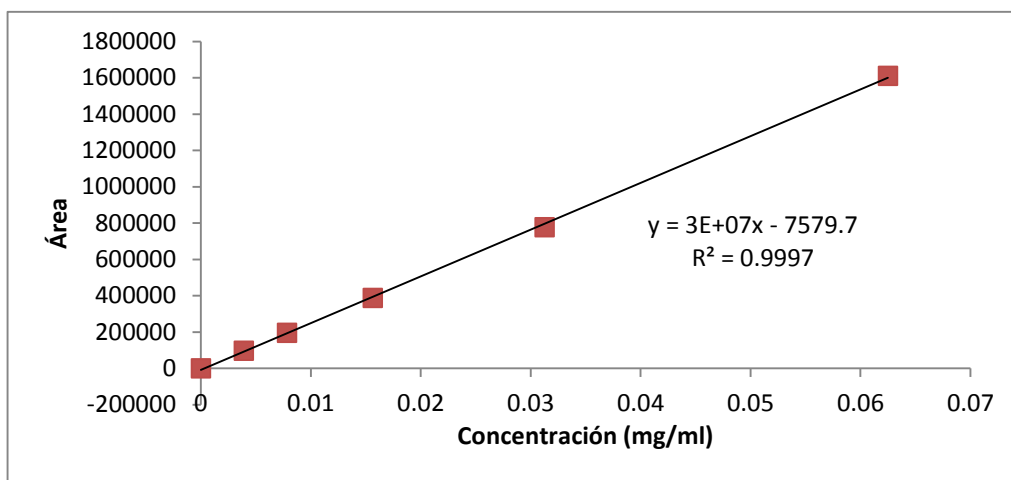


Figura 6. Curva de calibración de capsaicina

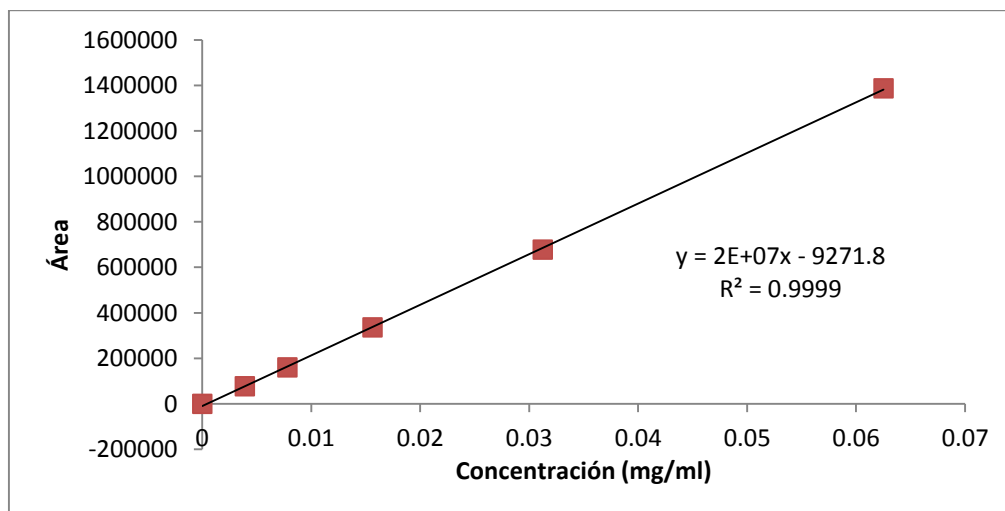


Figura 7. Curva de calibración de dihidrocapsaicina

La determinación de capsaicina y dihidrocapsaicina en las dos muestras de rocoto, fue llevada a cabo separando la pulpa de la placenta/semilla.

En la tabla 3 se muestra el contenido total de capsaicinoides expresados como microgramos de capsaicina y dihidrocapsaicina por cada gramo de muestra fresca. El contenido total de capsaicinoides por fruto, se calculó multiplicando la proporción extraída del peso total del fruto por el total de capsaicinoides expresados como microgramos de capsaicinoides por cada gramo de muestra fresca, destacando el rocoto amarillo.

Tabla 3. Contenido de capsaicinoides en las 2 muestras de rocoto

Muestra	Capsaicinoides ($\mu\text{g/g}$ muestra fresca)				Total de capsaicinoides por fruto	Scoville Unit (SHU)
	Capsaicina		DHC			
	pulpa	placenta/semilla	pulpa	placenta/semilla		
Rocoto rojo	16.84 \pm 0.00	153.45 \pm 0.00	19.08 \pm 0.00	186.90 \pm 0.00	142.50	2138
Rocoto amarillo	41.76 \pm 0.01	362.53 \pm 0.00	59.88 \pm 0.01	530.97 \pm 0.01	171.57	2574

5.3 Determinación de concentración de compuestos fenólicos

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos, se utilizó la curva de calibración de ácido gálico mostrada en la figura 5.

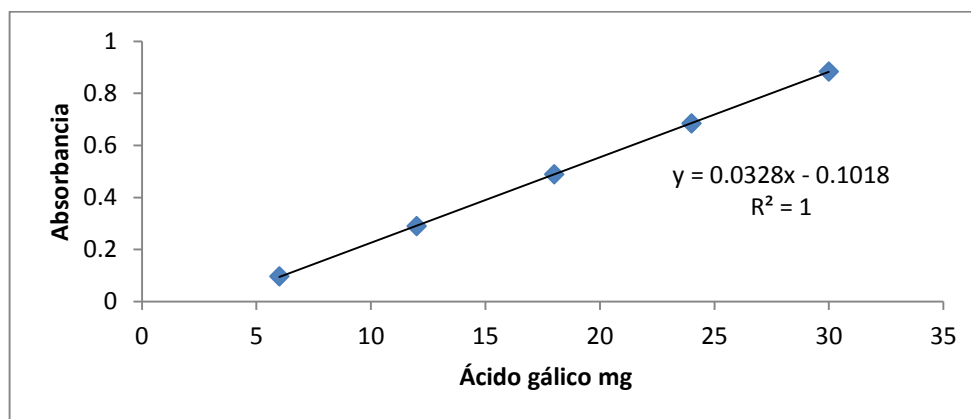


Figura 8. Curva de calibración de ácido gálico

En la tabla 4 se muestra el contenido de compuestos fenólicos totales expresados como miligramos de ácido gálico por cada 100 g de muestra fresca, destacando el valor obtenido para rocoto amarillo, en comparación con el rocoto rojo.

