

Ref. 121



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"CARACTERIZACIÓN DE CAPSAICINOIDES POR HPLC, PRODUCIDOS EN CALLOS Y CELULAS EN SUSPENSIÓN DEL GÉNERO CAPSICUM"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A :  
**MARIA RUTH TAPIA GARCIA**



**1 9 8 7**

**EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

| INDICE   | Pags. |
|--|-------|
| I. RESUMEN   | 1     |
| II. INTRODUCCION                                     | 3     |
| III. OBJETIVOS                                       | 5     |
| IV. ANTECEDENTES                                     |       |
| 4.1 Cultivo de tejidos vegetales.                    | 6     |
| 4.2 <u>Capsicum</u> (Chile).                         | 9     |
| 4.3 Capsaicinoides.                                  | 11    |
| 4.4 Características de capsaicinoides.               | 14    |
| 4.5 Cromatografía de líquidos de alta<br>eficiencia. | 26    |
| V. PARTE EXPERIMENTAL                                | 27    |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSION                           | 37    |
| VII. CONCLUSIONES                                    | 66    |
| VIII. REVISION BIBLIOGRAFICA                         | 69    |

## I. R E S U M E N

Se ha caracterizado el contenido de capsaicinoides en frutos, callos, agar y células en suspensión del género Capsicum (Chile), mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).

Esta investigación pertenece al proyecto de "Producción de capsaicinoides por células del género Capsicum en cultivo sumergido".

Debido a la excelente resolución que se obtuvo con la técnica seleccionada de HPLC, se logró la identificación individual de los capsaicinoides.

Por otro lado, se estableció la técnica de extracción para los capsaicinoides presentes en frutos, callos y agar, como resultado de la realización de numerosos experimentos y ensayos en los cuales se probaron diferentes disolventes y condiciones de extracción.

Finalmente, se obtuvo una mayor cantidad de capsaicinoides mediante extracción en frío con metanol.

En la validación del método se obtuvo la linealidad en un intervalo de 1 a 500 ppm de capsaicina. Se determinó el porcentaje de recuperación de capsaicina y se obtuvo un intervalo de 96 a 101%. También se determinó la precisión del método.

Por los resultados obtenidos el método de HPLC descrito en el presente trabajo es exacto, preciso y con

amplias posibilidades de aceptación para caracterizar a los capsaicinoides.

## II. INTRODUCCION.

En los últimos años se ha visto la necesidad de buscar vías alternativas para la obtención de metabolitos secundarios que tengan particular interés desde el punto de vista farmacéutico o alimentario.

Una de éstas alternativas la ofrece el cultivo de células vegetales. Las sustancias naturales obtenidas a partir de esta técnica son variadas, entre éstas se encuentran los capsaicinoides, que son compuestos químicos responsables del sabor picante de las especies del género Capsicum (Chile).

Los capsaicinoides son estructuras de amidas muy complejas y en el fruto su contenido puede variar dependiendo de las condiciones ecológicas de su producción.

Por otra parte, en el caso de éstos compuestos se ha visto la necesidad de estandarizar una técnica analítica que permita determinarlos y cuantificarlos individualmente. En varios trabajos publicados esto se ha logrado mediante técnicas analíticas clásicas. Durante los años setenta se desarrollaron métodos colorimétricos y cromatográficos (papel, capa fina, columna y de gases) que en algunos casos solo dieron resultados cualitativos, resultados cuantitativos totales o bien fueron demasiado lentos.

En el caso de cromatografía de gases (CG) fué necesario formar un derivado de los capsaicinoides, lo que dificultó su determinación.

Por este motivo en los últimos años se le ha da do gran importancia a la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC), que tiene la ventaja de separar mezclas complejas en niveles muy bajos de concentración. Además, las temperaturas a las cuales se realizan los análisis evitan la biodegradación de los compuestos y no hay límite por el peso molecular de las sustancias.

El objetivo general de este trabajo es establecer un método de extracción y, encontrar las condiciones de trabajo óptimas de HPLC para la determinación y cuantificación de los capsaicinoides presentes en frutos, callos y células en suspensión del género Capsicum.

### III. O B J E T I V O S .

Para lograr la caracterización de los capsaicinoides presentes en frutos, callos, agar y células en suspensión del género Capsicum se propusieron los siguientes objetivos particulares:

- 3.1 Seleccionar la técnica de análisis de capsaicinoides por HPLC y establecer sus parámetros óptimos.
- 3.2 Separar e identificar a los capsaicinoides en las diferentes muestras del género Capsicum.
- 3.3 Establecer el método de extracción para dichos compuestos en frutos, callos y células en suspensión.
- 3.4 Determinar el contenido de capsaicinoides en frutos, callos, agar y células en suspensión de diferentes especies de Capsicum mediante HPLC.

#### IV. ANTECEDENTES

##### 4.1 El cultivo de tejidos vegetales como una alternativa para la producción de capsaicinoides.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica de cultivo IN VITRO de células, tejidos u órganos, bajo condiciones asépticas y controladas como luz, temperatura, humedad, composición del medio de cultivo etc., (26) que en México ha alcanzado un gran auge debido a las amplias perspectivas que ofrece. Algunas de sus aplicaciones son las siguientes:

- a) Micropropagación de cultivos
- b) Preservación del germoplasma
- c) Mejoramiento genético
- d) Obtención de sustancias naturales de interés comercial. (26)

El último punto representa un factor muy importante debido a que nuestro país en los últimos años se ha visto en la necesidad de buscar vías alternativas para la obtención de sustancias naturales.

Por otro lado, se sabe que las plantas producen una gran variedad de sustancias orgánicas de interés comercial como son: aceites, resinas, saponinas, coloran-

tes, ceras, saborizantes y fármacos entre otros, lo cual en la actualidad representa un factor económico muy importante (24). De los compuestos anteriores, los fármacos, los aceites y otras sustancias con una gran demanda en el mercado son metabolitos secundarios que producen las plantas. Estos metabolitos son sintetizados en células especializadas de la planta durante una etapa establecida del desarrollo de las mismas y pueden obtenerse a partir del cultivo de tejidos vegetales (CTV). (26)

El CTV ofrece la alternativa de producir estos metabolitos secundarios, sin embargo los estudios acerca de la utilización de ésta técnica para producirlos en nuestro país son muy pocos (26).

A pesar de que en México el chile es muy importante en la dieta y de contar con una gran variedad de ellos, se tiene poco conocimiento de los metabolitos secundarios que produce y que pueden obtenerse mediante la técnica del CTV. (24). Metabolitos de gran importancia para la industria alimentaria y farmacéutica principalmente.

Actualmente, en el Departamento de Biotecnología y Biongeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional se efectúan estudios con el fin de obtener metabolitos secundarios de interés comercial, mediante el cultivo de te

cidos vegetales, en este caso de capsaicinoides a partir de especies del género Capsicum.

#### 4.2 Capsicum ( Chile ).

El chile pertenece al género Capsicum de la familia de las Solanáceas. El nombre de capsicum se deriva del griego "Kapsa" que se refiere al picor del chile. (20)

Antes de la llegada de los españoles, era cultivado por los nativos en los países tropicales de América, quienes lo utilizaban como condimento y en algunos casos para curar calambres y diarreas. (21)

Actualmente se conocen más de 20 especies silvestres y sólo se reconocen 5 especies domésticas :

C. annuum L.

C. baccatum L.

C. frutescens L.

C. chinense

C. pubescens

(20)

La primera agrupa a muchas variedades entre las cuales están C. annuum var. glabriusculum y C. annuum var. annuum. A esta última pertenecen casi todos los chiles cultivados en México y es el grupo de mayor distribución e importancia económica en el mundo. (20)

Todos los frutos del género Capsicum presentan una composición general basada principalmente en conte-

nido de proteínas, resinas, celulosas, pentosas, sales minerales, vitaminas y principio picante (capsaicinoides), al que pertenecen alrededor de 10 compuestos responsables del picor del chile (28). Dicho picor puede variar debido a muchos factores, entre los cuales se encuentran los siguientes: el medio de cultivo, el grado de maduréz del fruto, la especie de que se trate y -- factores genéticos y geográficos. (26)

#### 4.3 Capsaicinoides.

Durante los siglos XVI, XVII y XVIII los frutos de Capsicum habían sido cultivados en muchos países; pero es hasta el siglo XIX cuando verdaderamente empieza la investigación sobre su composición y propiedades. En 1816 (21), Buchholz fué el primero en indicar que la propiedad picante del chile podría ser obtenida por maceración de los frutos con solventes orgánicos.

