



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

**INFLUENCIA DEL GENOTIPO Y ETAPAS DE MADURACIÓN DE LOS FRUTOS
DE CHILE PERÓN (*Capsicum pubescens* Ruiz et Pavón) SOBRE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE E HIPOGLUCÉMICA EN RATAS DIABÉTICAS**

BIOL. ANTONIO CARRILLO CORONA

**Para obtener el título profesional de:
Maestro en Ciencias Biológicas**

**Director de Tesis
D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA**

**Co-Director de Tesis
D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA**

Morelia, Michoacán; Marzo de 2019

DEDICATORIA

A mi madre Virginia, por ser la base y la inspiración en mi vida profesional, forjando la responsabilidad y deseos de superación. A mi tío Rafael, que a pesar de no estar en vida aún tengo presente los gratos momentos que compartí a tu lado.

"Para tener éxito en tu vida, tu deseo de éxito debe ser mayor que tu miedo al fracaso", Bill Cosby.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, Área Temática de Biotecnología Alimentaria (Facultad de Químico FarmacoBiología) por permitirme el ingreso a este posgrado y brindarme las facilidades para realizar mis estudios.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de la maestría.

Principalmente a mi director de tesis, al Dr. Rafael Salgado Garciglia por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado y por haber compartido sus enseñanzas y experiencias durante estos dos años, mostrándome el excelente profesionalista que es. Y de igual manera, agradezco al Dr. Alfredo Saavedra Molina, codirector de esta tesis, por su acertada dirección en gran parte del desarrollo de esta investigación

También agradezco a los profesores miembros del comité de sinodales, a los Dres. Patricia Ríos Chávez, Héctor Eduardo Martínez Flores y Asdrúbal Méndez Aguilera, que, por sus aportaciones y conocimientos, se alcanzó la calidad de esta tesis.

A la M.C. Alejandra Hernández García, responsable técnica del laboratorio de Biotecnología Vegetal, por sus comentarios y observaciones.

A mis compañeros de los laboratorios de Biotecnología Vegetal y Bioquímica, agradeciendo su amistad, pero en especial al Dr. Rafael Torres Martínez, al M.C. Donovan Peña Montes y a la M.C. Maribel Huerta Cervantes, quienes me apoyaron en el trabajo experimental.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>i</i>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>v</i>
RESUMEN GENERAL	<i>vi</i>
GENERAL SUMMARY	<i>viii</i>
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. Diabetes mellitus	3
I.1.1. Diabetes mellitus a nivel mundial y en México	4
I.1.2. Estrés oxidante y diabetes mellitus	5
I.1.2.1. Acumulación y acción de productos de glicación avanzada	8
I.1.2.2. Incremento en la vía de polioles	8
I.1.2.3. Aumento en la vía de hexosaminas	9
I.1.2.4. Activación de la proteína C cinasa	9
I.1.2.5. Disminución de antioxidantes exógenos	10
I.2. Antioxidantes endógenos y exógenos	11
I.2.1. Antioxidantes de origen vegetal en diabetes experimental	12
I.2.2. Métodos de determinación de actividad antioxidante	15
I.3. Características del género <i>Capsicum</i>	16
I.3.1. Compuestos bioactivos de frutos de <i>Capsicum</i>	17
I.3.2. Chile perón (<i>Capsicum pubescens</i>)	19
II. JUSTIFICACIÓN	22
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	24
IV.1. Objetivo general	24
IV.1.1. Objetivos específicos	24
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
VI. RESULTADOS	26
VI.1. Relación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de extractos de frutos de chile perón (<i>Capsicum pubescens</i> Ruiz <i>et</i> Pavón) con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina.	26

VI.2. Actividad hipoglucémica del extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón (<i>Capsicum pubescens</i> Ruiz et Pavón) en ratas diabéticas.	43
VI.3. Efecto del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón (<i>Capsicum pubescens</i>) genotipo “Amarillo” sobre el contenido de marcadores de estrés oxidante en mitocondrias de riño de ratas diabéticas.	63
VII. DISCUSIÓN GENERAL	82
VII.1. Relación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> con el contenido los compuestos bioactivos en extractos de frutos de chile perón.	82
VII.2. Efecto del extracto metanólico de frutos de chile perón genotipo “Amarillo” en ratas diabéticas.	83
VII.3. Efecto antioxidante del extracto metanólico de frutos de chile perón genotipo “Amarillo” en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas.	85
VIII. CONCLUSIONES GENERALES	88
IX. PERSPECTIVAS	89
X. LITERATURA CITADA GENERAL	90
XI. ANEXOS	99

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Principales mecanismos que generan el estrés oxidante en condiciones de hiperglicemia con un bajo nivel de antioxidantes exógenos.	7
Figura 2. Planta (a), flores (b) y frutos (c) de chile perón (<i>Capsicum pubescens</i>) del genotipo “Amarillo”.	21
Figura 3. Frutos de chile perón (<i>C. pubescens</i>) de los genotipos “Amarillo” (a) y “Rojo” (b) en etapa de madurez de consumo.	29
Figura 4. Porcentajes de actividad antioxidante por ABTS (a), DPPH (b) y TAC (c) en los extractos metanólico (MeOH), de acetato de etilo (AcEt) y hexánico (Hex), de los frutos inmaduros y maduros de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de chile perón (<i>C. pubescens</i>), comparados con 100 μ moles de BHT (Butil Hidroxitolueno) y Trolox. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).	33
Figura 5. Contenido de ácidos fenólicos totales (a) y flavonoides totales (b) en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).	36
Figura 6. Contenido de ácido ascórbico en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).	37
Figura 7. Contenido de carotenoides en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).	38
Figura 8. Contenido de capsaicina en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).	39
Figura 9. Concentración de glucosa (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) (a) y diabéticas (D) (b) tratadas durante 60 días con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg). Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).	49

	Página
Figura 10. Peso corporal (g) en ratas normoglucémicas (N) (a) y diabéticas (D) (b), tratadas durante 60 días con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg). Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).	50
Figura 11. Concentración de glucosa (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).	52
Figura 12. Concentración de ácido úrico (a), creatinina (b) y urea (c) (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).	53
Figura 13. Concentración de triacilglicéridos (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).	55
Figura 14. Concentración de colesterol total (a) y colesterol HDL (b) (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).	57
Figura 15. Concentración de lípidos totales (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).	58

- Figura 16. Concentración de glutatión total (GSht) (mmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey). 69
- Figura 17. Concentración de glutatión oxidado (GSSG) (mmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey). 70
- Figura 18. Concentración de glutatión reducido (GSH) (mmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey). 71
- Figura 19. Relación de la concentración de GSH/GSSG (mmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey). 73
- Figura 20. Actividad de superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) (U/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey). 74
- Figura 21. Niveles de lipoperoxidación (TBARS nmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey). 75

- Figura 22. Niveles de carbonilación de proteínas (nmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey). 76
- Figura 23. Mecanismo de acción propuesto de los antioxidantes del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo”, elaborado de acuerdo a los resultados obtenidos con la administración de 10 mg/Kg en ratas diabéticas y a la función descrita para antioxidantes exógenos de origen vegetal, en condiciones de diabetes mellitus. 86

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro1. Ejemplo de plantas o frutos con actividad antioxidante e hipoglucémica en modelos experimentales <i>in vivo</i> .	13
Cuadro 2. Unidades Scoville de diferentes especies del género <i>Capsicum</i> .	17
Cuadro 3. Tratamientos experimentales en ratas para determinar el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón (<i>C. pubescens</i>) en ratas diabéticas Wistar macho.	47
Cuadro 4. Valores de referencia de parámetros bioquímicos en suero de ratas Sprague Dawley.	47

RESUMEN GENERAL

En los últimos años se ha demostrado la actividad antioxidante e hipoglucémica de compuestos provenientes de plantas como el ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), ácidos fenólicos, carotenoides, flavonoides y glutatión. Algunos de estos compuestos se producen en frutos de *Capsicum* spp. (chiles), por lo que se ha comprobado su efecto antioxidante e hipoglucémico en algunas de sus especies. Sin embargo, los frutos de chile perón (*Capsicum pubescens*) han sido poco estudiados y se desconoce su poder antioxidante e hipoglucémico, así como la relación del contenido de sus principales compuestos activos con las etapas de maduración y los diferentes genotipos. Por esta razón, el objetivo principal de esta investigación fue cuantificar el contenido de ácido ascórbico, ácidos fenólicos, capsaicina, carotenoides y flavonoides, de los frutos de chile perón de dos genotipos de chile perón “Amarillo” y “Rojo”, en dos etapas de maduración, mediante análisis espectrofotométrico de tres extractos obtenidos con maceración en metanol, acetato de etilo y hexano, con el propósito de relacionar su contenido con la actividad antioxidante e hipoglucémica, utilizando un modelo experimental de ratas diabéticas. Los frutos se obtuvieron de plantas cultivadas bajo condiciones controladas de invernadero en dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo), cada extracto se preparó en una concentración de 10 mg/mL, los que fueron evaluados para determinar la capacidad antioxidante *in vitro* para seleccionar el de mayor actividad y probar su efecto hipoglucémico. La actividad antioxidante *in vitro* se determinó por los métodos ABTS, DPPH y TAC, demostrando la mayor actividad antioxidante en el extracto metanólico de los frutos de chile perón inmaduro genotipo “Amarillo” (1 mg/mL), con 92.4%, 93.68% y 70.90%, correspondiendo a valores de IC₅₀ de 0.1, 0.4 y 0.3 mg/mL respectivamente. Debido a estos resultados, este extracto fue considerado como el de mayor actividad, relacionando dicha propiedad con el mayor contenido de flavonoides con 121.97 μ moles EqQ/mg p.f., un valor sin diferencia significativa con los demás extractos de ácido ascórbico (11.6 μ moles/mg p.f.) y una cantidad menor de ácidos fenólicos totales (82.82 μ moles EAG/mg p.f.) y de capsaicina (3.095 μ moles/g p.f.), a los presentados por los otros extractos metanólicos. El extracto se administró oralmente (100 μ L) en tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg) por 60 días a ratas diabéticas Wistar macho (300-400 g), inducidas con estreptozotocina (40 mg/kg), encontrando un mayor efecto hipoglucémico a la dosis de 10 mg/Kg, ejerciendo una disminución drástica en los niveles de glucosa de hasta 177% (115 mg/dL), permitiendo una ligera ganancia en el peso corporal. En este grupo de ratas, a los 60 días de tratamiento, se observó una disminución en los niveles de glucosa, ácido úrico, creatinina, triacilglicéridos y lípidos totales, un aumento en el peso de las ratas y una tendencia a bajar los niveles de colesterol y colesterol-HDL. El extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de *C. pubescens*, tuvo un efecto hipoglucémico, hipotriglicéridémico, hipolipidémico y protector de daño renal, principalmente a la concentración de 10 mg/kg. En mitocondrias aisladas de riñón de ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg del extracto, se observó un incremento en las concentraciones de glutatión evaluados (GSht, GSH y GSH/GSSG) con 2.94, 1.45 y 1.0 mmoles/mg de proteína, respectivamente, presentándose una tendencia a aumentar las concentraciones de GSH. Sin embargo, el contenido de glutatión oxidado (GSSG) disminuyó hasta en un 32.7% con esta dosis de extracto, respecto al contenido mostrado por las ratas diabéticas no tratadas con el extracto. Así mismo, los niveles de

lipoperoxidación y de carbonilación de proteínas fueron menores en las ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg del extracto, con valores de 0.51 nmoles/mg de proteína y 2.66 nmoles/mg de proteína, con un 32% y 69.2% menor, respectivamente, que lo observado en ratas diabéticas no tratadas. La actividad de la SOD2 no presentó cambios dependientes de la dosis del extracto tanto en ratas normoglucémicas como en diabéticas. Estos resultados indican una relación directa entre la alta actividad antioxidante *in vitro* presentada por el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo “Amarillo”, con el efecto hipoglucémico, hipotriglicéridémico, hipolipidémico y protector de daño renal; así como su efecto sobre la disminución del estrés oxidante y en los niveles de lipoperoxidación y de carbonilación de proteínas a nivel mitocondrial.

Palabras clave: Antioxidantes, chile perón, diabetes, estrés oxidativo, hipoglucémico.

GENERAL SUMMARY

In recent years some compounds obtained from plant as ascorbic acid, α -tocopherol (vitamin E), phenolic acids, carotenoids, flavonoids and glutathione, have antioxidant activity and hypoglycemic effects. Some of these compounds are produced in fruits of *Capsicum* spp. (chili pepper), which could be suggest its antioxidant activity and hypoglycemic effect. However, fruits of other species such chili "perón" (*Capsicum pubescens*) have been little studied and is unknown its antioxidant power and hypoglycemic, as well as the relationship of the content of its main active compounds with the stages ripening and different genotypes. For this reason, the main objective of this research was to quantify the content of ascorbic acid, phenolic acids, capsaicin, carotenoids and flavonoids from the chili "perón" fruits of "Amarillo" and "Red" genotypes, in two stages of ripening, using spectrophotometric analysis of three extracts obtained by maceration in methanol, ethyl acetate and hexane, to relate its content with antioxidant and hypoglycemic activity, using an experimental model of diabetic rats. The fruits were obtained from plants grown under controlled greenhouse conditions in two stages of maturity (unripe and consumption maturity), each extract was prepared at a concentration of 10 mg/mL, which were evaluated to determine the antioxidant activity *in vitro* to select the most antioxidant activity and hypoglycemic effect. The antioxidant activity *in vitro* was determined by ABTS, DPPH and TAC methods, demonstrating greater antioxidant activity in methanol extract of unripe fruits of "Yellow" genotype chili "perón" (1 mg/mL), with 92.4%, 93.68% and 70.90%, corresponding to values of IC₅₀ of 0.1, 0.4 and 0.3 mg/mL respectively. Because of these results, this extract was considered to be the greatest activity, relating this property with the highest content of flavonoids (121.97 micromoles EqQ/mg p.f.), a value without significant difference with other extracts of ascorbic acid (11.6 micromoles/mg p.f.) and one smaller amount of total phenolic acids (82.82 micromoles EAG/mg p.f.) and capsaicin (3.095 μ mol/g p.f.), to those presented by other methanol extracts. The extract was administered orally (10 μ L) at three doses (0.1, 1 and 10 mg/Kg) for 60 days to male Wistar diabetic rats (300-400 g), induced with streptozotocin (40 mg/kg), finding that the dose of 10 mg/Kg had the highest hypoglycemic effect, exerting a drastic decrease in the levels of glucose to 177% (115 mg/dL), allowing a slight gain in body weight. In this group of rats, during the 60 days of treatment, it was observed a decrease in the levels of glucose, uric acid, creatinine, triacilglycerides and total lipids, an increase in the weight of the rats and a tendency to lower levels of cholesterol and HDL-cholesterol. Extract methanol of unripe fruits of "Yellow" genotype of *C. pubescens*, had indeed a hypoglycemic, renal and liver damage protector effects, mainly to the dose of 10 mg/Kg. In mitochondria isolated from kidney of diabetic rats treated with 10 mg/Kg of the extract, it was observed an increase in levels of glutathione (GSht, GSH and GSH/GSSG) with 2.94, 1.45 and 1.0 mmol/mg protein, respectively, presenting a trend to diminish GSH levels, depending on the concentration. However, the content of oxidized glutathione (GSSG) decreased until 32.7% with this dose of extract, with respect to the content showed by the diabetic rats not treated with the extract. Likewise, lipoperoxidation and protein carbonylation levels were lower in diabetic rats treated with 10 mg/Kg of the extract, with values of 0.51 nmol/mg protein and 2.66 nmol/mg of protein, with 32% and 69.2% lower than that observed in rats non-treated diabetic, respectively. The SOD2 activity did not present

dose-dependent changes in normoglycemic and diabetic rats. These results indicate a direct relationship between the high antioxidant activity *in vitro* by methanol extract of unripe fruits of "Yellow" genotype chili "peron", with hypoglycemic, hipotrigliceridemic, hypolipidemic and protector of kidney damage; as well as its effect on the reduction of oxidative stress and lipid peroxidation and protein carbonylation levels at the kidney mitochondrial level, in diabetic rats.

Keywords: Antioxidants, chili peron, diabetes, oxidative stress, hypoglycemic.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los frutos de chile (*Capsicum* spp) son ampliamente consumidos en el mundo y usados como alimentos o aditivos en la industria alimentaria. México junto con China, Indonesia, India, Turquía, España, Estados Unidos y Nigeria, son los países con mayor producción de chile en el mundo, el 90% de los chiles que se consumen a nivel mundial, son de origen mexicano y se estima que estos frutos son el segundo vegetal más consumido por la población mexicana después del tomate, con un consumo de aproximado de 7 a 9 kg/persona por año (Ornelas-Paz *et al.*, 2008; Álvarez-Parrilla *et al.*, 2011; SAGARPA, 2012). Además de alimento, estos frutos se han utilizado por sus propiedades analgésicas, antiartríticas, antipiréticas, antisépticas y antiespasmódicas, así como para el tratamiento de enfermedades como artritis, reumatismo, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, entre otras más, por lo que se reconocen sus aplicaciones médicas en diversas regiones como India, América y China (Buck y Bucks, 1983; Bloque y Langseth, 1994; Maturino, 2013).

Las propiedades medicinales de los frutos de algunas variedades o cultivares de *Capsicum* se ha relacionado con la presencia de una amplia gama de compuestos bioactivos como los del tipo fenólico, saponinas, carotenoides, capsaicinoides y vitaminas (A, B, C y E), ya que éstos poseen actividad antioxidante, antimicrobiana e hipoglucémica (Oboh y Rocha, 2008; Adedayo *et al.*, 2010; Earnest *et al.*, 2013). La actividad antioxidante, principalmente se les ha atribuido a las vitaminas, a los carotenoides, a los capsaicinoides y a los compuestos fenólicos (Daood *et al.*, 1996; Rosa *et al.*, 2002; Ochi *et al.*, 2003; Marín *et al.*, 2004; Materska y Perucka, 2005); mientras que las saponinas (furostanol), capsaicina y algunos compuestos fenólicos han presentado actividad antimicrobiana (Molina-Torres *et al.*, 1999; Iorizzi *et al.*, 2002; Kappel *et al.*, 2008). La capacidad hipoglucémica de los frutos de *C. frutescens* también ha sido evaluada, en los que la capsaicina fue la responsable, por lo que la población de Jamaica lo consume para tratar la diabetes tipo 2 (Bloque y Langseth, 1994).

El contenido de estos compuestos bioactivos puede variar según el genotipo, etapa de madurez, condiciones de cultivo y manipulación postcosecha, lo que afectan sus propiedades medicinales y funcionales (Osuna-García *et al.*, 1998; Howard *et al.*, 2000; Maturino, 2013). Por lo tanto, resulta pertinente analizar en las diferentes especies de *Capsicum* y sus diferentes cultivares o genotipos, estas variaciones y relacionarlas con la actividad antioxidante, antimicrobiana e hipoglucémica.

Las propiedades funcionales o nutraceuticas de los antioxidantes de origen vegetal tienen una gran influencia en el manejo de una de las enfermedades más importantes en nuestro siglo, la diabetes mellitus, así como algunas de sus complicaciones. Un desequilibrio entre el estrés oxidante y los mecanismos de defensa antioxidantes en pacientes con diabetes, lleva al daño de células y tejidos, acelerando las complicaciones de la enfermedad. La administración de antioxidantes apropiados podría prevenir o retardar las complicaciones diabéticas en cierta medida, diversas investigaciones sobre la actividad antioxidante de un gran número de plantas medicinales apoyan que ésta se relaciona con el efecto hipoglucémico (Packer *et al.*, 1999; McCune y Johns, 2002; Kamalakkannan y Mainzen, 2006).

En diversas investigaciones se ha demostrado este efecto protector antioxidante ejercido por diferentes compuestos bioactivos tanto de plantas medicinales como de frutos, cuando se administran en modelos experimentales de diabetes. Algunos extractos además de disminuir los niveles de glucosa en sangre en ratas con diabetes experimental, restauran los niveles de moléculas antioxidantes como el glutatión, así como de enzimas antioxidantes como la catalasa y la superóxido dismutasa, presentando bajos niveles tanto de lipoperoxidación como de carbonilación de proteínas, lo que sugiere protección renal y hepático (Mahdi *et al.*, 2003; Martínez-Mora *et al.*, 2017; Murillo, 2017; Montes, 2018; Udayakumar *et al.*, 2010).

Los frutos de chile (*Capsicum* spp) también han sido analizados tanto por su actividad antioxidante como hipoglucémica, demostrando con ello que, al consumir

sus frutos o extractos derivados de éstos, principalmente de las especies de *C. frutescens* (Block y Langseth, 1994; Young-In *et al.*, 2007) y *C. annuum* (Ahuja y Ball, 2006; Magied *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2017), tienen un efecto sobre la disminución de los niveles de glucosa durante la diabetes mellitus, así como propiedades insulinoimímicas o secretagogos (Earnest *et al.*, 2013).

Los frutos de la especie *C. pubescens*, conocidos mayormente en México como chile perón o chile manzano, aunque su origen es en Sudamérica, su cultivo y consumo en nuestro país ha incrementado en los últimos años (Kumar, 2003; Alcántar, 2007), son considerados como frutos de alto valor comercial, de los que hay pocos estudios que relacionen el contenido de sus compuestos bioactivos con las propiedades medicinales atribuidos a estos frutos como la actividad antioxidante y el efecto hipoglucémico.

Por lo anterior, los estudios encaminados a evaluar la actividad antioxidante en este tipo de frutos, deben de tomar en cuenta los factores involucrados en la variación del contenido de compuestos bioactivos, como el genotipo y las etapas de maduración (Maturino, 2013), por lo que en esta investigación se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de tres diferentes extractos de frutos de dos genotipos de chile perón (amarillo y rojo) de dos etapas de maduración (inmaduro y maduro), realizando una relación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de los principales compuestos bioactivos, así como estudios de la capacidad hipoglucémica del extracto con mayor actividad antioxidantes en un modelo experimental de ratas diabéticas.

I.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre (hiperglucemia), con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, donde la secreción y/o acción de insulina es deficiente, nula o ambos. Actualmente, la diabetes mellitus es clasificada

como tipo I, tipo II, gestacional y experimental, entre otras. La diabetes tipo I o insulino dependiente, es causada por autoinmunidad o factores idiopáticos y se caracteriza en edades tempranas debido a la destrucción paulatina de las células β del páncreas y acumulación de cetoacidosis, por lo que, personas que padecen este tipo de diabetes necesitan la administración diaria de insulina para mantener sus niveles de glucemia normales (OMS, 2016; ADA, 2018). La diabetes tipo II o no insulino dependiente, es determinada por la interacción de factores hereditarios, genéticos, metabólicos, sobrepeso y obesidad, alimentación malsana, falta de actividad física y tabaquismo, que contribuyen a la disminución de la secreción de insulina. Además, existe diabetes asociada a medicamentos, infecciones, enfermedades exocrinas del páncreas y endocrinopatías (Fernández-Mejía, 2013; OMS, 2016).

Entre los principales síntomas de la diabetes mellitus están la polidipsia, polifagia y poliuria, así como el daño a órganos vitales como los ojos, riñones, cerebro, vasos sanguíneos y corazón, que aumentan el riesgo de cardiopatía y accidentes cerebrovasculares. Este daño incrementa las complicaciones micro y macrovasculares provocando que el flujo sanguíneo disminuya, lo cual, sumado a la lesión de los nervios (neuropatía) de los pies, aumenta el riesgo de que se produzcan úlceras e infecciones que lleven a la amputación de miembros inferiores. La retinopatía diabética es una causa importante de ceguera y el resultado de un daño prolongado y acumulativo de los vasos sanguíneos en la retina. Con el transcurso del tiempo, una glucemia elevada asociada con diabetes sin tratar puede producir presión arterial alta y esto, a su vez, provocar daño renal (nefropatía), disminuyendo la filtración glomerular. Los criterios que establecen el comité de expertos sobre el diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus para el diagnóstico de la diabetes son: 1) niveles de glucemia en ayunas > 126 mg/dL (7.0 mmol/L); 2) glucosa postprandial de 2 horas > 200 mg/dL (11.1mmol/L); 3) hemoglobina glucosilada, estableciendo el punto de corte en 6.5% (ENSANUT, 2016; OMS, 2016).

I.1.1. Diabetes mellitus a nivel mundial y en México

Actualmente, la diabetes mellitus ocupa el 4° lugar de defunciones por enfermedades crónicas no transmisibles a nivel mundial. En el 2012, la diabetes causó 1.5 millones de muertes y las elevaciones de glucemia por encima de los valores estándar, provocaron otros 2.2 millones de muertes por efecto de un aumento del riesgo de sufrir principalmente enfermedades cardiovasculares. En el 2014, 422 millones de adultos tuvieron diabetes, correspondiente al 8.4% de la población adulta, es decir 1 por cada 11 personas. Desde 1980 al 2014, la prevalencia mundial de la diabetes en adultos (mayores a 18 años) ha ascendido a casi al doble del 4.7% al 8.5% aumentado en los países de ingresos medianos y bajos. Esto, representa un total de 3.7 millones de defunciones relacionadas con la hiperglucemia, de las cuales, el 43% pertenecen a personas en edades de 20 a 69 años (OMS, 2016).

Las tasas más altas en hiperglucemia se observan en las regiones del Mediterráneo Oriental, Asia Sudoriental y África, y en las otras regiones las tasas son mucho más bajas. Según la Federación Internacional de la Diabetes, se estima que, a partir de los costos estimados en una revisión sistemática reciente de los pacientes diabéticos, el gasto directo anual generado por esta enfermedad a escala mundial asciende a más de 827,000 millones de dólares (OMS, 2016). En México, la diabetes ocupa el 5° lugar a nivel mundial (FID, 2015; OMS, 2016), con una prevalencia de diagnóstico médico previo de diabetes en adultos del 9.4%, siendo ligeramente mayor en las mujeres (10.3%) respecto a hombres (8.5%), en localidades urbanas. El 87.8% de los diabéticos reciben un tratamiento médico para controlar su enfermedad, mientras que el 46.4% no realiza medidas preventivas para evitar o retrasar alguna complicación en la enfermedad (ENSANUT, 2016). En el 2016, el número de defunciones de diabetes en México fue de 105,574 de personas y se estima que para el 2020, este valor aumentará a 126,000 muertes (OMENT, 2016)

I.1.2. Estrés oxidante y diabetes mellitus

El estrés oxidante es un estado que ocurre a nivel celular, en el que las fuerzas oxidantes superan los sistemas antioxidantes, causando la pérdida del equilibrio entre ellos, provocando un desbalance de óxido-reducción (Yoshikawa y Naito, 2002; Díaz-Flores *et al.*, 2004). En este estado, los radicales libres, que pueden ser átomos, iones o moléculas con un electrón desapareado en su orbital más externo, tienen una gran capacidad de reaccionar con otras macromoléculas orgánicas (carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos), modificando su estructura y función, provocando efectos citotóxicos y clastogénicos (Díaz-Flores *et al.*, 2004).

Las diversas especies reactivas como el oxígeno, nitrógeno, hierro, cobre, así como las enzimas oxidantes (NADPH oxidasa, xantina oxidasa, aldehído oxidasa, galactosa oxidasa, lipooxigenasa, ciclooxigenasa y mieloperoxidasa) y las especies reactivas que se generan durante la respiración (reacciones en la cadena transportadora de electrones entre el complejo II y III) en la mitocondria, son factores que contribuyen a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), radical lípido peróxido (ROO^{\cdot}), radical óxido nítrico (ON^{\cdot}) y el radical peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), que aumentan el estrés oxidante (Ibarra, 2006).

En la figura 1 se muestra de manera esquemática el aumento del estrés oxidante causado por altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). Esto provoca a su vez, un aumento en los niveles de glucosa intracelular, lo que lleva a un aumento en el flujo de la cadena transportadora de electrones en la membrana intramitocondrial, a partir de los que se genera la formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que al reaccionar con óxido nítrico (NO) forma peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), pero mediante la acción de Mn-SOD lo convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), molécula que por la reacción de Fenton forma el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Todas estas especies reactivas de oxígeno son las responsables de causar el estrés oxidante. Con la hiperglucemia incrementa el estrés oxidante mediante cinco mecanismos principales: 1) por la acumulación y acción de los productos de glicación avanzada o AGEs (por sus siglas en inglés, Advanced Glycation end Products); 2) al incremento en la vía de polioles;

3) al aumento en la vía de las hexosaminas; 4) por la activación de diversas isoformas de la proteína C cinasa (PKC, del inglés protein kinase C); y 5) a la disminución de antioxidantes exógenos (Díaz-Flores, 2004 *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006; Hernandez *et al.*, 2011; Guerra, 2011; Salinas *et al.*, 2013) (Figura 1).

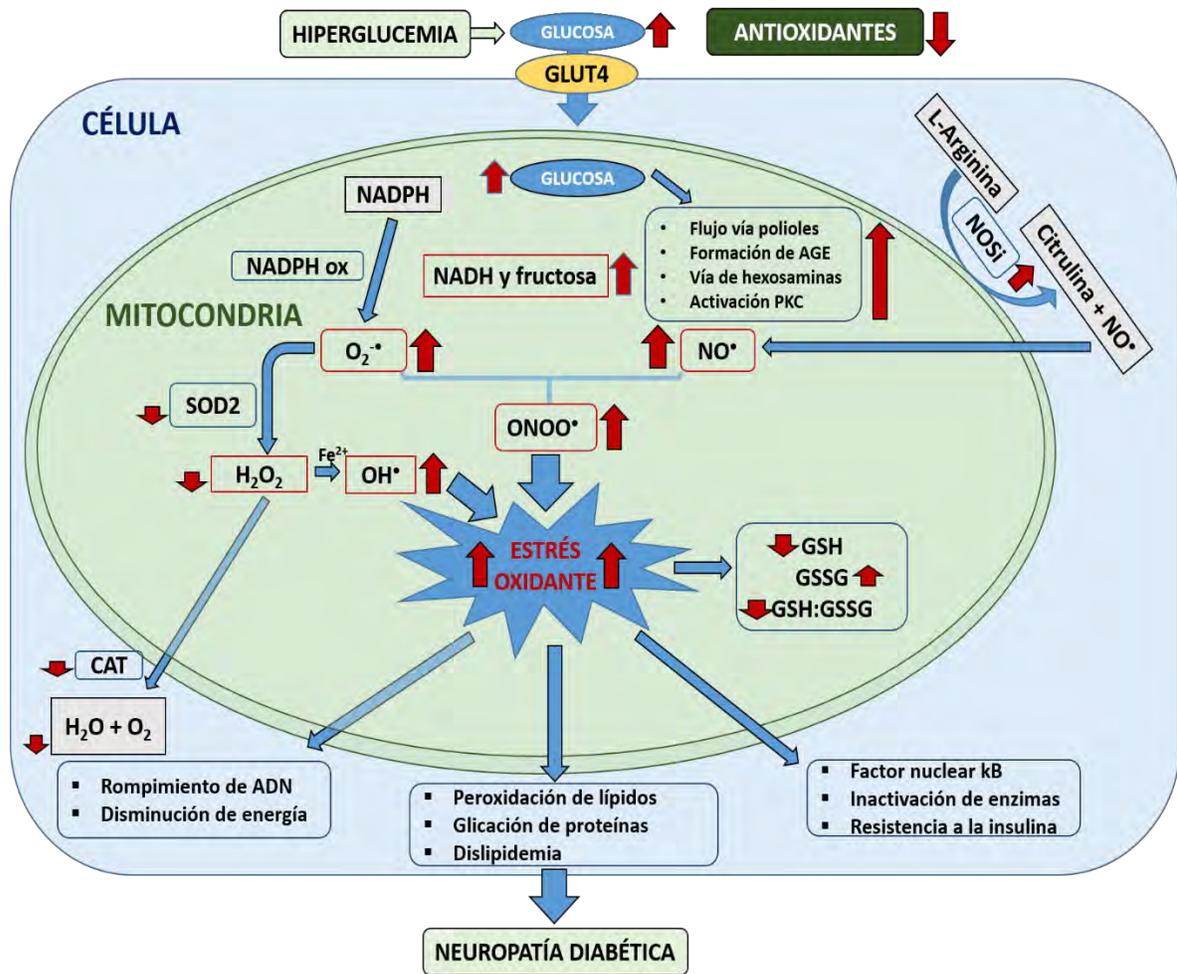


Figura 1. Principales mecanismos que generan el estrés oxidante en condiciones de hiperglucemia con un bajo nivel de antioxidantes exógenos. Transportador de glucosa dependiente de insulina (GLUT-4), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADPH ox), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el radical peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), oxígeno molecular (O_2), ion ferroso (Fe_2), catalasa (CAT), superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2), glutati6n reducido (GSH), glutati6n oxidado (GSSG), relaci6n glutati6n reducido y

oxidado (GSH: GSSG) y óxido nítrico sintasa (NOSi). Elaboración propia de acuerdo a resultados de investigaciones citadas (Villa-Caballero *et al.*, 2000; Díaz-Flores *et al.*, 2004; Altamirano *et al.*, 2011; Salinas *et al.*, 2013).