Tabla 4. Contenido de compuestos fenólicos totales en *Capsicum pubescens*

Muestra	Compuestos fenólicos totales (mg EAG/100 g muestra fresca)
Rocoto rojo	46.11 ± 0.64
Rocoto amarillo	58.57 ± 0.98

5.4 Determinación de contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides fue determinado a partir de la curvas de calibración de quercetina, luteolina, apigenina y kaempferol (Figuras 6 a 9).

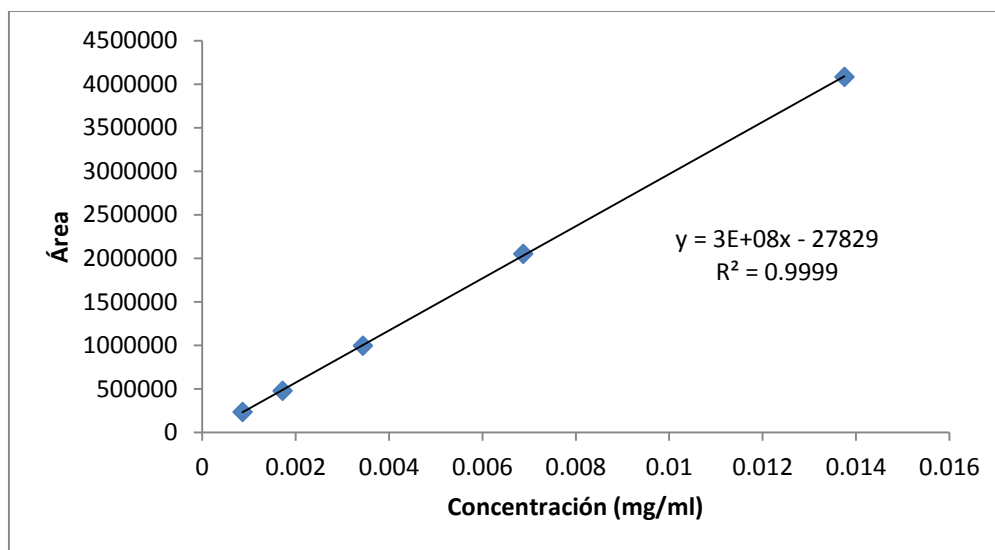


Figura 9. Curva de calibración de quercetina

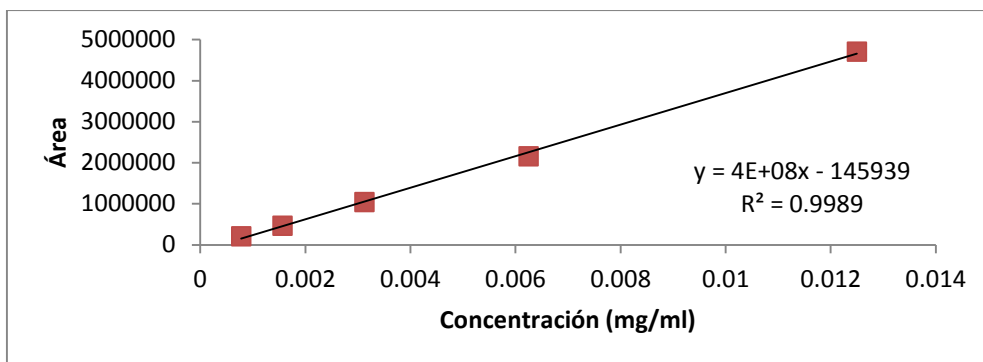


Figura 10. Curva de calibración de luteolina

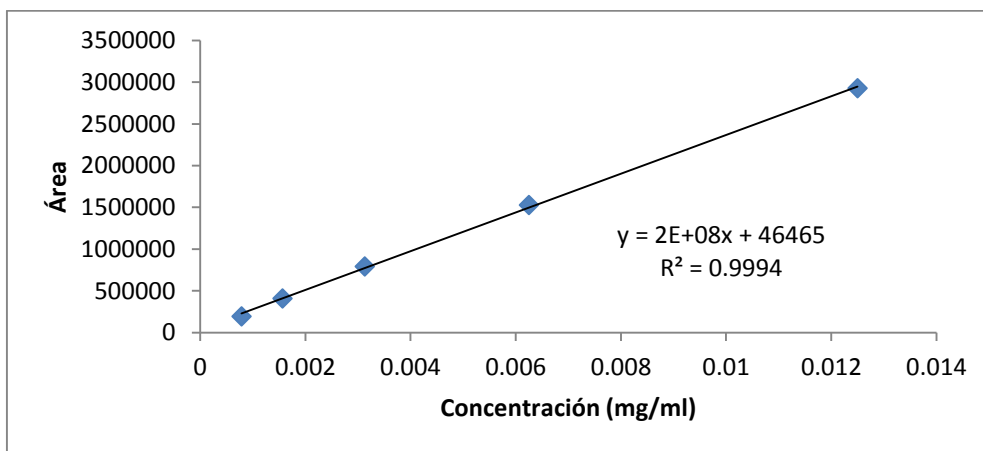


Figura 11. Curva de calibración de apigenina

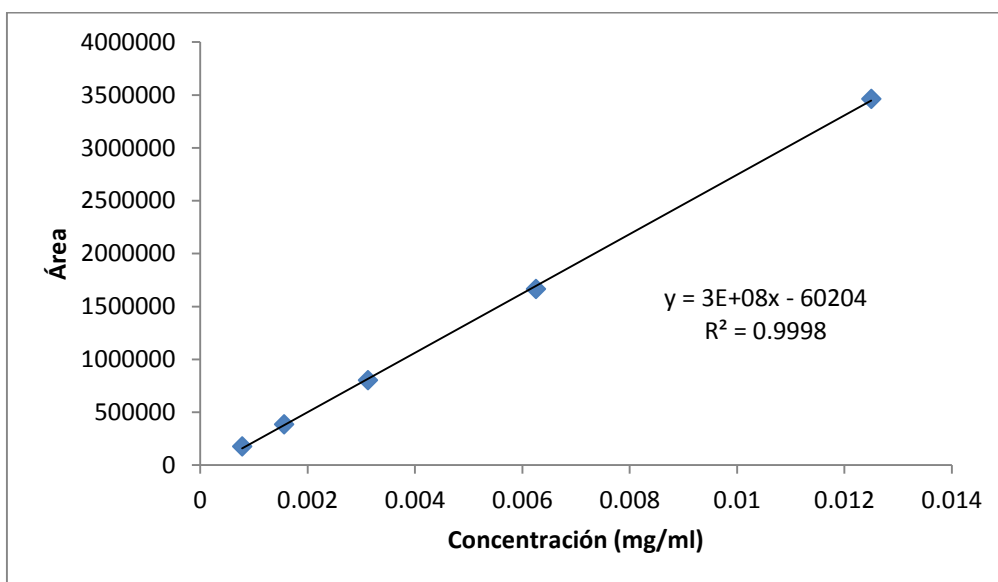


Figura 12. Curva de calibración de kaempferol

En la tabla 5 se muestra el contenido total de flavonoides expresados como microgramos de luteolina, quercetina, apigenina y kaempferol por cada gramo de muestra fresca destacando el valor obtenido para rocoto amarillo, en comparación con el rocoto rojo.

Tabla 5. Contenido de flavonoides en *Capsicum pubescens*

Muestra	Flavonoides ($\mu\text{g/g}$ muestra fresca)				Total de flavonoides
	Luteolina	Quercetina	Apigenina	Kaempferol	
Rocoto Amarillo	tr	7.0 ± 0.0	tr	8.0 ± 0.0	15
Rocoto Rojo	nd	tr	nd	2	2

5.4 Determinación de la Actividad Antioxidante

La Actividad Antioxidante se determinó a través del ensayo ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno).

En la tabla 6 se muestra la Actividad Antioxidante expresada como micromoles de trolox por cada 100 g de muestra fresca, destacando el valor obtenido para rocoto amarillo, en comparación con el rocoto rojo.

Tabla 6. Actividad Antioxidante de *Capsicum pubescens*

Muestra	$\mu\text{mol ET en 100 g}$ muestra fresca
Rocoto rojo	1060.15