En 1817 (21), Braconot encontró que el mismo principio podría ser soluble en sales alcalinas. Posteriormente, Thresh (21) fué el primero en purificar el primer principio picante llamándolo capsaicina. Otras investigaciones (21) demostraron que el compuesto responsable del picor contenía grupos hidroxí y metoxi. A fines del siglo XIX se postuló que la capsaicina y la vainillina presentaban estructuras muy similares, pero no fué sino hasta el año de 1923 (21) cuando al sintetizar capsaicina y dihidrocapsaicina, Nelson y Dawson demostraron que la capsaicina estaba formada por una unidad básica llamada vainillilamina y un componente ácido (un isómero del ácido decanoico). A toda esta estructura corresponde el siguiente nombre químico:

N-(4-hidroxi-3-metoxibenzil)-8-metilnon-trans-6-enamida.  
(Fig.1)

Los capsaicinoides son compuestos que pertenecen al grupo de alcaloides y son metabolitos secundarios que se excretan al medio en un 90% (19).

Su interés comercial tanto para la industria farmacéutica como para la alimentaria, se debe al gran número de aplicaciones dentro de las mismas (ver características de capsaicinoides). (3), (18), (28)

Actualmente los capsaicinoides son comercializados como un extracto llamado "Oleoresina de Capsicum" que contiene, además del principio picante, grasas, pigmentos, pentosas, sales minerales y resinas entre otros compuestos; pero deben ser eliminadas con el fin de purificar a los capsaicinoides. Este proceso en México eleva mucho los costos, por lo que actualmente dicha oleoresina se importa.

Químicamente los capsaicinoides son una mezcla -- compleja de amidas cuya estructura está formada por los ácidos enoico, octanoico, nonanoico y decanoico de la vainillilamina (13).

Se ha demostrado que los 5 capsaicinoides que se encuentran en mayor cantidad dentro del fruto en orden decreciente son:

Capsaicina (C)

Dihidrocapsaicina (DHC)  
Homocapsaicina (HC)  
Nordihidrocapsaicina (NDC)  
Homodihidrocapsaicina (HDC)  
(17), (18)

La capsaicina es el compuesto mas ampliamente estudiado por ser el capsaicinoide responsable en mayor cantidad de la sensación picante. (15)

#### 4.4 Características de los capsaicinoides.

a) Fórmula desarrollada. (Fig. 1)

b) Fórmula condensada.

|                       |                    |
|-----------------------|--------------------|
| Capsaicina            | $C_{19}H_{27}NO_3$ |
| Homocapsaicina        | $C_{20}H_{29}NO_3$ |
| Nordihidrocapsaicina  | $C_{18}H_{27}NO_3$ |
| Dihidrocapsaicina     | $C_{19}H_{29}NO_3$ |
| Homodihidrocapsaicina | $C_{20}H_{31}NO_3$ |

(35)

c) Peso Molecular.

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| Capsaicina            | 317 |
| Homocapsaicina        | 331 |
| Nordihidrocapsaicina  | 305 |
| Dihidrocapsaicina     | 319 |
| Homodihidrocapsaicina | 333 |

(35)

d) Punto de fusión.

Entre 64- 64.5 °C (14)

e) Solubilidad.

Solubles en éter, dietil éter, cloroformo, etanol y acetato de etilo; muy solubles en meta-

**CAPSAICINOIDES**

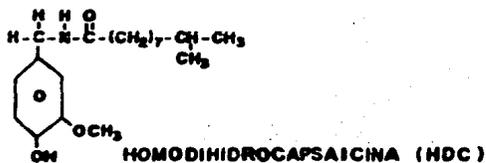
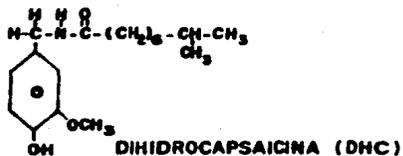
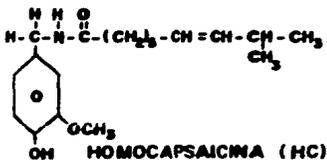
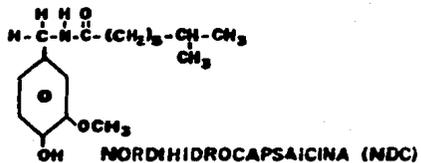
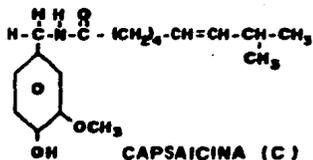


Fig. 1

no1 y poco solubles en acetona. (12), (23)

f) Espectro de Absorción.

El espectro de absorción en el ultravioleta de la capsaicina, muestra un máximo de absorción a 200 nm. (Fig. 2) (37)

g) Biosíntesis.

La biosíntesis de capsaicinoides se lleva a cabo en la placenta del fruto (chile) y celularmente en una especie de vacuola llamada capsisoma. (32)

Su ruta biosintética fue establecida por primera vez por Fujiwake y colaboradores (7). Un esquema que representa lo que ellos propusieron se observa en la Fig. 3

Algunos trabajos ya habían demostrado que las unidades aromáticas ( $C_6 - C_1$ ) se derivan biosintéticamente de la fenilalanina vía ácido cinámico. (2)

Debido a que de la fenilalanina se deriva la vainillilamina y de ésta, a su vez, la capsaicina se estableció que éste compuesto es un precursor importante que tendrá que ser tomado muy en cuenta en la producción de capsaicinoides (7).

Algunos otros estudios han demostrado también que la leucina, isoleucina y valina, son precursores

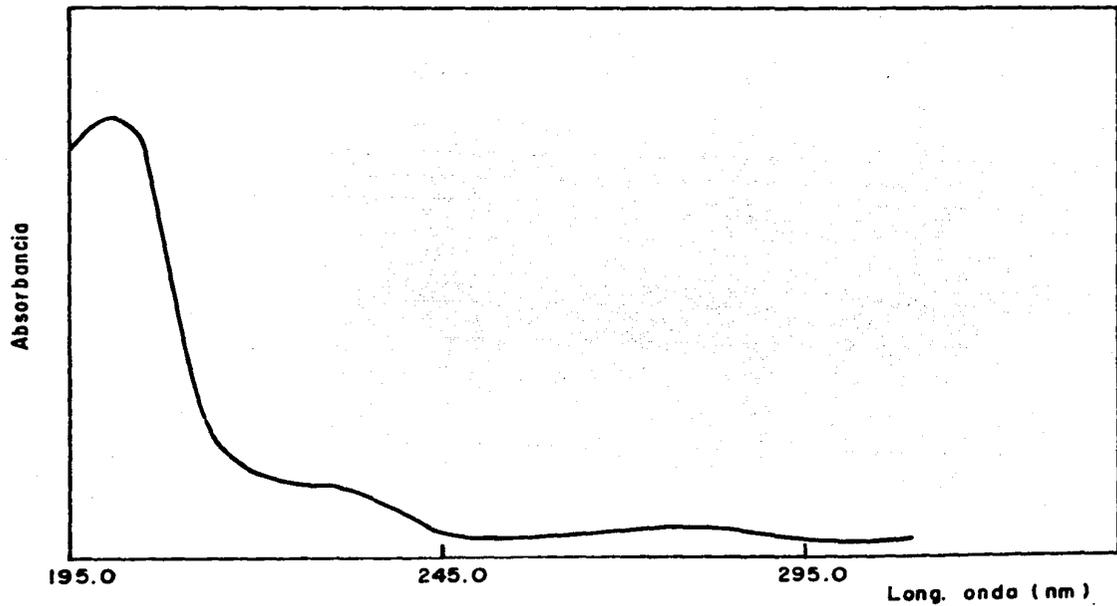
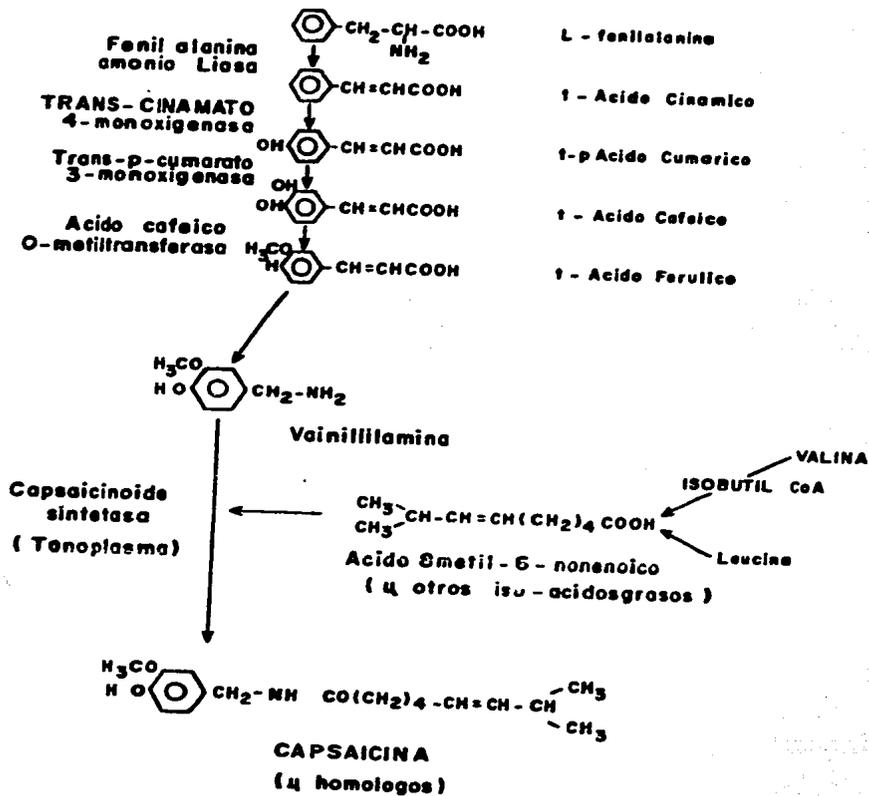