I.1.2.1. Acumulación y acción de productos de glicación avanzada

Estas modificaciones son causadas por la interacción de la glucosa y de otros carbohidratos como la fructosa y la glucosa-6-fosfato y/o sus derivados con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, para formar productos de glicación avanzada, conocidos como AGE o AGEs (por sus siglas en inglés, Advanced Glycation End Products). Inicia con la reacción de los grupos carbonilos de los carbohidratos con los grupos amino de las proteínas, en especial con el amino terminal y el ϵ -amino de residuos de lisina, dando origen a los productos tempranos de glicación, también llamados de Amadori o fructosamina α -dicarbonilos (α -oxoaldehídos) como la 3-desoxiglucosona, el metilglioxal y el glioxal que son conocidos como precursores de los AGEs (Díaz-Flores *et al.*, 2004).

Éstos son más reactivos que sus predecesores y al combinarse simultáneamente con dos grupos reactivos de las proteínas, forman puentes cruzados entre ellas muy estables, produciendo su agregación y pérdida en sus funciones biológicas. Los AGE, también modifican el colágeno tipo IV, activación de interleucina-1, la activación de factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la activación de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Brownlee, 2001; Díaz-Flores *et al.*, 2004).

I.1.2.2. Incremento en la vía de polioles

La ruta preferencial de conversión de la glucosa es la vía del sorbitol, también conocida como la vía de los polioles, en ésta, la glucosa es transformada por la acción secuencial de dos enzimas, la aldosa reductasa (AR) y la sorbitol

deshidrogenasa (SDH). La primera es la responsable de la reducción irreversible de la glucosa a sorbitol y requiere como coenzima a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). Esta enzima controla la vía de los polioles y se activa al estar en contacto con altos niveles de glucosa, aumentando la concentración de sorbitol y disminuyendo la disponibilidad de NADPH. La SDH cataliza la transformación del sorbitol en fructosa con la concomitante formación de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), reacción reconocida como el punto crítico de la vía, con repercusión en las complicaciones diabéticas, disminuyendo la NADPH citosólica, la actividad de ATPasa ($\text{Na}^+\text{+K}^+$), glutatión reducido (GSH) e incrementando NADH:NAD citosólica y triosas fosfatos (metilglioxal y diacilglicerol) (Brownlee, 2001).

Esta vía, ocurre en los órganos y tejidos que no requieren insulina para la captación de glucosa y en los cuales se presentan principalmente las complicaciones crónicas en condiciones de hiperglucemia como riñón, retina, cristalino, corazón y sistema nervioso central (Díaz-Flores *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006; Hernandez *et al.*, 2011).

I.1.2.3. Aumento en la vía de hexosaminas

El aumento del flujo a través de esta vía está relacionado con algunos efectos de la diabetes, contribuye en parte a la estimulación de la expresión de genes como los del factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), TGF- β 1 y del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). También participa en la inducción de la resistencia a la insulina por lípidos o por hiperglucemia debido a la N-acetilglucosamina, ya que disminuye la actividad de transportadores de glucosa (GLUT-4) en la membrana celular e inhibe la fosforilación y la activación para el sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1) (Brownlee, 2001) Díaz-Flores *et al.*, 2004).

I.1.2.4. Activación de la proteína C cinasa

La acumulación de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído fosfato (G3P), promueve la producción de diacilgliceroles (DAG) y la subsecuente activación de la proteína C cinasa (PKC), mismos que también afectan la homeostasis vascular en células del endotelio, la retina y los glomérulos renales durante las complicaciones diabéticas en modelos animales. Además, afecta la producción de sustancias vasoactivas, por una parte, deprime la producción de óxido nítrico y por otra, estimula la expresión de la endotelina-1 (ET-1), lo que conduce a la disminución del flujo sanguíneo de la retina, los nervios periféricos y el riñón, en el modelo de diabetes experimental; así como la activación de TGF- β , del factor de crecimiento VEGF y activación del PAI-1 (Brownlee, 2001; Díaz- Flores *et al.*, 2004; Ibarra *et al.*, 2006; Salinas *et al.*, 2013).

I.1.2.5. Disminución de antioxidantes exógenos

En condiciones de hiperglucemia, las especies reactivas de oxígeno y derivados se generan durante la autooxidación de la glucosa y en diferentes reacciones oxidativas que acompañan a la glicación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Entre otros factores también disminuyen la actividad de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa (GR); así, como la disponibilidad del NADPH, que es dependiente de algunas enzimas antioxidantes. El aumento de las especies reactivas y la disminución de enzimas antioxidantes conlleva a la resistencia a la insulina (GLUT-4), glicación de proteínas, lipoperoxidación y activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) (Villa-Caballero *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2003; Díaz-Flores *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2013).

Uno de los principales antioxidantes endógenos que se ve comprometido por las complicaciones de la hiperglucemia es el glutatión (GSH, glutatión reducido). Se ha demostrado que las concentraciones de GSH y el cociente de éste con el glutatión oxidado (GSH/GSSG) tanto en hígado como en riñones de ratas diabéticas, disminuyen hasta 2 o 3 veces su contenido en comparación con ratas controles. Así mismo, esta reducción coincide con el aumento en el contenido de GSSG, debido

principalmente al aumento de estrés oxidante, consumo de NADPH y a la disminución de las enzimas SOD, CAT y GR (Panda *et al.*, 2010; Díaz-Flores *et al.*, 2012; Martínez, 2017; Murillo, 2017; Jamshidi *et al.*, 2018).

Actualmente, se sabe que el aumento del estrés oxidante está relacionado a diversas enfermedades crónico degenerativas como el envejecimiento celular, aterosclerosis, hipertensión arterial, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cáncer y diabetes mellitus, entre otras (Guerra, 2001).

I.2. Antioxidantes endógenos y exógenos

Un antioxidante es cualquier molécula capaz de prevenir o inhibir la oxidación de un sustrato, generalmente de macromoléculas orgánicas como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estas moléculas al interactuar con una radical libre o especie reactiva, cede un electrón, que se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico permitiendo disminuir el estrés oxidante. Los antioxidantes pueden ser clasificados de dos maneras, los que son fabricados en el cuerpo (endógenos) y aquellos que provienen de la dieta (exógenos) (Gutiérrez, 2002).

Entre los antioxidantes endógenos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), que presenta tres isoformas, citoplasmática (CuZn-SOD1), mitocondrial (Mn-SOD2) y de matriz extracelular (CuZn- SOD3), que catalizan la dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), no es un radical libre, pero es considerado como una especie reactiva de oxígeno debido a que interacciona con metales de transición formando la reacción de Fenton y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Sin embargo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), puede ser catalizado por dos enzimas diferentes, la glutatión peroxidasa (GPX), única enzima humana que contiene selenio y que oxida el glutatión oxidado (GSSG), y por último la catalasa, que al igual que la GPX, también reduce el H_2O_2 a H_2O y O_2 (Asayama y Burr, 1984; Castillo *et al.*, 2003; Fujita *et al.*, 2009).

Otro sistema de defensa frente al estrés oxidante es a partir del consumo de plantas y/o frutos, atribuido a su capacidad antioxidante. Entre los compuestos presentes en las plantas con mayor actividad antioxidante se encuentran los polifenoles (taninos, flavonoides, derivados del ácido cinámico, xantonas, cumarinas, lignanos, quinonas, rotenoides, estilbenos), aceites esenciales (terpenoides), ácidos grasos (saturados e insaturados), algunos alcaloides (derivados de la isoquinoleína), carotenoides (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) (Bhaskar y Balakrishnan, 2009; Ebrahimzadeh *et al.*, 2009).

El consumo de antioxidantes exógenos, por la dietas de frutos, vegetales, semillas y aceites, disminuye la incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, artritis, enfermedad de Parkinson, enfermedad Alzheimer, en las que la actividad antioxidante principalmente se debe a metabolitos como la rutina, el resveratrol, el ácido gálico y la quercetina, entre otros (Beckman *et al.*, 1990; Tun *et al.*, 2001; Yao *et al.*, 2007).

1.2.1. Antioxidantes de origen vegetal en diabetes experimental

En recientes estudios se ha reportado el mecanismo de acción de los antioxidantes de origen vegetal para disminuir las complicaciones asociadas a la diabetes y que son atribuidas a los compuestos bioactivos de las plantas como los alcaloides, ácidos fenólicos, ácido gálico, catequinas, cumarinas, flavonoides, taninos y capsaicina. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la existencia de aproximadamente 120 compuestos de origen vegetal considerados como fármacos con efecto hipoglucémico. Se estima en cinco mil, el número de especies vegetales estudiadas exhaustivamente para una posible aplicación médica en diabetes (Lujan *et al.*, 2009).

Entre éstas, destacan las plantas medicinales utilizadas en las diferentes regiones del mundo, en el cuadro 1 se describen algunos ejemplos de plantas o frutos con

actividad hipoglucémica, con estudios mayormente en modelos experimentales de inducción de diabetes en ratas, en el que también se mencionan los compuestos bioactivos responsables de esta capacidad como los compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, alcaloides, terpenos y capsaicina (Gushiken *et al.*, 2012).

Otras plantas o frutos con esta propiedad son *Vaccinium myrtillus* (arándano), *Phalaris canariensis* (alpiste), *Morinda citrifolia* (noni), *Allium cepa* (cebolla), *Ginkgo biloba* (ginkgo), *Ficus carica* (higo), *Aloe vera* (sábila), *Cinnamomum cassia* (canela), *Citrullus colocynthis* (sandía), *Persea americana* (aguacate), *Opuntia milpa* (nopál), *Tamarindus indica* (tamarindo), *Piper longum* (pimienta), entre otros (Lujan *et al.*, 2009; Gushiken *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Ejemplo de plantas o frutos con actividad antioxidante e hipoglucémica en modelos experimentales *in vivo*.

PLANTA	MODELO EXPERIMENTAL	COMPUESTOS BIOACTIVOS	REFERENCIA
<i>Moringa oleífera</i> (semilla de moringa)	Ratas (Aloxano)	Polifenoles	Paula <i>et al.</i> , 2017
<i>Ocimum tenuiflorum</i>	Ratas (Estreptozotocina)	Flavonoides	Mousavi <i>et al.</i> , 2016
<i>Vitis vinifera</i> (uva)	Ratas (Estreptozotocina)	Resveratrol	Mozafari <i>et al.</i> , 2015
<i>Psidium guajava</i> (guayaba)	Ratas (Aloxano)	Compuestos fenólicos, ácido gálico, catequinas y quercetina	Ogueri <i>et al.</i> , 2014
<i>Phyllanthus niruri</i>	Ratas (Aloxano)	Taninos	Lemus <i>et al.</i> , 2013
<i>Allium sativum</i> (ajo)	Ratas (Aloxano)	Kaempferol, luteína y quercetina	Moradabadi <i>et al.</i> , 2013
<i>Salvia officinalis</i> (salvia)	Ratas (Aloxano)	Kaempferol, luteína y quercetina	Moradabadi <i>et al.</i> , 2013

<i>Vaccinium angustifolium</i>	Ratas (Estreptozotocina)	Antocianinas	Grace <i>et al.</i> , 2009
<i>Capsicum frutescens</i> (chile serrano)	Humanos (Diabetes tipo 2)	Capsaicina	Kamon <i>et al.</i> , 2009
<i>Lycium barbarum</i>	Ratas (Aloxano)	Carotenoides, riboflavina, ácido ascórbico, tiamina y ácido nicótico	Luo <i>et al.</i> , 2004

Para la realización de investigaciones sobre el efecto de los antioxidantes de plantas en diabetes mellitus, los estudios se llevan a cabo en modelos experimentales que implican el uso de animales pequeños como conejos, hámster, ratones y principalmente en ratas. Entre los principales agentes diabetogénicos se encuentra la estreptozotocina (STZ) y aloxano, compuestos que tienen un efecto citotóxico en las células β del páncreas, lo que provoca la escasa o nula producción de insulina, desarrollando diabetes experimental (Rodríguez y Méndez, 1994).

Las ratas Wistar son uno de los modelos más utilizados en diabetes experimental, empleadas para determinar los niveles de glucosa, marcadores bioquímicos de daño renal y hepático; así como para evaluar el contenido o los niveles de moléculas o enzimas relacionadas con el estrés oxidante. Mediante un análisis serológico se les determina el contenido de urea, creatinina, ácido úrico, triacilglicéridos, colesterol total, colesterol-HDL y lípidos totales, ya que se cuentan con los valores de referencia en ratas a las que no se les induce la diabetes experimental. Algunas de las enzimas y/o moléculas antioxidantes en órganos y tejidos aislados que son estudiadas en este modelo de diabetes experimental, son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión, así como los niveles de lipoperoxidación y la carbonilación de proteínas, entre otras moléculas relacionadas con el estrés oxidante en la diabetes (Murillo, 2017; Montes, 2018).

Martínez-Mora *et al.* (2017) demostró que algunos extractos de *Justicia spicigera* con actividad antioxidante tuvieron un efecto hipoglucémico en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, en las que además, disminuyó el contenido de colesterol y triacilglicéridos. Con este mismo modelo experimental, los extractos de otras plantas como *Momordica charantia*, *Azadirachta indica*, *Allium sativum* y *Ocimum sanctum*, han mostrado actividad antioxidante en ratas diabéticas, disminuyendo también la peroxidación de lípidos, indicativo de la función de los antioxidantes de origen vegetal sobre la regulación del desequilibrio del estrés oxidante en las ratas diabéticas (Mahdi *et al.*, 2003).

Además, se ha observado una relación entre el tipo de compuestos bioactivos, la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*, con el efecto hipoglucémico. Udayakumar *et al.* (2010) encontraron esta relación al administrar extractos etanólicos de hojas y raíces de *Whitania somnifera* por vía oral a ratas diabéticas inducidas con aloxano, ya que los compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides, fueron los responsables de restaurar los niveles normales de glucosa, así como de moléculas antioxidantes como glutatión y la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT).

Algunos autores señalan que el mecanismo de acción antidiabético de algunos compuestos de origen vegetal, también puede ser similar a los fármacos del tipo sulfonilurea, promoviendo la secreción de insulina, despolarizando la membrana y estimulando el influjo de calcio, lo que constituye una etapa inicial en el proceso de secreción de insulina, en las células pancreáticas (Lemus *et al.*, 2013; Ogueri *et al.*, 2014; Mozafari *et al.*, 2014; Mousavi *et al.*, 2016).

I.2.2. Métodos para determinación de actividad antioxidante

Los modelos para la determinación del estrés oxidante permiten estimar el potencial de los candidatos a ser fármacos antioxidantes de uso en humanos (Martínez *et al.*, 2004). Existen los métodos analíticos *in vitro* y los que utilizan para los estudios,

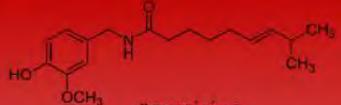
células, tejidos u órganos, a los que se les denomina ensayos *in vivo*. Entre los métodos *in vitro*, son empleados principalmente el ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidazil), FRAP (por sus siglas en inglés, Ferric Reducing Antioxidant Power) (Rossi, 2016) y TAC (por sus siglas en inglés, Total Antioxidant Capacity) (Roginsky y Lissi, 2005; Kumaran y Karunakaran, 2007; Miguel, 2010). Entre los métodos para la determinación indirecta de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno en macromoléculas, está el método de TBARS (por sus siglas en inglés, Thiobarbituric Acid Reactive Substances) que analiza los niveles de lipoperoxidación; así como el método para evaluar la carbonilación de proteínas (3-nitrotirosina) o la oxidación de ADN (8-hidroxideoxiguanosina) (Rossi *et al.*, 2016). También, la actividad antioxidante se evalúa con la medición de la actividad de enzimas que participan en el control del estrés oxidante como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y la xantina oxidasa, que pueden ser detectadas por reacciones colorimétricas o mediante inmunoensayos. Para la determinación de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno, los métodos consisten en detección colorimétrica, fluorométrica o por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Rossi *et al.*, 2016).

I.3. Características del género *Capsicum*

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae y está conformado por 31 especies, pero sólo cinco han sido domesticadas: *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. annuum*. Todas estas especies producen los frutos a los que en México y diversos países se les denomina chiles. La mayor diversidad de chiles cultivados y comercializados corresponden a la especie *C. annuum*. El fruto, en donde se encuentran las semillas, es una baya hueca carnosa o semi-cartilaginosa, puede alcanzar distintos tamaños, desde poco menos de 1 cm hasta 30 cm de largo, y su forma va de lo redondo a lo alargado, en colores que oscilan de distintos tonos de amarillo y verde en estado inmaduro, a rojo y hasta café en la etapa de maduración (Aguirre-Hernández y Muñoz-Ocoter, 2015).

El consumo de chile se debe principalmente a su sabor pungente o picante, causado por la presencia de capsaicinoides, éstos suelen ser una mezcla de capsaicina e hidrocapsaicina que son los de mayor nivel de pungencia, con 68,337 en unidades Scoville. El grado de pungencia varía en las diferentes especies de *Capsicum*, los pimientos morrones tienen 0 unidades mientras que los chiles habaneros tienen entre 100,000 a 350,000 unidades (Cuadro 2). México es el país de mayor producción de chile en el mundo, alrededor del 90% de chile que se consume a nivel mundial es de origen mexicano. Otros países productores son China, Indonesia, India, Turquía, España, Estados Unidos y Nigeria (Cruz-Perez; 2007; SAGARPA, 2012 y Aguirre-Hernández y Muñoz-Ocotero, 2015).

Cuadro 2. Unidades Scoville de diferentes especies del género *Capsicum* (Salgado-Garciglia, 2018).

Unidades Scoville (SHU)	
16,000,000	 Capsaicina
500,000 – 1,500,000	 Carolina Reaper, Bhut Jolokia, Escorpión Trinidad
100,000 – 500,000	 Habanero, Savina Rojo
25,000 - 100,000	 Cayenne, Piquín, Chiltepín
5,000 - 25,000	 Serrano, Jalapeño
500 - 5,000	 Anaheim, Poblano
0	 Pimiento Morrón, Chile dulce

I.3.1. Compuestos bioactivos de frutos de *Capsicum*

Los frutos de las diferentes especies del género *Capsicum*, han sido ampliamente usados en la industria alimentaria y para el tratamiento de diversas enfermedades o malestares como artritis, reumatismo, malestares estomacales, problemas dermatológicos, entre otras. En México el chile es ampliamente consumido, además de ser utilizado principalmente como especia en los alimentos, también se usa en la industria alimentaria, industria farmacéutica y en la elaboración de cosméticos (Cruz *et al.*, 2007; Dagnoko *et al.*, 2013). El chile es uno de los cultivos agrícolas más importantes a nivel mundial y en México, donde ha formado parte de la dieta básica de la población desde hace cinco mil años (Long, 2011), debido a que sus frutos se consumen tanto en fresco como seco por proporcionar color, sabor y aroma a platillos regionales del país, lo que lo sitúa entre las principales especias cultivadas (Aguilar, 2012).

La actividad antioxidante de estos frutos es dependiente del contenido de los compuestos bioactivos, principalmente de los capsaicinoides, los compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas A, C y E (Menichini *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2012; Maturino, 2013).

Los factores como la variedad, el tipo de cultivar, el estado de madurez, las condiciones de cultivo y la manipulación poscosecha pueden afectar este contenido de compuestos y, por lo tanto, la actividad biológica en los frutos de las especies de *Capsicum* (Maturino, 2013). Estos compuestos están presentes en diferentes especies, variedades o cultivares de chile, como son el chile serrano, poblano y jalapeño, los que varían también según las etapas de maduración (Oboh y Rocha, 2008; Henao *et al.*, 2009).

En diversas investigaciones se ha comprobado el efecto hipoglucémico por el consumo de frutos de *Capsicum*, se ha encontrado que los diferentes compuestos inhiben la absorción de glucosa intestinal en rata y hámster *in vitro* (Monserenusorn y Glinsukon, 1978). Esta inhibición de la absorción puede ser parcialmente responsable de reducir los niveles de glucosa en la sangre. En otros trabajos, se ha evaluado la actividad de extractos de frutos de *Capsicum* sobre enzimas indicadoras del poder hipoglucemiante, como α -amilasa y α -glucosilasa (Tundis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Watcharachaisoponsiri *et al.*, 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, se ha confirmado que la actividad hipoglucémica tiene una estrecha relación con la actividad antioxidante. En estudios con extractos de frutos de diferentes especies de *Capsicum* (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. frutescens*), la actividad antioxidante es dependiente del contenido de compuestos bioactivos como los ácidos fenólicos, flavonoides, capsaicinoides, carotenoides y el ácido ascórbico, que a su vez varían su contenido en etapas de maduración y genotipo del fruto (Zhang y Hamauzu, 2003; Kappel *et al.*, 2008; Medina-Juárez, 2012; Shotorbani-Heidari, 2012; Zimmer *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2016; Ayala, 2017).

Actualmente, se han realizado investigaciones con frutos o extractos de éstos de *Capsicum annuum*, *C. baccatum* y *C. frutescens*, administrados en dietas de ratones y humanos diabéticos demostrando un efecto hipoglucémico, hipolipidémico e hipotrigliceridémico, así como una reducción postprandial de hiperinsulinemia y restauración anatómica del páncreas (Ahuja y Ball, 2006; Survay, 2010; Earnest *et al.*, 2013; Magied *et al.*, 2014; Mohammed *et al.*, 2017). Tal efecto está íntimamente relacionado por los compuestos bioactivos presentes en el fruto e identificados por cromatografía de gases encontrando mayormente a capsaicina, dihidrocapsaicina, ácido tridecanoico, fitol, kauran-16-ol, eugenol, ácido 1,2-bencenodicarboxílico y mono (2-etilhexil) éster, a los que se les atribuye el mejoramiento de las complicaciones de la diabetes en modelos biológicos y humanos (Mohammed *et al.*, 2017).

1.3.2. Chile perón (*Capsicum pubescens*)

El chile perón o también conocido como chile manzano (*Capsicum pubescens* Ruiz et Pavón), es una planta perenne originaria del sur de América. El aroma de sus frutos es muy peculiar, al igual que su sabor ya que tiende a hacer muy picante con hasta 4,000 a 6,000 unidades Scoville (Kumar, 2003; Alcántar, 2007; Sanchez-Sanchez *et al.*, 2010). El cultivo de chile (*Capsicum* spp) en México tiene gran importancia social y económica y entre las diferentes especies se cultiva el chile perón, particularmente en las zonas altas (entre 1,700 a 2,400 m de altitud) (Aguirre-Hernández y Muñoz-Ocotero, 2015)

Los tallos de esta planta son leñosos y de crecimiento erecto, algunos ejemplares presentan abundante pubescencia, es de color verde excepto los primeros entre nudos, su ramificación es pseudo dicotómica. Las hojas son pecioladas y su filotaxia es alterna dística, es simple con forma cordada y ápice acuminado, los bordes lisos, vellosas y la nervadura reticulada perinerve (Figura 2a). Es una especie hermafrodita con cierto porcentaje de autogamia (Martín y González, 1991), la floración inicia en el primer nodo de la bifurcación, y así sucesivamente en cada nodo (Bosland, 1996), con flores solitarias de corolas en gama de colores violeta en ocasiones con los bordes blancos sin manchas difusas en la base de los pétalos (Figura 2b). El fruto es una baya carnosa y hueca llena de aire y semilla en la cual, el cáliz de los frutos maduros por lo general sin constricción anular en la unión con el pedicelo, venas prolongadas en dientes. La coloración en la base del fruto en estado inmaduro es verde, cuando madura se puede encontrar en amarillo, naranja o rojo (Figura 2c). La estructura del fruto varía en el número de lóculos desde uno hasta cuatro. La longitud del fruto es de 4 a 8 cm y diámetro de 2 a 6 cm, con un grosor de pericarpio que va de 2 a 6 mm. Los frutos contienen de 16 a 50 semillas, es el único chile del género *Capsicum* que posee semillas negras, las cuales son de forma ovalada y ligeramente onduladas en el borde (Pérez y Castro, 2008). Presenta el número básico de cromosomas del género *Capsicum*, $x=12$ para *C. pubescens* y se identifica un

número cromosómico de $2n = 24$ (Heiser Jr y Pickersgill, 1969), en general las especies de este género *Capsicum* son diploides (Sinha, 1950).

En los últimos diez años se ha observado un incremento en la demanda de este producto, lo cual ha motivado el desarrollo de sistemas de producción intensivo en invernadero para incrementar la cantidad y calidad del fruto (Pérez *et al.*, 2004).



Figura 2. Planta (a), flores (b) y frutos (c) de chile perón (*Capsicum pubescens*) del genotipo “Amarillo” (Fotografías de RSalgadoGarciglia).

El Estado de Michoacán es considerado como uno de los principales productores de chile perón más importante del país, aunque aún no existen cifras oficiales, se estima que al menos cada año se cultivan 1000 hectáreas. Los municipios que tienen mayor producción son Tacámbaro, Tancítaro, Uruapan, Zitácuaro y Peribán de Ramos, donde sus sistemas de producción en mayor parte son a campo abierto y en menor escala en invernaderos. Los centros de distribución y mercados más importantes son la Central de Abastos de Morelia, Zamora, Pátzcuaro, Paracho y Uruapan (Espinosa-Torres, 2010).

II. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa que produce daño a diferentes órganos, el que se relaciona con el estrés oxidante, que puede ser disminuido con antioxidantes exógenos como los presentes en los frutos de diversas especies de *Capsicum* (chiles), algunos con un efecto hipoglucémico. Los frutos de chile perón (*C. pubescens*) no han sido estudiados con este propósito, por lo que se desconocen los niveles de la actividad antioxidante de éstos y la relación de esta propiedad con el contenido de los compuestos presentes en extractos de diferente polaridad, genotipo y etapa de maduración. Así mismo, es importante realizar estudios que demuestren la relación entre la actividad antioxidante y el efecto hipoglucémico.

III. HIPÓTESIS

La actividad antioxidante de los extractos de frutos de chile perón (*Capsicum pubescens*) es dependiente del contenido de los compuestos bioactivos, del genotipo y de la etapa de maduración, y el de mayor actividad tiene efecto hipoglucémico en ratas diabéticas.

IV. OBJETIVOS

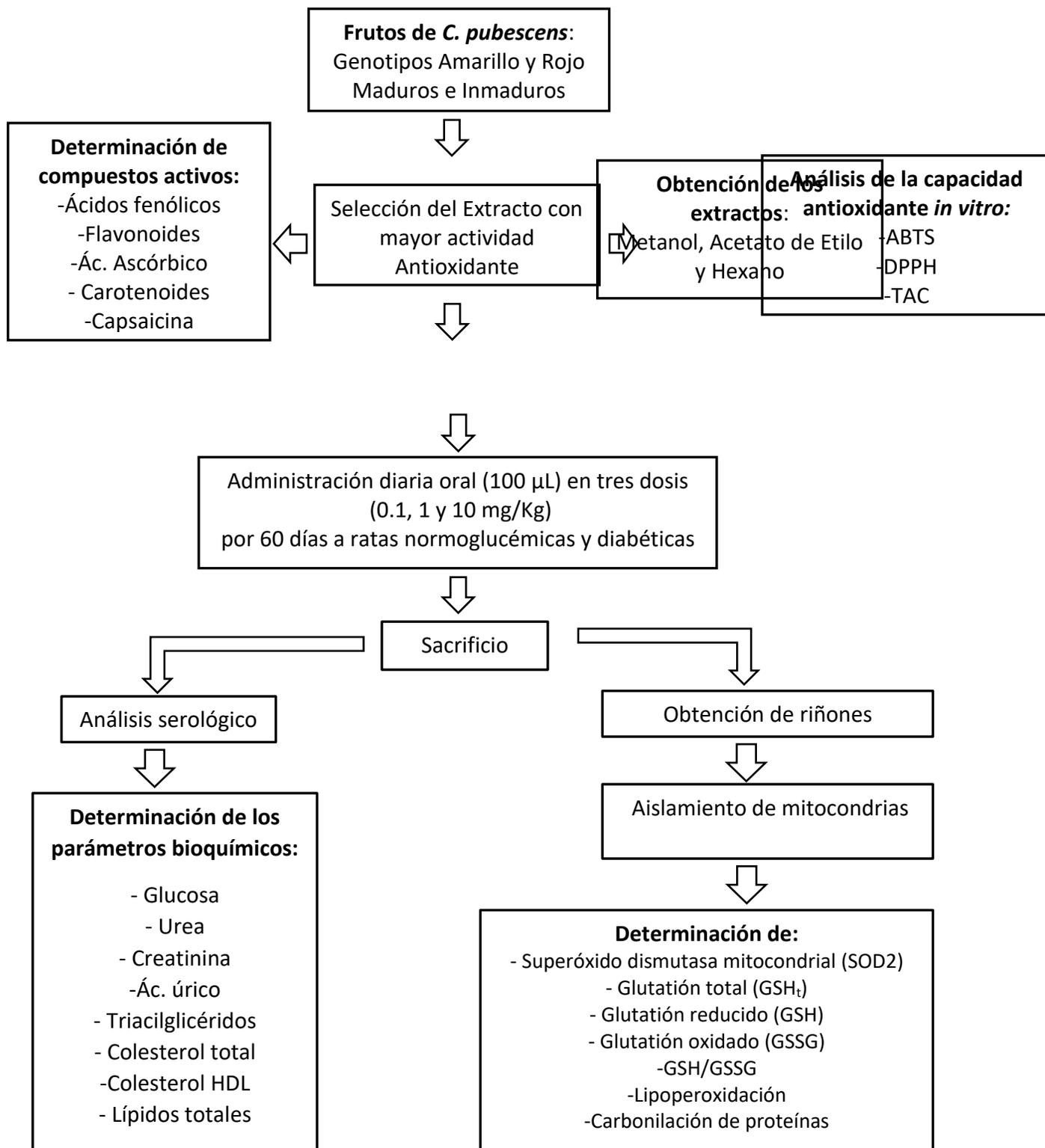
IV.1. Objetivo general

Analizar la actividad antioxidante de extractos de frutos de diferentes genotipos y estados de maduración de chile perón (*Capsicum pubescens*) para determinar el efecto hipoglucémico del extracto de mayor actividad, en ratas diabéticas.

IV.1.1. Objetivos específicos

- 1) Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de tres extractos de frutos de dos genotipos de chile perón (amarillo y rojo), en dos etapas de maduración.
- 2) Determinar el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina, en los extractos de los frutos de chile perón (amarillo y rojo), en dos etapas de maduración.
- 3) Analizar el efecto hipoglucémico y antioxidante del extracto con mayor actividad antioxidante *in vitro*, en ratas diabéticas
- 4) Evaluar el efecto del extracto con mayor actividad antioxidante sobre la función y estrés oxidante en mitocondrias de riñones de ratas diabéticas.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VI. RESULTADOS

VI.1. Relación de la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de frutos de chile perón (*Capsicum pubescens* Ruiz et Pavón) con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la actividad antioxidante *in vitro* y los compuestos bioactivos del chile perón (*Capsicum pubescens* Ruiz et Pavón), un fruto originario del Sur de América utilizado con fines ornamentales, terapéuticos y ampliamente consumido en México, teniendo un mayor cultivo en diversos municipios de Michoacán (Tacámbaro, Tancítaro, Uruapan, Zitácuaro y Peribán de Ramos). Estos frutos fueron colectados de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” en dos estadios de maduración (inmaduro y madurez de consumo), provenientes de plantas cultivadas de invernadero bajo condiciones semi-controladas de luz, temperatura y humedad relativa ambiental. Los frutos se mantuvieron en congelación a -20°C y fueron sometidos a extracción por maceración en frío, usando tres diferentes solventes: metanol (MeOH), acetato de etilo (AcEt) y hexano (Hex). Los extractos fueron obtenidos de 100 g de peso fresco de frutos triturados en licuadora comercial, añadiendo 500 mL de solvente, permitiendo la maceración a 4°C por 5 días, posteriormente los extractos se filtraron con papel filtro Whatman No. 1 y fueron llevados a sequedad total en rotavapor a 45°C , preparando cada extracto a una concentración de 10 mg/mL, almacenándolos a 4°C hasta su análisis. A cada extracto se le determinó el contenido de ácidos fenólicos totales, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina, así como la actividad antioxidante *in vitro* mediante los métodos de ABTS, DPPH y TAC. Con estos resultados, se confirmó la diferencia del contenido de compuestos bioactivos y su relación con la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos en base al estadio de maduración y al genotipo, encontrando que los extractos metanólicos de frutos inmaduros fueron los de mayor actividad captadora de radicales libres en ambos genotipos, aunque los del genotipo “Amarillo” (1 mg/mL) presentaron la mayor actividad con 92.4%, 93.6% y 70.9%, con ABTS, DPPH y TAC, respectivamente, presentando la IC_{50} más baja (0.15 mg/mL) por el método DPPH. La actividad antioxidante de este extracto fue similar al BHT (99.99%) y Trolox (93.68%), de acuerdo a los resultados obtenidos por el método DPPH. El extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” mostró el mayor contenido de flavonoides con 121.97 $\mu\text{moles EqQ/mg p.f.}$ y un valor sin diferencia significativa con los demás extractos de ácido ascórbico (11.6 $\mu\text{moles/mg p.f.}$). La cantidad de ácidos fenólicos totales (82.82 $\mu\text{moles EAG/mg p.f.}$) y de capsaicina (3.095 $\mu\text{moles/g p.f.}$), fueron menores a los presentados por los extractos metanólicos de los frutos del genotipo “Rojo”, con el mayor contenido de ambos compuestos (95.18 $\mu\text{moles EAG/mg p.f.}$ y 4.01 $\mu\text{moles de capsaicina/g p.f.}$).