Rocoto amarillo	1137.9

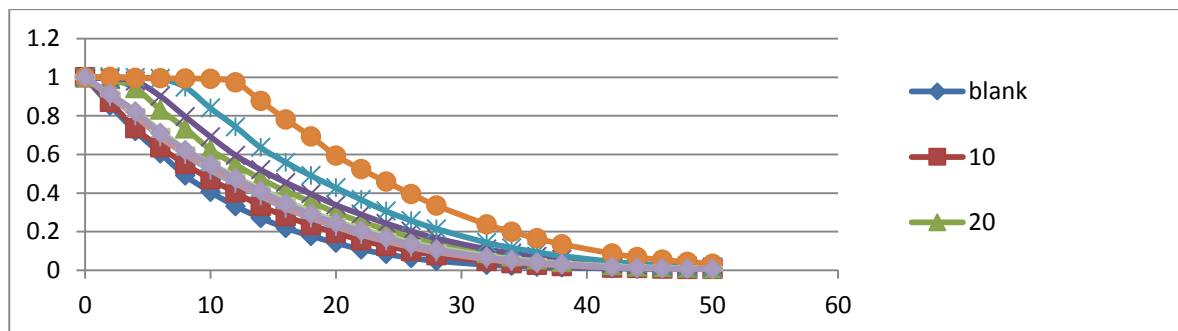


Figura13 . Disminución de fluorescencia en presencia de un agente generador de radicales libres.

VI. DISCUSIÓN

El rocoto rojo y amarillo presentan un alto porcentaje de carbohidratos (55.29 % y 51.31%) en comparación a lo reportado por Bautista et al. (2012) cuya muestra proveniente de México de la especie *C. pubescens* (Manzano) presenta 4.99% de carbohidratos y alto porcentaje de humedad (89.18%) .

De acuerdo a los estudios realizados por Okewole et al(2013) con diferentes variedades de *C. frutescens* de Brazil, el rocoto rojo y amarillo contienen mayor porcentaje de proteína, esto debido a las diferentes condiciones ambientales como temperatura y altitud en las que fueron cultivados. Los rocotos fueron cultivados a 20°C y 2300 msnm, mientras que las variedades de *C. frutescens* a 23°C y 113 msnm.

Los capsaicinoides, compuestos químicos, que se encuentran de manera natural en el fruto, se sintetizan y acumulan principalmente en el tejido de la placenta adyacente a las semillas (Cedrón J.C., 2013), es por ello que en nuestros resultados se puede observar mayor concentración de capsaicinoides en placenta y semilla.

Según Sánchez-Sánchez et al. (2010), la capsaicina y dihidrocapsaicina explican el 90% del picor del ají, y entre las dos, la dihidrocapsaicina ha sido el capsaicinoide predominante en *C. pubescens*, lo cual confirma nuestro resultado en el que tenemos mayor concentración de dihidrocapsaicina que capsaicina. Algo similar se encuentra en el estudio realizado por Vera-Guzmán (2011) quien trabajó con una variedad Canario que pertenece a *C. pubescens* y obtuvo una mayor concentración de dihidrocapsaicina en comparación a los otros capsaicinoides.