Fig. 2 (37) ESPECTRO DE ABSORCION DE LA CAPSAICINA



Via propuesta de la Biosíntesis de Vainillilamina y Capsaicinoides

Fujlwake, H. y col. (1982)

Fig. 3

de las moléculas de ácidos grasos de los capsaicinoides es decir, de las porciones olefinicas y parafínicas de ellos. (16)

#### h) Efectos fisiológicos.

Los capsaicinoides son compuestos muy potentes que causan una severa irritación en ojos piél y membrana mucoidal. (27)

En 1965, Molnar reporta efectos de hipotermia, --somnolencia y bradicardia por ingestión de elevadas concentraciones de capsaicina en alimentos. (3)

Los capsaicinoides son absorbidos en el tracto intestinal y posteriormente son metabolizados (22). Así mismo, se ha reportado que la capsaicina aparece en la orina después de haber sido ingerida en los alimentos lo cual ha sido comprobado mediante métodos cromato--gráficos (HPLC) y reacciones colorimétricas. (11)

Por otro lado también se ha observado, en estudios realizados con ratas, que cuando se introducen cantidades excesivas de capsaicina en el organismo se produce una degeneración celular tanto en hígado como en corazón. (22)

En el hígado la capsaicina tiene un efecto inhibitorio en el metabolismo mitocondrial, específicamente sobre la fosforilación oxidativa y algunas otras fun-

ciones energéticas. (4)

i) Usos.

Los capsaicinoides han sido ampliamente utilizados dentro de la industria alimentaria como saborizantes y condimentos. Dentro de la industria farmacéutica, uno de sus usos es como analgésico local de aplicación dental debido a sus efectos sobre las neuronas sensoriales. (3)

Los capsaicinoides han sido también incorporados dentro de medicamentos farmacéuticos de uso tópico, utilizados para calmar dolor de huesos o como contra reumáticos. (28)

Algunos trabajos publicados revelan que los capsaicinoides presentan propiedades antimicrobianas y actividad antioxidante. (28)

Recientes estudios revelan que la capsaicina disminuye los niveles de colesterol en sangre, lo cual resulta muy interesante ya que podría ser utilizada en pacientes que sufren afecciones debidas al colesterol. (3)

j) Producción.

Los capsaicinoides son compuestos que se sintetizan naturalmente en el fruto de las especies del género Capsicum y también pueden ser sinteti-

zados químicamente (10). La cantidad de ellos en las especies de Capsicum varía dependiendo de diversos factores (mencionados en el punto 4.2).

Se ha observado que los chiles originarios de México, del centro y sur de América y algunos de África contienen mayor cantidad de capsaicinoides, por lo cual, su picor es considerablemente más alto que los originarios de los países de Europa. (28)

Algunos ejemplos de chiles que contienen mayor número de capsaicinoides son: piquín (muy picante), chiptle (muy picante), jalapeño (muy picante), serrano (picante), habanero (muy picante) y pimienta melagueta (picante). (28)

Debido a las características de su biosíntesis y puesto que son metabolitos secundarios que se excretan al medio, pueden producirse mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales (20). Aunque esto no es aún un hecho, la producción de grandes cantidades de capsaicinoides, está en proceso de investigación.

#### k) Identificación y Determinación.

Existen varias técnicas que han sido utilizadas para determinar o separar a los capsaicinoides. En los últimos años se ha requerido buscar un método analítico para determinarlos individualmente.

Desde el punto de vista de control de calidad

es también importante una técnica analítica que permita establecer el contenido de capsaicinoides en distintos productos alimenticios con el fin de igualar y estandarizar sabores.

Los métodos que han sido utilizados para determinarlos son: métodos organolépticos introducidos por Scoville (18), y métodos fisicoquímicos. Dentro de estos últimos han sido utilizados especialmente métodos colorimétricos y métodos cromatográficos. Fig.4

Las técnicas colorimétricas que se han utilizado para este fin generalmente, se basan en hacer reaccionar un cromóforo con la porción olefinica de los capsaicinoides formando un compuesto colorido el cual absorbe a una determinada longitud de onda. Un método colorimétrico es el desarrollado por Krishan (1), en el cual la capsaicina que está presente en el fruto de Capsicum reacciona con nitrato de sodio-molibdato formando un complejo amarillo cuyo máximo de absorción se encuentra en 430 nm. (1)

Otra reacción espectrofotométrica se basa en la reacción entre la capsaicina, y el ácido tungstofosfórico y el ácido molibdofosfórico, que da lugar como producto a un complejo colorido. (33). Estos tienen la desventaja, de que los reactivos reaccionan con otros compuestos que no son capsaicinoides, quienes se enmascaran por la presencia de pigmentos (carotenos). Además se determina el to-

## DETERMINACION DE CAPSAICINOIDES

Métodos Colorimétricos

Métodos Cromatográficos: papel  
capa fina  
columna  
CG  
HPLC

Ventajas del HPLC:

- alta resolución
- alta sensibilidad (ug - ng)
- cantidades mínimas de muestra
- identificación de capsaicinoides individuales
- no biodegradación
- rapidez
- equipos automatizados

Fig. 4

tal de capsaicinoides sin poder evaluar el contenido individual de estos compuestos. En general la sensibilidad, estabilidad y exactitud de este tipo de métodos es pobre. (1)

Dentro de los métodos cromatográficos utilizados para determinar capsaicinoides, se encuentran técnicas cromatográficas en papel, capa fina, cromatografía de gases y HPLC.

En los dos primeros métodos los tiempos de análisis son muy largos y las técnicas resultan ser laboriosas. (29), (35)

Para la determinación por cromatografía de gases es necesario formar un derivado de los capsaicinoides, como el éster metílico del ácido graso correspondiente o los derivados del trimetil-silano. La reacción anterior al análisis por cromatografía de gases (CG) hace que se dificulte la determinación y se presenten algunos problemas por causa de las elevadas temperaturas que se utilizan. (14), (34)

La determinación de los capsaicinoides por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), ofrece las siguientes ventajas:

- identificación de capsaicinoides en forma individual, por lo que el análisis cuantitativo es más específico.
- no ocurre biodegradación de los compuestos en es

tudio.

- alta sensibilidad y resolución.
- introducción de muestras en forma directa, sin --  
previa formación de derivados.

(8), (30), (36)

#### 4.5 La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia, como una técnica para determinar capsaicinoides.

La cromatografía líquida clásica tuvo sus inicios con los estudios realizados por Tswett (1903). Durante los años posteriores su desarrollo fue lento; poco después, debido a las limitaciones de la CG para analizar compuestos orgánicos de peso molecular mayor de 600, que fueran poco volátiles o biodegradables a causa de las temperaturas al análisis, resurgió el interés y con ello el estudio de la cromatografía de líquidos que dió lugar a lo que es ahora el HPLC. (30)

En la actualidad gracias a los adelantos en computación y electrónica, diseño de columnas y detectores, han hecho del HPLC una técnica muy versátil, sensible, exacta, precisa y rápida (36). Motivo por el cual, en el presente trabajo se seleccionó un método analítico por HPLC para el estudio y cuantificación de los capsaicinoides.

## V. P A R T E      E X P E R I M E N T A L

5.1 Desarrollo del Método para la cuantificación de capsaicinoides producidos en callos, frutos y células en suspensión del género Capsicum.

### Equipos y aditamentos

- Cromatógrafo de Líquidos HPLC marca TRACOR 951
- Detector de U.V. longitud de onda variable TRACOR-970A
- Integrador Hewlett Packard 3392-A
- Columna Supelcosil LC-18 (Supelco, INC) de 15 cm de longitud por 4.6 mm de diámetro interno
- Sonicador Cole-Parmer modelo 8851
- Balanza analítica Mettler H-20
- Equipo Soxhlet Millipore
- Equipo de filtración Millipore
- Potenciómetro Fisher-525 digital

### Material

- Frascos viales de 10 ml
- Matraces aforados de 10 ml
- Matraces Erlen-Meyer de 250 y 500 ml
- Matraz bola de 250 ml
- Probeta de 100 ml
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 ml
- Termómetro de -10 a 350 °C

### Reactivos

- Acido acético glacial R.A ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) Baker
- Acetato de etilo R.A ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) Baker
- Acetona R.A ( $\text{C}_2\text{H}_5$ )<sub>2</sub>O Baker
- Acetonitrilo grado HPLC ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) Baker
- Agua desionizada
- Etanol R.A ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) Baker
- Eter R.A ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) Baker
- Cloroformo R.A ( $\text{CHCl}_3$ ) Baker
- Metanol R.A ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) Baker
- Metanol grado HPLC ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) Baker
- Nitrato de plata R.A ( $\text{AgNO}_3$ ) Merck

### Estándares

- Capsaicina (90% pureza) Sigma
- Oleorresina de Capsicum Importada

### Preparación de soluciones

- Solución estándar de capsaicina.