Palabras clave: Actividad antioxidante, *Capsicum pubescens*, ABTS, DPPH, TAC.

ABSTRACT

In this research, the *in vitro* antioxidant activity and the bioactive compounds of the chile perón (*Capsicum pubescens* Ruiz et Pavón) were determined, a fruit native to South America used for ornamental, therapeutic and widely consumed in Mexico, having a greater crop in different municipalities of Michoacán (Tacámbaro, Tancítaro, Uruapan, Zitácuaro and Periban de Ramos). These fruits were collected from the genotypes "Yellow" and "Red" in two stages of ripening (unripe and ripe), from cultivated plants in greenhouse under semi-controlled conditions of light, temperature and relative humidity. The fruits were kept frozen at -20°C and were subjected to extraction by cold maceration, using three different solvents: methanol (MeOH), ethyl acetate (AcEt) and hexane (Hex). Extracts were obtained from 100 g of fresh weight of crushed fruits in commercial blender, adding 500 mL of solvent, allowing maceration at 4°C for 5 days, then the extracts were filtered through paper filter Whatman No. 1 and were taken to total dryness on rotavapor at 45°C, preparing each extract at a concentration of 10 mg/mL, storing at 4°C until analysis. Each extract, the content of total phenolic acids, flavonoids, ascorbic acid, carotenoids and capsaicin was spectrophotometric determined, and the antioxidant activity *in vitro* through the methods of ABTS, DPPH and TAC assay. With these results, it was confirmed the difference in the content of bioactive compounds and their relationship with antioxidant capacity of each extracts based on the stage of ripening and genotype, finding that the methanol extracts of unripe fruits showed the most free radical scavenging activity in both genotypes, although those of the "Yellow" genotype (1 mg/mL) reached a 92.4%, 93.6% and 70.9% of antioxidant activity, with ABTS, DPPH and TAC, respectively, presented lower IC₅₀ (0.15 mg/mL) by the DPPH method. The antioxidant activity of this extract was similar to BHT (99.99%) and Trolox (93.68%), according to the results obtained by the DPPH method. The methanol extracts of unripe fruits of "Yellow" genotype showed the highest content of flavonoids with 121.97 µmol EqQ/mg p.f. and a value of ascorbic acid (11.6 µmol/mg p.f.) without significant difference with the other extracts. The amount of total phenolic acids (82.82 µmol EAG/mg p.f.) and capsaicin (3.095 µmol/g p.f.), were lower than those presented by the fruits of the "Red" genotype methanol extracts, with the highest content of both compounds (95.18 µmoles EAG/mg) (p.f. and 4.01 µmol capsaicin/g p.f. µmol).

Keywords: Antioxidant activity, *Capsicum pubescens*, ABTS, DPPH y TAC

Introducción

Los frutos de chile perón del género *Capsicum* spp. son ampliamente consumidos en el mundo y usados como alimentos o aditivos en la industria alimentaria. Actualmente, México ocupa el primer lugar en producción de chile en el mundo, con un alrededor del 90% del chile que se consume es de origen mexicano. Mientras que otros países productores son China, Indonesia, Turquía, España, Estados Unidos y Nigeria (SAGARPA, 2012). Adicionalmente, varios estudios han estimado que el género *Capsicum*, es el segundo vegetal más consumido por la población mexicana después del tomate, con un consumo de aproximado de 7 a 9 kg/persona por año (Ornelas-Paz *et al.*, 2008; Álvarez-Parrilla *et al.*, 2011). Además de alimento, los

frutos de las especies pertenecientes a este género han sido utilizados por sus propiedades analgésicas, antiartríticas, antipiréticas, antisépticas y antiespasmódicas, así como para el tratamiento de enfermedades como artritis, reumatismo, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, entre otras más, por lo que se reconocen sus aplicaciones médicas en diversas regiones como India, América y China (Buck y Bucks, 1983; Bloque y Langseth, 1994; Rodríguez, 2013).

Las propiedades medicinales de frutos de algunas variedades o cultivares de *Capsicum* se han relacionado con la presencia de una amplia gama de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos, saponinas, carotenoides, capsaicinoides y vitaminas (A, B, C y E), ya que éstos poseen actividad antioxidante, antimicrobiana e hipoglucémica (Oboh y Rocha, 2008; Adedayo *et al.*, 2010; Earnest *et al.*, 2013). Un ejemplo de lo anterior es la actividad hipoglucémica de los frutos de *C. frutescens*, en los que la capsaicina fue la responsable, por lo que la población de Jamaica lo consume para tratar la diabetes tipo II (Bloque y Langseth, 1994). Mayormente se ha estudiado la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos presentes en los frutos del género *Capsicum*, la que varía dependiendo de su concentración, que se relaciona con el tipo de cultivar, estado de madurez, condiciones de cultivo y manipulación postcosecha, lo que afectan sus propiedades medicinales y funcionales (Rodríguez, 2013).

Los frutos de chile perón (*C. pubescens*) son muy conocidos en Sudamérica y en nuestro país, su cultivo y consumo se ha incrementado en los últimos años, son frutos de alto valor comercial de los que hay pocos estudios que relacionen el contenido de sus compuestos bioactivos con las propiedades medicinales atribuidos a los frutos de *Capsicum*.

Por todo lo anterior, los estudios encaminados a evaluar la actividad antioxidante en este tipo de frutos, deben de tomar en cuenta los factores involucrados en la variación del contenido de compuestos bioactivos, como el genotipo y los estados de maduración (Rodríguez, 2013), por lo que en esta investigación se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de tres diferentes extractos de frutos de dos genotipos de chile perón (Amarillo y Rojo) de dos estados de maduración (inmaduro y maduro), realizando una relación entre la actividad antioxidante *in vitro* y el contenido de los principales compuestos bioactivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos de chile perón

En esta investigación se utilizaron frutos de chile perón *Capsicum pubescens* Ruiz *et Pavón*) de los genotipos “Amarillo” y “Rojo”, colectados en dos estadios, inmaduro (frutos de color verde, 30 días después de antesis, dda) y madurez de consumo (frutos de color amarillo y rojo, 60 dda) (Figura 3), provenientes de plantas cultivadas de invernadero del IIQB-UMSNH, en condiciones semi-controladas de luz, temperatura y humedad relativa ambiental.



Figura 3. Frutos de chile perón (*C. pubescens*) de los genotipos “Amarillo” (a) y “Rojo” (b) en etapa de madurez de consumo (Fotografía: RSalgadoGarciglia).

Métodos de extracción

Los frutos del chile perón fueron sometidos a extracción por maceración en frío (4°C) por cinco días, usando tres diferentes solventes: metanol (MeOH), acetato de etilo (AcEt) y hexano (Hex). Previamente, los frutos se mantuvieron en congelación a -20°C y en frío fueron triturados (licuadora comercial) hasta obtener pequeños fragmentos. Por cada 100 g peso fresco se añadieron 500 mL de solvente y después de la maceración, los extractos se filtraron (Papel filtro Whatman No. 1) y fueron llevados a sequedad en rotavapor a 45°C. Cada extracto se preparó a una concentración 10 mg/mL, éstos fueron mantenidos bajo refrigeración (4°C) hasta su posterior análisis.

Métodos de determinación de actividad antioxidante

Determinación de actividad antioxidante por ABTS. La evaluación por el método de ABTS [ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], descrito por Rufino *et al.* (2010). Se generó el radical ABTS por la interacción de ABTS (7.4 mM) y K₂S₂O₈ (2.4 mM), en una relación 1:1, durante 12 h a temperatura ambiente y completa oscuridad, preparando una solución de trabajo mediante dilución con metanol hasta alcanzar una absorbancia de 0.8 a una λ de 734 nm. La actividad antioxidante se obtuvo por la medición de la absorbancia de cada extracto, tomando 50 μ L de extracto y 950 μ L de solución de trabajo, después de 7 min las muestras fueron leídas a 734 nm, utilizando como blanco metanol. La actividad antioxidante se estimó como porcentaje de acuerdo con la siguiente fórmula, donde A es la absorbancia:

$$ABTS (\%) = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}} \times 100$$

Determinación de actividad antioxidante por DPPH. La actividad captadora de radicales libres DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazil) se determinó con el reactivo DPPH

[1mM] preparado en metanol como solución madre, utilizando una proporción de 2 mL de solución madre y 8 mL de metanol (solución de trabajo), verificando que la absorbancia de ésta fuera entre 0.8 y 1.3, utilizando el método descrito por Karamać *et al.* (2005). De esta solución, se utilizaron 50 µL de solución problema (extracto) y 1 mL de la solución de trabajo, las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 min, determinando su absorbancia a 517 nm, usando metanol como blanco. El porcentaje de decoloración del DPPH de las muestras se calculó con la siguiente fórmula, donde *A* es la absorbancia:

$$DPPH (\%) = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}} \times 100$$

Determinación de actividad antioxidante total (TAC). El ensayo de la capacidad antioxidante total del extracto se realizó por el método del azul de fosfomolibdeno descrito por Kumaran y Karunakaran (2007) que utiliza una solución de trabajo compuesta por ácido sulfúrico 0.6 M, fosfato de sodio 28.0 mM y molibdato de amonio 4.0 mM, la que se mezcla en una relación de 1:1:10. La determinación se realiza adicionando 900 µL de la solución de trabajo y 100 µL de la solución problema, dejando incubar a 80 °C durante 90 min. El blanco fue preparado con el respectivo disolvente de cada muestra. Mientras que el control positivo fue agua desionizada. Después de mantener a temperatura ambiente, se registró la densidad óptica a 695 nm. La actividad antioxidante se estimó como porcentaje de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$TAC\% = [(A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}}) / A_{\text{blanco}}] \times 10$$

Donde.

A muestra. Densidad óptica de la muestra tratada con el extracto.

A control. Densidad óptica de agua desionizada.

A blanco, Densidad óptica del disolvente de la muestra.

Determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀). Según la FDA, la IC₅₀ representa la concentración de un fármaco que se requiere para una inhibición del 50% de la actividad *in vitro*. Ésta se determinó para el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo amarillo, mediante los ensayos *in vitro* DPPH, ABTS y TAC, utilizando diferentes concentraciones del extracto (0.001, 0.01, 0.1, 0.5 y mg/mL). Los resultados de la actividad antioxidante fueron graficados para obtener la IC₅₀ (Anexo 1).

Determinación de compuestos bioactivos de frutos de chile perón

Contenido de ácidos fenólicos totales. El contenido de ácidos fenólicos totales se determinó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Schwarz, 2001), consistente en mezclar 100 µL de cada uno de los extractos con 750 µL de la solución de Folin-Ciocalteu, preparada 1:10 con agua estéril. Con ayuda de un vortex, se homogenizaron las mezclas durante 5 min, para después añadir 750 µL de carbonato de sodio (Na₂CO₃) al 6% preparada con agua estéril. Posteriormente a la mezcla, se dejaron reposar por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, para finalmente

obtener las lecturas de absorbancia a 725 nm. Los resultados se muestran en μ moles equivalentes a ácido gálico por gramo de peso fresco (μ moles EAG/mg p.f.), obtenidos por curva de calibración preparada usando concentraciones de ácido gálico como estándar entre 0 y 1 μ moles, obteniendo las lecturas a 725 nm (Anexo 2a). El contenido de ácidos fenólicos se calculó por la ecuación de la recta generada por la curva de linealidad:

$$X = \frac{Y}{6.1652} + 0.0016$$

Determinación de flavonoides totales. Para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método de Kim *et al.* (2003), que consiste en mezcla 10 μ L de cada uno de los extractos de los frutos de chile perón con 490 μ L de metanol, sometiendo la mezcla a agitación en vortex, para posteriormente agregar 1 mL de metanol, 100 μ L de cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 10% y 100 μ L de 1 M de acetato de potasio (CH_3CO_2K). Finalmente, las muestras se sometieron a agitación en vortex y se dejaron reposar por 30 min en oscuridad, para obtener las lecturas de absorbancia a 415 nm. La cuantificación se obtuvo mediante una curva de calibración realizada con quercetina, con un rango de concentración de 0 a 100 μ moles ($\lambda=415$ nm) (Anexo 2b). Los valores se presentan en equivalentes a μ moles de quercetina/mg peso fresco (μ moles EQ/mg p.f.), obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$X = \frac{Y}{0.016} - 0.0114$$

Determinación de ácido ascórbico. Se cuantificó por un método espectrofotométrico directo, determinado el contenido en cada una las muestras en μ moles de ácido ascórbico por mg de peso fresco (μ moles AcAsc/mg p.f.), mediante una curva de calibración del analito, realizada en un rango de concentración de 0 a 1 μ M (Anexo 2c), midiendo la absorbancia a 264 nm, descrito por Hung y Yen (2002). Cada determinación consistió en mezclar 100 μ L de la muestra problema con 900 μ L del respectivo solvente de cada muestra (metanol, acetato de etilo o hexano), para después agitar vigorosamente en vortex por unos segundos, para finalmente obtener la absorbancia de cada muestra a 264 nm. El contenido de ácido ascórbico de cada extracto se obtuvo por la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$X = \frac{Y}{2.2649} - 0.0868$$

Determinación de carotenoides totales. El contenido de carotenoides se obtuvo por el método modificado de Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández (1989). Primero se preparó una solución de dimetilformamida/carbonato de magnesio (DFM/ $MgCo_3$), a 500 mL de dimetilformamida se adicionaron 0.2 g de carbonato de magnesio, disolviendo completamente en frío y almacenando a 4°C. Posteriormente se realizó una mezcla de 0.5 mL de cada una de las muestras con 1 mL de la solución de DFM/ $MgCo_3$. Las muestras fueron llevadas a agitación vigorosa en un vortex por 5 min y se les añadió 1 mL de hexano, para después, de nuevo agitarlas, dejando en reposo unos minutos. Una vez que las fases se separaron y fueron evidentes, se retiró la fase superior con una micropipeta, para llegar a la fase

ligeramente coloreada, por último, se leyó a una longitud de onda de 470 nm. Para determinar el contenido de carotenoides totales por volumen de muestra, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Carotenoides} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{A * \lambda(470) * 10^6}{\varepsilon (2000) * FD (1\text{mL})}$$

Donde: A = Lectura de Absorbancia obtenida; λ = Longitud de onda de la luteína; FD = Factor de dilución o volumen de muestra; ε = Coeficiente de extinción de luteína (2000).

Determinación de capsaicina. Se empleó el método reportado por Xu *et al.* (2007) para la cuantificación de capsaicina por análisis espectrofotométrico. Su cuantificación se obtuvo de manera directa, obteniendo la concentración mediante una curva de calibración realizada con capsaicina, con un rango de concentración de 0 a 1.25 μmoles , realizando las lecturas a 286 nm (Anexo 1d). Los valores se presentan en equivalentes a μmoles de capsaicina/mg peso fresco (μmoles Capsaicina/mg p.f.) de cada muestra, que fueron obtenidos con la ecuación de la recta de la curva de linealidad:

$$X = \frac{Y}{1.6186} - 0.0929$$

Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo con 3 réplicas ($n=3$). Cada tipo de fruto fue tomado como réplica y los datos se presentan como promedio (media) más la desviación estándar, analizados por ANOVA ($p<0.05$) y diferencia de medias por la prueba de Tukey, utilizando el programa JMP8.

RESULTADOS

Actividad antioxidante (ABTS, DPPH y TAC)

Con el análisis de la actividad antioxidante *in vitro* de cada uno de los extractos de chile perón por los métodos ABTS, DPPH y TAC se observó de manera general que los extractos metanólicos mostraron la mayor actividad antioxidante independientemente del método de ensayo, del genotipo y de los estados de maduración. (Figura 4). Sin embargo, los extractos metanólicos de los frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” presentaron la mayor actividad con los tres métodos (ABTS, DPPH y TAC), con 92.4%, 93.6% y 70.9%, respectivamente, obteniendo diferencias significativas respecto a los demás extractos, a una concentración de 1 mg/mL, presentando igual o mayor actividad antioxidante que el BHT y ligeramente menor en Trolox, con 99.99%. No obstante, la actividad antioxidante del genotipo “Rojo” mostró similares resultados con el genotipo “Amarillo”, con una mayor actividad antioxidante observada en el extracto metanólico de frutos inmaduros, con los métodos ABTS (86.38%) y DPPH (84.36%) (Figuras 4a y 4b).

Con el análisis de la actividad antioxidante *in vitro* de cada uno de los extractos del chile perón por el método de TAC, se observó de manera general que los extractos metanólicos mostraron los más altos porcentajes de actividad antioxidante, independientemente del del genotipo y de los estados de maduración. Sin embargo, los extractos metanólicos de los frutos maduros del genotipo “Rojo” y “Amarillo” fueron los de mayor actividad con 75% y 74%, valores similares a los presentados por los de frutos inmaduros con 66% y 71%, respectivamente. Estos mostraron diferencias significativas respecto a los mismos extractos, pero de los frutos maduros. En este ensayo como los anteriores, los extractos de acetato de etilo y hexánico fueron los que presentaron los más bajos porcentajes de actividad antioxidante (Figura 4c).

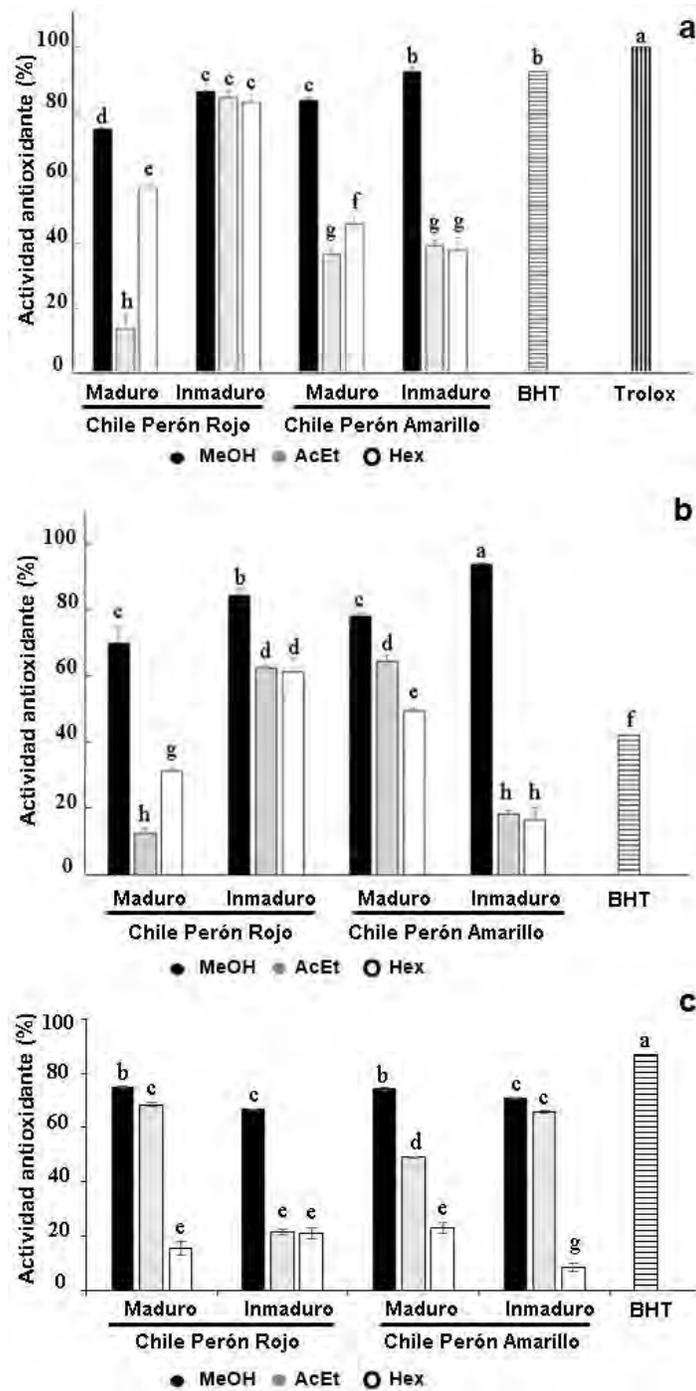


Figura 4. Porcentajes de actividad antioxidante por ABTS (a), DPPH (b) y TAC (c) en los extractos metanólico (MeOH), de acetato de etilo (AcEt) y hexánico (Hex), de los frutos inmaduros y maduros de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de chile perón (*C. pubescens*), comparados con 100 μ moles de BHT (Butil Hidroxitolueno) y Trolox. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Determinación de la concentración inhibitoria media (IC₅₀)

Los valores calculados de IC₅₀ de la actividad antioxidante del extracto metanólico del genotipo Amarillo inmaduro, para los ensayos ABTS, DPPH y TAC, fueron de 0.39, 0.15 y 0.30 mg/mL, respectivamente. La mayor actividad inhibitoria fue en ABTS al mostrar la menor concentración de IC₅₀ demostrando así, que a una concentración de 0.15 mg/mL puede inhibir el 50% de las especies reactivas.

Los compuestos antioxidantes, al reaccionar con el ABTS, DPPH y TAC transfieren electrones o protones al ABTS, DPPH y TAC que neutralizan los radicales libres (Archana *et al.*, 2005). En la presente investigación fue determinante conocer la influencia del genotipo y el estado de maduración sobre la actividad antioxidante de cada uno de los diferentes extractos, esto último con el fin de relacionar dicha actividad con el tipo de compuestos bioactivos presentes, encontrando la mayor actividad en los frutos inmaduros tanto del genotipo “Amarillo” como en el “Rojo”.

Lo anterior concuerda con lo reportado recientemente en nuestro grupo de trabajo para frutos de chile habanero (*C. chinense*) Cv. Chocolate, observando un 91.63% de actividad antioxidante por DPPH del extracto metanólico de frutos del estadio inmaduro (Ayala-Ponce *et al.*, 2017). También se ha demostrado que los extractos etanólicos o metanólicos de frutos rojos como *Lycium barbarum* (baya tibetana), *Myrtus communis* (arrayán), *Morus alba* (mora), *Synsepalum dulcificum* (fruta milagrosa), ejercen una actividad antioxidante superior al 80% por DPPH, a concentración de 0.1 y 1 mg/mL (Hidalgo y Almajano, 2017). En estos mismos frutos, los valores de la actividad antioxidante determinados por ABTS son similares a los observados para los frutos de chile habanero perón “Amarillo”.

En *C. frutescens* var. sina y *C. annum* var. goudion, los porcentajes de actividad antioxidante por DPPH, fueron de 96.95 % a 98.64 % en frutos inmaduros y maduros; resultados similares fueron reportados por el método ABTS, aunque con valores más bajos (77.73 % y 93.11 %) similares por el método de TAC, a una concentración de 100 mg/mL (Shaimaa *et al.*, 2016). Estos valores concuerdan también con lo reportado por Tripathi y Mishra (2009), que encontraron una actividad antioxidante por DPPH del 96.78 % en pimiento rojo en polvo. Es importante resaltar que la actividad antioxidante mostrada por los frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” se obtuvo a una concentración de 1 mg/mL, muy por debajo de otras concentraciones reportadas para otras especies de *Capsicum spp.* Estos resultados son similares a los reportado en chile habanero (*Capsicum chinense*) del genotipo “Rojo” inmaduro, que presenta una IC₅₀ de 0.13 mg/mL (Castro, 2014), aunque es una actividad antioxidante mayor a diversos extractos como el extracto metanólico de *Gentianella nitida* (Carbonel, 2016) con valores de IC₅₀ mayores a 0.5 mg/mL correspondiente al ensayo ABTS.

Con los resultados antes descritos, se demuestra la capacidad antioxidante de los extractos de chile perón, observado un mayor porcentaje de actividad en los extractos de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo”. Sin embargo, se observó también actividad antioxidante en los extractos de acetato de etilo y hexano de los frutos, tanto inmaduros y maduros de ambos genotipos, estos porcentajes fueron más bajos, con valores menores al 65% tanto por ABTS como DPPH.

Contenido de ácidos fenólicos totales

El contenido de ácidos fenólicos totales mostró una variación dependiente del genotipo y los estados de maduración de los frutos de chile perón, observando el mayor contenido en los extractos metanólicos y de acetato de etilo con 95.18 $\mu\text{moles EAG/mg p.f.}$ y 99.22 $\mu\text{moles EAG/mg p.f.}$, respectivamente, de los frutos maduros del genotipo Rojo, valores con diferencias significativas a los de los demás extractos. El contenido de este tipo de compuestos fue similar al del extracto hexánico de frutos maduros genotipo Rojo, a todos los extractos de los frutos inmaduros del genotipo Rojo y a los extractos metanólicos y de acetato de etilo de los frutos maduros del genotipo Amarillo. Estos últimos mostraron un contenido de 82.82 y 84.9 $\mu\text{moles EAG/mg p.f.}$, respectivamente, aproximadamente un 14% menor que lo presentado por los extractos con el mayor contenido. Los compuestos fenólicos se encontraron en cantidades bajas en los tres extractos de los frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” (Figura 5a).

El valor más alto de ácidos fenólicos totales en esta variedad de chile, supera a lo reportado para otras variedades de chiles pimiento y campana, ya que el primero tanto verde como rojo Cv. Almuden y campana var. Bell, presentan un bajo contenido de ácidos fenólicos, de 6.9, 7.1 y 1.3 $\mu\text{moles EqAG/mg}$, respectivamente (Rahim y Mat, 2012; Lutz *et al.*, 2015). Sora *et al.* (2015) han reportado una estrecha relación entre el contenido de ácidos fenólicos y las variedades comerciales de *Capsicum*. El orden del contenido de éstos en semillas es habanero > malagueta > cayenne > pimiento rojo > pimiento campana; y para pulpa, el mayor contenido se ha observado en chile malagueta, mientras que los más bajos en chile campana.

Contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides totales ($\mu\text{moles EqQuercetina/mg p.f.}$) de los diferentes extractos de los frutos de chile perón “Amarillo” y “Rojo” de dos estados de maduración, fue mayor en el extracto metanólico de los frutos maduros de chile perón “Amarillo” con 121.97 $\mu\text{moles EqQ/mg p.f.}$, con diferencia significativa a los demás extractos. En el genotipo Rojo en etapa maduro, el extracto metanólico de frutos maduros alcanzó un contenido de 78.75 $\mu\text{moles EqQ/mg p.f.}$ y de 101.12 $\mu\text{moles EqQ/mg p.f.}$ en el extracto metanólico de los frutos inmaduros del genotipo Rojo. Los mayores contenidos de flavonoides totales se obtuvieron en los extractos metanólicos de los frutos, independiente de genotipo y etapa de madurez, a excepción del observado en los extractos de los frutos maduros del genotipo rojo, con los valores más bajos, que coincide con el contenido de ácidos fenólicos totales (Figura 5b).

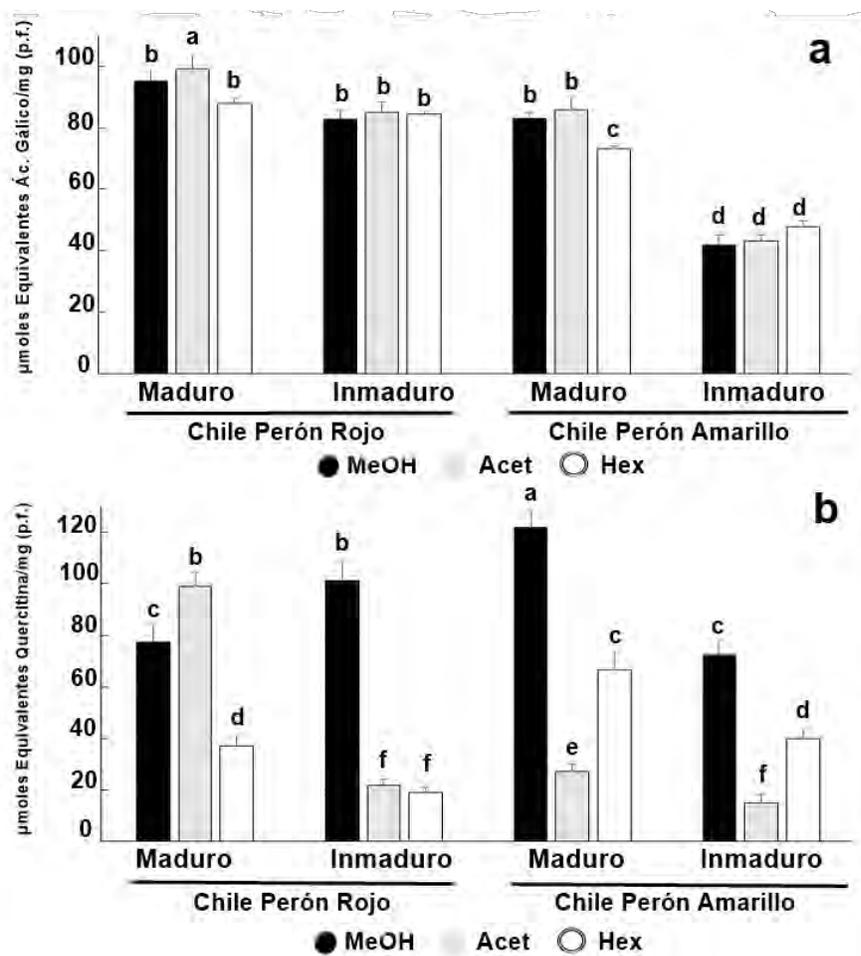


Figura 5. Contenido de ácidos fenólicos totales (a) y flavonoides totales (b) en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Estos valores de flavonoides son considerablemente más altos que los reportados para otras especies o variedades de *Capsicum*. Howard *et al.* (2000) mostraron contenidos de 5.69 a 28.35 μmoles de EqQ/mg de peso fresco en variedades similares de *Capsicum annuum* (Materska y Perucka, 2005) observaron diferentes cantidades de flavonoides entre los pimientos rojos y verdes, estas variaciones, tanto de flavonoides como de ácidos fenólicos están asociadas con las etapas de maduración, tipo del cultivar, así como las condiciones de crecimiento. También esta relación directa se ha observado con los valores de la actividad antioxidante (Howard *et al.*, 2000).

Contenido de ácido ascórbico

En los distintos extractos de los frutos de chile perón, se observaron solo variaciones dependientes de los métodos de extracción, ya que el contenido fue similar en

ambos genotipos, tanto en frutos maduros como inmaduros, pero con un contenido mayor en los extractos metanólicos, con la más alta cantidad (12.28 μ moles de ácido ascórbico/mg p.f.) en los frutos inmaduros del chile perón “Rojo”, pero sin diferencias significativas con los extractos metanólicos de los frutos del genotipo “Rojo” y con los del genotipo “Amarillo”, tanto maduros como inmaduros, con valores de 11.93, 11.12 y 11.6 μ moles de ácido ascórbico/mg p.f., respectivamente (Figura 6).