Por otro lado, Kollmannsberger et al. (2011), luego de estudiar dos accesiones de *C. pubescens* provenientes de Guatemala y Ecuador, los cuales crecieron a 20 °C en la noche y a 35 °C en el mediodía, encontraron que la concentración total de capsaicinoides en muestra fresca fue de 352 y 159 µg/g para las muestras de Guatemala y Ecuador, respectivamente. En comparación a dichas accesiones, el rocoto rojo presenta menor concentración de capsaicinoides; sin

embargo, el rocoto amarillo presenta mayor concentración que la muestra proveniente de Ecuador, pero menor que la muestra de Guatemala; esta diferencia se podría deber a la temperatura a la cual las muestras fueron cultivadas, ya que según lo reportado por Mateos et al. (2013), la temperatura puede afectar la síntesis de capsaicinoides y las funciones fisiológicas de este fruto.

Adicionalmente, el estudio realizado por Gamarra et al. (2010) con rocotos rojos provenientes del Valle del Mantaro reportó mayor concentración de capsaicinoides (4357.92 $\mu\text{g/g}$ muestra seca); esta diferencia se puede deber al método de extracción utilizado (Fluido supercrítico) y/o al lugar de origen.

En general, las diferencias en las concentraciones de capsaicinoides se pueden deber a diversos factores, por ejemplo, los ajíes con mayor cantidad de agua son menos pungentes porque tienen menos capsaicinoides por unidad de peso; así mismo, factores ambientales como la disponibilidad de agua y la luz solar pueden afectar esta concentración (Sánchez-Sánchez et al. 2010).

En la investigación que realizaron Meckelmann et al. (2015) en 32 accesiones de *Capsicum pubescens* “rocotos” provenientes de Arequipa, los cuales crecieron en el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) a una temperatura de 19°C, humedad, agua y luz controladas; encontraron una concentración de polifenoles totales en un rango de 89 a 166 mg EAG/100 g muestra fresca. Este resultado es mayor a lo reportado en el presente trabajo para rocoto rojo y amarillo (46.11 y 58.57 mg EAG/100 g, respectivamente) los cuales crecieron a 20°C y las condiciones ambientales no fueron controladas.

Oboh & Texeira (2006) estudiaron frutos maduros e inmaduros de *C. pubescens* provenientes de Santa María RS, Brasil; en los cuales determinaron el contenido de polifenoles en estos dos estadios, también en semillas y pulpa, a partir de una extracción con acetona al 80%. El resultado que obtuvieron indica que existen diferencias en el contenido de polifenoles en estadio maduro e inmaduro y explica que los cambios fisiológicos durante el proceso de maduración y el cambio de color pueden afectar el contenido de polifenoles totales. Por otro lado, indica

que los compuestos fenólicos se distribuyen por igual entre la pulpa y las semillas, debido a que no presentan diferencia significativa entre los resultados (Oboh & Texeira, 2006). De acuerdo a lo expuesto, nuestras dos muestras fueron recolectadas en estadio maduro, lo que indica que ambas concentraciones de polifenoles pueden ser comparadas.

En el año 2008, los mismos investigadores determinaron el contenido de polifenoles en el mismo fruto, pero cambiaron de solvente, esta vez utilizaron agua y no separaron las semillas de la pulpa. A pesar de los diferentes solventes empleados (agua y acetona) la muestra proveniente de Brasil presenta mayor contenido de polifenoles que nuestra muestra y esta diferencia se puede deber a la temperatura de extracción, ya que a mayor temperatura es mejor la extracción de estos compuestos. Para las muestras provenientes de Brasil la extracción se realizó a 60°C, mientras que la extracción en ambos rocotos se realizó a 45°C (Oboh & Rocha, 2008).

Por otro lado Rivas et al. (2014) investigaron el rocoto, "locoto" como se le conoce en Argentina, en tres muestras de diferentes colores amarillo, rojo y verde y en estadio maduro, los cuales fueron adquiridos en la provincia de Jujuy, Argentina y liofilizados en el laboratorio. El contenido de polifenoles totales fue 712, 681.60 y 822 mg EAG/100 g para los rocotos verde, amarillo y rojo, respectivamente. Al transformar nuestros resultados de base fresca a seca, encontramos un contenido de polifenoles totales para rocoto rojo y amarillo comparativamente menores (72.68 y 100.25 mg EAG/100g, respectivamente).

Todas estas diferencias pueden ser consecuencia de factores intrínsecos al propio vegetal (de origen genético) que llevan a que la composición en estas sustancias sea diferente no sólo entre distintas especies, sino incluso también entre variedades de un mismo producto (Tomás-Barberán F.A., 2003).

Por otro lado, numerosos factores medioambientales como la luz, el clima y factores agronómicos juegan un papel fundamental en el contenido de la mayoría de los polifenoles (Tomás-Barberán F.A., 2003).

Miean & Mohamed (2010), luego de evaluar el contenido de flavonoides en plantas tropicales comestibles, sostienen que los frutos contienen exclusivamente quercetina porque kaempferol y otros flavonoides se encuentran en trazas, lo cual no coincide con nuestros resultados ya que el rocoto amarillo presenta ambos flavonoides; sin embargo, en el rocoto rojo quercetina se encuentra en trazas. Dentro de su investigación también se encuentra el ají verde y el pimiento, los cuales presentan luteolina y apigenina, esto difiere de nuestros resultados ya que dichos flavonoides no fueron detectados en el rocoto rojo y en el rocoto amarillo se encuentran como trazas.

De acuerdo a la investigación realizada por Rivas et al. (2014), donde evalúan tres muestras de *Capsicum pubescens* (locoto verde, amarillo y rojo) y un locoto comercial, se obtuvo que el locoto verde presenta mayor contenido de flavonoides (0.90 mg/g) en comparación a las muestras de rocoto rojo y amarillo.

La diferencia de los resultados respecto al contenido de flavonas y flavonoles se debe a condiciones de crecimiento, grado de madurez, tamaño de fruto y variedad.