Se preparó una solución de 500 ppm, para lo cual se pesaron 0.0125 g y se disolvieron en 25 ml de metanol. De esta solución se hicieron las diluciones correspondientes para obtener concentraciones de 400, 300, 200, 100, 10 y 1 ppm.

Nota: el estándar causa severa irritación en la piel y --

abundante secreción nasal por ser un poderoso irritante. Es indispensable manejarlo con cuidado, e incluso se recomienda usar mascarilla especial.

- Solución de oleorresina (importada).

En 50 ml de hexano se disolvieron aproximadamente 5 g de oleorresina, de la cual se extrajeron los capsaicinoides con 50 ml de acetonitrilo (3 veces). Los extractos combinados se evaporaron a sequedad, controlando la temperatura entre 55 y 60 °C con el fin de evitar la degradación de los capsaicinoides, ya que a temperaturas mayores de 64.5°C se provoca la descomposición de éstos compuestos. (21), (23)

- Solución problema.

Las muestras de material vegetal de frutos, callos y células en suspensión del género Capsicum fueron proporcionadas por los siguientes integrantes del grupo de Cultivo de células vegetales del Departamento de Biotecnología y Biongeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional:

- M. en C. Carlos Arias Castro

Capsicum chinense (Habanero)

Capsicum annuum (Serrano)

- M. en C. Ana Carmela Ramos

Capsicum annuum (Jarocho)

Capsicum pubescens (Rocoto)

- M. en C. Martha Alicia Rodríguez  
Capsicum pubescens (Perón)  
Capsicum annuum var. glabriusculum (Nanchito)
- Q.B.P Graciano Calva Calva  
Capsicum annuum (Jalapeño papaloapan)
- P.B Victoria T. Velázquez Martínez  
Capsicum annuum var. annuum (Chile de agua)  
Capsicum annuum var. glabriusculum (Chiltepn)
- P.B San Juana Arellano Martínez  
P.B Bernarda García Ocón  
Capsicum chinense (Habanero)

La metodología empleada para la obtención de callos y células en suspensión se encuentra descrita en los informes de Avance del Programa de Proyecto del grupo de Células Vegetales.

En base a los resultados que se obtuvieron en los estudios de extracción de capsaicinoides, todas las muestras se sometieron al procedimiento de extracción establecido. Para frutos, callos y agar con metanol en frío y para células en suspensión con cloroformo.

Condiciones de trabajo.

- Fase móvil

a) Método A.1 (ver métodos)

Acetonitrilo 40%

Agua acidulada (1% ác. acético) 60%

La solución se desgacificó en un sonicador durante 15 minutos.

b) Método A.2 (ver métodos)

Metanol 150 ml

Agua acidulada (ác. acético pH=2.5) 100 ml

Nitrato de plata 0.85 g (agua)

Nitrato de plata 1.28 g (metanol)

El nitrato de plata se disolvió en agua acidulada (pH=2.5) y en metanol respectivamente, posteriormente ambas soluciones se mezclaron y se obtuvo una solución final que se desgasificó en un sonicador durante 15 minutos.

El nitrato de plata se incluye con el fin de mejorar la separación, ya que forma un quelato con la porción elefónica de la capsaicina y la homocapsaicina; además evita que los picos presenten formas asimétricas.

(10)

- Velocidad de flujo

a) Método A.1

1.0 ml/min.

b) Método A.2

1.5 ml/min.

|                         |   |              |
|-------------------------|---|--------------|
| - Longitud de onda      |   | 280 nm       |
| - Sensibilidad          | 3 | $2^3 = 8$ mv |
| - Velocidad de la carta |   | 0.3 cm/min.  |
| - Anchura del pico      |   | 0.16 mv      |
| - Tamaño del pico       | 3 | mv           |
| - Volumen de inyección  |   | 10 ul.       |

### Métodos.

A. Métodos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Se probaron varios métodos analíticos por HPLC, y se seleccionaron los dos métodos que presentaron la mejor resolución.

A.1 Modificación del método desarrollado por Hoffman.

(10)

Con las condiciones de trabajo mencionadas anteriormente, se evaluaron los estándares de capsaicina y la oleoresina.

## A.2 Método desarrollado por Johnson y Bowman. (11)

Con las condiciones de trabajo mencionadas anteriormente también se evaluaron los estándares de capsaicina y la oleorresina, además de algunas muestras para verificar reproducibilidad.

## B. Métodos de Extracción.

B.1 Extracción con metanol a reflujo (Soxhlet). Fig. 5

B.2 Extracción con metanol en frío. Fig. 6

B.3 Extracción con cloroformo en frío. Fig. 7

TECNICA DE EXTRACCION DE CAPSAICINOIDES  
CON METANOL EN EQUIPO SOXHLET

1. Pesar 3-5 g. de muestra\*
2. Adicionar 300 ml de metanol
3. Pasar a un matraz de fondo plano
4. Conectar el equipo Soxhlet
5. Controlar la temperatura entre 55-60°C
6. Se deja refluja 3 veces.
7. Concentrar a 50 ml para frutos y a 10 ml para callos y agar.
8. Inyectar al cromatógrafo.

\* Frutos, callos y agar.

Fig. 5

TECNICA DE EXTRACCION DE CAPSAICINOIDES  
CON METANOL EN FRIO

1. Pesar 3 g. callo o agar; 0.5 g. fruto
2. Adicionar 12.5 ml de metanol Abs.
3. Agitar durante 15 minutos
4. Centrifugar
5. Decantar
6. Repetir 4 veces del 2 al 5 paso
7. Reunir los extractos. Vol. total 50 ml
8. En el caso de callo y agar concentrar a 5 ml controlando la T° 50-60°C y vacio.
9. Inyectar al cromatógrafo.

Nota: el agar se tiene que fundir (controlando la T° con el fin de tener una muestra representativa.

Fig. 6

TECNICA DE EXTRACCION DE CAPSAICINOIDES  
DE CELULAS EN SUSPENSION

1. Tomar 3 ml de medio nutritivo (líquido)
2. Adicionar de 3-4 ml de cloroformo
3. Agitar moderadamente
4. Extraer la parte clorofórmica
5. Repetir 2 veces del 2 al 4 paso
6. Juntar los extractos de cloroformo
7. Evaporar a sequedad controlando la T° y con vacío.
8. Resuspender en 0.5 ml de metanol al 70%
9. Inyectar al cromatógrafo.

Nota: la temperatura se tiene que controlar entre 55-60 °C, para evitar la biodegradación.

Fig. 7

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

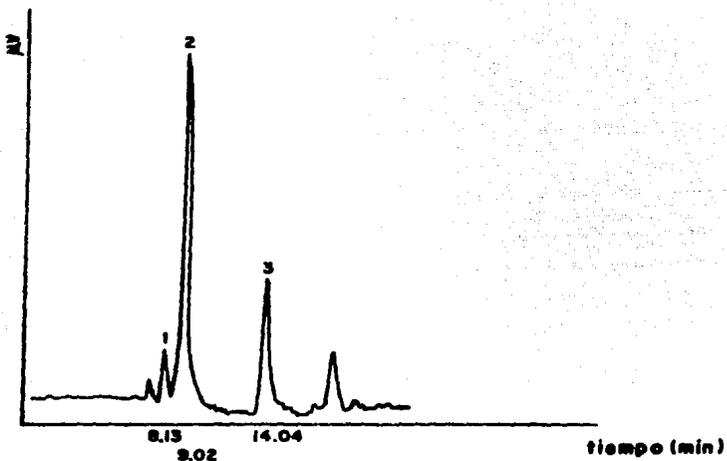
### 6.1 Selección de la técnica de análisis por HPLC e identificación de capsaicinoides.

Se probaron las técnicas de HPLC desarrolladas por Hoffman y por Johnson y Bowman, y se obtuvo una buena separación con ambas.

Para lograr la identificación de los capsaicinoides en las diferentes muestras, se analizó el estándar de 90% de pureza y la oleorresina de Capsicum como muestra de referencia. Los  $T_R$  (tiempos de retención) se compararon con los de los compuestos presentes en las muestras y se verificaron mediante coinyecciones con el estándar para observar el aumento del pico correspondiente.