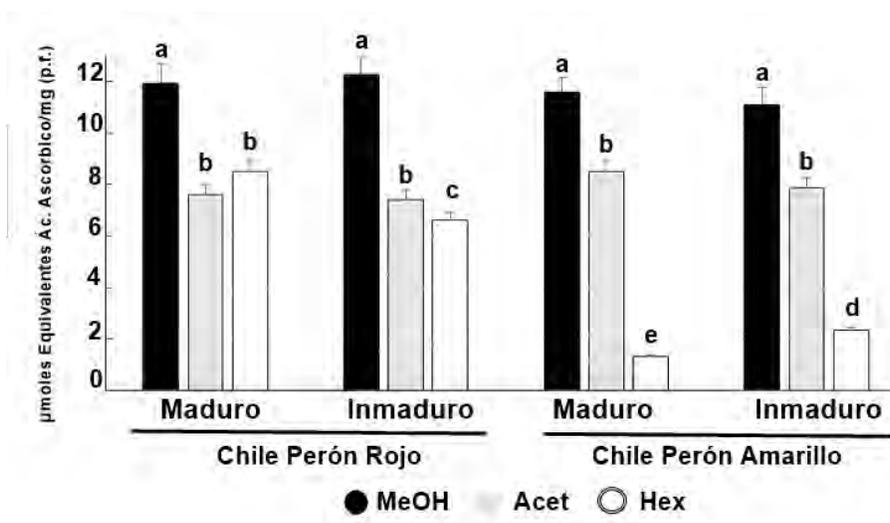


Figura 6. Contenido de ácido ascórbico en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Los frutos del género *Capsicum* son considerados como los de más alto contenido de ácido ascórbico (Lee y Kader, 2000). Se han reportado diversos niveles de esta vitamina, Bae *et al.* (2014) reportan un contenido entre 4.2-13.2 μ moles/mg peso fresco, pero esta concentración depende de la etapa de madurez del fruto. Un contenido similar ha sido encontrado en los frutos de Jalapeño y Serrano, con una menor concentración en frutos maduros, debido a la degradación del ácido ascórbico (Chuah *et al.*, 2008; Álvarez-Parrilla *et al.*, 2011).

Contenido de carotenoides totales

Los extractos de los frutos maduros de chile perón tanto del genotipo “Amarillo” como “Rojo”, del extracto acetato de etilo, obtuvieron el mayor contenido de carotenoides, con 705 y 766 μ g de carotenoides/g p.f., valores que no mostraron diferencias significativas con el extracto hexánico de frutos maduros del genotipo “Rojo” con 607 μ g de carotenoides/g peso fresco. En los extractos de los frutos del estadio inmaduro, el contenido de carotenoides fue el más bajo con concentraciones menores a 100 μ g de carotenoides/g peso fresco (Figura 7).

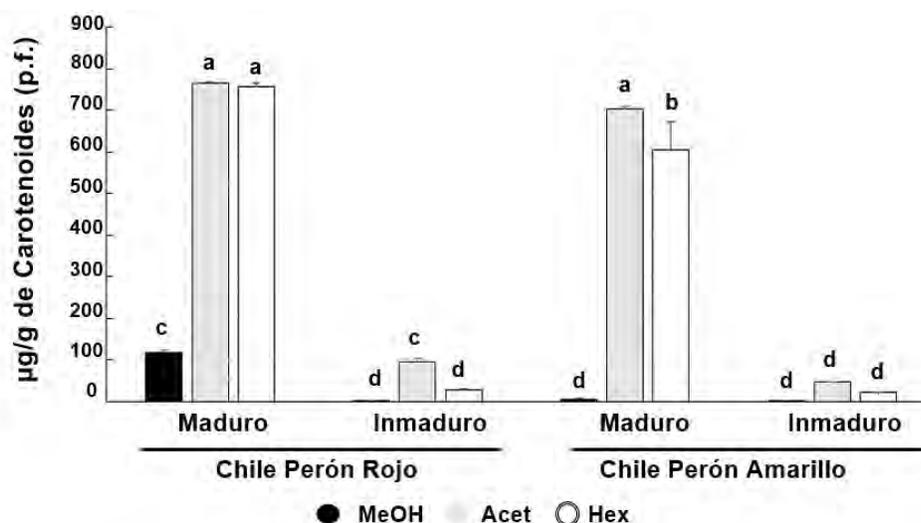


Figura 7. Contenido de carotenoides en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

Los frutos de *Capsicum* se han utilizado en forma de concentrados, oleorresinas y como especias en colorantes alimenticios, ya que los frutos presentan carotenoides, como ceto-carotenoides, capsantina, capsorrubina contribuyendo a la coloración roja del fruto, mientras que β -caroteno, zeaxantina, luteína y β -criptoxantina son responsables del color amarillo-naranja (Philip *et al.*, 1971). El conocer el contenido de carotenoides en los frutos de *Capsicum* spp es de gran importancia debido a las propiedades antioxidantes que se les atribuye y poder recomendar su consumo.

Los reportes del contenido de carotenoides en diversas especies o variedades comerciales de *Capsicum*, del genotipo “Amarillo” y “Rojo” de chile perón son similares en frutos maduros del chile pimiento Cv. MA1 que contienen 12.61 mg de carotenoides/g de peso fresco (Hornero-Méndez *et al.*, 2002); en chile habanero Cv. Jaguar se han encontrado cantidades de 17 a 23 mg de carotenoides/g de fruto (Ramírez *et al.*, 2016). El contenido total de carotenoides en los frutos de *Capsicum* varían de acuerdo con el tipo de cultivar (Almeda *et al.*, 1991).

Contenido de capsaicina

El contenido de capsaicina determinado en los frutos maduros e inmaduros de chile perón “Amarillo” y “Rojo” varió según el solvente de extracción, el estado de madurez y el genotipo, obteniendo un mayor contenido en acetato de etilo y metanol. Con el sistema de extracción con acetato de etilo, los frutos maduros del genotipo “Rojo” presentaron 4.088 μ moles de capsaicina/g p.f., seguidos por el extracto metanólico de frutos inmaduros del este genotipo con 3.91 μ moles de capsaicina/g p.f. habiendo diferencias significativas entre ellos y con los demás tratamientos (Figura 8). Aunque

el contenido de capsaicina fue mucho más bajo en los frutos tanto maduros como inmaduros del genotipo “Amarillo”, la producción más alta fue en los extractos metanólicos con 3.095 y 1.751 μmoles de capsaicina/g p.f., respectivamente (Figura 8).

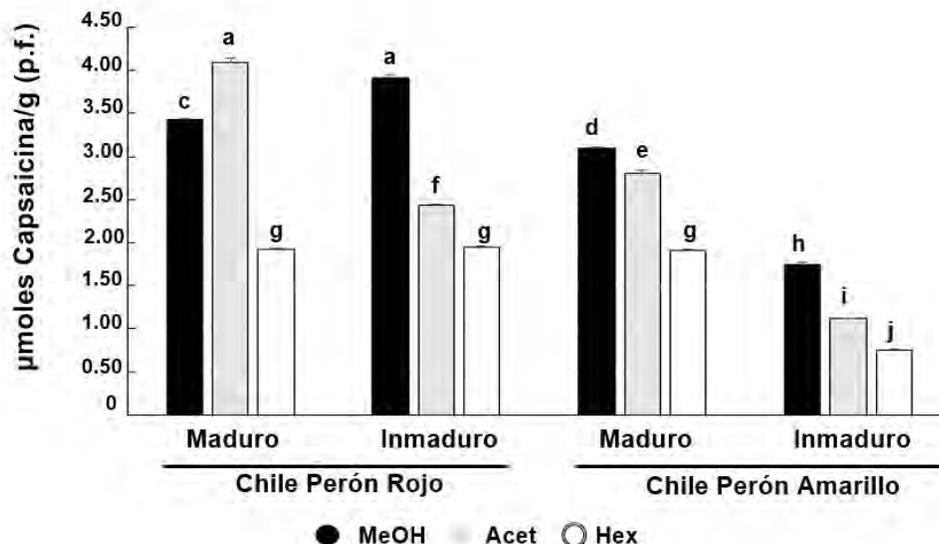


Figura 8. Contenido de capsaicina en frutos de chile perón de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de dos etapas de maduración (inmaduro y madurez de consumo). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

El contenido de capsaicina en diferentes accesiones o variedades comerciales de chile considerados con una alta pungencia, es entre 16 y 200 μmoles de capsaicina/g de peso fresco, que equivalen a 5 y 60 mg/g peso fresco (Canto-Flick *et al.*, 2008). En particular, los valores encontrados en los genotipos de chile perón, corresponden a cultivares con de moderada a baja pungencia, con una equivalencia a 3075 unidades Scoville (Mathur *et al.*, 2000; Usman *et al.*, 2014). Así como la variación en el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico y carotenoides, depende de la especie y la variedad comercial o bien debido a las condiciones y factores inherentes al cultivo, el contenido de capsaicina o capsaicinoides totales también presenta este fenómeno, como lo reporta Canto-Flick *et al.* (2008) al estudiar 18 accesiones de chile habanero y Usman *et al.* (2014) en 21 genotipos de *C. annuum*.

Conclusiones

La actividad antioxidante de los extractos de frutos de chile perón (*Capsicum pubescens*) es dependiente del contenido de los compuestos bioactivos que varían según el genotipo y la etapa de maduración.

Los resultados evidencian que la mayor actividad antioxidante fue mostrada por los extractos metanólicos independientemente del genotipo y etapa de maduración, y ésta se relacionó con el alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y ácido ascórbico.

El extracto metanólico de los frutos inmaduros de chile perón (*C. pubescens*) del genotipo “Amarillo” presentó la mayor actividad antioxidante, con un alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y ácido ascórbico, a los que se les atribuye dicha capacidad.

Referencias

- Adedayo, B.C., Oboh G. y Akindahunsi A.A. 2010. Changes in the total phenol content and antioxidant properties of pepper fruit (*Dennettia tripetala*) with ripening. *African Journal of Food Science*, 4:403-409.
- Almeda, L., López-Roca J.M., Candela M.E. y Alcázar M.D. 1991. Carotenoid composition of new cultivars of red pepper for paprika. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:1606-1609.
- Álvarez-Parrilla E., de la Rosa L.A., Amarowicz R y Shahidi F. 2011. Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 12:163-173.
- Archana, B., Nahasree D. y Bratati De. 2005. *In vitro* study on antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, 90:727-733.
- Ayala-Ponce, R., Torres-Martínez R., Manzo-Ávalos S., Saavedra-Molina A., Hernández-García A. y Salgado-Garciglia R. 2017. Determinación de la actividad antioxidante de chile habanero (*Capsicum chinense* Cv. Chocolate) y su relación con los compuestos activos. 12º. Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y 6º Encuentro de jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. 6 de octubre de 2017. Morelia Michoacán.
- Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Crosby, K., Yoo, K.S., Leskovar, D.I., Jifon, J. y Patil, B.S. 2014. Ascorbic acid, capsaicinoid, and flavonoid aglycone concentrations as a function of fruit maturity stage in greenhouse-grown peppers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(2): 195-202.
- Block, G. y Langseth L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food and Technology*, 48:80-84.
- Buck, S.H. y Burks T.F. 1983. Capsaicin: hot new pharmacological tool. *Trends in Pharmacological Sciences*, 4:84-87.
- Canto-Flick, A., Balam-Uc E., Bello-Bello J.J., Lecona-Guzmán C., Solís-Marroquín D., Avilés-Viñas S., Gómez-Uc E., López-Puc G. y Santana-Buzzy N. 2008. Capsaicinoids content in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): hottest known cultivars. *Hortscience*, 43(5): 1344–1349.
- Carbonel, V.N., Suárez C.S y Arnao S.A. 2016. Características fisicoquímicas y capacidad antioxidante *in vitro* del extracto de *Gentianella nitida*. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4):333-337.
- Castro, C.L., Tuyub-C. J., Moo M.A., Vázquez F.F y Miranda-Ham M. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from

- accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, 24:1-6.
- Chuah, A.M., Lee Y.C., Yamaguchi T., Takamura H., Yin L.J. y Matoba T. 2008. Effect of cooking on the antioxidant properties of colored peppers. *Food Chemistry*, 111:20-28.
- Earnest, E., Lawrence E., Franklin I. y Daniel O. 2013. The roles of *Capsicum* in Diabetes Mellitus. *Pharmacology and Toxicology Research*, 6(1): 22 -27.
- Hidalgo, G.I. y Almajano M.P. 2017. Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Antioxidants*, 6(7):1-27.
- Hornero, M.D., Costa G.J. y Minguez-Mosquera M.I. 2002. Characterization of carotenoid high-producing *Capsicum annuum* cultivars selected for paprika production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(57):11-6.
- Howard, L.R., Talcott S.T., Brenes C.H. y 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*, 48:1713-1720.
- Hung, C.Y y Yen G.C. 2002. Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona procumbens* Hemsl. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50(10):2993-2297.
- Karamać, M., Kosińska A. y Pegg B.R. 2005. Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2):165-170.
- Kim, D., Jeoung S. y Lee C. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, (81) 321-326
- Kumaran, A. y Karunakaran J.R. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Food Science and Technology*, 40:344-352.
- Lee, S.K. y Kader A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology Technology*, 20(3):207-220.
- Lutz, M., Hernández J. y Henríquez C. 2015. Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. *Journal of Food*, 13(4):541-547.
- Materska, M. y Perucka I. (2005). Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:1750-1756.
- Mathur, R., Dangi R.S., Das S.C. y Malhotra R.C. 2000. The hottest chilli variety in India. *Current Science*. India, 79:287-288.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández J. 1989. Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(1):1-7.
- Oboh, G. y Rocha, J.B.T. 2008. Water extractable phytochemicals from *Capsicum pubescens* (tree pepper) inhibit lipid peroxidation induced by different

- prooxidant agents in brain: *in vitro*. *European Food Research and Technology*, 226:707-713.
- Ornelas-Paz, J.J., Yahia E.M., Gardea-Bejar A.A. 2008. Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography–APCl+–time-offlight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology*, 50:145-152.
- Philip, T., Navar W.W. y Francis F.J. 1971. The nature of fatty acids and capsanthin esters paprika. *Journal of Food Science*, 36:98-102
- Rahim, R.A. y Mat I. 2012. Phytochemical contents of *Capsicum frutescens* (Chili Padi), *Capsicum annum* (Chili Pepper) and *Capsicum annum* (Bell Peper) Aqueous Extracts. *International Conference on Biological and Life Sciences IPCBEE*, 40:164-167.
- Ramírez, H., Mendoza-Castellanos J., Vázquez-Badillo M.E., Zermeño-González A. 2016. La prohexadiona de calcio (P-CA): una alternativa hormonal viable en chile habanero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(3):631-641.
- Rodríguez. M.A. 2013. Capacidad antioxidante de extractos de chile chiltepin (*Capsicum annum* var. *Glabriusculum*) y su potencial en el biocontrol de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California. pp. 1- 61.
- Rufino, M.S.M., Alves R.E., Brito E.S. y Pérez-Jiménez J. 2010. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, 121:996-1002.
- SAGARPA. 2012. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Chile manzano en invernadero. Disponible en: <http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/nota.php?accion=buscar¬ald=81263127451b69ce074cac> (Consultado en Febrero del 2019).
- Schwarz, K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinonem M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L. y Tijburg L. 2001. Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*, (212):319-328.
- Shaimaa, G.A., Mahmoud M.S., Mohamed M.R. y Emam A.A. 2016. Phytochemical screening, antioxidant activities and *in vitro* anticancer potential of egyptian *Capsicum* spp. *Biochemistry & Pharmacology*, 5(2): 1-8
- Sora, S.T., Charles I.C., da Silva V.M., Zielinski F.A., Gonçalves A.G., Bracht A. y Peralta M.R. 2015. A comparative study of the capsaicinoid and phenolic contents and *in vitro* antioxidant activities of the peppers of the genus *Capsicum*: an application of chemometrics. *Journal Food Science and Technology*, 52(12): 8086-8094.
- Tripathi, S. y Mishra H.N. 2009. Nutritional changes in powdered red pepper upon *in vitro* infection of *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:139-144.

- Usman, M. G., Rafii M.Y., Ismail M.R., Malek M.A. y Latif M.A. 2014. Capsaicin and dihydrocapsaicin determination in chili pepper genotypes using ultra-fast liquid chromatography. *Molecules*, 19(5):6474-88.
- Xu, X., Zhao Y. y Yan S. 2007. Optimization of soxhlet extraction of capsaicinoids using orthogonal experiment. *Science Paper Online*, 1:1-7.

VI.2. Actividad hipoglucémica del extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón (*Capsicum pubescens* Ruiz et Pavón) en ratas diabéticas

Resumen

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por niveles de hiperglucemia, con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, donde la secreción y/o acción de insulina es deficiente, nula o ambos. Actualmente, se han relacionado las complicaciones de la DM con el estrés oxidante, ya que provoca un daño a diferentes biomoléculas que no puede ser contrarrestado por antioxidantes endógenos, ya que se encuentran disminuidos. Sin embargo, dicho daño oxidante puede ser contrarrestado con la administración de antioxidantes exógenos presentes en diversas plantas o sus frutos como los de chile perón (*Capsicum pubescens*), del cual en estudios previos se observó que el extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” mostró una alta actividad antioxidante determinada con los métodos DPPH, ABTS y TAC, con 92.4%, 93.6% y 70.9%, respectivamente (Capítulo I), lo cual se relacionó con un alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y ácido ascórbico. Con el fin de evaluar el efecto hipoglucémico, dicho extracto fue administrado vía oral (100 µL) durante 60 días en tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg de peso corporal) a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (40 mg/kg de peso corporal) y a ratas control (normoglucémicas). A éstas se les administró la solución vehículo (DMSO 0.1%). Durante este tiempo se cuantificó el peso corporal y los niveles de glucosa cada diez días, con previo ayuno de 12 h. A los 60 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas, realizando un análisis serológico determinando los niveles de glucosa, marcadores bioquímicos de daño renal (urea, creatinina y ácido úrico) y del metabolismo de lípidos (triacilglicéridos, colesterol total, colesterol-HDL y lípidos totales). Con la administración del extracto en ratas normoglucémicas se demostró que éste no mostró un efecto hipoglucémico, sin observar una disminución del peso corporal. Sin embargo, el extracto, a una dosis de 10 mg/Kg, fue responsable de una disminución drástica en los niveles de glucosa en las ratas diabéticas, de hasta un 177% (115 mg/dL), permitiendo una ligera ganancia en el peso corporal. En este grupo de ratas, a los 60 días de tratamiento, se observó una disminución en los niveles de glucosa, ácido úrico, creatinina, triacilglicéridos y lípidos totales, un aumento en el peso de las ratas y una tendencia a bajar los niveles de colesterol y colesterol-HDL. El extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de *C. pubescens*, presentó un efecto hipoglucémico, hipotrigliceridémico e hipolipidémico, con protección de daño renal, en ratas diabéticas.

Palabras clave: *Capsicum pubescens*, diabetes mellitus, hiperglucemia, hipoglucemia.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a chronic degenerative disease characterized by levels of hyperglycemia, with alterations in the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins, where the secretion and / or action of insulin is deficient, null or both. Currently, the complications of DM have been related to oxidative stress, since it causes damage to different biomolecules that cannot be counteracted by endogenous antioxidants, since they are diminished. However, this oxidative damage can be counteracted by the administration of exogenous antioxidants present in various plants or their fruits such as those of chile peron (*Capsicum pubescens*), which in previous studies it was observed that the methanolic extract (MeOH) of immature fruits of the "Yellow" genotype showed a high antioxidant activity determined with the DPPH, ABTS and TAC methods with 92.4%, 93.6% and 70.9%, respectively (chapter I), which was related to a high content of flavonoids, phenolic acids and ascorbic acid. In order to evaluate the hypoglycemic effect, this extract was administered orally (100 µL) for 60 days in three doses (0.1, 1 and 10 mg/Kg of body weight) (40 mg/Kg body weight) of streptozotocin-induced diabetic rats and rats control (normoglycemic). These were administered with vehicle solution (DMSO 0.1%). During this time, the body weight and glucose levels were quantified every ten days, with a previous fast for 12 h. At 60 days of treatment, rats were sacrificed, performing a serological analysis by determining the levels of glucose and biochemical markers of renal damage (urea, creatinine, and uric acid) and of lipid metabolism (triacylglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol and total lipids). With the administration of the extract in normglycemic rats, it was demonstrated that this did not show a hypoglycemic effect, without observing a decrease in body weight. However, the extract, at 10 mg/Kg doses, was responsible for a drastic decrease in the glucose levels in diabetic rats, of up to a 177% (115 mg/dL), allowing a slight gain in body weight. In this group of rats, during the 60 days of treatment, a decrease in glucose levels, uric acid, creatinine, triacylglycerides and total lipids levels was observed, an increase in the weight of the rats and a tendency to lower levels of cholesterol and HDL-cholesterol. Methanol extract of immature fruits of the genotype "Yellow" of *C. pubescens*, presented a hypoglycemic, hypotriglyceridemic, and hypolipidemic effect, with renal damage protection, in diabetic rats

Keywords: *Capsicum pubescens*, diabetes mellitus, hyperglycemia, hypoglycemia.

Introducción

En la actualidad, a nivel mundial hay un aumento en la prevalencia de la diabetes, tan solo en el año 2000 se reportaron 171 millones de personas con esta enfermedad y se estima que para el 2030 sean 366 millones de personas, siendo la primera causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Sze *et al.*, 2015). México, ocupa la lista de los diez países con mayor número de personas con diabetes, tan solo en el año 2016 la prevalencia de diagnóstico de diabetes en la población fue 9.4%

mayormente entre mujeres que en hombres (10.3% vs 8.4%), respectivamente. Esta última prevalencia representa un poco más de 7 millones de personas diabéticas en México, por lo que se estima que para el 2030, podría alcanzar de un 12 a un 18%, y para 2050, de 14 a un 22%. Entre las complicaciones más frecuentes de la diabetes está la visión disminuida (54.46%), seguida de ardor, dolor o pérdida de la sensibilidad en la planta de los pies (41.17%). Además, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, se asocian a la diabetes. En México, el 46.4% de los diabéticos no realiza medidas preventivas para evitar o retrasar algunas de estas complicaciones, lo que se considera lejos alcanzarse (ENSANUT, 2016; Rojas *et al.*, 2018).

Actualmente, existen diversas clases de medicamentos para el control de la diabetes como las sulfonirureas, biguanidas, inhibidores de α -gluconidasa, meglitidinas y tiazolidinedionas, que mayormente actúan, aumentando la liberación de insulina a través del canal de potasio, inhibición de la gluconeogénesis, aumento y activación de transportadores de GLUT-1 y GLUT-4, inhibición de carbohidratos y sensibilizadores de receptores de insulina. Sin embargo, cada uno tiene efectos secundarios destacando efectos hipoglucémicos, ganancia de peso, náuseas, vómito, mareo, dolor abdominal y/o diarrea (ALAD, 2000; Mateos *et al.*, 2002; Zarate *et al.*, 2014). No obstante, en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la diabetes, que ofrezcan menos efectos secundarios y sean disponibles para un número mayor de personas, se ha acudido al uso de plantas medicinales y comestibles, y que han sido estudiadas, por tener un efecto hipoglucémico y/o antidiabético, algunas de ellas se emplean en la medicina tradicional, las que requieren ser validadas científicamente, analizando el contenido, tipo y actividad biológica de sus compuestos activos, presentes en los diversos órganos de las plantas (Martínez y Sánchez, 2013).

De estas investigaciones, se ha mostrado la existencia de plantas con efecto hipoglucémico que constituyen a familias como Leguminosae, Lamiaceae, Liliaceae, Curcubitaceae, Asteraceae, Moraceae, Rosaceae, Euphorbiaceae y Araliaceae. Los mayores estudios se han realizado en especies como *Opuntia streptacantha*, *Trigonella foenum graecum*, *Momordica charantia*, *Ficus bengalensis*, *Polygala senega*, *Ocimum tenuiflorum* y *Gymnema sylvestre*, con óptimos resultados de hipoglucemia en experimentos con ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y aloxano (Patel *et al.*, 2012; Moradabadi *et al.*, 2013; Martínez y Sánchez, 2013, Mousavi y Asmawi, 2016; Gushiken *et al.*, 2016). No obstante, se han reportado también diversos frutos con actividad hipoglucémica como anona, arándano, calabaza, capulín, chayote, guanábana, guayaba, higo, fresa, lima, limón, nanche, noni, mezquite y tamarindo (Gallego y Ferreira, 2005; Saavedra *et al.*, 2007; García *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2012; Gaber *et al.*, 2013; Martínez y Sánchez, 2013; Cordero, 2015; Arribas, 2016).

Además, también se ha reportado un efecto hipoglucémico y/o insulínico con la administración de extractos de frutos de Chile Pimiento (*Capsicum annuum*), Chile habanero (*C. chinense*) y Chile Tabasco (*C. frutescens*), que además de ser una fuente de compuestos antioxidantes, contienen capsaicina, metabolito con efecto

farmacológico ya que permite la activación de receptores específicos como el potencial transitorio (V1) o (TPRV1), así como del polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) que estimulan el aumento de la secreción de la insulina en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y aloxano. Con esto, se ha demostrado que este compuesto tiene un efecto más insulínico que hipoglucémico (Abdel *et al.* 2004; Young-In *et al.*, 2006; Islam y Choi, 2008; Patel *et al.*, 2012; Earnest *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2014; Maekawa *et al.*, 2018).

Actualmente, no todos los frutos de las diferentes especies de chile (*Capsicum*) han sido analizados en cuanto al contenido de sus compuestos activos y la relación de éste con actividades como la antioxidante y la hipoglucémica. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se mostró que el extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón (*C. pubescens*) tuvo una mayor actividad antioxidante por el método de DPPH con 93.68%, comparados con los métodos de ABTS y TAC con 92.4% y 70.90% respectivamente, que se relacionó directamente con un alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y ácido ascórbico, principalmente (Carrillo-Corona *et al.*, 2018).

En la presente investigación se determinó la actividad hipoglucémica del extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón (*C. pubescens*) en ratas diabéticas, analizando el efecto sobre marcadores bioquímicos de daño renal y metabolismo de lípidos en sangre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar, con un peso de 300-400 g, alojadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y mantenidas con ciclos de 12 h de luz/oscuridad, en condiciones de temperatura controlada, alimentadas con una dieta estándar de roedores y agua purificada *ad libitum*. La dieta de los animales consistió en alimento para roedores de laboratorio con una presentación comercial de croquetas Nutricubos Purina®. El manejo general de los animales se realizó bajo la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999 y con la aprobación del Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para el uso y cuidado de animales de laboratorio, actualmente vigente.

Inducción de la diabetes a las ratas

La diabetes experimental fue inducida con estreptozotocina (STZ) a 40 mg/Kg de peso corporal, vía intraperitoneal disuelta en buffer de citrato (pH 4.4). La glucemia fue medida antes de la inducción, ya que las ratas fueron privadas de alimento 12 h antes de la administración de la STZ. Las ratas control fueron administradas solo con buffer de citrato, diez días después de la administración de STZ, los niveles de glucemia se determinaron para confirmar la diabetes, utilizando un glucómetro ACCU-CHECK Performa.

Tratamiento

El periodo de tratamiento fue de 60 días teniendo 4 grupos de ratas normoglucémicas (no tratadas con STZ) y 4 grupos de ratas diabéticas (Cuadro 3), a las que se les administró el extracto metanólico (MeOH) el cual fue evaporado y disuelto con dimetil sulfóxido (DMSO) al 0.1 % (vehículo). La administración a los animales fue vía oral con cánula, en un volumen de 100 μ L en tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg de peso corporal).

Cuadro 3. Tratamientos experimentales en ratas para determinar el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón (*C. pubescens*) en ratas diabéticas Wistar macho (n=5).

Grupo	Tratamientos
1	Normoglucémicas + DMSO (0.1%)
2	Diabéticas + DMSO (0.1%)
3	Normoglucémicas + Dosis 1 (0.1 mg/Kg)
4	Diabéticas + Dosis 1 (0.1 mg/Kg)
5	Normoglucémicas + Dosis 2 (1 mg/Kg)
6	Diabéticas + Dosis 2 (1 mg/Kg)
7	Normoglucémicas + Dosis 3 (10 mg/Kg)
8	Diabéticas + Dosis 3 (10 mg/Kg)

Al grupo control sólo se les administró DMSO al 0.1% durante el periodo de tratamiento. Cada 10 días, se determinó el peso corporal de las ratas en una báscula digital y los niveles de glucosa en sangre con 12 h de ayuno. La medición de glucemia se realizó mediante la punción en la vena caudal de la cola del animal.

Análisis serológico

Para la obtención y análisis del suero, las ratas fueron sacrificadas por decapitación en guillotina, evitando el mínimo dolor y estrés, con privación previa de alimento durante 12 h. La sangre fue recolectada en tubos BD Vacutainer y se recolectaron los riñones, almacenando las muestras a -60° C hasta su análisis.

Posteriormente la sangre fue colocada en tubos BD Vacutainer, dejando coagular, centrifugando a 3,500 rpm durante 10 min para obtener el suero, al cual se le realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol y triacilglicéridos, a través del equipo Dri-Chem NX500i Fujifilm. Los resultados fueron comparados con los valores de referencia para suero de ratas Sprague Dawley (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores de referencia de parámetros bioquímicos en suero de ratas Sprague Dawley (Tomado y modificado de León y Blanco, 2011).

Prueba	Rango (mg/dL)
Glucosa	43-157.2
Urea	38-63.3
Creatinina	0.32-0.71
Ac. úrico	0.88-1.66
Colesterol total	44.4-96.9
Triacilglicéridos	26.7-99.9

Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo con 5 réplicas (n=5). Los datos se presentan como promedio (media) más desviación estándar, analizados por ANOVA ($p < 0.05$), realizando una diferencia de medias por Tukey-Kramer, empleando el software JMP-8.

RESULTADOS

Efecto hipoglucémico del extracto en ratas diabéticas

Durante los 60 días de administración del extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de Chile perón, los niveles de glucosa no mostraron una diferencia significativa en ratas normoglucémicas tratadas con las tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg), ya que estos valores oscilaron en un promedio de 82-85 mg/dL, los cuales fueron considerados normales, ya que en ratas Wistar éstos oscilan entre 70 a 110 mg/dL (Martínez, 2017). Con esto se demostró que independientemente de las concentraciones del extracto, no hubo un efecto hipoglucémico en ratas normoglucémicas durante los 60 días de tratamiento (Figura 9a).

Sin embargo, las ratas diabéticas tratadas con las tres dosis del extracto, desde los diez días de tratamiento mostraron una disminución en los niveles de glucosa, ya que a las que se les administró solamente la solución vehículo (DMSO 0.1%), mantuvieron un promedio de 300 mg/dL durante los 60 días de tratamiento. Aunque se encontró un mayor efecto de disminución en los niveles de glucosa con las dosis de 0.1 y 10 mg/Kg, los niveles más bajos se presentaron en las ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg, registrando niveles de 115 mg/dL, un valor con diferencia significativa respecto al grupo diabético con DMSO 0.1% (Figura 9b).

Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa en las ratas diabéticas tratadas con las tres dosis del extracto, el nivel por el efecto de la concentración de 10 mg/Kg disminuyó hasta en un 177%, respecto a los valores normales de las ratas normoglucémicas (Figura 9b).

Los valores de glucosa alcanzados por la administración del extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de Chile perón, tienen un mayor efecto si se compara con el de los extractos de hojas de *Justicia spicigera* (muicle), de los frutos

de Chile Tabasco (*C. frutescens*) y de Chile Pimiento (*C. annuum*), ya que muestran un efecto hipoglucémico en concentraciones más altas (100 mg/kg, 5g y 15g, respectivamente) (Young-In *et al.*, 2006; Kamon *et al.*, 2009; Earnest *et al.*, 2013; Komindr, 2015).