Isabelle et al. (2010) evaluaron la actividad antioxidante de algunos vegetales en Singapur y obtuvo que *Capsicum annum* variedad grossum presenta 5.35 $\mu\text{mol ET/g}$ y la variedad longum 18.35 $\mu\text{mol ET/g}$ comparando con el rocoto amarillo 11.38 $\mu\text{mol ET/g}$ y rojo 10.60 $\mu\text{mol ET/g}$, estos últimos presentan mayor actividad que la variedad grossum, pero menor que la variedad longum. Por otro lado, Lutz et al. (2015) evaluaron dos tipos de pimientos (verde y rojo) cultivados en Chile y obtuvieron que el pimiento verde presenta 11.8 $\mu\text{mol ET/g}$ y el pimiento rojo 13.9 $\mu\text{mol ET/g}$, en este caso ambos pimientos presentaron mayor actividad antioxidante que el rocoto rojo 10.6 $\mu\text{mol ET/g}$ y amarillo 11.4 $\mu\text{mol ET/g}$.

Las diferencias que se encuentran en cuanto a la actividad antioxidante se podrían deber al uso de diferentes solventes al momento de realizar la extracción, ya que algunos antioxidantes (polifenoles y flavonoides) son más solubles en agua; así mismo el origen geográfico de los frutos y las condiciones ambientales

controladas pueden influir en dicha actividad. Las muestras provenientes de Chile fueron cultivadas a 19°C y bajo condiciones controladas (humedad y luz solar), mientras que ambos rocotos fueron cultivados a 20°C y las condiciones ambientales no fueron controladas, por lo cual la disposición de luz solar y humedad no fueron constantes durante la maduración de los frutos.

VII. CONCLUSIONES

- En el análisis químico-proximal de las muestras de rocoto rojo y amarillo se obtuvo, respectivamente, las siguientes concentraciones: Grasas, 1.76 y 1.84%; Fibra, 18.04 y 20.99% y Cenizas, 9.34 y 10.33%. Ambas muestras contenían 15.54% de proteínas; mientras que el contenido de Carbohidratos fue mayor en el rocoto rojo (55.29 versus 51.31%).
- Para ambos rocotos, el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina siempre es mayor en la placenta/semilla que en la pulpa. Independientemente de la parte del fruto, el contenido de dihidrocapsaicina es mayor al de la capsaicina. El contenido de capsaicina en el rocoto rojo y amarillo fue 16.84 y 41.76 en la pulpa y 153.45 y 362.53 $\mu\text{g/g}$ muestra fresca en la placenta/semilla, respectivamente. Mientras que el contenido de dihidrocapsaicina fue 19.08 y 59.88 en la pulpa y 186.90 y 530.97 $\mu\text{g/g}$ muestra fresca en la placenta/semilla, respectivamente.
- El contenido de fenólicos totales para el rocoto rojo y amarillo fue 46.11 y 58.57 mg EAG/100 g muestra fresca, respectivamente.
- Los flavonoides luteolina y apigenina estuvieron presentes solo a nivel de trazas en ambos rocotos. El rocoto amarillo contiene quercetina y kaempferol (7 y 8 $\mu\text{g/g}$ muestra fresca, respectivamente), mientras que el rocoto rojo solo presenta el flavonoide kaempferol (2 $\mu\text{g/g}$ muestra fresca).
- La capacidad antioxidante del rocoto rojo y amarillo, determinada por el método ORAC, fue 1060.15 y 1137.9 $\mu\text{mol ET/100 g}$ muestra fresca, respectivamente.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEX. (2015). Exportación de Capsicum. 10-13. <http://www.adexperu.org.pe/index.php/prensa/notas-de-prensa/item/517-adex-estima-que-exportacion-de-capsicum-peruano-crecera-20-este-ano>
2. AOAC. Official Methods of Analysis. AOAC International USA, 18 th Edition, 2005, Chapter 4, pp 1, 34, 44.
3. Alvarez-Parrilla, E.; de la Rosa, L.A.; Amarowicz, R.; Shahidi, F. (2011). Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 163-173.
4. Appendino, G. (2008). Capsaicin and Capsaicinoids. en: *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*. Edited by E. Fattorusso and O. Tagliatalata-Scafati. Weinheim. Alemania. pp. 73-110.
5. Bautista, J.; Jimenez R., Garay M.; Quintanilla, C.; León, G., García, C. (2012). Valor nutritivo de Chiles (*Capsicum*, spp) consumidos en Mexico. XIV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Monterrey, México. pp. 361-364.
6. Berríos, M.E.; Arredondo C.; Holwerda H.T. (2007). Guía de Manejo de Nutrición Vegetal de Especialidad Pimiento. Disponible en: http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/807/SQM-Crop_Kit_Pepper_L-ES.pdf
7. Blainski, A.; Lopes G.C.; Palazzo de Melo, J.C. (2013). Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, 18, 6852-6865.
8. Cedrón, J. C. (2013). La capsaicina. *Revista de Química PUCP* 27, 7-9.
9. Chhabra, N.; Aseri, M.L.; Goyal, V.; Sankhla, S. (2012). Capsaicin: A promising therapy. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, 2, 8-15.
10. Emmanuel-Ikpeme, C.; Peters, H.; Okiri, O.A. (2014). Comparative evaluation of the nutritional, phytochemical and microbiological quality of three pepper varieties. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2, 74-80.
11. Fernández-Pachón, M.S.; Villaño, D.; García-Parrilla M.C.; Troncoso, A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 113-118.
12. Gamarra, N.; Bontemps, I.; Coronel, E.; Velásquez, S.; Obed, J.; Granza, S. (2010). Extracción por fluido supercrítico de CO₂ y cuantificación de capsaicinoides de rocoto (*Capsicum pubescens*) del Valle del Mantaro. *Revista Informativa del Centro de Investigación de la Universidad Nacional del Centro del Perú*, 3, 24-29.
13. Gómez, M.; Barrera, J.; Melgarejo, L.; Bardales, X. (2004). Caracterización y usos potenciales del banco de germoplasma de ají amazónico. Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas Sinchi, Universidad Nacional de Colombia.
14. Halliwell, B. (1996). Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, 25, 57-74.
15. Hernández, JE; León, V. (1994). Neglected crops: 1492 from a different perspective. *FAO Plant Production and Protection Series*, no.26. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/018/t0646e/t0646e.pdf>