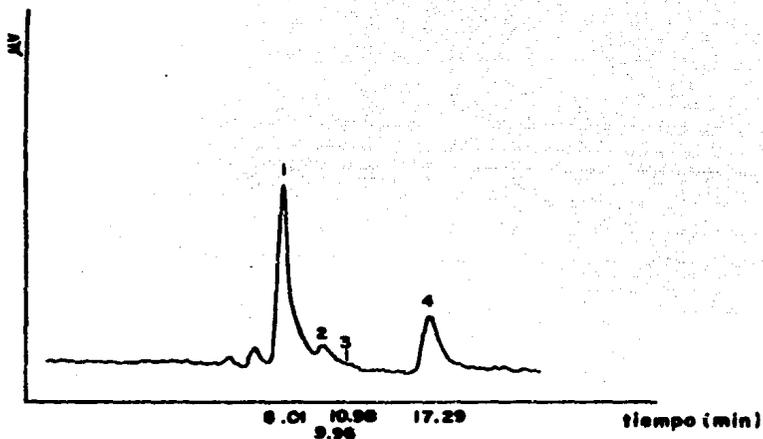
Con las condiciones utilizadas por Hoffman se analizó la oleorresina y se obtuvo el cromatograma I. En él se muestra que los picos correspondientes a cada uno de los capsaicinoides están perfectamente definidos. La resolución obtenida es buena y el tiempo de análisis total es relativamente corto.

Con las condiciones reportadas por Johnson Y Bowman se probó la misma oleorresina diluida 1;1 y se obtuvo el cromatograma II. En él se puede observar que la resolución es buena y el tiempo de análisis total también es corto. También se observan otros compuestos que no



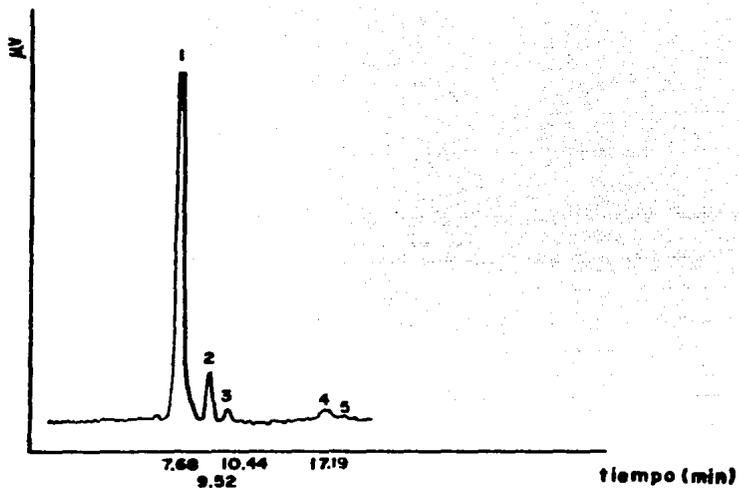
### Cromatograma I

Cromatograma de una oleoresina de Capsicum (importada) x HPLC fase inversa; Columna:  $C_{18}$ ; fase móvil: Acetonitrilo/ $H_2O$  (40-60) v/v + 1% ac. acético; flujo 1.5 ml/min. detector U.V (280nm) (2) Capsaicina, (1) Nordihidrocapsaicina y (3) Dihidrocapsaicina.



### Cromatograma II

Cromatograma de una oleoresina de Capsicum (importada)  
 por HPLC fase inversa columna: C<sub>18</sub> fase móvil: MeOH/H<sub>2</sub>O  
 (60-40 v/v) + 0.05 M AgNO<sub>3</sub> . pH = 2.5 (ac. acético)  
 flujo 1 ml./min. ; detector U.V. (280 nm).  
 (1) C ; (2) NDC ; (3) HC ; (4) DHC .



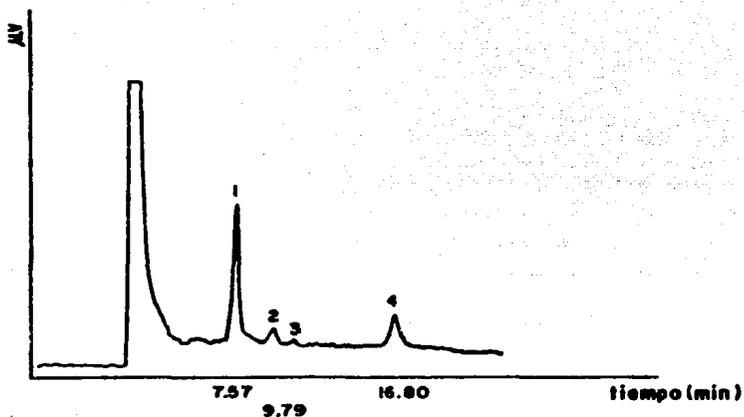
### Cromatograma III

Cromatograma del standar de Capsaicina (90% pureza) obtenido x HPLC fase inversa. Columna:  $C_{18}$ ; fase móvil: MeOH /  $H_2O$  (60-40  $V/V$ ) + 0.05 M  $AgNO_3$  a ambos const. pH= 2.5 ac. acético; flujo 1 ml./min; detector U.V. (280 nm).  
(1) C ; (2) NDC ; (3) HC ; (4) DHC y (5) HDC .

interfieren en la determinación pues se eluyen en tiempos menores. Con las mismas condiciones, se analizó el estándar de capsaicina (90% pureza) a fin de observar la reproducibilidad y se obtuvo el cromatograma III. En él se muestra la separación de 5 capsaicinoides cuyos picos están muy bien definidos y el tiempo de análisis fué de 18 minutos.

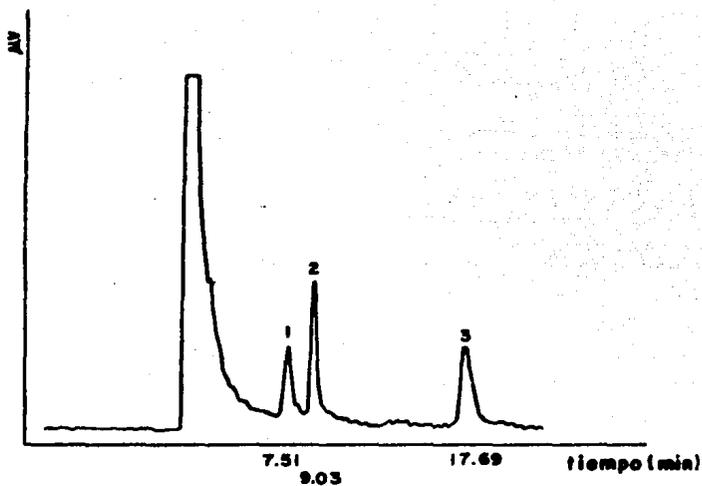
Para la identificación de los capsaicinoides presentes en las muestras en estudio (frutos, callos, agar y células en suspensión) fué necesario, después de haber efectuado un estudio con diferentes disolventes y condiciones de extracción, hacer una extracción según la técnica establecida. (punto 6.3)

Los cromatogramas IV, V y VI corresponden a los extractos de diferentes tipos de muestra. En ellos se observa buena resolución y los  $T_R$  del estándar corresponden a los de las muestras.



**Cromatograma IV** Extracto de fruto maduro  
Especie: C. annuum (Nanchito)

- |                               |                            |
|-------------------------------|----------------------------|
| <b>1 Capsaicina</b>           | <b>3 Homocapsaicina</b>    |
| <b>2 Nordihidrocapsaicina</b> | <b>4 Dihidrocapsaicina</b> |



**Cromatograma V**

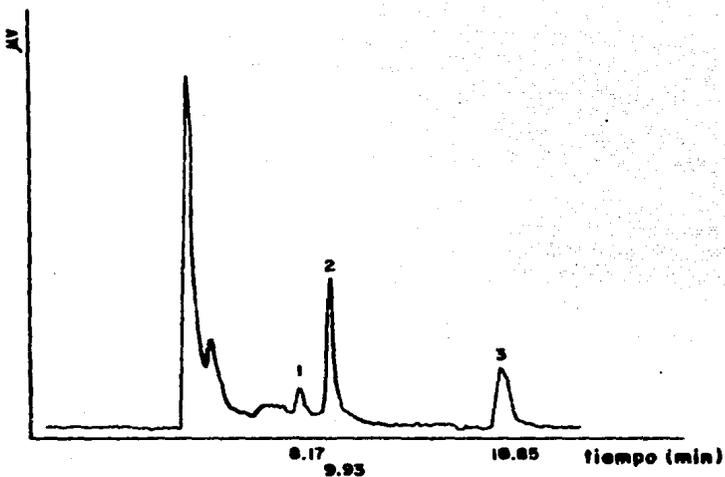
**Extracto de Cello**

**Especie: C. annuum var. glabrisculum (Chilitopín)**

**1 Capsaicina**

**3 Dihidrocapsaicina**

**2 Nordihidrocapsaicina**



**Cromatograma VI**

**Extracto de Agar**

**Especie: C.annuum var. glabrisculum (Chilitopín)**

**1 Capsaicina**

**3 Dihidrocapsaicina**

**2 Nordihidrocapsaicina**

## 6.2 Validación estadística del método.

Para ser estadísticamente válida toda técnica analítica debe reunir ciertos requisitos. Los criterios estadísticos que más se utilizan son: exactitud, especificidad, precisión y linealidad.