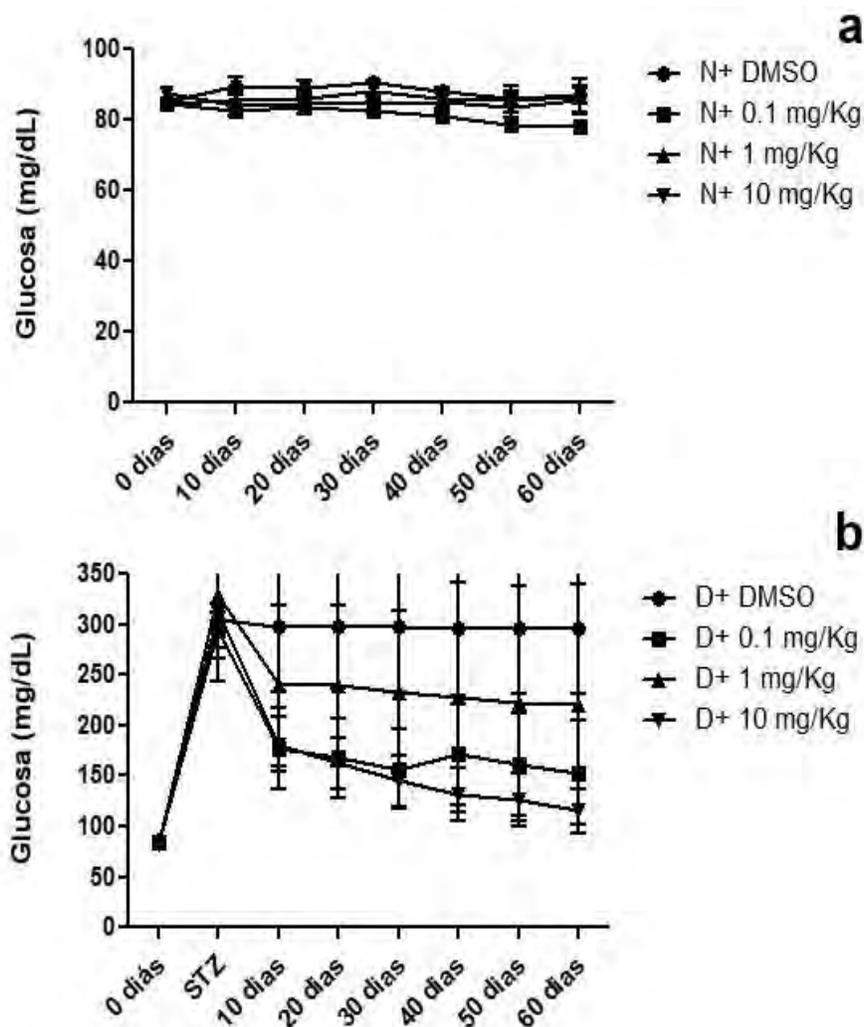


Figura 9. Concentración de glucosa (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) (a) y diabéticas (D) (b) tratadas durante 60 días con el extracto metanólico de frutos inmaduros de Chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg). Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Efecto del extracto sobre el peso corporal

De manera general, los resultados obtenidos del peso corporal en ratas normoglucémicas, mostró durante los 60 días de administración del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo “Amarillo”, un incremento de peso al grupo tratado con vehículo (DMSO 0.1%) y con las tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/kg) (Figura 10a). El peso de las ratas tratadas fue en promedio de 419 g, con diferencias significativas entre ellas, pero con un menor peso en las ratas no tratadas (436 g).

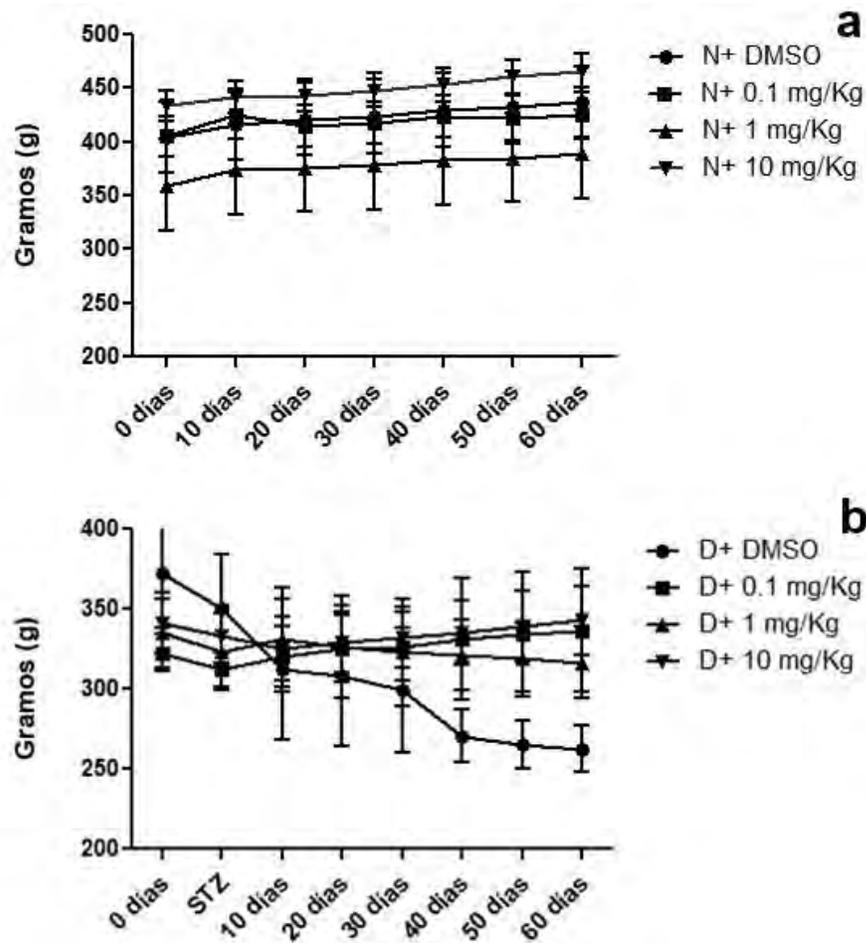


Figura 10. Peso corporal (g) en ratas normoglucémicas (N) (a) y diabéticas (D) (b), tratadas durante 60 días con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg). Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

En ratas diabéticas tratadas con DMSO 0.1% y con dosis de 0.1, 1 y 10 mg/Kg, al inicio del tratamiento, mostraron un peso de 322 a 372 g, que disminuyó a partir de la inducción con STZ, hasta obtener un promedio general de 320 g a los 10 días de tratamiento. Sin embargo, desde los 20 días de tratamiento se observó una ganancia de peso dependiente de la dosis, mostrando un peso mayor en las ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg (342 g) y con diferencia significativa entre el grupo diabético tratado con vehículo (DMSO 0.1%), que mostró la menor ganancia de peso con (262 g) (Figura 10b).

Las ratas tanto normoglucémicas como diabéticas tratadas con 10 mg/kg de extracto, mostraron una ganancia de peso desde el inicio del tratamiento, permaneciendo éste hasta los 60 días (Figura 10b). De manera general, las ratas normoglucémicas y diabéticas tratadas con 10 mg/Kg de extracto, mostraron una ganancia de peso durante los 60 días de tratamiento (Figura 10).

Es importante mencionar, que el extracto administrado además de contener flavonoides, ácidos fenólicos y ácido ascórbico, presenta valores de 3.095 μ moles de capsaicina/g p.f., y este compuesto cuando se ha administrado en animales de experimentación, se ha observado que regula la hiperglucemia postprandial e hiperinsulinemia, mejorando la resistencia a insulina, un factor estrechamente asociado a la obesidad, así como de trastornos metabólicos de lípidos en ayunas en mujeres con diabetes mellitus (Yuan *et al.*, 2015; Varghese *et al.*, 2016). Actualmente, se sabe que el consumo de chile aumenta la anorexigenicidad (Janssens *et al.*, 2014) y reduce el apetito de alimentos grasos, salados y dulces. Dougnon y Gbeassor (2016) demostraron que el administrar frutos de chile Tabasco (*C. frutescens*) en conejos, además de tener un efecto hipoglucémico, ejerció un efecto sobre la ganancia de peso hasta en 56 días.

Concentración de glucosa

En el grupo de ratas normoglucémicas no hubo diferencias significativas independientemente de la concentración del extracto metanólico de los frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón y del vehículo (DMSO 0.1%), manteniendo una concentración de 90 mg/dL de glucosa. Sin embargo, en el grupo diabético se observó un efecto hipoglucémico dependiente de las concentraciones del extracto, ya que con las tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg) se obtuvo una disminución en el nivel de glucosa, de 288 mg/dL (grupo de ratas no tratadas) hasta 115 mg/dL en las ratas tratadas con 10 mg/Kg, con diferencias significativas a los demás grupos (Figura 11).

La disminución de niveles de glucosa en ratas diabéticas tratadas con extractos de frutos de chile se ha observado también con dosis mayores (>10 mg/Kg) de los extractos de chile Tabasco (*C. frutescens*) y de chile Pimiento (*C. annum*), aunque con la administración de extractos o frutos de otras especies de *Capsicum*, no se reportan efectos hipoglucémicos (Young-In *et al.*, 2006; Kamon *et al.*, 2009; Earnest *et al.*, 2013; Komindr, 2015).

Los resultados de esta investigación demuestran que el extracto metanólico de los frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de Chile perón muestra un efecto hipoglucémico en ratas diabéticas, sin que se presenten alteraciones del nivel de glucosa en las ratas normoglucémicas. Otro aspecto importante es que las concentraciones efectivas son más bajas y más significativas que las reportadas para otras especies de *Capsicum*.

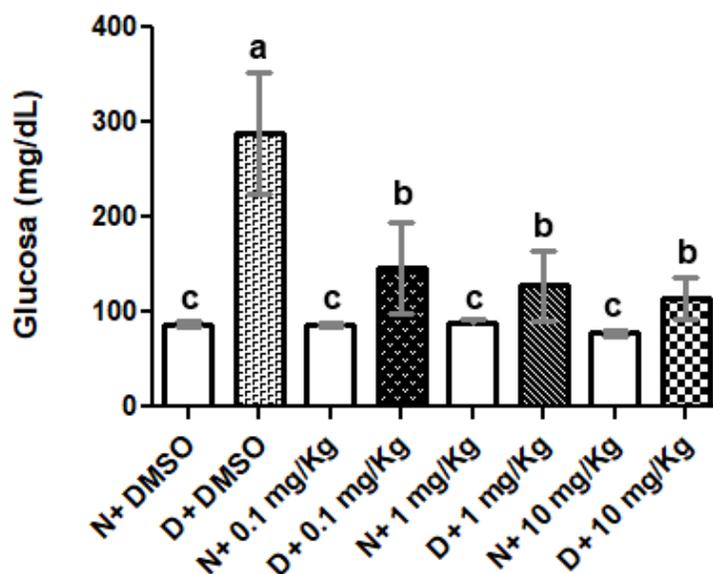


Figura 11. Concentración de glucosa (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de Chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Concentración de marcadores de daño renal (ácido úrico, creatinina y urea)

En la figura 12 (a, b y c) se presentan los resultados de los parámetros bioquímicos séricos del perfil renal (ácido úrico, creatinina y urea en suero) tanto de ratas normoglucémicas como diabéticas, tratadas con las tres dosis del extracto metanólico de los frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de Chile perón. Con estos parámetros es posible detectar daño renal, la localización anatómica del daño (pre-renal, glomerular o tubular) y cuantifican el grado de daño del órgano. Algunas pruebas van dirigidas a evaluar la función glomerular, a través de la medida de la velocidad de filtración glomerular y otras, dirigidas a evaluar la función tubular (Carvajal, 2016).

Concentración de ácido úrico

En la Figura 12a se muestran los niveles de ácido úrico, con valores sin diferencia significativa en los grupos de ratas normoglucémicas, tanto con extracto como sin la administración de éste, observando una tendencia a disminuir con la dosis de 10 mg/Kg, en la que se obtuvieron 1.2 mg/dL de ácido úrico. En las ratas diabéticas, se muestra un efecto del extracto sobre la disminución de ácido úrico, ya que las ratas de este grupo a las que solo se les administró el vehículo (DMSO 0.1%), alcanzaron el nivel más alto con 2.4 mg/dL.

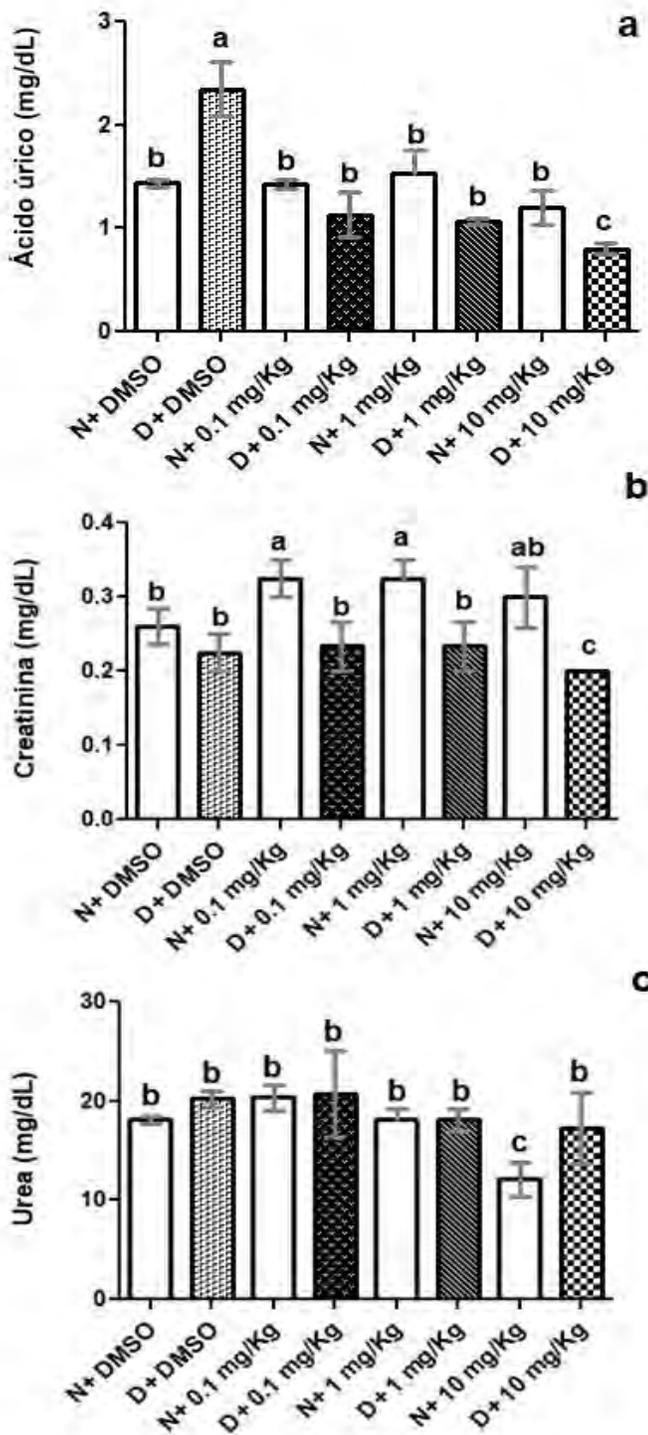


Figura 12. Concentración de ácido úrico (a), creatinina (b) y urea (c) (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Con las tres dosis del extracto, los niveles disminuyeron hasta en un 100%, presentando valores de 1.13, 1.06 y 0.8 mg/dL con las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/Kg, respectivamente, con diferencias significativas respecto al control. En ratas diabéticas, la disminución de los niveles de ácido úrico con la dosis de 10 mg/Kg del extracto fue tres veces menos que el presentado por las ratas control (Figura 12a).

Estos resultados demuestran que en el grupo de ratas diabéticas no se presentó un daño a nivel renal, independientemente de las dosis (0.1, 1, 10 mg/Kg) en comparación con las ratas tratadas con DMSO (0.1%), que alcanzó el nivel más alto en ácido úrico, lo que demuestra una mayor degradación de bases nitrogenadas que conllevan a largo plazo, a procesos inflamatorios como nefrolitiasis y finalmente nefropatía diabética, ya que no hay una filtración eficiente en el glomérulo (Carvajal, 2016).

Contenido de creatinina

En el grupo de ratas normoglucémicas tratadas con DMSO 0.1% y con las tres dosis del extracto, aunque no hubo diferencias significativas en los niveles de creatinina, se notó un ligero incremento que estuvo en un rango de 0.275 a 0.325 mg/dL. Sin embargo, en las ratas diabéticas, aunque el nivel de creatinina fue menor que en las normoglucémicas, éste no aumentó con las dosis de 0.1 y 1 mg/Kg, con un promedio de 0.225 mg/dL y disminuyó con diferencia significativa hasta 0.190 mg/dL en las tratadas con 10 mg/kg del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo” (Figura 12b).

Estos resultados demuestran que independientemente de las dosis de extracto (0.1, 1, 10 mg/kg) para ambos grupos de ratas (normoglucémicas y diabéticas), no ejercen un efecto en el aumento de los niveles de creatinina, ya que dichos valores oscilan entre 0.37 y 0.71 mg/ dL en ratas Sprague Dawley (León *et al.*, 2011) demostrando ausencia de insuficiencia renal. Un aumento en la concentración de creatinina responde a las mismas causas que la elevación de las cifras de urea, donde la insuficiencia renal es la principal razón del aumento de los niveles en suero (Martínez-Mora, 2017).

Contenido de urea

En general, el extracto metanólico de frutos de chile perón genotipo “Amarillo” no presentó cambios en los niveles de urea en todos los grupos de ratas, a excepción de lo observado en ratas normoglucémicas, en las que con la dosis de 10 mg/Kg,

hubo disminución en la concentración de urea, bajando de 18 mg/dL en las no tratadas (DMSO 0.1%) hasta 12 mg/dL (Figura 12c).

La urea al ser un compuesto orgánico y producto final del catabolismo de las proteínas, es una de las sustancias más difusibles en el cuerpo, que en concentraciones elevadas puede ser tóxica, ya que, puede desnaturalizar las proteínas. La concentración de urea en sangre (uremia) aumenta como consecuencia de dietas con exceso de proteínas, ejercicio, insuficiencia cardiaca, obstrucciones renales, así como también por fármacos o tóxicos que propician la destrucción de las proteínas. A un nivel alto de uremia se le denomina como azoemia, desarrollando el síndrome urémico cuando es acompañada con insuficiencia renal (González *et al.*, 2013; Martínez-Mora, 2017). Con estos resultados se observó un incremento en la concentración de urea en ratas diabéticas no tratadas con el extracto, indicativo del inicio de daño renal, por lo que el extracto metanólico de frutos de chile perón genotipo “Amarillo” ejerce un efecto protector de daño renal.

Concentración de triacilglicéridos

Los niveles de triacilglicéridos en ratas normoglucémicas se mantuvieron constantes con valores de 75 mg/dL, no encontrando diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, en las ratas diabéticas a las que no se les administró el extracto (DMSO 0.1%), se observaron concentraciones de hasta 123 mg/dL, que disminuyeron al tratar las ratas con 0.1, 1 y 10 mg/Kg del extracto, con valores de 75, 48 y 73 mg/dL, respectivamente. Estos valores no mostraron diferencias significativas con las ratas de los grupos normoglucémicos pero si con las del control diabético por lo que el extracto ejerció un efecto hipotrigliceridémico (Figura 13).

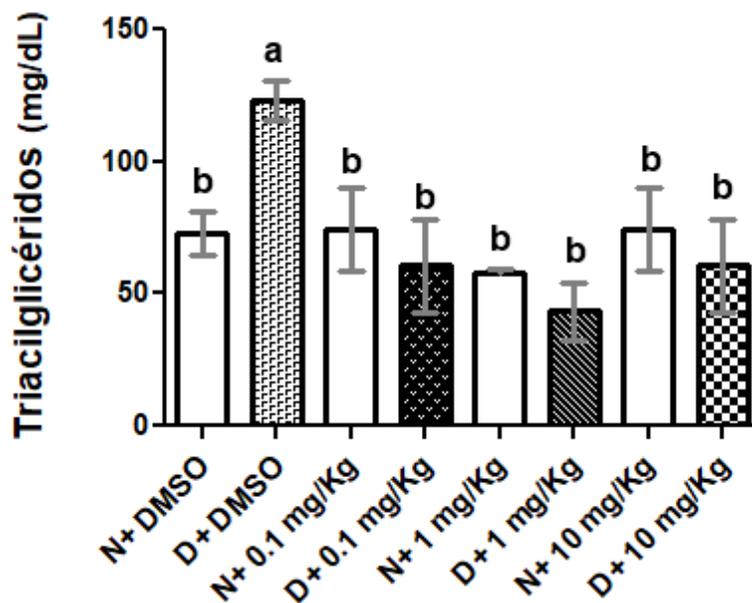


Figura 13. Concentración de triacilglicéridos (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Estos resultados son similares a los reportados en ratas Wistar tratadas durante 21 días con tres dosis (50, 200 y 350 mg/Kg) de extractos de frutos de chile ají (*C. baccatum*) (Jhinés, 2015), en las que se mostró un efecto hipotrigliceridémico. Con la dosis de 1 mg/Kg se logró disminuir el nivel de triacilglicéridos hasta 48 mg/dL, considerado dentro de la normalidad presentado por las ratas normoglucémicas no tratadas, que presentaron niveles de 75 mg/dL.

La concentración normal de triacilglicéridos en ratas, oscila entre 27 y 100 mg/dL (León *et al.*, 2011), lo que significa que las dosis del extracto bajan los niveles de este parámetro a los normales solo en ratas diabéticas, restaurando los niveles a los que presentaron las ratas control. Este resultado puede ayudar a prevenir a futuro enfermedades cardiovasculares y a reducir el riesgo de infarto cardíaco durante la diabetes (Soler *et al.*, 2012).

Concentración de colesterol total y colesterol HDL

Con la determinación de la concentración de colesterol total, no se observaron diferencias en el grupo de ratas normoglucémicas tratadas con DMSO 0.1% y con las dosis de 0.1 y 1 mg/Kg, mostrando un decremento con la dosis de 10 mg/Kg,

disminuyendo a valores de 42.25 mg/dL, 1.3 veces menos que el presentado por las ratas control (54.8 mg/dL) (Figura 14a).

En ratas diabéticas, el nivel de colesterol no mostró diferencia significativa entre las no tratadas y las tratadas con las tres dosis del extracto, aunque se observó una tendencia a disminuir con la dosis de 10 mg/Kg (33 mg/dL), 1.48 veces menor al observado en las ratas control (48.75 mg/dL) (Figura 14a). Sin embargo, la concentración de colesterol total de ratas diabéticas a las que se les administraron las tres dosis del extracto (0.1, 1 y 10 mg/Kg) fue significativamente menor a la presentada por las ratas normoglucémicas tratadas con las dosis de 0.1 y 1 mg (Figura 14a).

Un efecto similar fue observado para los niveles de colesterol HDL, con valores sin diferencias significativas en ratas normoglucémicas y con una tendencia a disminuir con la dosis de 10 mg/Kg de extracto en las ratas diabéticas, llegando a niveles de hasta 24 mg/dL, un valor sin diferencia significativa con los valores mostrados por las ratas diabéticas de todos los grupos experimentales. Aunque, también fue una concentración menor al observado en ratas normoglucémicas tratadas con 0.1 y 1 mg/Kg del extracto (Figura 14b).

Estos resultados indican que el extracto metanólico de frutos de chile perón genotipo "Amarillo", aunque no ejerce un efecto claro hipocolesterolémico, debido a que se mantienen los niveles considerados normales (33-63 mg/dL) tanto de colesterol como de colesterol HDL (León *et al.*, 2011), se observan niveles más bajos que los mostrados por los grupos de ratas nomoglucémicas (Figura 14b). Una disminución más drástica de colesterol y colesterol HDL se han reportado cuando se administran extractos de frutos de *C. baccatum* a ratas Wistar, pero con una dosis más alta (50 mg/Kg) (Jhinés, 2015).

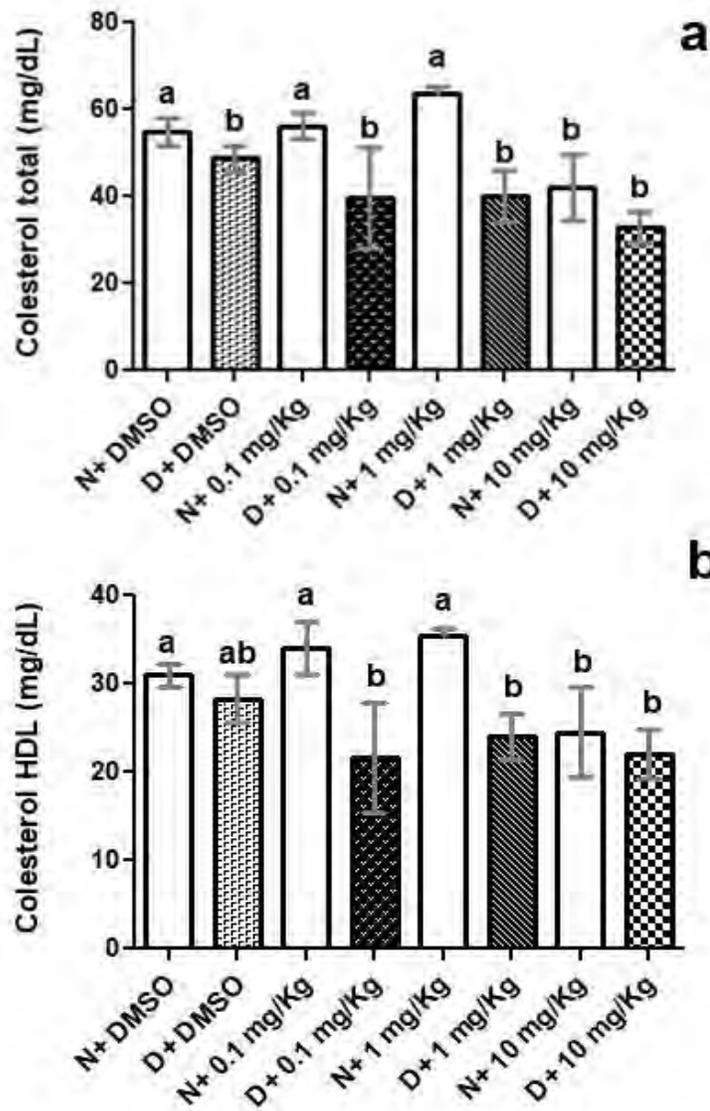


Figura 14. Concentración de colesterol total (a) y colesterol HDL (b) (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Concentración de lípidos totales

Gran parte del interés en el estudio del aumento de los lípidos totales se debe a la conexión entre hiperlipidemia y arteriosclerosis, diabetes y enfermedad cardíaca (Pérez *et al.*, 2004; Soler *et al.*, 2012), por lo que, en esta investigación, los niveles de lípidos fueron determinados. Con la administración del extracto metanólico de

chile perón, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de lípidos totales en las ratas normoglucémicas, pero se presentó una tendencia a disminuir con la dosis de 10 mg/Kg, con valores promedio de 230 mg/dL. En ratas no tratadas con el extracto (DMSO 0.1%) hasta 185.5 mg/dL en las tratadas con 10 mg/kg del extracto (Figura 15).

Sin embargo, en las ratas diabéticas, la concentración de lípidos totales disminuyó con las tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg), con valores de 180, 150 y 137 mg/dL, respectivamente, que presentaron diferencias significativas con el grupo de ratas diabéticas tratadas con el vehículo (DMSO 0.1%) que mostraron hasta 309.6 mg/dL (Figura 15). El extracto en la dosis de 10 mg/Kg ejerció un efecto hipolipidémico, disminuyendo hasta 2.26 veces los niveles de lípidos totales, respecto al control diabético.

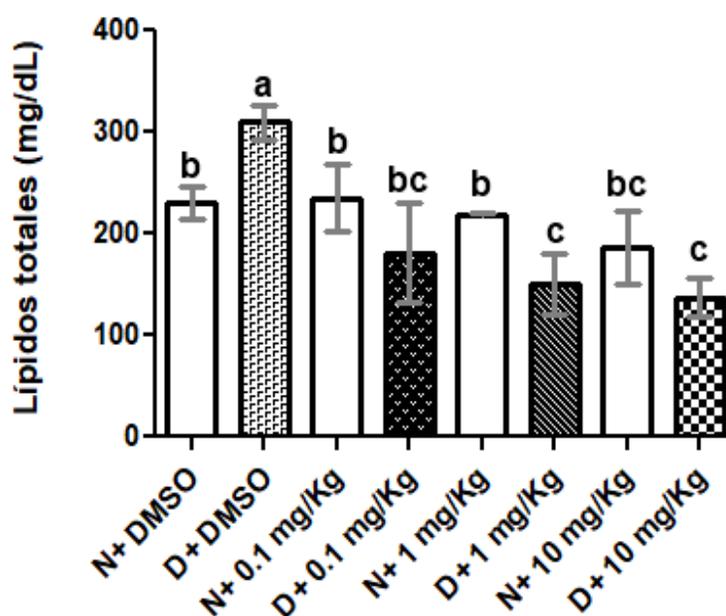


Figura 15. Concentración de lípidos totales (mg/dL) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

De manera general, estos resultados son similares a los reportados con la administración del extracto de acetato de etilo de frutos de *Capsicum annuum* (300 mg/Kg) que mostraron un efecto hipolipidémico en ratas diabéticas macho Sprague-Dawley (Mohammed, 2017). Se ha demostrado por medio de cromatografía de masas que metabolitos como el eugenol, el fitol, el kauranol, la dihidrocapsaicina y la

capsaicina disminuyen los parámetros de perfil lipídico en ratas diabéticas (Marquez-Ibarra *et al.*, 2016; Mohammed *et al.*, 2017). Un aspecto interesante es que en la presente investigación, el efecto se observó con una dosis más baja del extracto (10 mg/Kg) en comparación al utilizado de *Capsicum annum*.

Conclusiones

El extracto metanólico de chile perón inmaduro del genotipo “Amarillo” no presentó desórdenes metabólicos extremos en las ratas normoglucémicas, manteniendo en óptimos niveles, los valores de glucosa y peso corporal, con la administración durante 60 días.

Este extracto a una dosis de 10 mg/Kg fue responsable de una disminución drástica en los niveles de glucosa en las ratas diabéticas, de hasta un 177% (115 mg/dL), permitiendo una ligera ganancia en el peso corporal. Además, en este grupo de ratas, a los 60 días de tratamiento, se observó una disminución en los niveles de ácido úrico, creatinina, triacilglicéridos y lípidos totales, y una tendencia a bajar los niveles de colesterol y colesterol-HDL.

Lo anterior, es indicativo de que este extracto administrado a una dosis de 10 mg/Kg a ratas diabéticas, tiene un efecto hipoglucémico, hipotrigliceridémico e hipolipidémico, además de un efecto protector de daño renal.