16. Isabelle, M.; Lee, B.L.; Lim, M.T.; Koh, W.P.; Huang, D.; Ong, C.N.; (2010). Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chemistry*, 120, 993-1003.
17. Jäger, M.; Jiménez, A.; Amaya, K. (2013). Guía de oportunidades de mercado para los ajíes nativos de Perú. Bioversity International, Roma, Italia.
18. Jäger, M.; Amaya, K. (2014). Generación de innovaciones para mejorar la competitividad y los beneficios de los actores de las cadenas de valor de los ajíes nativos en Bolivia y Perú. *Bioversity International*. Roma, Italia. 88 pp.
19. Juangsamoot, J.; Ruangviriyachai, C.; Techawongstien, S.; Chanthai, S. (2012). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in some hot chili varieties by RP-HPLC-PDA after magnetic stirring extraction and clean up with C18 cartridge. *International Food Research Journal*, 19, 1217-1226.
20. Kollmannsberger, H.; Rodríguez-Burruezo, A.; Nitz, S.; Nuez, F. (2011). Volatile and capsaicinoid composition of ají (*Capsicum baccatum*) and rocoto (*Capsicum pubescens*), two Andean species of chile peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1598-1611.
21. Krishna, A. (2004). *Capsicum: The Genus Capsicum*. New York: Taylor & Francis. 275 pp.
22. León, J. (2000). *Botánica de los Cultivos Tropicales* (tercera edición ed.). IICA. San José, Costa Rica. 522 pp.
23. Long Towell, J. (2005). Los senderos Prehispánicos del Capsicum. *Históricas Digital*. Disponible en: <http://www.historicas.unam.mx/publicaciones/publicadigital/libros/caminosymercados/cm006.pdf>
24. López Riquelme, G.O. (2003). Chilli. La especia del Nuevo Mundo. *Ciencias*, 69, 67-75.
25. Lutz, M.; Hernández, J.; Henríquez, C. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. *CyTA-Journal of Food*, 13, 541-547.
26. Mateos, R.M.; Jiménez, A.; Román, P.; Romojaro, F.; Bacarizo, S.; Leterrier, M.; Gómez, M.; Sevilla, F.; del Río, L.A.; Corpas, F.J.; Palma, J.M. (2013). Antioxidant systems from pepper (*Capsicum annuum*): Involvement in the response to temperature change in ripe fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9556-9580.
27. Meckelmann, S.W.; Riegel, D.W.; van Zonneveld, M.J.; Ríos, L.I.; Peña, K.; Ugas, R.; Quinones, 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.
28. Meckelmann, S.W.; Jansen, C.; Riegel, D.W.; van Zonneveld, M.J.; Ríos, L.I.; Peña, K.; Mueller-Seitz, E.; Petz, M. (2015). Phytochemicals in Native Peruvian *Capsicum pubescens* (Rocoto). *European Food Research and Technology*, 241, 817-825.
29. Mercado-Mercado, G.; de la Rosa, L.; Wall-Medrano, A.; López, J.; Alvarez-Parrilla E. (2013). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especies típicas consumidas en México. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 36-46.
30. Miesan, K.H.; Mohamed, S. (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3106-3112.
31. Oboh, G.; Texeira, J.B. (2006). Distribution and antioxidant activity of polyphenols in ripe and unripe tree pepper. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 456-473.

32. Oboh, G.; Rocha, J.B.T. (2008). Water extractable phytochemicals from *Capsicum pubescens* (tree pepper) inhibit lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents in brain: *in vitro*. *European Food Research and Technology*, 226, 707-713.
33. Okewole, A.I.; Ojiodu, C.C.; Eruola, A.O.; Oredoko, O.O. (2013). Comparative Evaluation of Nutritional Value of Two Selected Varieties of Chili Pepper. *The Polytechnic Journal of Science and Technology*, 8, 45-52.
34. Othman, Z.A.; Ahmed, Y.B.; Habila, M.A.; Ghafar, A.A (2011). Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in Capsicum Fruit using HPLC. *Molecules*, 16, 8920-8927.
35. Pedrola, I.E. (2010). Polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Disponible en: <http://dietcan.net/docs/POLIFENOLES-MAD.pdf>
36. Quintanar, M.A.; Calderón, J.V. (2009). La Capacidad Antioxidante Total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28, 89-101.
37. Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27, 76-89.
38. Rivas, M; Vignale, D.; Ordóñez, R.M.; Zampini, I.C.; Alberto, M.R.; Sayago, J.E.; Isla, M.I. (2014). Nutraceutical Properties and Toxicity Studies of Flour Obtained from *Capsicum pubescens* Fruit and Its Comparison with "Locoto" Commercial Powder. *Food and Nutrition Sciences*, 5, 715-724.
39. Sánchez-Sánchez, H.; González-Hernández, V.A.; Cruz-Pérez, A.B.; Pérez-Grajales, M.; Gutiérrez-Espinosa, M.A.; Gardea-Béjar, A.A.; Gómez-Lim, M.A. (2010). Herencia de capsaicinoides en Chile Manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). *Agrociencia*, 44, 655-665.
40. Sierra Exportadora. (2012). Perfil Comercial. Rocoto. Disponible en: http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/09_%20PERFIL%20COMERCIAL%20DE%20ROCOTO-OK.pdf
41. Tomás-Barberán, FA. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10, 41-53.
42. Vázquez-Flota, F; Miranda-Ham, M.L.; Monforte-González, M.; Gutiérrez-Carbajal, G; Velásquez-García, C.; Nieto-Pelayo, Y. (2007). La biosíntesis de los capsaicinoides, el principio picante del chile. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 30, 353-360.
43. Vera-Guzmán, A.M.; Chávez-Servia, J.L.; Carrillo-Rodríguez, J.C.; López, M.G. (2011). Phytochemical evaluation of wild and cultivated pepper (*C. annuum* and *C. pubescens*) from Oaxaca, Mexico. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71, 578-585.
44. Vidal, M.A.; Calderón, E.; Román, D.; Pérez-Bustamante, F.; Torres, L.M. (2004). Capsaicina tópica en el tratamiento del dolor neuropático. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 11, 306-318.