### A. Especificidad.

En los cromatogramas correspondientes al análisis del estándar y de las muestras (extractos de Capsicum) que consistían en una mezcla de capsaicinoides, se observa que en los tiempos de retención de los compuestos de importancia para la cuantificación, no interfiere algún otra sustancia.

Aunque existen otros compuestos que se eluyen durante el análisis, éstos tuvieron tiempos de retención menores a los compuestos de interés, indicando con esto que el método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia con las condiciones óptimas para el análisis de capsaicinoides es específico.

En los cromatogramas II, III, IV, V y VI se observa una buena resolución que determinó la especificidad del método por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación de los capsaicinoides.

## B. Exactitud.

Se obtuvo el % de capsaicina recuperada, para lo cual se prepararon 4 soluciones de diferente concentración del estándar y se adicionaron a una solución problema.

Bajo las condiciones óptimas, previamente establecidas, se analizaron las soluciones anteriormente mencionadas y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 1 .

Demostración de la exactitud.

Si tenemos los siguientes datos:

$$\bar{X} = 98.5500$$

$$S = 2.1172$$

$$\text{No. de datos } N = 4$$

### 1) Prueba de Hipótesis

$$H_0 : U = 100\%$$

$$H_1 : U \neq 100\%$$

### 2) Modelo probabilístico

$$T_{\text{exp.}} = \frac{\bar{X} - U}{S / \sqrt{N}}$$

### 3) Resultados

$$T_{\text{exp.}} = \frac{98.5500 - 100}{2.1172 / \sqrt{4}}$$

## B. Exactitud.

Se obtuvo el % de capsaicina recuperada, para lo cual se prepararon 4 soluciones de diferente concentración del estándar y se adicionaron a una solución problema.

Bajo las condiciones óptimas, previamente establecidas, se analizaron las soluciones anteriormente mencionadas y se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla I.

Demostración de la exactitud.

Si tenemos los siguientes datos:

$$\bar{X} = 98.5500$$

$$S = 2.1172$$

$$\text{No. de datos } N = 4$$

### 1) Prueba de Hipótesis

$$H_0 : U = 100\%$$

$$H_1 : U \neq 100\%$$

### 2) Modelo probabilístico

$$T_{\text{exp.}} = \frac{\bar{X} - U}{S / \sqrt{N}}$$

### 3) Resultados

$$T_{\text{exp.}} = \frac{98.5500 - 100}{2.1172 / \sqrt{4}}$$

$$= 1.3697$$

$T_{\text{teo}} = t^* 3.1825$  para un nivel de significancia de 0.05 y 3° de libertad.

$$T_{\text{exp.}} < T_{\text{teo.}}$$

Por lo tanto, no se rechaza  $H_0$  y podemos concluir que la técnica es exacta.

RECUPERACION DE CAPSAICINA ADICIONADA, POR EL METODO DE HPLC.

| Cantidad en muestra (mg/ml) | Cantidad adicionada (mg/ml) | Vol. total (ml) | Total (mg/ml) | Encontrados (mg/ml) | Recuperación (%) |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------|---------------------|------------------|
| 0.130                       | 0.092                       | 2               | 0.111         | 0.108               | 97.3             |
| 0.132                       | 0.272                       | 2               | 0.202         | 0.195               | 96               |
| 0.133                       | 0.356                       | 2               | 0.244         | 0.248               | 101.6            |
| 0.130                       | 0.450                       | 2               | 0.29          | 0.288               | 99.3             |

Tabla 1

Media  $\bar{X}$  = 98.5500  
 Desviación estándar  $S$  = 2.1172  
 Coeficiente de varianción  $S^2$  = 1.4825  
 $T_{exp.}$  = 1.3697  
 $T_{teo.}$  = 3.1825

### C. Linealidad.

Para establecer el intervalo lineal se prepararon soluciones del estándar a diferentes concentraciones bajo las condiciones ideales. Los resultados que se muestran en la tabla II, fueron obtenidos para comprobar este parámetro estadístico.

Se obtuvo la curva de calibración de la capsicina ajustada por regresión lineal. (Fig. 8)

| ppm agregados (x) | ppm recuperados (y) |
|-------------------|---------------------|
| 1                 | 1                   |
| 10                | 10                  |
| 100               | 92.5                |
| 200               | 186.2               |
| 300               | 272.25              |
| 400               | 356.05              |
| 500               | 458.05              |

Tabla II

Intercepto a la ordenada

$$a = 1.2155$$

Pendiente

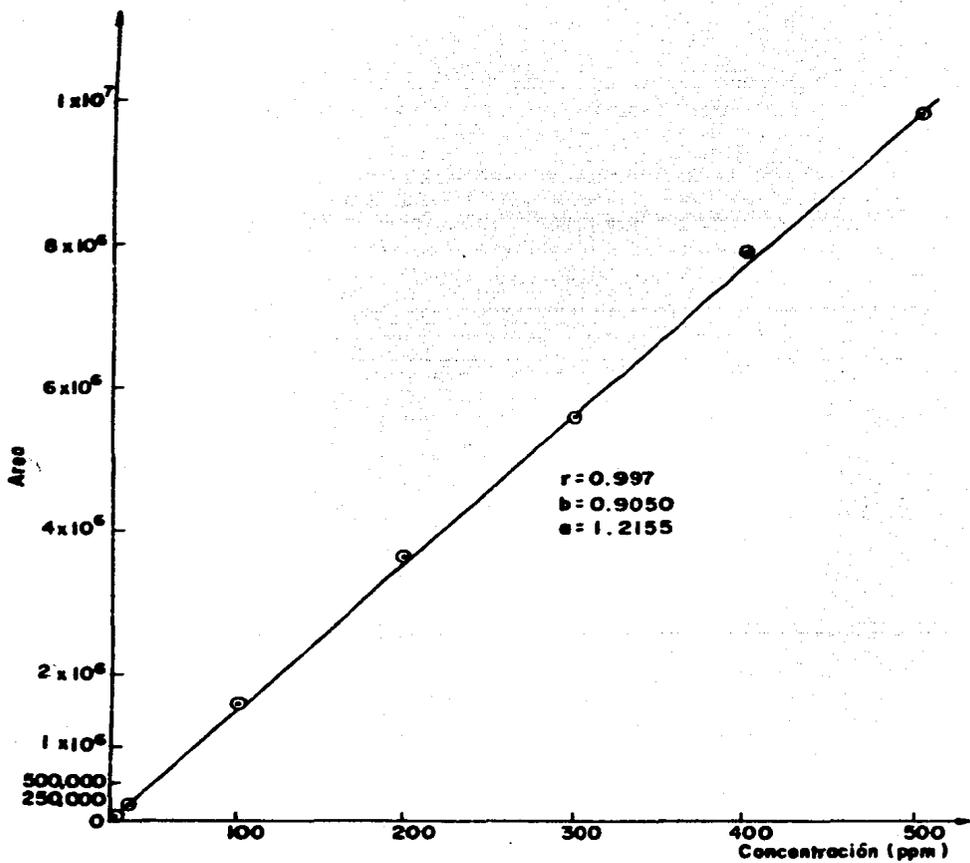
$$b = 0.9050$$

Coefficiente de correlación

$$r = 0.997$$

Por lo tanto, debido a que  $r$  es muy cercano a 1, la técnica es lineal.

El intervalo de concentración lineal se obtuvo entre 1 y 500 ppm y la mínima cantidad detectada por el método fue 1 ppm.



Curva de Calibración de la Capsaicina.

Fig. 8

#### D. Precisión.

Se prepararon soluciones a diferente concentración (1, 100, 300 y 500 ppm de capsaicina) y se analizaron por triplicado según el método, durante un sólo día de trabajo realizado por el mismo analista. Se determinó la desviación estándar y el coeficiente de variación. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla III.

Evaluación de la precisión

| ppm agregados | ppm recuperados | % recuperación |
|---------------|-----------------|----------------|
| 1             | 0.975           | 97.5           |
| 100           | 97.625          | 97.62          |
| 300           | 287.18          | 95.72          |
| 500           | 482.06          | 96.41          |

Tabla III

$$\bar{X} = 96.81$$

$$S = 0.9092$$

$$S^2 = 0.8266$$

Debido a que se obtuvo un coeficiente de variación menor que 2, se puede establecer que el método utilizado para cuantificar a los capsaicinoides descrito en

el presente trabajo es preciso y también puede referirse a la repetibilidad del método.