Referencias

- Abdel, M.M., Rahman S.N y Rashad A.M. 2004. Hypoglycemic and hypocholesterolemia effects of intragastric administration of dried red chili pepper (*Capsicum annum*) in alloxan-induced diabetic male albino rats fed with high-fat-diet. *Journal of Food and Nutrition*, 2(11):850-856.
- ALAD. 2000. Asociación Latino Americana de Diabetes. 1-80 p.
- Arribas, M.M.A. 2016. Efectos del cacao sobre el metabolismo de la glucosa. *Diabetes*, 40:1-80.
- Brownlee, M. 2005. The pathology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6):1615-1625.
- Carrillo-Corona.A., Saavedra-Molina A., Manzo-Ávalos S., Ríos-Chávez P., Martínez Flores H.E, Hernández-García A. y Salgado-Garciglia R. 2018. Relación del contenido de compuestos bioactivos con la capacidad antioxidante *in vitro* del chile perón. 3er Congreso Internacional de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos. Mazatlán, Sinaloa.
- Carvajal, C.C. 2016. El ácido úrico: de la gota y otros males. *Medicina Legal de Costa Rica*, 33(1):1-12.
- Castro, C.L., Tuyub-C. J., Moo M.A., Vázquez F.F y Miranda-Ham M. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, 24:1-6.
- Cordero, H.I. 2015. Mecanismos de acción de los flavanoles del cacao en las células hepáticas durante la resistencia a la insulina y la diabetes: estudio en cultivos

- celulares y en animales de experimentación. Tesis de Doctorado en Ciencias, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. 225 p.
- Dougnon, T.J y Gbeassor M. 2016. Evaluation of the effects of the powder of *Capsicum frutescens* on glycemia in growing rabbits. *Veterinary World*, 9(3):281-286.
- ENSANUT. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. 151 p.
- Earnest, E.O., Lawrence E.O., Franklin I. y Daniel O. 2013. The roles of *Capsicum* in diabetes mellitus. *Journal Pharmacology and Toxicology Research*, 6(1):22-27.
- Gaber, K., Singhal U y Daowd O. 2013. Hypoglycemic and hypolipidaemic effects of some common plants extract in Type 2 diabetic patients at Eldabba area (North Sudan). *Physiology and Biochemistry*, 8(6):38-43.
- Gallego, M.C. y Ferreira A.J. 2015. Plantas medicinales en el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2. *Farmacéuticos*, 7(4):27-34.
- García, L.C., Pérez H.E.B., Martínez R.A. y Castro B.F. 2009. Uso de plantas medicinales y suplementos diabéticos para el control glucémico de la diabetes. *Revista Chapingo*, (8):229-239.
- González G.A., Madariaga G.Y., Ruiz H.D., Caraballo F.D. y Hernández B.M. 2013. Enzimas antioxidantes en la hiperglicemia e hiperlipidemia inducida por sacarosa en ratas wistar. *Revista Médica Electrónica*, 35(2): 95-103.
- Gushiken, F.L., Beserra P.F., Rozza L.A., Bérghamo L.P., Bérghamo D.A. y Pellizzon H.C. 2016. Chemical and biological aspects of extracts from medicinal plants with antidiabetic effects. *The Review of DIABETIC Studies*, 93(2-3):1-17.
- Islam, M.S y Choi H. 2008. Dietary red chilli (*Capsicum frutescens* L.) is insulinotropic rather than hypoglycemic in type 2 diabetes model of rats. *Phytotherapy Research*, 22(8):1025-1029.
- Janssens, P.L, Hursel R y Westerterp-Plantenga M.S. 2014. Capsaicin increases sensation of fullness in energy balance and decreases desire to eat after dinner in negative energy balance. *Appetite*, 77:44-49.
- Jhinés, S.M.L. 2015. Efecto hipocolesterolémico de extracto hidroalcohólico de *Capsicum baccatum* en un modelo experimental de hipercolesterolemia en ratas. Tesis Profesional de Médico Cirujano, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 91p.
- Kamon, C., Supeecha W. y Weerapan K. 2009. Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in *Capsicum frutescens* on decreasing plasma glucose level. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 92(1):1-7.
- Komindir, S. 2015. Effect of chili pepper (*Capsicum frutescens*) ingestion on plasma glucose response and metabolic rate in Thai women. *Journal of the Medical Association of Thailand*, (86):2 855-860.
- León, G.A.C., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B.O., Arteaga M.E., Bada A.M., González Y. y Mancebo A. 2011. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB. *Revista electrónica de Veterinaria*, 12(11):1-10.
- Ludy, M.J. y Mattes R.D. 2011. The effects of hedonically acceptable red pepper doses on thermogenesis and appetite. *Physiology Behavior*, 102:251-258.
- Maekawa, R., Ogata H., Murase M., Harada N., Suzuki K., Joo E., Sankoda A., Iida A., Izumoto T., Tsunekawa S., Hamada Y., Oiso Y., Inagaki N., Arima H.,

- Hayashi Y. y Seino Y. 2018. Glucose dependent insulinotropic polypeptide is required for moderate high fat diet, but not high carbohydrate diet-induced weight gain. *Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 314(6):572-583.
- Martínez-Mora, J.A. 2017. Relación de la actividad hipoglucémica y la capacidad antioxidante de extractos de las hojas de *Justicia spicigera* en ratas diabéticas. Tesis de Maestría en Ciencias, Inst. de Inv. Químico Biológicas, Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 110 p.
- Martínez, G.M y Sánchez D.M.R. 2013. Importancia de algunas frutas, verduras y hortalizas en la prevención de la diabetes mellitus tipo II. *Revista Iberoamericana para la Investigación y el Desarrollo Educativo*, 3(6):17.
- Marquez-Ibarra A, Huerta M., Villalpando-Hernández S., Ríos-Silva M., Díaz Reval M.I., Cruzblanca H., Mancilla E. y Trujillo X. 2016. The effects of dietary iron and capsaicin on hemoglobin, blood glucose, insulin tolerance, cholesterol, and triglycerides, in healthy and diabetic wistar rats. *PLOS ONE*, (11):1-16.
- Mateos-Santa, Cruz, N. y Zacarias C.R. 2002. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Revista del Hospital General "Dr. Manuel Gea. González"*, 5(1-2):33-41.
- Mohammed, A., Koorbanally N.A. y Islam S.MD. 2017. Anti-diabetic effect of *Capsicum annum* L. fruit acetone fraction in a type 2 diabetes model of rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 76(6):1767- 1779.
- Moradabadi, L., Kouhsari M.S. y Sani F.M. 2013. Hypoglycemic effects of three medicinal plants in experimental diabetes: inhibition of rat intestinal α -glucosidase and enhanced pancreatic insulin and cardiac *Glut-4* mRNAs expression. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (3):387-397.
- Mousavi, L y Asmawi Z.M. 2016. Hypoglycemic study of *Ocimum tenuiflorum* L. leaves extract in normal and streptozotocin- induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (6):12 1029-1036.
- NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-062-ZOO 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Patel, D.K., Prasad S.K., Kumar R. y Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedic*, 2(4):320-330.
- Pérez, G.M., González H.V.A., Mendoza C.M.C. y Peña V.C. 2004. Physiological characterization of manzano hot pepper (*Capsicum pubescens* R & P) landraces. *Revista HortSciencie*, 129(1):88-92.
- Rojas, M.R., Basto, A.A., Aguilar S.C., Zarate M.E., Villapaldo S y Barrientos-G.T. 2018. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud Pública de México*, 60:1-9.
- Saavedra, F., Delgado A. y Hernandez F.L. 2007. Especies vegetales con utilidad en el tratamiento de la diabetes. 2º. Congreso Nacional de Química Médica, No.3, 4p.
- Soler, T.W., Rodríguez C., Angarita V.B y Corredor P.C. 2012. Efecto de la dieta sobre lípidos de la sangre y el hígado en ratas. *Salud Uninorte*, 3(1):19-29.
- Sze, N., Mohd S.M., Fatariah Z., Wan R.W y Wan A.N. 2015. Hypoglycemic and antidiabetic effect of *Pleurotus sajor-caju* aqueous extract in normal and

- streptozotocin-induced diabetic rats. *BioMed. Research International*, 2015:1-8.
- Varghese, S., Kubatka P., Rodrigo L., Gazdikova K., Caprnda M., Fedotova J., Zulli A., Kruzliak P. y Büsselberg D. 2016. Chili pepper as a body weight-loss food. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 68(4):392-401.
- Young-In, K., Apostolidis E. y Shetty K. 2006. Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*, 31:370-385.
- Yuan, L.J., Qin Y., Wang L., Zeng Y., Chang H., Wang J., Wang B., Wan J., Chen S.H., Zhang Y., Zhu J.D., Zhou Y. y Mi M.T. 2015. Capsaicin-containing chili improved postprandial hyperglycemia, hyperinsulinemia, and fasting lipid disorders in women with gestational diabetes mellitus and lowered the incidence of large-for-gestational-age newborns. *Clinical Nutrition*, 35:388–393.
- Zárate, A., Islas S. y Saucedo R. 2014. Eficacia y efectos adversos de los antidiabéticos orales. *Gaceta Médica de México*, 150:5-7.

VI.3. Efecto antioxidante del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón (*Capsicum pubescens*) genotipo “Amarillo” sobre el contenido de marcadores de estrés oxidante en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas

Resumen

En la presente investigación se determinó la actividad antioxidante y marcadores de estrés oxidante *in vivo* en mitocondrias de riñones en ratas diabéticas inducidas con STZ y normoglucémicas, tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo “Amarillo” en tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg) y con DMSO 0.1% (control). Después de 60 días de la administración de 100 μ L del extracto, se evaluó la actividad del superóxido dismutasa (SOD2) y los niveles de glutatión total (GSht), glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH), relación GSH/GSSG, niveles de lipoperoxidación y carbonilación de proteínas, en las mitocondrias aisladas de riñón de los diferentes grupos de ratas. En ratas normoglucémicas, la administración del extracto en una dosis de 10 mg/Kg produjo un aumento de los niveles de GSht, GSH y GSH/GSSG, con 3.56, 2.26 y 1.77 mmoles/mg de proteína, respectivamente; con esta misma dosis, en ratas diabéticas se observó un efecto similar, aumentando los niveles de glutatión (GSht, GSH y GSH/GSSG) con 2.94, 1.45 y 1.0 mmoles/mg de proteína, respectivamente. La administración del extracto metanólico de los frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo” presentó una tendencia a aumentar los niveles de GSH, dependiendo de la concentración. El contenido de GSSG aumentó en las ratas diabéticas tratadas con DMSO 1%, alcanzando 2.2 mmoles/mg de proteína, mientras que en ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg de extracto, éste disminuyó hasta en un 32.7% (1.48 mmoles/mg de proteína). Los niveles más altos de lipoperoxidación y de carbonilación de proteínas fueron presentados por los grupos de ratas diabéticas tratadas con DMSO 1%, con 0.74 nmoles/mg de proteína y 8.64 nmoles/mg de proteína, respectivamente. Con la administración del extracto no se mostraron cambios significativos en los niveles de lipoperoxidación, pero con una tendencia a disminuir, ya que se obtuvieron valores de 0.57, 0.52 y 0.51 nmoles/mg de proteína, con las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/Kg, respectivamente. Así mismo, en los grupos de ratas tratadas con el extracto, tanto normoglucémicas como diabéticas, la carbonilación de proteínas disminuyó con las tres dosis. En ratas diabéticas se obtuvo una disminución del 69.2% de carbonilación de proteínas (2.66 nmoles/mg de proteína) con la dosis de 10 mg/Kg respecto a las diabéticas tratadas con DMSO 1% (8.64 nmoles/mg de proteína). Con la determinación de la actividad de SOD2, no se encontraron cambios dependientes de la dosis del extracto tanto en ratas normoglucémicas como en diabéticas. Estos resultados indican que la administración del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo “Amarillo”, aumentó la actividad antioxidante tanto en ratas normoglucémicas como en diabéticas, principalmente en la dosis de 10 mg/Kg, sin observar efectos pro-oxidantes durante los 60 días de tratamiento.

Palabras clave: Carbonilación de proteínas, glutatión, lipoperoxidación, superóxido dismutasa.

Abstract

In the present investigation, antioxidant activity and markers of oxidative stress *in vivo* were determined in mitochondria of kidney in diabetic induced with STZ and normoglycemic rats, treated with the methanol extract of unripe fruits of chili peron "Yellow" genotype in three dose (0.1, 1 and 10 mg/Kg) and DMSO 0.1% used as vehicle solution (control). After 60 days of the administration of 100 μ L of the extract, the superoxide dismutase (SOD2) activity and the levels of total glutathione (GSht), oxidized glutathione (GSSG), reduced glutathione (GSH), GSH/GSSG ratio, lipoperoxidation and protein carbonylation in mitochondria isolated from kidney of different groups of rats were evaluated. In normoglycemic rats, the extract administration at a dose of 10 mg/Kg resulted in increased levels of GSht, GSH and GSH/GSSG, with 3.56, 2.26, and 1.77 mmol/mg protein, respectively; with this same dose, a similar effect was observed in diabetic rats by increasing the levels (GSht, GSH and GSH/GSSG) glutathione with 2.94, 1.45 and 1.0 mmol/mg protein, respectively. The administration of the methanolic extract of unripe fruits of chili peron "Yellow" genotype presented a tendency to increase the levels of GSH, depending on the concentration. GSSG content increased in diabetic rats treated with DMSO 1%, reaching 2.2 mmol/mg protein, while in diabetic rats treated with 10 mg/Kg of extract, this decreased to a 32.7% (1.48 mmol/mg protein). The highest levels of lipoperoxidación and protein carbonylation were presented by groups of diabetic rats treated with DMSO 1%, with 0.74 nmol/mg protein and 8.64 nmoles/mg protein, respectively. With the administration of the extract showed no significant changes in the levels of lipoperoxidation, but with a tendency to decrease, as obtained values of 0.57 0.52 and 0.51 nmol/mg of protein, with doses of 0.1, 1 and 10 mg/Kg, respectively. Likewise, in rats treated with the extract, both normoglycemic and diabetic groups, the protein carbonylation decreased with the three doses. Diabetic rats showed a decrease of the 69.2% of protein carbonylation (2.66 nmol/mg protein) with a dose of 10 mg/Kg respect to the diabetic rats treated with DMSO 0.1% (8.64 nmol/mg protein). With the determination of SOD2 activity, determination of extract dose-dependent changes was not found in normoglycemic and diabetic rats. These results indicate that the administration of the methanol extract of unripe fruits of chili peron "Yellow" genotype, increased antioxidant activity in normoglycemic and diabetic rats, mainly in the dose of 10 mg/Kg, without pro-oxidant effects seen during the 60 days of treatment.

Keywords: Glutathione, superoxide dismutase, lipid peroxidation, protein carbonylation

Introducción

Actualmente, se sabe que la diabetes mellitus está asociada con las reacciones oxidativas a partir de especies reactivas como oxígeno, hierro, cobre y nitrógeno, moléculas que juegan una función importante en la patogénesis y en las complicaciones de esta enfermedad, que involucran mecanismos de autooxidación de la glucosa, formación de productos avanzados de glucosilación, activación de la

vía de los polioles, inactivación de las enzimas antioxidantes, activación de la proteína C cinasa (PKC) y disminución del transportador de glucosa GLUT-4, así como de prostaglandinas (Ramos *et al.*, 2006). Por esta razón, el ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidante por la producción de especies reactivas principalmente en los complejos I, II y III de la cadena respiratoria de electrones (Villa-Caballero *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2003; Ibarra *et al.*, 2006).

Sin embargo, un mecanismo de defensa para prevenir o disminuir estas especies reactivas, es a partir de enzimas antioxidantes intracelulares como la superóxido dismutasa (SOD), la mitocondrial (SOD2), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT), así como diversos componentes como la bilirrubina, ácido úrico, albúmina, vitaminas A, C y E, y minerales como Se, Zn, Mn, Cu, cofactores de enzimas antioxidantes, así también como hormonas (ej. dehidroepiandrosterona), estrógenos y melatonina (Ibarra *et al.*, 2006).

Recientemente se han buscado nuevas alternativas para el tratamiento de la diabetes, que ofrezcan menos efectos secundarios y sean disponibles para un número mayor de personas, a partir de plantas medicinales y comestibles, de las que una amplia diversidad ha sido estudiada, por tener un efecto hipoglucémico, relacionado con sus propiedades antioxidantes. Entre éstas, los extractos de frutos de *Capsicum* (chiles) han sido evaluados y se han demostrado algunas propiedades medicinales, como chile pimiento (*Capsicum annuum*), chile ají (*C. baccatum*), chile habanero (*C. chinense*) y chile Tabasco (*C. frutescens*). Estas propiedades han sido atribuidas al contenido de compuestos activos como el ácido ascórbico, ácidos fenólicos, capsaicina, carotenoides, flavonoides y α -tocoferol, entre otros (Magied *et al.* 2004; Kwon *et al.*, 2006; Islam y Choi, 2008; Patel *et al.*, 2012; Earnest *et al.*, 2013; Castro-Concha *et al.*, 2014; Maekawa *et al.*, 2018).

En previas investigaciones se determinó que el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón (*Capsicum pubescens*) del genotipo "Amarillo", mostró una alta actividad antioxidante, determinada por los métodos ABTS, DPPH y TAC, lo que se relacionó directamente con un alto contenido de compuestos de ácidos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico (Capítulo I). Este extracto fue administrado por 60 días a ratas normoglucémicas y con diabetes experimental, observando un efecto hipoglucémico e hipotriglicéridémico con la dosis de 10 mg/Kg (Capítulo II).

Con el propósito de determinar la actividad antioxidante de este extracto, en este estudio se evaluaron marcadores de estrés oxidante en mitocondrias de riñones de ratas normoglucémicas y diabéticas tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo amarillo en tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg), determinando la concentración de GSht, GSSG, GSH, relación GSH/GSSG, actividad de SOD2; así como los niveles de lipoperoxidación y de carbonilación de proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de mitocondrias de riñón

Los riñones fueron obtenidos de ratas Wistar machos, de los grupos de ratas normoglucémicas y grupos de ratas diabéticas (Cuadro 1, Capítulo II), a las que se les administraron 100 μ L del extracto metanólico de frutos de chile perón genotipo “Amarillo” disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) al 0.1 %, en tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/Kg de peso corporal, durante 60 días. La diabetes experimental en ratas fue inducida con STZ a 40 mg/kg de peso corporal, vía intraperitoneal disuelta en buffer de citrato (pH 4.4) (Capítulo II). Las ratas fueron sacrificadas por decapitación en guillotina con 12 h de preva privación de alimento, siguiendo las especificaciones de la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999 y la aprobación del Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para el uso y cuidado de animales de laboratorio, actualmente vigente.

Los riñones extraídos se colocaron en un recipiente con medio 1 (Manitol 200 mM, Sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM y EGTA 1 mM) sobre hielo, éstos fueron triturados hasta obtener pequeños fragmentos, los que se pasaron a un tubo con 20 mL de medio 1, homogeneizando tres veces en un tubo Potter-Elvehjem con un vástago de teflón, colocando el homogenado en dos tubos para centrifugar a 2,200 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a dos tubos previamente fríos y se sometieron a centrifugación a 7,500 rpm durante 10 min a 4°C. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se suspendió el precipitado en 1 mL de medio 2 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM, pH 7.4). Posteriormente, se agregaron 80 μ L de albúmina al 0.2 % por mL, para después aforar a $\frac{3}{4}$ partes del volumen con medio 2 y se centrifugó a 9,000 rpm por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se suspendió en 1 mL de medio 2. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en un congelador a -80°C hasta su análisis (Saavedra-Molina y Devlin, 1997).

Determinación de la concentración de proteína mitocondrial

La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret, empleando un espectrofotómetro a 540 nm (Gornall *et al.*, 1949), adicionando 790 mL de agua desionizada, 200 μ L de DOC al 1% (desoxicolato de sodio), 10 mL de muestra y 2 mL del reactivo de Biuret (6 g Tartrato de sodio, 1.5 g CuSO_4 y 30 g NaOH) de. Posteriormente, se realizaron los cálculos correspondientes para ajustar el volumen de las muestras una concentración final de 0.3 mg/mL de proteína.

Determinación de glutatión total (GSht), oxidado (GSSG), reducido (GSH) y GSH/GSSG

Para la determinación del contenido total de GHSt se usaron las muestras de mitocondrias de riñón a 0.3 mg/mL que fueron desproteinizadas, empleando 100 μ L de ácido sulfosalicílico al 5% durante 20 min a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 5 min. Después se preparó la “mezcla de trabajo” adicionando 400 μ L de buffer de fosfatos, 250 μ L de DTNB, 90 μ L de muestra y 23 μ L de GSH, en el respectivo orden mencionado y dejando incubar durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 50 μ L de NADPH, las muestras fueron leídas en un

espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550 a 412 nm durante 5 min con 1 min de intervalo por cada muestra. Para la determinación de GSSG, se adicionó previamente 1 μ L de 4-vinilpiridina dejando incubar durante 1 h. Finalmente, se empleó la “mezcla de trabajo” pasando la incubación y para la determinación de GSH, fue por cálculo aritmético (GSH-GSSG) (Rahman *et al.*, 2006).

Determinación de la actividad de superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2)

La actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial o SOD2, fue determinada empleando un kit comercial (19160 Sigma-Aldrich), que permite determinar la actividad de la SOD2 mediante colorimetría, usando una sal de tetrazolio Dojindo que es altamente soluble en agua, WST-1 (sal monosódica (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio) que produce un color formazán, cuando ésta es reducida por el anión superóxido. Esta reacción es inhibida por la SOD2, que dismuta el anión superóxido evitando su reacción con la sal. La concentración de proteína empleada fue de 0.3 mg/mL. Los valores de absorbancia fueron tomados a 440 nm, empleando un lector de microplacas iMark Microplate Absorbance Reader de BIO-RAD.

Determinación de lipoperoxidación

Los niveles de lipoperoxidación se determinaron mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico (Ohkowa *et al.*, 1979). Para corregir la interferencia con azúcares libres en el buffer de aislamiento, las mitocondrias se lavaron dos veces con buffer de fosfatos salino (pH 7.4 PBS) y agregando 50 μ L de muestra y fueron llevadas a centrifugación a 15, 000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se desechó el PBS a cada tubo para agregar 70 μ L de PBS y se les determinó el contenido de proteína. Para 0.3 mg/mL de proteína mitocondrial. A continuación, se adicionaron 2 mL de solución reactiva de ácido tricloroacético (0.25 M HCl y ácido tiobarbitúrico 0.375%), incubando 30 min a 90°C en baño maría. Después, las muestras fueron atemperadas y centrifugadas a 7,500 rpm durante 5 min. Para el blanco se preparó BHT (3%), agregando 1 mL de PBS, 10 μ L de BHT y 2 mL de ácido tricloroacético. Se preparó para prevenir la formación no específica de cromóforos. Finalmente, se obtuvieron las absorbancias en un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550 a 532 nm, determinando los niveles de lipoperoxidación por la producción de TBARS (de las siglas en inglés, Thiobarbituric Acid Reactive Substances) con la fórmula siguiente:

$$TBARS = ((Muestra 1 + Muestra 2)) / (\epsilon = 0.000156) * (mg/proteína)$$

Donde: Muestra 1. Primera absorbancia; Muestra 2. Segunda absorbancia; ϵ =Coeficiente de extinción molar.

Determinación de carbonilación de proteínas

Se suspendieron 0.3 mg/mL de proteína mitocondrial en PBS (pH 7.4) y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Al precipitado se le adicionó 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) en 2 M de HCl, y se incubó durante 10 min.

Posteriormente, se lavó 3 veces con acetato de etilo/etanol (1:1), después se resuspendió en SDS al 10% (dodecilsulfato sódico) y se registró la densidad óptica a 360 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV/Vis UV-2550. Las muestras fueron derivatizadas con 2 M de HCl. Se utilizó el coeficiente de extinción molar (ϵ) 0.022 mM/cm para calcular la concentración de proteínas carboniladas (Wehr y Levine, 2012).

$$\text{Carbonilación} = ((\text{Muestra 1} + \text{Muestra 2}) - (\text{Muestra deriv.})) / (\epsilon = 0.022) * \\ (\text{mg/proteína})$$

Donde: Muestra 1. Primera absorbancia; Muestra 2. Segunda absorbancia; Muestra deriv. Reprivatización; ϵ =Coeficiente extinción molar

Análisis estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo con una $n=5$, los resultados se presentan como promedio (media) más la desviación estándar, analizados por ANOVA ($p < 0.05$) con una diferencia de medias por Tukey-Kramer, empleando el software JMP-8.

RESULTADOS

Contenido de glutatión total (GSht)

La mayor concentración de GSht, fue presente en ratas normoglucémicas tratadas con la dosis de 10 mg/Kg del extracto (3.56 mmoles/mg de proteína), teniendo diferencias significativas en ratas normoglucémicas tratadas con las dosis de 0.1 y 1 mg/Kg (2.31 y 2.6 mmoles/mg de proteína) respectivamente, y sin mostrar diferencias significativas en ratas tratadas con DMSO (3.1 mmoles/mg de proteína).

En las ratas del grupo diabético, los niveles más altos de GSht se observaron en ratas diabéticas tratadas con la dosis de 10 mg/Kg (2.94 mmoles/mg de proteína) mostrando diferencias significativas en ratas diabéticas tratadas con DMSO y con las dosis de 0.1 y 1 mg/Kg, obteniendo (2.55, 2.30 y 2.50 mmoles/mg de proteína, respectivamente). Estos valores fueron similares con los presentados por las ratas normoglucémicas tratadas con DMSO 0.1% (Figura 16).

Valores similares de GSht han sido también observados en ratas diabéticas tratadas con otros extractos vegetales, pero con la administración de dosis superiores como con el extracto metanólico de *Swietenia mahagoni* (25 mg/Kg), *Cucurbita ficifolia* (200 mg/Kg), *Phyllanthus niruri* (200 mg/Kg) y el extracto acetato de etilo de *Justicia spicigera* (100 mg/Kg) (Panda *et al.*, 2010; Cisneros *et al.*, 2011; Díaz-Flores *et al.*, 2012; Martínez-Mora, 2017; Jamshidi *et al.*, 2018). Ortiz (2012) y Lash (2015) mencionan que los factores que intervienen en el aumento o disminución de glutatión mitocondrial (GSHmt) en ratas diabéticas, principalmente son la dosis del extracto, el tiempo de tratamiento y los transportadores de membrana OGC (2-oxoglutarato) y DIC (dicarboxilato).

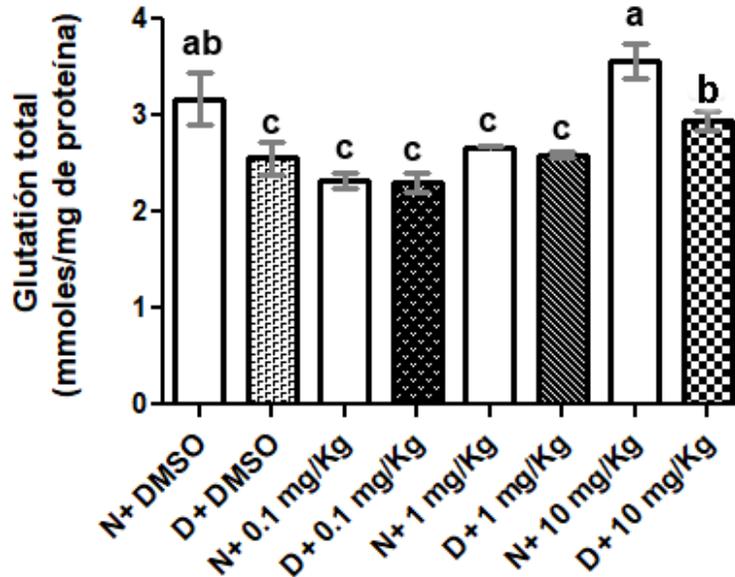


Figura 16. Concentración de glutatión total (GSht) (mmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Contenido de glutatión oxidado (GSSG)

La mayor concentración de GSSG, fue en el grupo diabético tratado con DMSO (2.20 mmoles/mg de proteína) mostrando únicamente diferencia significativa con los valores mostrados de las ratas diabéticas tratadas con la dosis de 10 mg/Kg (1.48 mmoles/mg de proteína). Sin embargo, en las ratas normoglucémicas tratadas con DMSO, se obtuvieron 1.45 mmoles/mg de proteína, sin mostrar diferencias significativas entre las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/Kg con 1.50, 1.64 y 1.29 mmoles/mg de proteína, respectivamente. Un aspecto interesante, fue que las ratas diabéticas tratadas con el extracto, disminuyeron los niveles de GSSG, obteniendo resultados similares entre el grupo normoglucémico. Así mismo, las ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg, mostraron valores similares entre el grupo normoglucémico tratado con DMSO 0.1% (Figura 17).

La disminución del GSSG provocado por la administración del extracto metanólico de frutos de chile perón del genotipo “Amarillo”, también ha sido observado, con resultados similares, por el extracto etanólico de *Justicia spicigera* (100 mg/Kg) en mitocondrias de hígado y de riñones de ratas diabéticas (Martínez-Mora, 2017; Murillo, 2017), así como con el extracto acuoso de *Cucurbita ficifolia* (200 mg/Kg), en mitocondrias de corazón e hígado de ratas diabéticas (Díaz-Flores *et al.*, 2012).

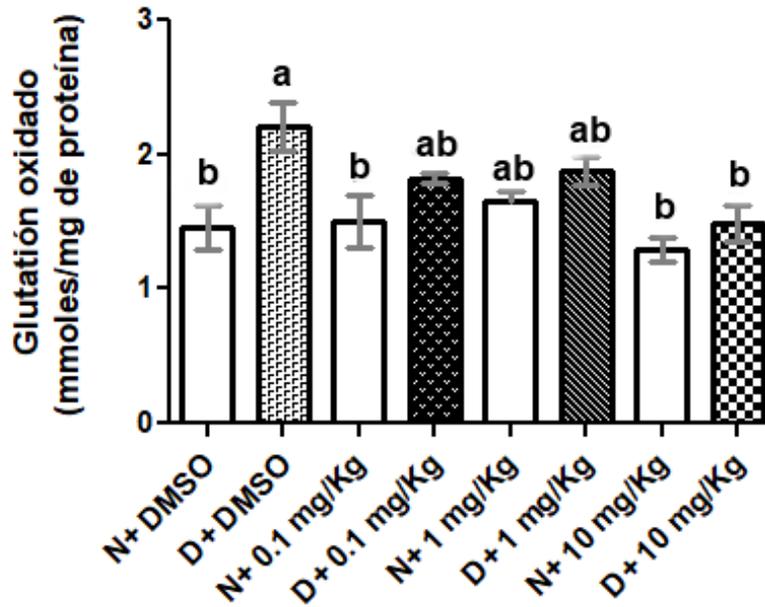


Figura 17. Concentración de glutatión oxidado (GSSG) (mmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Estos valores indican que en ratas diabéticas tratadas con DMSO (0.1%), presentan un aumento de niveles de disulfuro de de glutatión (GSSG), desbalance redox, disminución de transducción de señales y activaciones de genes que descartan principalmente el activador de proteína (AP-1), el factor nuclear k-B (NF k-B) y P-53. Estos factores, disminuyen el contenido de GSH a nivel mitocondrial que conlleva finalmente a la apoptosis celular (Denzoin-Vulcano *et al.*, 2013).

El aumento del estrés oxidante está asociado, entre otros factores, con los mecanismos de glicoxidación, formación de productos avanzados de glucosilación, activación de la vía de los polioles, disminución de enzimas antioxidantes del metabolismo de ascorbato y con un descontrol del metabolismo de óxido nítrico y de prostaglandinas, que son responsables de aumentar las especies reactivas como oxígeno, hierro, cobre y nitrógeno (Villa-Caballero *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2003; Ibarra *et al.*, 2006; Díaz-Acosta y Membrillo-Hernandez, 2006; Lash, 2015).

Contenido de glutatión reducido (GSH)

Aunque la mayor concentración de GSH fue observada en ratas normoglucémicas tratadas con la dosis de 10 mg/Kg (2.26 mmoles/mg de proteína), un valor de 1.45 mmoles/mg de proteína fue presentando por el grupo de ratas diabéticas, igual al

mostrado por el grupo de ratas normoglucémicas no tratadas con el extracto. La administración del extracto metanólico de los frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo” presentó una tendencia a aumentar los niveles de GSH, dependiendo de la concentración (Figura 18).

Los niveles más bajos de GSH fueron presentes en ratas diabéticas tratadas con DMSO 0.1% (0.35 mmoles/mg de proteína) mostrando únicamente diferencia significativa con la dosis de 10 mg/Kg (1.45 mmoles/mg de proteína) (Figura 18).

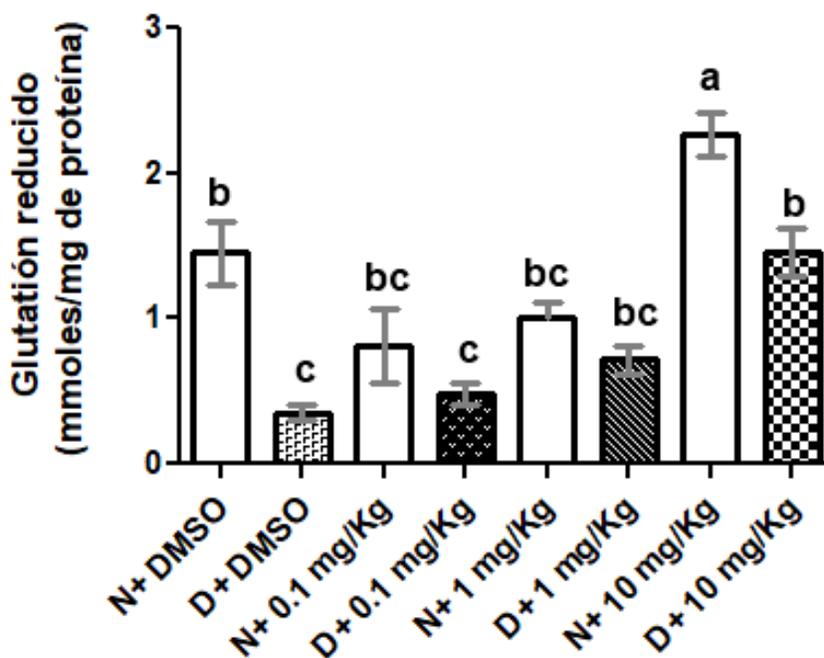


Figura 18. Concentración de glutati6n reducido (GSH) (mmoles/mg de prote6na) en ratas normogluc6micas (N) y diab6ticas (D), tratadas con el extracto metan6lico de frutos inmaduros de chile per6n “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 d6as del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Estos valores son similares a los observados con la administraci6n de limoneno, extracto de *Eryngium carlinae* (30 mg/Kg), quercetina m6s resveratrol (10 y 30 mg/Kg, respectivamente) en ratas diab6ticas, ya que se demostr6 un incremento en el contenido de GSH y alcanzando valores iguales o similares con respecto a ratas controles. No obstante, un aspecto interesante fue que estas dosis fueron superiores

en comparación a la utilizada con el extracto metanólico de chile perón (10 mg/Kg) (Bacali *et al.*, 2017; Garcia-Cerrillo *et al.*, 2018; Yang y Kang, 2018).