IX ANEXOS

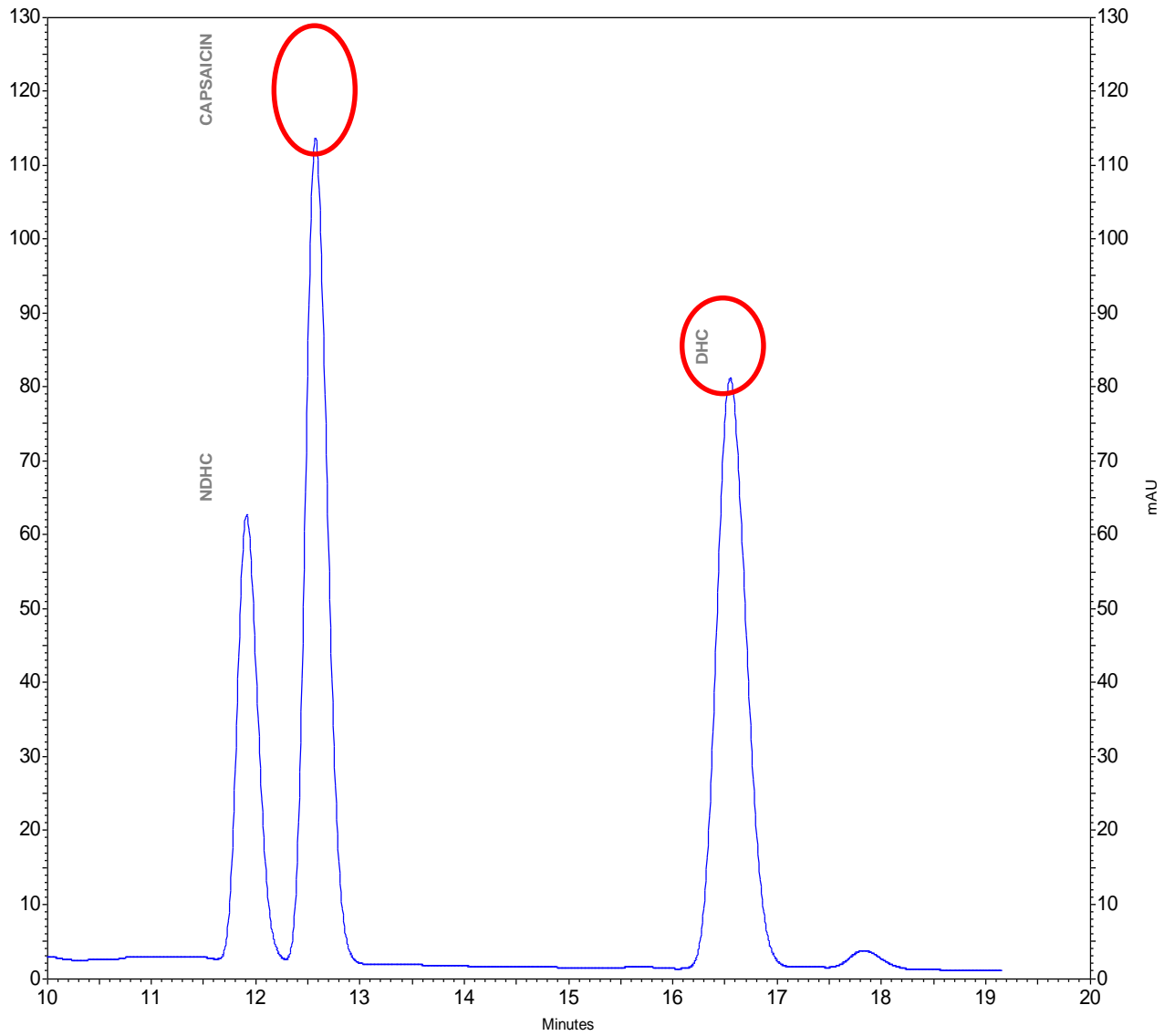
Anexo 1

Esquema del Análisis Proximal de las dos variedades



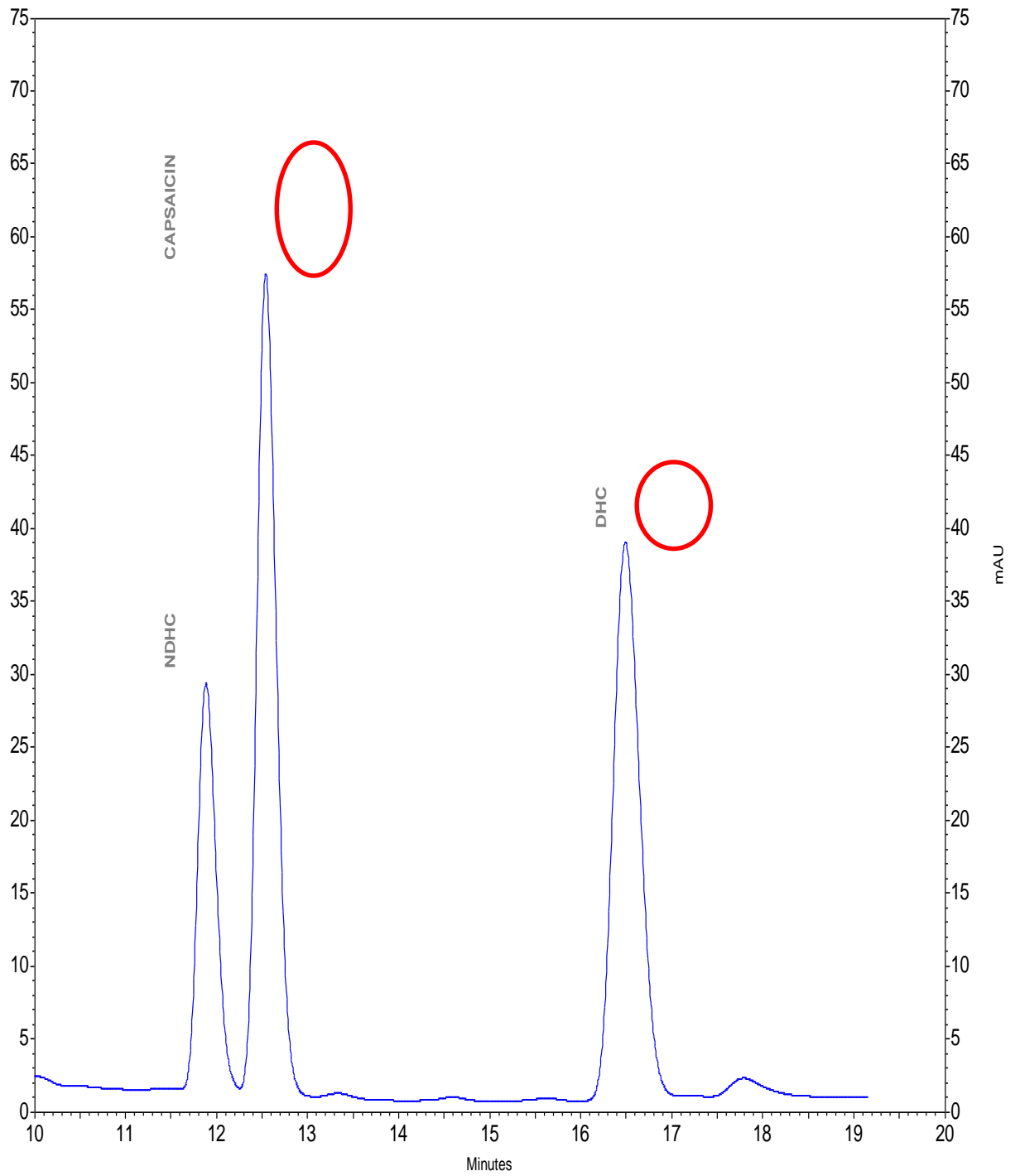
. Anexo 2

Cromatograma de rocoto amarillo semilla