#### E. Cuantificación de capsaicinoides.

La cuantificación se realizó por estandarización externa, para lo cual se prepararon soluciones patrones del estándar a diferentes concentraciones. Posteriormente, se inyectaron alícuotas iguales de muestras y estándar y se compararon las áreas con las de las concentraciones conocidas.

Se obtuvo una gráfica de calibración de concentraciones conocidas del estándar contra las áreas obtenidas.

Se trataron las muestras en las mismas condiciones y el área que se obtuvo, se interpoló en la gráfica o bien se calculó por el método convencional.

### 6.3 Extracción de capsaicinoides en frutos, callos y agar.

Las metodologías utilizadas para extraer los capsaicinoides del fruto, callos, agar y células en suspensión fueron establecidas y adaptadas a las condiciones de laboratorio.

Se probaron diferentes disolventes, seleccionados con base en la solubilidad de los capsaicinoides. Estos disolventes fueron: acetona, acetato de etilo, metanol, etanol, cloroformo y éter. Se pesaron 5 g. de muestra de callo y agar de una misma especie y se realizó una extracción en frío siguiendo las condiciones señaladas en la sección de métodos (inciso B.2, pag. 31). Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla IV.

En ella se observa que el disolvente que extrae mayor cantidad de capsaicinoides es el metanol. Este experimento se realizó por duplicado obteniendo en ambos, resultados similares.

Con el fin de ver si la cantidad de capsaicinoides extraídos aumentaba por efecto del calentamiento ( $T^{\circ}$  controlada entre  $55-60^{\circ}\text{C}$ ), se efectuaron diversos experimentos de extracción a reflujo en soxhlet siguiendo los pasos que se indican en los métodos (inciso B.1, pag. 31). De los extractos obtenidos en cada reflujo se tomó una alícuota de 10 ml y se analizó según el método de HPLC.

Extracción de Capsaicinoides con diferentes solventes

Especie: *Capsicum pubescens*

I Muestra: callo

| Eter | Cloroformo  | Acetato etilo | EtOH    | MeOH    | Acetona |
|------|---|---------------|---------|---------|---------|
| 0    | Pico de (C)<br>sin buena<br>separación 15ppm<br>* | 0             | 12.8ppm | 35.4ppm | 2.5 ppm |

II Muestra: Agar

|         |   |   |          |           |         |
|---------|---|---|----------|-----------|---------|
| 1.7 ppm | 0 | 0 | 28.8 ppm | 49.35 ppm | 3.1 ppm |
|---------|---|---|----------|-----------|---------|

\* cuantificación por HPLC

TABLA IV.

En este caso se determinó la cantidad total de capsaicinoides extraídos en cada reflujo. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla V. Para este experimento se analizaron el callo y el agar de una misma especie de Capsicum, con un mismo tiempo de crecimiento.

Puesto que la técnica anterior resultaba muy laboriosa y el consumo de disolvente utilizado era muy grande se decidió efectuar cuatro extracciones con metanol en frío determinando el contenido de capsaicinoides en cada una de ellas. Posteriormente, se sumaba el total de las cuatro extracciones. Con estas condiciones se analizaron el callo y el agar de una misma especie de Capsicum con un tiempo igual de desarrollo al del experimento anterior y se obtuvieron los resultados que se muestran en las Tablas VI y VII.

En ellas se observa que la cantidad recuperada de capsaicinoides con cuatro extracciones y metanol en frío es mayor que con extracción a reflujo.

METODO B.1

EXTRACCION DE CAPSAICINOIDES PRESENTES  
EN CALLO Y AGAR, CON MEDIO A REFLUJO (SOXHLET)

Especie: C. annum var. glabriusculum (Chiltepín)

I. CALLO (Edad: 1 mes)

| Muestra | C      | NDC      | HC  | DHC   | HDC | Total  |
|---------|--------|----------|-----|-------|-----|--------|
| R # 1   | 0.003* | 0.007    | --- | 0.022 | --- | 0.032  |
| R # 2   | 0.016  | 0.022    | --- | 0.026 | --- | 0.064  |
| R # 3   | 0.017  | 0.023    | --- | 0.038 | --- | 0.078  |
| R # 4   | 0.004  | 0.016    | --- | 0.008 | --- | 0.028  |
| R # 5   | 0.008  | presente | --- | 0.001 | --- | 0.0018 |
| R # 6   | 0.0016 | -        | --- | ---   | --- | 0.0016 |

\* mg/gr callo

II. AGAR

| Muestra | C        | NDC    | HC  | DHC   | HDC | Total |
|---------|----------|--------|-----|-------|-----|-------|
| R # 1   | presente | 0.021* | --- | 0.010 | --- | 0.031 |
| R # 2   | 0.007    | 0.026  | --- | 0.003 | --- | 0.036 |
| R # 3   | 0.008    | 0.045  | --- | 0.035 | --- | 0.088 |
| R # 4   | presente | 0.013  | --- | 0.023 | --- | 0.036 |
| R # 5   | 0.001    | 0.011  | --- | 0.010 | --- | 0.022 |

\* mg/gr agar

R= una extracción en soxhlet  
Temperatura constante.

TABLA V.

METODO B.2

EXTRACCION DE CAPSAICINOIDES PRESENTES EN  
CALLO, CON MECH EN FRIO

Especie: C. annum var. glabriusculum (Chiltepin)  
Edad (1 mes)

| Muestra | C | NDC    | HC | DHC   | HDC | Total         |
|---------|---|--------|----|-------|-----|---------------|
| E # 1   | - | 0.039* | -- | 0.010 | -   | 0.049         |
| E # 2   |   | 0.037  |    | 0.019 | -   | 0.056         |
| E # 3   |   | 0.007  |    | 0.006 |     | 0.013         |
| E # 4   | - | 0.0009 | -- | 0.004 | -   | 0.0049        |
| E # 5   | - | --     | -- |       | -   | -             |
| Total   |   |        |    |       |     | <u>0.1229</u> |

\* mg/gr callo

MECH FRIO 0.1229 MG/G CALLO

MECH REFLUJO 0.076 MG/G CALLO

TABLA VI.

METODO B.2

EXTRACCION DE CAPSAICINOIDES EN AGAR,  
CON MECH EN FRIO

Especie: C. annuum var. glabriusculum (Chiltepin)

Edad: 1 mes

| Muestra | C        | NDC   | HC  | DHC   | HDC | T o t a l    |
|---------|----------|-------|-----|-------|-----|--------------|
| E#1     | 0.003*   | 0.004 | --- | 0.011 | --- | 0.016        |
| E#2     | 0.005    | 0.014 | --- | 0.021 | --- | 0.04         |
| E#3     | 0.002    | 0.035 | --- | 0.042 | --- | 0.079        |
| E#4     | presente | 0.005 | --- | 0.006 | --- | 0.011        |
| E#5     | ---      | ---   | --- | ---   | --- | ---          |
|         |          |       |     |       |     | <u>0.148</u> |

\* mg/gr Agar

MeOH frío 0.148 mg/g Agar

MeOH reflujo 0.083 mg/g Agar

TABLA VII.

Para corroborar lo anterior se efectuaron experimento con tres diferentes condiciones de extracción y se analizaron dos frutos de especies distintas. En la Tabla VIII se muestran los resultados obtenidos. Se observa que con la extracción con metanol en frío y agitación durante 10 minutos se extrae mayor cantidad de capsaicinoides.

APLICACION Y COMPARACION DE LOS METODOS DE EXTRACCION  
EN EL FRUTO DE DOS ESPECIES DE Capsicum.

Especies: C. annum var. glabriusculum (Chiltepin) 1  
C. chinense (Habanero) 2

I. EXTRACCIONES EN FRIO CON METANOL

| Muestra | C     | NDC  | HC   | DHC  | HDC | Total |
|---------|-------|------|------|------|-----|-------|
| 1       | 4.46* | 0.37 | ND   | 0.22 | ND  | 5.05  |
| 2       | 13.6  | ND   | 0.32 | 0.38 | ND  | 14.3  |

\* mg/g fruto seco.

II. EXTRACCIONES EN FRIO CON METANOL + AGITACION

| Muestra | C     | NDC | HC   | DHC  | HDC | Total |
|---------|-------|-----|------|------|-----|-------|
| 1       | 7.64* | 0.6 | 0.23 | 0.28 | ND  | 8.75  |
| 2       | 14.43 | ND  | 0.22 | 0.34 | ND  | 15    |

\* mg/g fruto seco.

III. EXTRACCIONES CON METANOL (SOCHLET) 3 REFLUJOS

| Muestra | C     | NDC | HC  | DHC  | HDC | Total |
|---------|-------|-----|-----|------|-----|-------|
| 1       | 6.9*  | 0.4 | ND  | 0.3  | ND  | 7.6   |
| 2       | 13.62 | ND  | 0.2 | 0.32 | ND  | 14.4  |

\* mg/g fruto seco.