De manera general, estos valores indican que el aumento en el contenido de GSH en ratas diabéticas tratadas con una dosis de 10 mg/Kg del extracto metanólico de chile perón, mejora sus funciones biológicas como la detoxificación de xenobióticos, mantenimiento en el balance redox intracelular, transporte y almacenamiento de cisteína (vía de disminución de radicales libres), regulación del crecimiento y muerte celular. No obstante, al verse comprometido y/o disminuido el GSH, se asocia al envejecimiento celular, aumento de radicales libres y de especies reactivas que su vez dañan directamente carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN (Denzoin-Vulcano *et al.*, 2013).

Relación del contenido de GSH/GSSG

Los valores de la relación de GSH/GSSG son similares a lo observado con los niveles presentados de GSH, de igual manera, se observó una mayor relación en ratas normoglucémicas tratadas con 10 mg/Kg (1.77 mmoles/mg de proteína), con diferencias significativas con todos los otros grupos de ratas (Figura 19). Las ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg, mostraron una relación de GSH/GSSG de 1.04 mmoles/mg de proteína, valor similar al de las ratas normoglucémicas sin administración del extracto (Figura 19).

De manera general, el mayor nivel de GSH/GSSG fue en ratas normoglucémicas administradas con la dosis de 10 mg/Kg, ya que muestran un patrón similar en GSHt y GSH (Figuras 16 y 18). Esta relación (GSH/GSSG) indica estrés oxidante y el resultado ejercido por la administración de 10 mg/Kg tanto en ratas normoglucémicas como diabéticas, disminuye dicho estrés. Esto sugiere una disminución de estrés oxidante en macromoléculas orgánicas como carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN, así como un aumento en la actividad de GSH y una homeostasis en reacciones de óxido reducción (Hernández *et al.*, 2011; Salinas *et al.*, 2013)

Actualmente se ha desmotrado que la relación de GSH/GSSG, está asociada al balance de óxido reducción, expresión de enzimas, genes y factores de apoptosis celular. No obstante, para pacientes diabéticos permite una mejor captación de glucosa en sangre, mejorando la sensibilidad de la insulina para el transporte de glucosa, sin afectar el metabolismo de la glucosa oxidada (Pailoso *et al.*, 1992; De Mattia *et al.*, 1998). También se ha demostrado que la administración de GSH o la estimulación de GSH, es responsable de la captación de glucosa en sangre, disminuyendo el estado de hiperglucemia en pacientes diabéticos, debido a que el GSH podría mejorar la homeostasis de la glucosa, reduciendo las concentraciones de radicales libres intracelulares y mejorando los cambios en el estado redox de GSH. Esto a su vez, interfiere con otras vías metabólicas intracelulares como proteínas sulfidriolo, lo que depende de la relación GSH/GSSG, lo que puede ser modificado por una serie de estímulos fisiológicos. Los procesos de oxidación-reducción parecen regular varias vías intracelulares que afectan la estructura y actividad de diversas proteínas (De Mattia *et al.*, 1998).

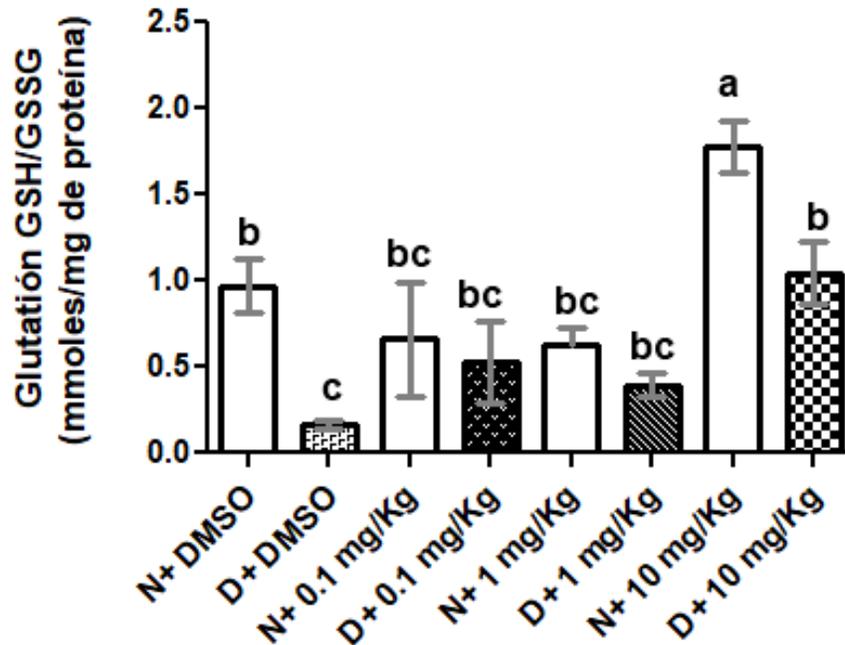


Figura 19. Relación de la concentración de GSH/GSSG (mmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Actividad de superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2)

Los valores obtenidos de actividad de la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) fueron similares en todos los grupos de ratas de la experimentación. Estos resultados indican que la actividad de esta enzima no fue alterada por la diabetes experimental y la administración del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo” no afectó dicha actividad (Figura 20).

Algunos autores han reportado un incremento en la SOD en ratas diabéticas (Ramanathan *et al.*, 1999; Gargouri *et al.*, 2017; Mayyas *et al.*, 2017), mientras que en otras investigaciones se ha demostrado una disminución de la actividad de esta enzima en ratas diabéticas (Ramanathan *et al.*, 1999; Balahoroglu *et al.*, 2008; Mora *et al.*, 2009; Schmatz *et al.*, 2012). Actualmente, se ha demostrado que el aumento o disminución de la SOD es debido a la presencia de superóxido y de hierro, que pueden regular positiva o negativamente la transcripción del gen Mn-SOD2 (Ichikawa *et al.*, 1994), el tipo de tejido u órgano (Mora, 2009), periodo de tratamiento y dosis de STZ (Ramanathan *et al.*, 1999), dosis del extracto (Schmatz *et al.*, 2012) y las isoformas Mn-SOD2 (mitocondrial), CuZn-SOD1 (citoplasma) y CuZn-SOD3 (matriz extracelular) (Asayama y Burr, 1984; Fujita *et al.*, 2009).

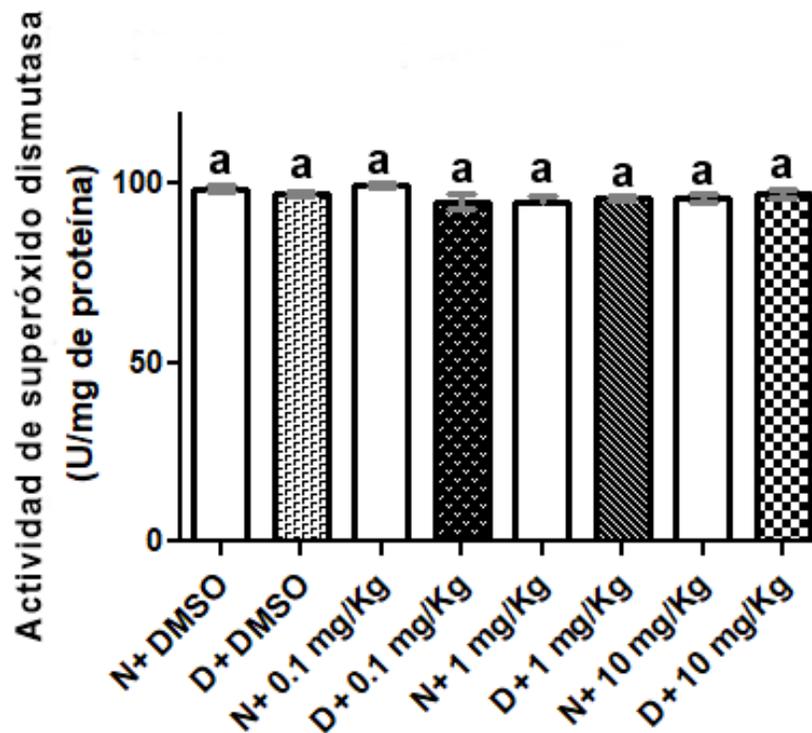


Figura 20. Actividad de superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) (U/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Estos resultados son similares, a los reportados por Fujita *et al.* (2009) en mitocondrias de riñones de ratas diabéticas (SOD2) y a lo observado al administrar dosis superiores de extracto acetato de etilo y etanólico en *Justicia spicigera* (100 mg/Kg), así como con el extracto hexánico en *Eryngium carlinae* (30 mg/Kg) y vitamina C y E (50 y 50 mg/Kg) en mitocondrias de cerebros, riñones y de ventrículo izquierdo de corazón de ratas diabéticas (Sadi *et al.*, 2012; Martínez-Mora, 2017; García-Cerrillo *et al.*, 2018).

Niveles de lipoperoxidación

El mayor nivel de lipoperoxidación, determinado por el método TBARS, se observó en ratas diabéticas tratadas con DMSO 0.1% (0.74 nmoles/mg de proteína), mostrando una diferencia significativa con los valores de todos los demás grupos de ratas evaluados. En ratas normoglucémicas, el extracto no mostró cambios en los niveles de lipoperoxidación y aunque en los grupos diabéticos con las tres dosis,

tampoco hubo diferencias significativa entre éstos, son menores a los que se presentaron en las ratas diabéticas sin extracto, disminuyendo hasta niveles de 0.57, 0.52 y 0.51 (nmoles/mg de proteína), respectivamente (Figura 21).

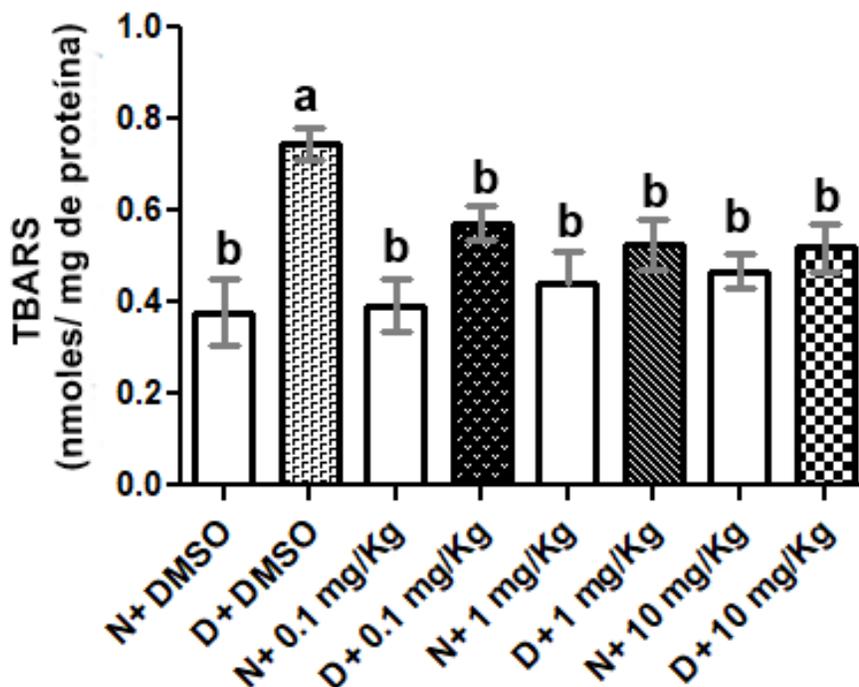


Figura 21. Niveles de lipoperoxidación (TBARS nmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60 días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Estos resultados son similares a los encontrados cuando se administró α -tocoferol (400 y 600 mg/Kg), carvacrol (25, 50 y 100 mg/Kg), quercetina más resveratrol (10 y 30 mg/Kg) y limoneno en ratas diabéticas, ya que ejercieron un efecto sobre la disminución en los niveles de lipoperoxidación dependientes de las dosis administradas (Schmatz *et al.*, 2012; Jamshidi *et al.*, 2018; Bacanli *et al.*, 2017).

Se ha reportado que una disminución en los niveles de lipoperoxidación en pacientes diabéticos tiene un efecto benéfico debido a que disminuye la oxidación de las membranas previniendo el envejecimiento celular prematuro, así como disminución en el contenido de lipoproteínas plasmáticas previniendo la oxidación de lípidos como HDL, VLDL y LDL, estos tres últimos factores, contribuyen a la génesis y

agravamiento de la aterosclerosis, un aumento de índice aterogénico y finalmente en complicaciones cardiovasculares (Hernández *et al.*, 2011).

Niveles de carbonilación de proteínas

El grupo de ratas normoglucémicas no tratadas con el extracto, mostraron un nivel de carbonilación de proteínas de 6.2 (nmoles/mg de proteína), valor que aumentó en el grupo de ratas diabéticas, alcanzando 8.64 (nmoles/mg de proteína), valores con diferencias significativas a los presentados con los demás grupos de ratas (Figura 22).

La administración del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo” de manera significativa disminuyó la carbonilación de proteínas tanto en ratas normoglucémicas como diabéticas, tratadas con con las tres dosis. En ratas diabéticas se obtuvieron valores de 4.6, 2.86 y 2.66 (nmoles/mg de proteína) de acuerdo a las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/Kg. Los valores más bajos se presentaron en las ratas tratadas con 1 y 10 mg/Kg del extracto, con diferencias significativas a los otros grupos (Figura 22).

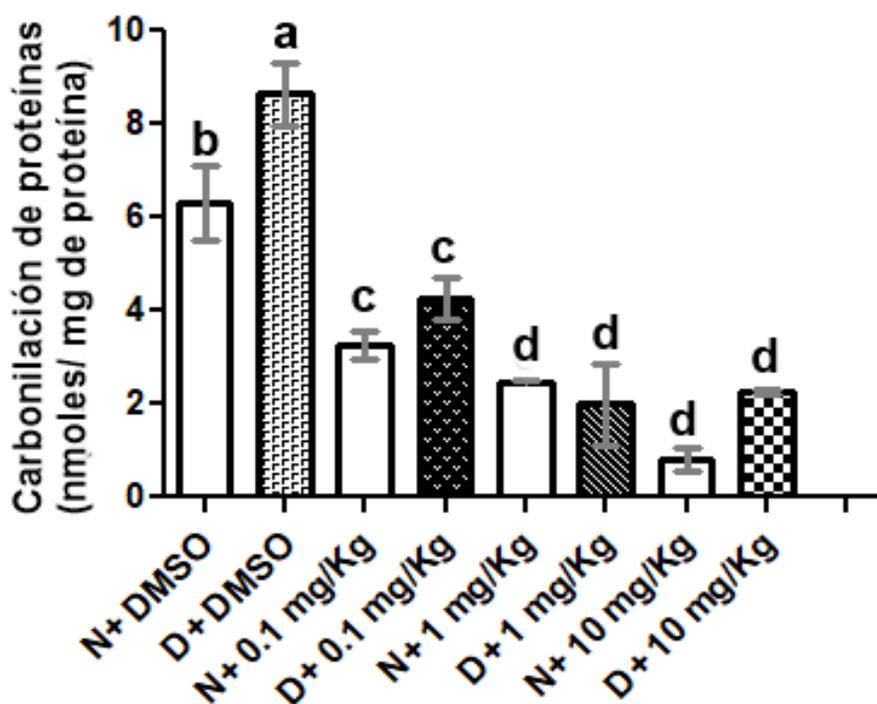


Figura 22. Niveles de carbonilación de proteínas (nmoles/mg de proteína) en ratas normoglucémicas (N) y diabéticas (D), tratadas con el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón “Amarillo” (0.1, 1 y 10 mg/Kg), a los 60

días del tratamiento. Las ratas control fueron tratadas con DMSO (0.1%) (N+DMSO, D+DMSO). Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

Actualmente, se ha demostrado que la oxidación de proteínas con respecto a la hiperglucemia está íntimamente involucrada con el aumento en la oxidación de proteínas, debido a reacciones de Fenton, Michael y Hopkins, proteólisis, formación de proteína-proteína, disminución de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa), aumento de superóxido y peroxinitrito, y disminución de óxido nítrico (Castillo *et al.*, 2003; Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006; Cortes-Rojo *et al.*, 2009; Huayta *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2013; Hecker y Wagner, 2017).

Una de las proteínas que puede sufrir daño oxidativo en los diabéticos es la insulina, lo cual provoca cambios químicos y estructurales en ésta, y como consecuencia, una pérdida de su función biológica. También se ha demostrado que el tejido adiposo humano en presencia de insulina oxidada no utiliza la glucosa con la misma eficiencia que la insulina nativa. Por otra parte, el estrés carbonílico también puede afectar a los receptores insulínicos y a las moléculas implicadas en la respuesta celular adecuada a la estimulación insulínica (Hernández *et al.*, 2011).

Los niveles en la disminución de la carbonilación de proteínas debido al extracto metanólico de chile perón, es similar a lo reportado en dosis superiores en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas tratadas con piridoinol (10 mg/Kg), carvacrol (25, 50 y 100 mg/Kg) y con α -tocoferol (400 y 600 mg/Kg) (Schmatz *et al.*, 2012; Jamshidi *et al.*, 2018; Sakul *et al.*, 2018), lo que demuestra que el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo "Amarillo" ejerce este efecto debido a los compuestos activos antioxidantes que contiene, principalmente en ratas diabéticas inducidas con STZ.

Conclusiones

La administración oral del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo "Amarillo" en ratas diabéticas, promovió un incremento de moléculas antioxidantes como GSHT y GSH, y una disminución en GSSG, lo que llevó a mantener una alta relación de GSH/GSSG.

En ratas diabéticas tratadas con 10 mg/Kg de este extracto, los niveles de lipoperoxidación y de carbonilación de proteínas presentaron una tendencia a disminuir, con una reducción del 31.1% y del 69.2%, respectivamente.

Estos resultados indican que la administración del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo "Amarillo", aumentó la actividad antioxidante tanto en ratas normoglucémicas como en diabéticas, principalmente en la dosis de 10 mg/Kg, sin observar efectos pro-oxidantes durante los 60 días de tratamiento.

Referencias

- Asayama, K. y Burr I. M. 1986. Rat superoxide dismutase purification, labeling, immunoassay, and tissue concentration. *Journal of biological Chemistry*, 260(4): 2212-2217.
- Bacanli, M., Anlar H.G., Aydin S., Cal T., Ari N., Undeger-Bucurgat U., Basara A.A. Basara N. 2017. D-limonene ameliorates diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chemistry Toxicology*, 100: 434-442.
- Balahoroğlu, R., Dülger H., Özbek H., Bayram I y Ramazan Ş. M. 2008. Protective effects of antioxidants on the experimental liver and kidney toxicity in mice. *European Journal of General Medicine*, 5(3):157-164.
- Castillo, R., Huerta P., Carrasco R. y Rodrigo R. 2003. Estrés oxidativo y daño renal. *Ciencia e Investigación Médico Estudiantil Latinoamerica*, 8(1): 43-52.
- Castro-Concha, L.A., Tuyub-Che. J., Moo-Mukul A., Vázquez-Flota F.A. y Miranda-Ham M.L. 2014. Antioxidant capacity and total phenolic content in fruit tissues from accessions of *Capsicum chinense* Jacq. (Habanero Pepper) at different stages of ripening. *The Scientific World Journal*, 24:1-6.
- Cisneros, R., Oré2 R., Arnao I y Suárez. S. 2011. Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*). *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(2): 107-111.
- Cortés-Rojo, R., Estrada-Villagómez M., Manzo-Ávalos S. y Saavedra-Molina A. 2009. Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la Integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. *Información Tecnológica*, 20(2): 1-12.
- De Mattia, G., Bravi M.C., Laurenti O., Cassone-Faldetta M., Armiento A., Ferri C. Balsano F.1998. Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 47(8):993-997.
- Denzoin-Vulcano L.A., Soraci L.A. Tapia O.M. 2013. Homeostasis del glutatión. *Bioquímica Clínica*, 47(3): 529-539.
- Díaz-Flores, M., Mejía S.A., Gutman B.L.A. Navarro M.R., Saavedra H.D., Camarillo O.C., Ramos R.R., Cruz C y Aguilar A.F.J. 2012. Effect of an aqueous extract of Cucurbita ficifolia Bouche´ on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 144:101-108.
- Díaz, A.A y Membrillo H.J. 2006. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(1):34-44.
- Earnest, E.O., Lawrence E.O., Franklin I.R. y Daniel O.E. 2013. The roles of *Capsicum* in diabetes mellitus. *Journal Pharmacology and Toxicology Research*, 6(1):22-27.
- ENSANUT. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. 151 p.
- Fujita, H., Fujishima H., Chida S., Takahashi K., Qi Z., Kanetsuna Y., Breyer M., Harris R., Yamada Y y Takamune T. 2009. Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20:1303-1313.
- García-Cerrillo, D., Noriega-Cisneros R., Peña-Montes D., Huerta-Cervantes M., Ríos-Silva., Salgado-Garciglia R., Montoya-Pérez R. y Saavedra-Molina A.

2018. Antioxidant effects of *Eryngium carlinae* in diabetic rats. *Asian Journal of Applied Sciences*, 6(5):1-7.
- Gargouri, M., Hamed H., Akrouti A., Dauvergne X., Magné C. y Feki A., 2017. Effects of *Spirulina platensis* on lipid peroxidation, antioxidant defenses and tissue damages in kidney of alloxan-induced diabetic rats. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 43(4):345-354.
- Gornall, A. G., Bardawill C. J. y David M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal Biology Chemistry*, 177(2): 751-766.
- Hecker, M. y Wagner H.A. 2017. Role of protein carbonylation in diabetes. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(1):29-38.
- Hernández, C.J., Piug L.M.E., García H.P., Marcel A.A.E. y Quesada Y.M. 2011. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 58(1): 4-15.
- Huayta, R., Zuñiga H., Esquerre C., Hernandez L. y Carranza E. 2013. Niveles de hidroperóxidos de proteínas y de grupos carbonilos en órganos de cobayos nativos de altura (Huancavelica, 3600 M). *Ciencias e investigación*, 16(2): 90-95.
- Ibarra, R.M.L., Gonzales B.C.M., Meda G.B.C. Pérez Z. A.L. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigation en Salud*, 3(1):1-9.
- Ichikawa, I *et al.*, 1994. Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney International*, 45: 1-9.
- Islam, M.S y Choi H. 2008. Dietary red chilli (*Capsicum frutescens* L.) is insulinotropic rather than hypoglycemic in type 2 diabetes model of rats. *Phytother Research*, 22(8):1025-1029.
- Jamshidi, R.H., Zeinabady Z., Zamani E., Shokrzadeh M y Shaki F. 2018. Attenuation of diabetic nephropathy by Carvacrol through anti-oxidative effects in alloxan induced diabetic rats. *Journal Pharmacognosy*, 5(2): 57-64.
- Kwon Y-In., Apostolidis E. y Shetty K. 2007. Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*, 31:370-385
- Lash, L.H. 2015. Mitochondrial glutathione in diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Medicine*, 4:1428-1447.
- Maekawa, R., Ogata H., Murase M., Harada N., Suzuki K., Joo E., Sankoda A., Iida A., Izumoto T., Tsunekawa S., Hamada Y., Oiso Y., Inagaki N., Arima H., Hayashi Y. y Seino Y. 2018. Glucose dependent insulinotropic polypeptide is required for moderate high fat diet, but not high carbohydrate diet-induced weight gain. *Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 314(6):572-583.
- Magied, A.M.M., Salama R.N.A. y Ali R.M. 2004. Hypoglycemic and hypocholesterolemia effects of intragastric administration of dried red chili pepper (*Capsicum annuum*) in alloxan-induced diabetic male albino rats fed with high-fat-diet. *Journal of Food and Nutrition*, 2(11):850-856.
- Martínez-Mora, J.A. 2017. Relación de la actividad hipoglucémica y la capacidad antioxidante de extractos de las hojas de *Justicia spicigera* en ratas diabéticas. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo. 110 p.

- Mayyas, F., Alzoubi H.K. y Bonyan R. 2017. The role of spironolactone on myocardial oxidative stress in rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovascular Therapeutics*, 1-9.
- Mora, H.A.C., Aragón N. D. y Ospina G.L. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 16(3):311-319.
- Murillo, V.M. 2017. Efecto antioxidante del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en hígado de ratas diabéticas. Tesis de Licenciatura, UMSNH, Fac. de Químico Farmacobiología, 79p.
- NORMA OFICIAL MEXICANA. NOM-062-ZOO 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Ohkawa, M., Ohisi, N. y K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2):351-358.
- OMS. 2016. Organización Mundial de la Salud. 88 p
- Ortiz, B.A.J. 2012. Efecto del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* sobre niveles de glutatión, metalotioneinas y proteínas totales en tejido renal de ratas diabéticas. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Venezuela. 50 p.
- Paolisso, G., Di Maro G., Pizza G., D'Amore A., Sgambato S., Tesaro P., Varricchio M. y D'Onofrio F. Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *The American Journal of Physiology*, 263(3): 435-440.
- Panda, P.S., Haldar K.P., Bera S., Adhikary S. y Kandar C.C. 2010. Antidiabetic and antioxidant activity of *Swietenia mahagoni* instreptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 48(9): 974–979.
- Patel, D.K., Prasad S.K., Kumar R. y Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedic*, 2(4):320-330.
- Rahman, I., Kode A. y Biswas S.K. 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6):3159-3165.
- Ramanathan, M., Jaiswal K.A y Brattacharya K.S. 1998. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the brain of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Experimental Biology*, 37:182-183.
- Rojas-Martínez, R., Basto-Abreu A., Aguilar-Salinas C.A., Zárate-Rojas E., Villalpando S. y Barrientos-Gutiérrez T. 2018. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud Pública de México*, 60:1-9.
- Saavedra-Molina, A. y Devlin T.M. 1997. Effect of extra-and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids*, 12(3-4): 293-298.
- Sadi, G., Eryilmaz N., Tütüncüoğlu E., Sahika C. y Güray T. 2012.Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. *Diabetes Metabolism*, 28: 228–235.
- Şakul, A., Arı N., Sotnikova R., Ozansoy G y Karasu C. 2018. A pyridoindole antioxidant SMe1EC2 regulates contractility, relaxation ability, cation channel activity, and protein-carbonyl modifications in the aorta of young and old rats with or without diabetes mellitus. *Gero Science*, 40: 377-392.

- Salinas, C.V., Reyes M.E y Escorza Q.M. 2013. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Diabetes y Oxidación*, 32(2): 53-66.
- Schmatz, R., Perreira B.L., Stefanello N., Mazzanti C., Spanevello R., Gutierrez J., Bagatini M., Martins C.C. Abdalla H.F., Serres S.D.J., Zanini D., Vieira M.J., Cardoso M.A., Schetinger R.M y Morsch M.V. 2012. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin induced diabetic rats. *Biochimie*, 94:374-383.
- Villa-Caballero, L., Nava-Ocampo A.A., Frati-Munari A.C. y Ponce-Monter P.H. 2000. El estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético? *Gaceta Médica de México*, 136(3):249-256.
- Wehr, B.N y Levine L.R. 2012. Quantitation of protein carbonylation by dot blot. *Analytical Biochemistry*, 423(2): 241-245.
- Yang K.D. y Hyung-Sub Kang H-Sub. 2018. Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-Induced diabetic rats. *Biomolecules & Therapeutics*, 26(2):130-138.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Con diversos estudios se ha demostrado que los compuestos bioactivos de plantas, como los polifenoles y el ácido ascórbico (vitamina C) pueden desempeñar un papel importante en la reducción del estrés oxidante y protegen contra varias enfermedades, como la diabetes mellitus (Surh y Seoul, 2002; Naidu, 2003; Perera y Yen, 2007). Las fuentes de estos compuestos en la dieta humana incluyen principalmente frutas, zumos y extractos de éstos, como ejemplos están las uvas y los frutos rojos como fresa, zarzamora, frambuesa y arándanos (Nowak *et al.*, 2018).

Entre los frutos que contienen estos tipos de compuestos y que son ampliamente consumidos en casi todo el mundo, están los del género *Capsicum*, usados como alimento o aditivos en la industria alimentaria. Algunas de sus especies como los frutos de *C. frutescens*, son utilizados para tratar la diabetes mellitus tipo II y se relaciona esta propiedad con los compuestos que contienen (Bloque y Langseth, 1994).

En estos frutos, también se ha determinado que la actividad antioxidante varía según la especie, la variedad, el genotipo y la madurez de los frutos, ya que esto se relaciona con la variación del contenido de los compuestos bioactivos, lo que afecta sus propiedades medicinales y funcionales (Rodríguez, 2013).

Debido a estos antecedentes y a que no existen investigaciones con los extractos derivados de frutos de chile péron (*C. pubescens*), en la presente investigación se analizó la relación de la actividad antioxidante con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides y capsaicina, en frutos maduros e inmaduros de los genotipos “Amarillo” y “Rojo”.

VII.1. Relación de la actividad antioxidante *in vitro* con el contenido los compuestos bioactivos en extractos de frutos de chile péron

Con la cuantificación de los principales compuestos activos de los diferentes extractos de frutos maduros e inmaduros de los genotipos “Amarillo” y “Rojo” de Chile perón (*C. pubescens*), se observó la relación del contenido de éstos con la actividad antioxidante. El mayor porcentaje de esta propiedad fue observada por el extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” (Figura 4), el que se relacionó directamente con un alto contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico, principalmente (Figuras 5 y 6).

En diversas investigaciones con frutos de *Capsicum* o extractos, se ha demostrado una estrecha relación de la actividad antioxidante con estos grupos de compuestos. En los frutos de Chile Pimiento, Anaheim, Bell, Caribe, Jalapeño y Serrano (*Capsicum annuum*) y algunos genotipos de Chile Habanero (*C. chinense*), la actividad antioxidante depende del contenido de los polifenoles, ácido ascórbico, carotenoides y capsaicinoides (Zhang y Hamazu, 2002; Medina-Juárez *et al.*, 2012; Segura-Campos *et al.*, 2013). Zhang y Hamazu (2002) observaron que el color de los frutos de Chile pimiento es esencial para mantener la actividad antioxidante, encontrando un mayor porcentaje en los cultivares rojos y amarillos. Medina-Juárez *et al.* (2012) demostraron que los cultivares Bell y Caribe poseen la mayor actividad antioxidante debido a su alto contenido en ácidos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico, lo que coincide con los resultados de la presente investigación, por lo que el extracto metanólico de frutos inmaduros de Chile perón genotipo “Amarillo” fue utilizado para administrarse en ratas con diabetes experimental y evaluar esta alta actividad antioxidante con un efecto hipoglucémico, protector de daño renal, función en el metabolismo de lípidos y sobre el estrés oxidante a nivel mitocondrial.

VII.2. Efecto del extracto metanólico de frutos de Chile perón genotipo “Amarillo” en ratas diabéticas

Con la administración por 60 días del extracto metanólico de frutos inmaduros de Chile perón del genotipo “Amarillo” en ratas con diabetes experimental (inducidas con STZ), se observó un efecto hipoglucémico, principalmente con la dosis de 10 mg/Kg, sin que hubiera cambios en los niveles de glucosa en ratas normoglucémicas

tratadas con esta dosis. El extracto (10 mg/Kg) ejerció una disminución del 40% en la concentración de glucosa en las ratas diabéticas, respecto a las que no se les administró dicho extracto (Figura 9).

Así mismo, en este mismo grupo de ratas diabéticas tratadas con la dosis de 10 mg/Kg del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo “Amarillo”, se observó una disminución en la concentración de ácido úrico, creatinina, triacilglicéridos, lípidos totales y una ligera ganancia en el peso corporal, como una tendencia a bajar los niveles de colesterol y colesterol-HDL, pero sin mostrar cambios en los niveles de urea (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 y 15).