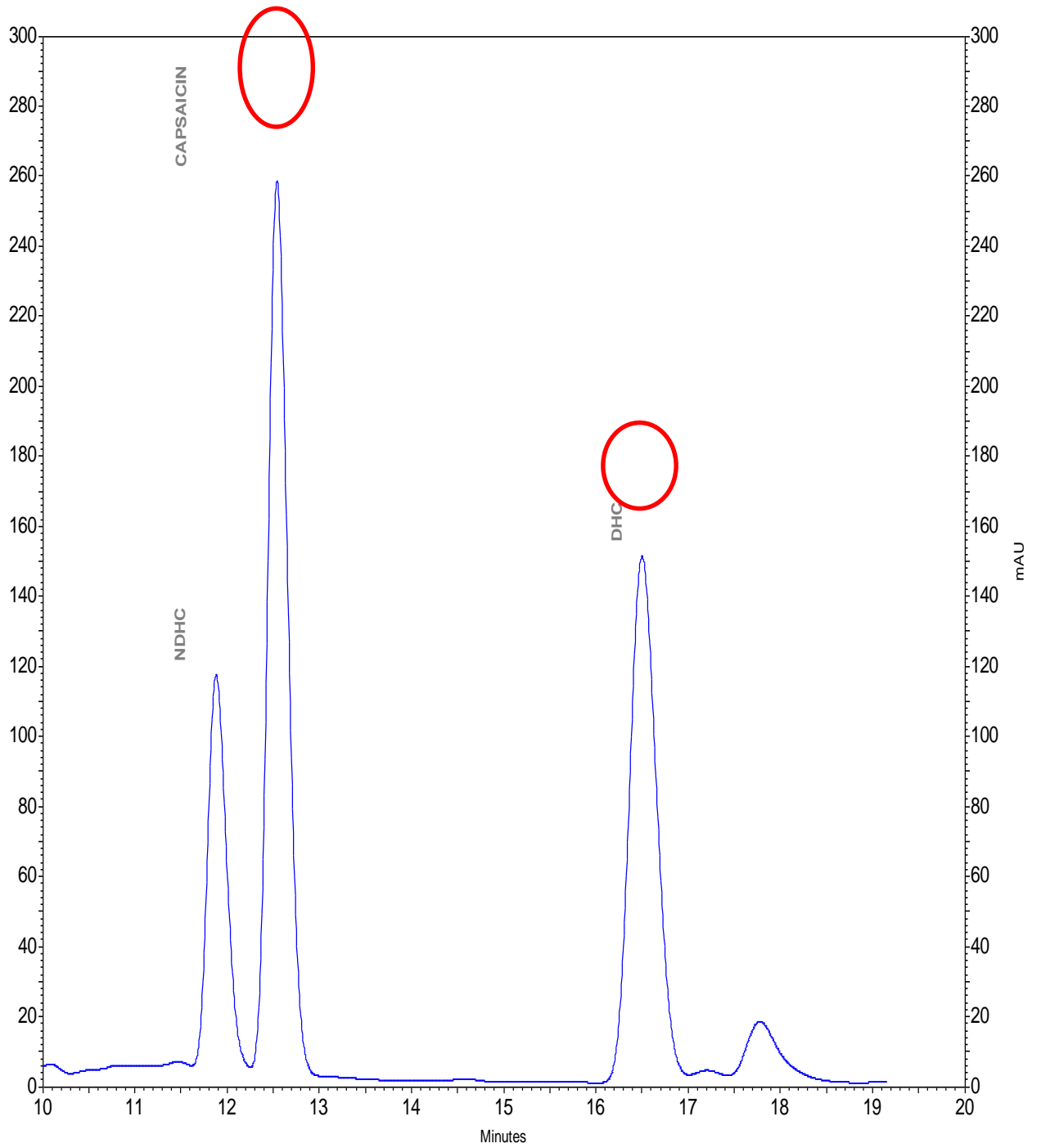
. Anexo 3

Cromatograma de rocoto amarillo pulpa



Anexo 4

Cromatograma de rocoto rojo semilla



Anexo 5

Cromatograma de rocoto rojo pulpa