Un efecto hipoglucémico por extractos de frutos que contienen compuestos bioactivos con una alta actividad antioxidante, ha sido observado de manera experimental y relacionado con una disminución en marcadores bioquímicos de daño renal como los niveles de ácido úrico, creatinina y parámetros lipídicos en suero. Extractos de frutos de *Lycium barbarum* con una alta actividad antioxidante, mostraron este efecto, consiguiendo la disminución de glucosa, colesterol total, triacilglicéridos y un aumento en colesterol HDL, en conejos con diabetes inducida con aloxano, después de 10 días de tratamiento, indicando un efecto hipoglucemiante e hipolipidémico (Luo *et al.*, 2004). La disminución de estos parámetros es dependiente también de los compuestos bioactivos presentes en frutos, principalmente flavonoides (Mousavi *et al.*, 2016), ácidos fenólicos totales (Oguerri *et al.*, 2014) y ácido ascórbico (Medina-Juárez *et al.*, 2012).

En ratas Wistar con diabetes inducidas con aloxano, con la administración oral de extractos metanólicos de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) (150 mg/Kg) por 45 días, se revertió el aumento de los niveles de glucosa, urea, ácido úrico y creatinina, así como el peso de las ratas. Estos resultados sugieren que de manera similar al efecto del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo”, el extracto de frutos de fresa tuvo una actividad hipoglucémica, debido al contenido de los compuestos fenólicos (Abdulazees y Ponnusamy, 2016).

Los efectos hipoglucémicos y sobre la disminución de parámetros de daño renal y marcadores lipídicos en ratas diabéticas, no ha sido observado en todos los frutos de las especies de *Capsicum* y sobre todo a la dosis con mayor efecto del extracto de chile perón (10 mg/Kg). Los extractos de frutos de chile Tabasco (*C. frutescens*) y de chile Pimiento (*C. annuum*), han mostrado algunos de estos efectos, pero con dosis mayores a los 10 mg/Kg (Young-In *et al.*, 2006; Kamon *et al.*, 2009; Earnest *et al.*, 2013; Chaiyata *et al.*, 2003).

De manera general, el extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo “Amarillo”, ejerció un efecto hipoglucémico, hipotrigliceridémico e hipolipidémico con 60 días de tratamiento en ratas diabéticas.

VII.3. Efecto antioxidante del extracto metanólico de frutos de chile perón genotipo “Amarillo” en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas

En mitocondrias de riñón, de ratas diabéticas tratadas con la dosis de 10 mg/Kg del extracto de frutos de chile perón con alta actividad antioxidante e hipoglucémica, promovió un incremento de las moléculas antioxidantes (GSht, GSH GSH/GSSG) y una disminución de GSSG, así como una disminución en los niveles de lipoperoxidación y de carbonilación de proteínas presentando una reducción del 31.1% y del 69.2%, respectivamente, aunque la actividad de SOD2 no mostró cambios en su actividad (Figuras 16, 17, 18, 19, 21 y 22).

Debido a que las mitocondrias son el reservorio de energía de las células, un daño en la mitocondria daría como resultado la reducción de la producción de energía, lo que conduciría a la muerte celular (Sohal y Dubey, 1994). En un panorama de desequilibrio en el estrés oxidante, las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno llevan a la reducción de las actividades del mecanismo de defensa antioxidante, disminuyendo los niveles de moléculas antioxidantes como GSht, GSH y la relación GSH/GSSG, aumentando el contenido de GSSG y los niveles de lipoperoxidación y de carbonilación de proteínas.

En el presente estudio, el extracto metanólico de los frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de chile perón, debido al contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y ácido ascórbico, posee una alta actividad antioxidante e hipoglucémica. El efecto en disminuir el contenido de glucosa en sangre, sugiere una disminución en mitocondria, lo que llevaría a inhibir o reducir los principales mecanismos del estrés oxidantes como la vía de polioles, vía de hexosaminas, la formación de AGE y la activación de PKC, desarrollándose un equilibrio entre antioxidantes y pro-oxidantes o capturando radicales libres y, por lo tanto, un decremento en los niveles de estrés oxidante (Villa-Caballero *et al.*, 2000; Díaz-Flores *et al.*, 2004; Altamirano *et al.*, 2011; Salinas *et al.*, 2013) (Figura 23).

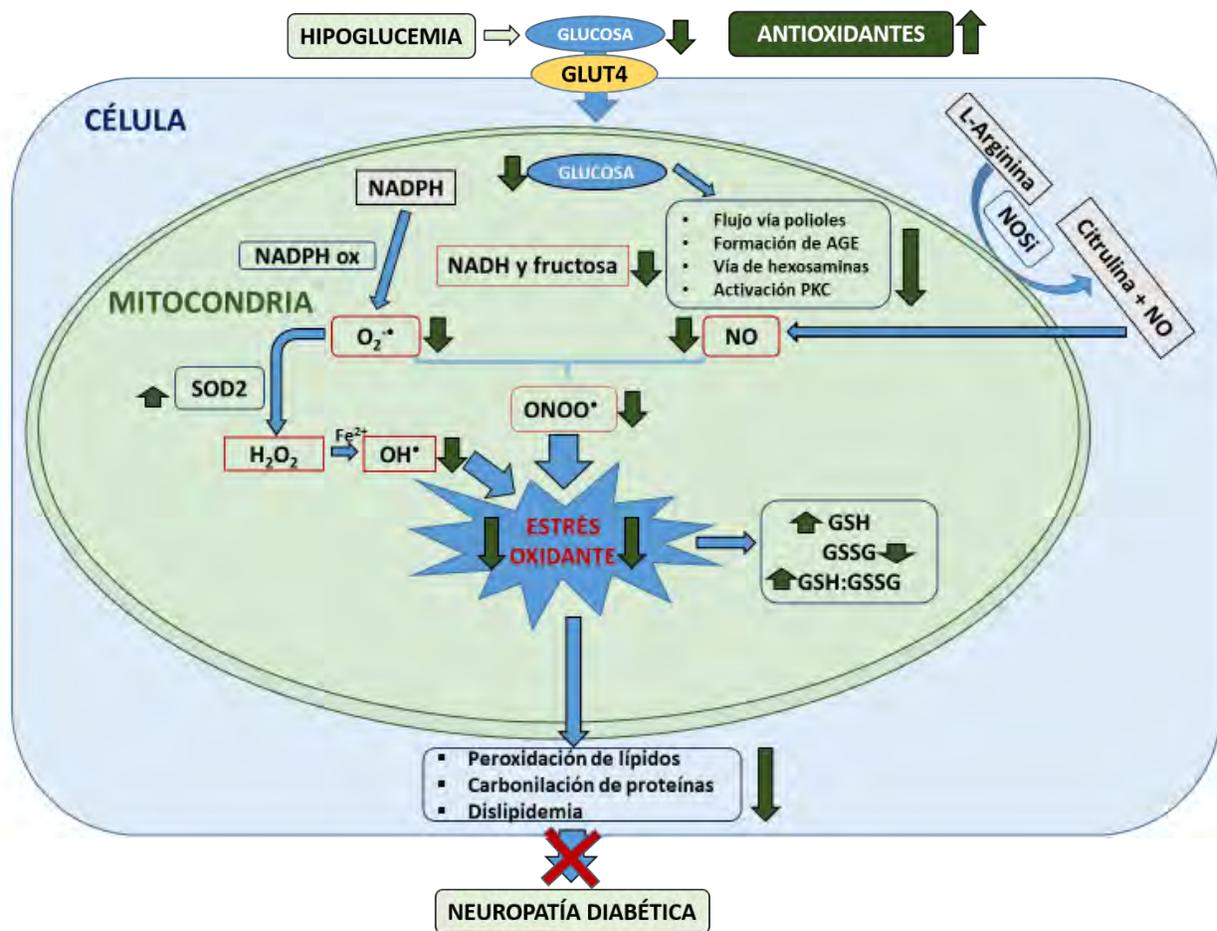


Figura 23. Mecanismo de acción propuesto de los antioxidantes del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón genotipo “Amarillo”, elaborado de acuerdo a los resultados obtenidos con la administración de 10 mg/Kg en ratas diabéticas y a la función descrita para antioxidantes exógenos de origen vegetal, en condiciones de diabetes mellitus.

Esto se demostró con el aumento de moléculas antioxidantes como GST, GSH y la relación GSH/GSSG, por lo que el extracto bajo estudio ejerció una mayor actividad antioxidante enzimática mitocondrial, disminuyendo los niveles de lípidos en suero (lipidemia), la peroxidación lipídica y la carbonilación de proteínas, en ratas diabéticas (Figura 23).

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

El extracto metanólico de los frutos inmaduros de chile perón del genotipo “Amarillo” presentó la mayor actividad antioxidante y se relacionó directamente con un alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y ácido ascórbico. Esta actividad es dependiente del contenido de los compuestos bioactivos, los que varían según el genotipo y la etapa de maduración.

El extracto metanólico de frutos inmaduros del genotipo “Amarillo” de *C. pubescens*, tuvo un efecto hipoglucémico, hipotrigliceridémico e hipolipidémico, ejerciendo un efecto protector al daño renal, en ratas diabéticas.

En mitocondrias de riñón de ratas diabéticas, este extracto incrementó el contenido de moléculas antioxidantes (GSht y GSH) y la relación de GSH/GSSG, sin mostrar un efecto pro-oxidante, a los 60 días del tratamiento.

IX. PERSPECTIVAS

- 1) Determinar el o los compuestos responsables de la actividad hipoglucémica, hipotrigliceridémica e hipolipidémica, del extracto metanólico de frutos inmaduros de chile perón del genotipo "Amarillo".
- 2) Esclarecer los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en el efecto hipoglucémico, hipotrigliceridémico e hipolipidémico, que ejerce el extracto antes mencionado.

X. LITERATURA CITADA GENERAL

- Abdulazeez, S.S. y Ponnusamy P. 2016. Antioxidant and hypoglycemic activity of strawberry fruit extracts against alloxan induced diabetes in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(1):255-260.
- Adedayo, B.C., Oboh G. y Akindahunsi A.A. 2010. Changes in the total phenol content and antioxidant properties of pepper fruit (*Dennettia tripetala*) with ripening. *African Journal of Food Science*, 4:403-409.
- Ahuja, K.D. y Ball M.J. 2006. Effects of daily ingestion of chilli on serum lipoprotein oxidation in adult men and women. *British Journal of Nutrition*, 96 (2):239-242.
- ADA. 2018. American Diabetes Association. Standars of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*, 41(1): S13-S61.
- Aguilar R.V.H. 2012. Cultivo del chile en México. *Revista fitotecnia mexicana*. 35(4):264.
- Aguirre-Hernandez y Muñoz-Ocotero V. 2015. El chile como alimento. *Usos de plantas medicinales*. 16-23.
- Alcántar, S.U. 2007. Efecto de la radiación solar en la germinación y desarrollo de chile manzano (*Capsicum pubescens*). Universidad Autónoma de Querétaro. 72 p.
- Altamirano, A.G., Frias de Leon M.G., Reyes-Montes M.R., Hernandez V.V. y Cuenca S.J.A. 2011. Radicales libres y mecanismo de daño tisular en la diabetes mellitus. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54(3): 46-53.
- Álvarez-Parrilla E., de la Rosa L.A., Amarowicz R y Shahidi F. 2011. Antioxidant activity of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 12:163-173.
- Asayama, K. y Burr I. M. 1996. Rat superoxide dismutases. *Journal of biological Chemistry*, 260(4): 2212-2217.
- Ayala-Ponce, R., Torres-Martínez R., Manzo-Ávalos S., Saavedra-Molina A., Hernández-García A. y Salgado-Garciglia R. Determinación de la actividad antioxidante de chile habanero (*Capsicum chinense* Cv. Chocolate) y su relación con los compuestos activos. 12º. Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología e Innovación y 6º Encuentro de jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. 6 de octubre de 2017. Morelia Michoacán.
- Beckman, S. J., Beckman W. T., Chen J., Marshall A.P y Freeman. A.B. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and peroxide. *National Academy Science*, 87:1620-1624.

- Bhaskar, H.V y N. Balakrishnan. 2009. In Vitro antioxidant property of Laticiferous plant species from Western Ghats Tamil Nadu, India. *International Journal Health Research*, 2: 163-170.
- Block, G. y Langseth L. 1994. Antioxidant vitamins and disease prevention. *Food and Technology*, 48:80-84.
- Brownlee., M. 2001 Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 44 (13): 813-820.
- Buck, S.H. y Burks T.F. 1983. Capsaicin: hot new pharmacological tool. *Trends in Pharmacological Sciences*, 4:84-87.
- Castillo, R., Huerta P., Carrasco R y Rodrigo R. 2003. Estrés oxidativo y daño renal. *Ciencia e Investigación Medico Estudiantil Latinoamerica*, 8(1): 43-52.
- Chaiyata, P., Puttadechakum S. y Komindr S. 2003. Effect of chili piper (*Capsicum frutescens*) ingestion on plasma glucose response and metabolic rate in Thai woman. *Journal of Medical Association of Thailand*, 84(9): 852-860.
- Cruz-Pérez.A.B., Gardea B.A.A., Gutiérrez E.M.A., Gonzales H.V.A., Pérez G.M. y Soto H.R.M. 2007. Capsaicinoides, vitamina C y heterosis durante el desarrollo del fruto de chile manzano. *Agrociencia*. 41(6):627-635.
- Dagnoko, S., Yaro-Diarisso N., Nador S.P., Adetula O., Dolo-Nantumé A., Gamby-Touré K., Traoré-Théra A., Katile S. y Diallo-Ba D., 2013. Overview of pepper (*Capsicum* spp.) breeding in West Africa. *AJAR*. 8(13):1108-1114.
- Daood, H.G., Vinkler M., Markus F., Hebshi E.A. y Biacs P.A. 1996. Antioxidant vitamin content of spice red pepper (paprika) as affected by technological and varietal factors. *Food Chemistry*, 55(4):365-372.
- Diaz-Flores, M., Baiza-Gutman L.A., Ibáñez-Hernández M.A., Pascoe-Lira D., Guzmán-Greenfel A.M y Kumate-Rodríguez J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta Medica de México*, (40):4 437-447.
- Earnest, E.O., Lawrence E.O., Franklin I.R. y Daniel O.E. 2013. The roles of *Capsicum* in diabetes mellitus. *Journal Pharmacology and Toxicology Research*, 6(1):22-27.
- Ebrahimzadeh, A.M., Nabavi F.Z y Nabavi M.S. 2009. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium caucasicum* Trautv at flowering stage. *Pharmacognosy Research*, 1: 435-439.
- Espinosa, T.E.L. 2010. Cultivo en invernadero, poscosecha y mercado del chile manzano (*Capsicum pubescens* R y P), Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Chapingo. 94 p.

- ENSANUT. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. 151 p.
- Fernández-Mejía, C. 2013. Molecular basis of type 2 diabetes. 88-108.
- FID. 2015. Federación Internacional de Diabetes. 144 p.
- Fujita, H., Fujishima H., Chida S., Takahashi K., Qi Z., Kanetsuna Y., Breyer M., Harris R., Yamada Y y Takamune T. 2009. Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20:1303-1313.
- Grace, H.M., Ribnicky M.D., Kuhn P., Poulev A., Logendra S., Yousef G.G., Raskin I. y Lila M.A. 2009. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* aiton. *Phytomedicine*, 16(5):406-415.
- Guerra, E.J.I. 2001. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *Anales de Medicina Interna*, 18:326-335.
- Gushiken, F.L., Beserra P.F., Rozza L.A., Bérghamo L.P., Bérghamo D.A. y Pellizzon H.C. 2016. Chemical and biological aspects of extracts from medicinal plants with antidiabetic effects. *The Review of DIABETIC Studies*, 93(2-3):1-17.
- Heiser, Jr.C.B. y Pickersgill B. 1969. Names for the cultivated *Capsicum* species (Solanaceae). *Taxon*, 18(3):277-283.
- Henao, M.L.A., *et al.*, 2009. Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud. *Perspectivas en Nutrición Humana*, 11(1):27-38.
- Hernandez, C.J., Piug L.M.E., García H.P. Marcel A.E.A y Quesada Y.M. 2011. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, (58):1 4-15.
- Hernandez-Ortega, M., *et al.*, 2012. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory effects of carotenoids extracted from dried pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-10.
- Hidalgo, G.I y Almajano M.P. 2017. Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Antioxidants*, 6(7):1-27.
- Howard, L.R., Talcott S.T., Brenes C.H. y 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.

- Iorizzi, M., Lanzotti V., Ranalli G., De Marino S. y Zollo F. 2002. Antimicrobial furostanol saponins from the seeds of *Capsicum annuum* L. var. acuminatum. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 50(15):4310-4316.
- Kamalakkannan, N. y Mainzen-Prince P.S. 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(1):97-103.
- Kamon, C., Supeecha W. y Weerapan K. 2009. Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in *Capsicum frutescens* on decreasing plasma glucose level. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 92(1):7.
- Kappel, V.D., Costa G.M., Scola G., Silva F.A., Landell M.F., Valente P., Souza D.G., Vanz D.C., Reginatto F.H. y Moreira J.C.F. 2008. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. pendulum at different maturity stages. *Journal of Medical Food*, 11(2):267-274.
- Kumaran, A y Karunakaran J.R. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Food Science and Technology*, 40:344-352.
- Kumar, S.B. y Krisbna A.D.2003. *Capsicum*: historical and botanical perspectives. Medicinal and aromatic plants, 275 p.
- Lemus, Mairin; Ramos Yusmar; Liscano Ahieska. y D' Armas Haydelba. 2013. Efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae), en ratas diabéticas. *Revista Científica*, 23(1): 1-11.
- Li, Ch., Yang Y., Li H., Li L. y Li J. 2013. Inhibitory effect of extract from *Capsicum annuum* leaves against α -glucosidase activity. *Journal of Zhejiang University*, 39(2):11-17.
- Long T.J. 2011. El chile protagonista de la independencia y la revolución. 1-99 p.
- Lou, Q., Cai Y., Yan J., Sun M. y Corke H. 2004. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life sciences*, 76: 137-149.
- Lujan, G.C., Hernandez P.B.E., Romero M.A. y Barranza C.F. 2009. Uso de plantas medicinales y suplementos diabéticos para el control glucémico de las plantas. *Revista Nacional de Investigación en Recursos Bioticos de Faunas Áridas*, 8:229-239.
- Magied, A.M.M., Salama R.A.N. y Ali R.M. Hypoglycemic and hypocholesterolemia effects of intragastric administration of dried red chili pepper (*Capsicum*

- Annum*) in alloxan-induced diabetic male albino rats fed with high-fat-diet." *Journal of Food and Nutrition Research* 2(11): 850-856.
- Mahdi, A.A., Chandra A., Singh K.R., Shukla S., Mishra L.C. y Ahmad s. 2003. Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 18(2):8-15.
- Marín, A., Ferreres F., Tomás-Barberán F.A. y Gil M.I. 2004. Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Jornal Agricultural Food Chemistry*, 52(12):3861-3869.
- Martínez-Mora, J.A., Murillo-Villicaña M., Salgado-Garciglia R., Manzo-Avalos S., Cortés-Rojo C, Montoya-Pérez R. y Saavedra-Molina. 2017. Relation of hypoglycemic activity and the antioxidant capacity of *Justicia spicigera* leaf extracts in diabetic rats, *The FASEB Journal*, 31(1):944.19.
- Martínez, M.J.A. 2017. Relación de la actividad hipoglucémica y la capacidad antioxidante de extractos de las hojas de *Justicia spicigera* en ratas diabéticas. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología Experimental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo. 110 p.
- Martín, N.C. y González W.G. 1991. Caracterización de accesiones de chile (*Capsicum* spp.). *Agronomía Mesoamericana*, 2:31-39.
- Materska, M. y Perucka I. 2005. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5):1750-1756.
- McCune, L.M. y Johns T. 2002. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. *Journal of Ethnopharmacol*, 82(2-3):197-205.
- Medina-Juárez, LA., Molina-Quijada D.M., Del Toro-Sánchez L.M., González-Aguilar G.A. y Gámez-Meza N. 2012. Exytacys and characterization of their phenolic constituents. *Interciencia*, 37(8): 588-593.
- Menichini, F., Tundis R., Bonesi M., Loizzo R.M., Conforti F., Statti G., De Cindo B., Houghton J.P. y Menichini F. 2009. The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry*, 114(2):553-560.
- Miguel, M.G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal.*, 25:291-312.
- Mohammed, A., Koorbanally N.A. y Islam S.MD. 2017. Anti-diabetic effect of *Capsicum annuum* L. fruit acetone fraction in a type 2 diabetes model of rats. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 76(6):1767- 1779.

- Molina-Torres, J., García-Chávez A. y Ramírez-Chávez E. 1999. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: caffeoyl and capsaicin. *Journal of Ethnopharmacol*, 64:241-248.
- Monserenusorn Y. y Glinsukon T. 1978. Inhibitory effect of capsaicin on intestinal glucose absorption *in vitro*. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16: 469-473.
- Montes, P.D.J. 2018. Efecto de la restricción y suplementación crónica de hierro en la función mitocondrial y el estrés oxidante en riñones de ratas con diabetes experimental. Tesis de Maestría. 64 p.
- Moradabadi, L., Kouhsari M.S. y Sani F.M. 2013. Hypoglycemic effects of three medicinal plants in experimental diabetes: inhibition of rat intestinal α -glucosidase and enhanced pancreatic insulin and cardiac *Glut-4* mRNAs expression. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (3):387-397.
- Mousavi, L y Asmawi Z.M. 2016. Hypoglycemic study of *Ocimum tenuiflorum* L. leaves extract in normal and streptozotocin- induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (6):12 1029-1036.
- Mozafari, M., Nekooeian A.A., Panjeshahin M.R. y Zare H.R. 2015. The effects of resveratrol in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension: a study of antihypertensive mechanisms. *Iran Journal of Medical Sciences*. 2015;40(2):152-60.
- Murillo, V.M. 2017. Efecto antioxidante del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en hígado de ratas diabéticas. Tesis de Licenciatura, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Fac. de Químico Farmacobiología, 79p.
- Naidu, K.A. 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition Journal*, 2:2-7.
- Nowak, D., Gośliński M., Wojtowitz E. y Przygoński K. 2018. Antioxidant properties and phenolic compounds of vitamin C-rich juices. *Journal Food and Science*, 83(8):2237-2246.
- Oboh, G. y Rocha J.B.T. 2008. Water extractable phytochemicals from *Capsicum pubescens* (tree pepper) inhibit lipid peroxidation induced by different prooxidant agents in brain: *in vitro*. *European Food Research and Technology*, 226:707-713.
- Ochi, T., Takaishi Y., Kogure K. y Yamauti I. 2003. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annum*. *Journal of Natural Products*, 66(8):1094-1096.

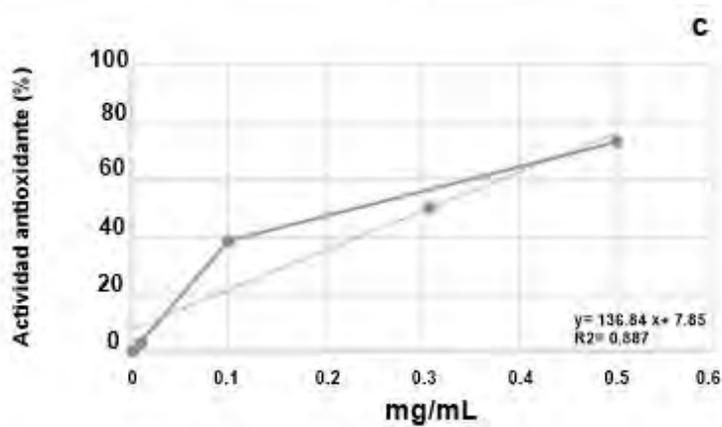
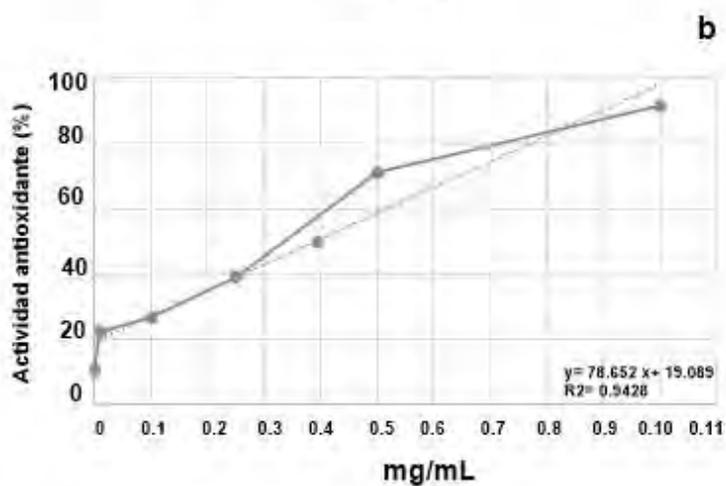
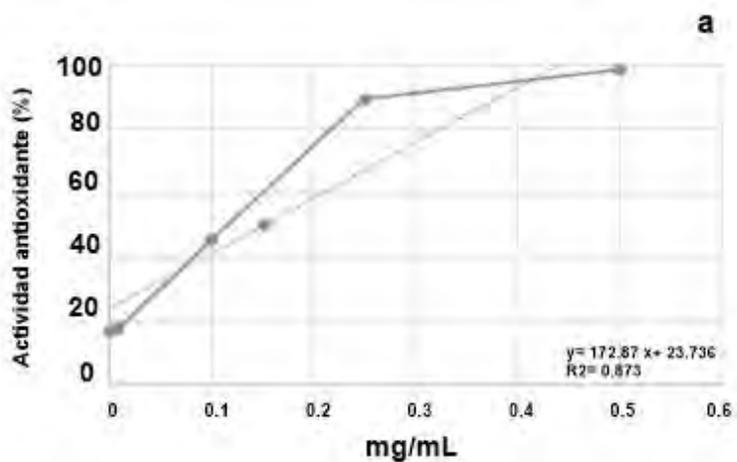
- Ogueri, C.C., Elekwa I., Ude V.C. y Ugbogu E.A. 2014. Effect of aqueous extract of guava (*Psidium guajava*) leaf on blood glucose and liver enzymes in alloxan induced diabetic rats. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(9): 1079-1087.
- OMS. 2016. Organización Mundial de la Salud. 88 p
- Ornelas-Paz, J.J., Yahia E.M., Gardea-Bejar A.A. 2008. Changes in external and internal color during postharvest ripening of 'Manila' and 'Ataulfo' mango fruit and relationship with carotenoid content determined by liquid chromatography–APCI+–time-of-flight mass spectrometry. *Postharvest Biology and Technology*, 50:145-152.
- Osuna-García, J.A., Wall M.M. y Waddell C.A. 1998. Endogenous levels of tocopherols and ascorbic acid during fruit ripening of new mexican-type chile (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:5093-5096.
- Packer, L., Rimbach G. y Virgil F. 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology & Medical*, 5-6:704-724.
- Patel, D.K., Prasad S.K., Kumar R. y Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedic*, 2(4):320-330.
- Paula, P.C., Oliveira J.T.A., Sousa D.O.B., Alves B.G.T., Carvalho A.F., Franco O.L. y Vasconcelos I.M. 2017. Insulin-like plant proteins as potential innovative drugs to treat diabetes the *Moringa oleifera* case study. *New Biotechnology*, 39: 99-109.
- Pereira, F.P., Goncalves A.M., Lima C.L. y Stefani R. 2016 Evaluation of antioxidant potential of pepper sauce (*Capsicum frutescens* L). *Cogent Food & Agriculture*, 2: 1-7.
- Perera, C.O. y Yen G.M. 2007. Functional properties of carotenoids in human health. *International Journal of Food Properties*, 10(2):201-230.
- Pérez, G. y Castro R. 2008. El chile manzano. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). 1a . Reimpresión. 135 p.
- Ramos, I.M.L. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. *Investigation en Salud*, 3(1): 1-9.
- Rodríguez, M.A. 2013. Capacidad antioxidante de extractos de chile chiltepin (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*) y su potencial en el biocontrol de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Baja California, 66 p.

- Rodriguez, R.H.G. y Méndez D.J. 1994. Diabetes mellitus experimental, *Ciencia y Veterinaria*, 6: 347-377.
- Roginsky, V. y Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92:235-254.
- Rosa, A., Deiana M., Casu V., Paccagnini S., Appendino G., Ballero M. y Dessi M.A. 2002. Antioxidant activity of capsinoids. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 50(25):7396-7401.
- Rossi M.W., Garrido G. y Selles N.A.J. 2016. Biomarcadores de estres oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(2): 62-83.
- SAGARPA. 2012. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Chile manzano en invernadero. Disponible en: <http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/nota.php?accion=buscar¬ald=81263127451b69ce074cac> (Consultado, 2019)
- Salinas, C.V., Reyes M.E y Escorza Q.M. 2013. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Diabetes y Oxidación*, 32(2): 53-66.
- Sanchez-Sanchez, H., Gonzalez-Hernandez V.A., Cruz-Pérez A.B., Pérez-Grajales M., Gutiérrez-Espinosa M.A., Cardea-Béjar A. y Gómez-Lim M.A. 2010. Herencia de capsaicinoides en chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P). *Agrociencia*, 44:655-665.
- Segura-Campos, M.R., Ramírez-Gómez R., Moguel-Ordoñez Y. y Betancur-Ancona D. 2012. Polyphenols, ascorbic acid and carotenoids contents and antioxidant properties of Habanero pepper (*Capsicum chinense*) fruit. *Food and Nutrition Sciences*, 4:47-54.
- Shotorbani, Y.A., Jamei R. y Heidari R. 2012. Antioxidant activities of two sweet pepper *Capsicum annuum* L. varieties phenolic extracts and the effects of thermal treatment. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(1): 25-34.
- Sinha, N. 1950. The somatic chromosomes and meiosis in *Capsicum*. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 10:36-42.
- Sohal, RS. y Dubey A. 1994. Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radical Biology & Medical*, 16(6): 621-626.
- Surh, Y.J. y Seoul S.K. 2002. Anti-Tumor promoting potential of selected spice ingredients with oxidative and anti-inflammatory activities. *Food and Chemical Toxicology*, 40(8):1091-1097.

- Tundis, R., Loizzo M.R., Menichini F., Bonessi M., Conforti F., Statti G., De Luca D., de Cindio B. y Menichini F. 2011. Comparative study on the chemical Composition, antioxidant properties and hypoglycemic activities of two *Capsicum annuum* L. cultivars (Acuminatum small and Cerasiferum). *Plant Foods for Human Nutrition*, 66:261.
- Tun, N.N., Holk A., Scherer G.F.E. 2001. Rapid increase of no release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*, 509:174-176.
- Udayakumar, R., Kasthuriengan S., Vasudevan A., Mariashibu T.S., Rayan J.J., Choi C.W., Ganapathi A. y Kim S.C. 2010. Antioxidant effect of dietary supplement *Withania somnifera* L. reduce blood glucose levels in alloxan-induced diabetic rats. *Plant Foods for Human. Nutrition*, 65(2):91-98.
- Venereo, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31(2): 126-133.
- Villa-Caballero, L., Nava-Ocampo A.A., Frati-Munari A.C. y Ponce-Monter P.H. 2000. El estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético? *Gaceta Médica de México*, 136(3):249-256.
- Watcharachaisoponsiri, T., Sornchan P., Charoenkiatkul S y Suttisansanee U. 2016. The α -glucosidase and α -amylase inhibitory activity from different chili pepper extracts. *International Food Research Journal*, 23(4):1439-1445.
- Yao, P., Nussler A., Liu L., Hao L., Song F., Schirmeier A. y Nussler N. 2007. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *Journal of Hepatology*, 47: 253–261
- Yoshikawa T. y Naito Y. 2002. What is oxidative stress. *Japan Medical Association Journal*, 45(7): 271-276.
- Young-In, K., Apostolidis E y Shetty K. 2007. Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. *Journal of Food Biochemistry*, 31:370-385.
- Zhang. D. y Hamauzu Y. 2003. Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of green, red and yellow bell peppers. *Food, Agriculture & Environment*, .1(2): 22-27.
- Zimmer, R.A., Leonardi L., Miron D., Schapoval E., Rodrigues de Oliveira J. y Gosmann G. Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: from traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 228-233.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Curva de concentración inhibitoria IC₅₀ del extracto metanólico del chile perón inmaduro del genotipo amarillo por el método ABTS (a), DPPH (b) y TAC (c) en mg/mL.



Anexo 2. Curva de calibración de ácido gálico ($\mu\text{moles/mg}$ peso fresco) ($\lambda=725$ nm) (a); curva de calibración de quercetina ($\mu\text{moles/mg}$ peso fresco) ($\lambda=415$ nm) (b); curva de calibración de ácido ascórbico ($\mu\text{moles/mg}$ peso fresco) ($\lambda=264$ nm) (c); curva de calibración de capsaicina ($\mu\text{moles/mg}$ peso fresco) ($\lambda=286$ nm) (d).