ND= NO DETECTABLE.

TABLA VIII.

#### 6.4 Determinación del contenido de capsaicinoides en fruto, callo, agar y células en suspensión.

Una vez alcanzadas las condiciones experimentales óptimas y después de haber efectuado diversas pruebas preliminares se obtuvieron los siguientes resultados:

- Determinación del contenido de capsaicinoides en 10 frutos de diferente especie de Capsicum. Tabla IX
- Determinación del contenido de capsaicinoides en callos y agar. Tablas V, VI y VII.
- Determinación del contenido de capsaicinoides en células en suspensión. Tabla X

CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN EXTRACTO DE  
DIFERENTES ESPECIES DE *Capsicum*  
POR HPLC

| Muestra   | C      | NDC      | HC       | DHC      | HDC      | Total |
|---|--------|----------|----------|----------|----------|-------|
| <i>C. annuum</i> var.<br><i>glabriusculum</i><br>(paradito)                   | 9.148* | 1.1      | presente | 4.7      | presente | 14.94 |
| <i>C. annuum</i> var.<br><i>glabriusculum</i><br>(chiltepin)                  | 7.54   | 0.06     | 0.023    | 0.028    | presente | 7.75  |
| <i>C. annuum</i> var.<br><i>annuum</i> (agua)                                 | 1.1    | ---      | ---      | 0.73     | ---      | 1.83  |
| <i>C. chinense</i><br>(Habanero)  | 18.8   | presente | 1.02     | 5.77     | presente | 25.6  |
| <i>C. pubescens</i><br>(Peron)  | 1.9    | ---      | ---      | presente | ---      | 1.9   |
| <i>C. annuum</i> (Tusta)  | 2.83   | ---      | 0.67     | 1.92     | ---      | 5.42  |
| <i>C. annuum</i> var.<br><i>annuum</i> (Jalapeño)                             | 0.61   | ---      | ---      | ---      | ---      | 0.61  |
| <i>C. annuum</i> var.<br>Tampiqueño 74<br>(Serrano)                           | 0.86   | ---      | ---      | ---      | ---      | 0.86  |
| <i>C. annuum</i> var.<br><i>glabriusculum</i><br>(Piquín morco)               | 8.82   | 0.318    | presente | 2.42     | presente | 11.55 |
| <i>C. annuum</i> var.<br><i>glabriusculum</i><br>(Piquín mira para<br>arriba) | 13.07  | 0.26     | 0.26     | 3.17     | presente | 16.76 |

Extracción con MeOH en frío + agitación

\*mg/gr peso seco.

TABLA IX

CONTENIDO DE CAPSAICINOIDES EN EXTRACTO DE  
CELULAS EN SUSPENSION.

Especie: C. annuum var. papaloapan

| t (días) | ug cap's/lt |
|----------|-------------|
| 6        | 667.0       |
| 8        | 7.20        |
| 15       | N.D         |
| 22       | 121.2       |
| 34       | 228.6       |
| 39       | 72.0        |

N.D= no detectable

Tabla X

## VII. C O N C L U S I O N E S .

1. La técnica cromatográfica de HPLC utilizada para caracterizar capsaicinoides en fruto, callo, agar y células en suspensión es exacta, específica, precisa y sensible. Además permite efectuar análisis en tiempos relativamente cortos.
2. La Técnica desarrollada por Johnson y Bowman fué seleccionada en virtud de que utiliza menor cantidad de disolvente y, por tanto, se disminuyó el costo del análisis.
3. La técnica de HPLC, descrita en el presente trabajo, permite analizar capsaicinoides en sustitución de técnicas colorimétricas y cromatográficas de papel, capa fina o CG. Estas técnicas que son también utilizadas para este tipo de análisis, ofrecen varias desventajas sobre el HPLC; en general su especificidad, exactitud y sensibilidad son pobres. En el caso particular de la CG, su desventaja primordial radica en el hecho de tener que formar un derivado de los capsaicinoides aumentando la dificultad en la determinación.
4. Para extraer capsaicinoides de frutos, callos o agar se utiliza 4 extracciones con metanol en frío y con

agitación. La cantidad que se extrae por este método es apreciable. Existen otras sustancias que se extraen con los capsaicinoides, pero se separan por el método de HPLC y no interfieren en los tiempos de retención de los compuestos de interés. Los capsaicinoides son compuestos que a temperaturas mayores de 65°C se descomponen o degradan.

5. Los capsaicinoides separados en el caso del fruto fueron similares a los del estándar. Se encontró que, en todos los casos, el contenido mayor es de capsaicina y dihidrocapsaicina.

6. En el caso del callo y el agar, el capsaicinoide que se encuentra en mayor cantidad en la especie analizada, es la NDC; esto se verificó mediante coinyección con el estándar.

7. Para extraer los capsaicinoides presentes en células en suspensión se adaptó la técnica de Lindsey (ver métodos, inciso B.3), con la cual se obtuvo buena recuperación. Para la especie que se analizó en este caso, la mayor cantidad encontrada fué de C.

8. El contenido de capsaicinoides en las distintas muestras puede variar dependiendo de varios factores, entre los cuales se enumeran los siguientes:

- especie
- condiciones de luz y temperatura

- medio de cultivo utilizado para crecer los callos o las células en suspensión
- adición de hormonas y precursores
- pH
- disolvente utilizado

9. En el caso de los frutos el contenido de capsaicinoides es mayor con respecto a los del callo y células en suspensión. El chile habanero es el que contiene mayor cantidad de capsaicinoides por lo que su picor aumenta considerablemente en comparación con otras especies.

VIII. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1. Bajaj L. Krishan (1980) "Colorimetric determination of capsaicin in Capsicum fruits"  
J. of Anal. Chem.; 63 (6); 1314-1316.
2. Bowman W.R y Col. (1969) "Biosynthetic incorporation of (B-<sup>14</sup>C; 3,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>; 4-<sup>3</sup>H) cinamic acid into capsaicin and norpluvine: lack of an apparent isotope effect following and NH shift".  
J. Chem. Soc. "D" Chem. Commun.; 18; 1075-1077.
3. Buck H. Stephen y Burks T.F (1983) "Capsaicin: hot new pharmacological tool."  
Trends Pharmacol. Sci.; 4 (2); 84-87.
4. Chudapongse P. y Col. (1976) "Studies on the effect of capsaicin on metabolic reactions of isolated rat liver mitochondria".  
Toxicology and App. Pharm.; 37; 263-270.
5. Fujiwake Hideshi y Col. (1980) "Intracellular localization of capsaicin and its analogues in Capsicum fruits II. The vacuole as the intracellular accumulation site of capsaicinoid in the protoplast of Capsicum fruit!"

Plant & Cell. Physiol.; 21 (6) ; 1023-1030.

6. Fujiwake Hideshi y Col. (1982) "Capsaicinoid formation in the protoplast of the placenta of Capsicum fruits". Agric. Biol. Chem.; 46 (10); 2591-2592.
7. Fujiwake Hideshi y Col. (1982) "Intracellular distributions of enzymes and intermediates involved in biosynthesis of capsaicin and its analogues in Capsicum fruits" Agric. Biol. Chem.; 46 (11); 2685-2689.
8. Hadden Nina y Col. (1971) "Basic Liquid Chromatography". U.S.A  
Copyright, Varian Aerograph.
9. Heiser C.B. (1969) "Systematics and the origin of cultivated plants." Taxonomic.; 18; 36-45.
10. Hoffman y Col. (1983) "Separation and quantitation of reed pepper major heat principles by Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography." J. Agric. Food Chem.; 31; 1326-1330.
11. Johnson and Bowman (1982) "Trace analysis of natural capsaicinoids in animal feed, human urine and wastewater by high- pressure liquid chromatography."

- J. Agric. Chem.; 30; 324-329.
12. Joint Comm. of the Pharm. Soc. and the Soc. for Anal. Chem. on Mets. of assay of crude drugs (1959) "The determination of the content of Capsicum and its preparations" Analyst; 84; 603-617.
13. Kap-Rang Lee (1976) "Quantitative microanalysis of the capsaicin, dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin -- using Mass Fragmentography." J. of Chrom.; 123; 119-128.
14. Kazuo Iwai y Col. (1975) "Simultaneous microdetermination of capsaicin and its analogues by using High-Performance Liquid Chromatography and CG-MS." J. of Chrom.; 172; 303-311.
15. Kazuo Iwai y Col. (1977) "Formation of pungent principles in fruits of sweet pepper, Capsicum annuum L. var. grossum during post-harvest ripening under continuous light." Agric. Biol. Chem.; 41 (10); 1873-1876.
16. Koop B. and Jerenitsch J. (1981) "Biosynthesis of capsaicinoids in C. annuum L. var. annuum; formation of the fatty acid moiety of the capsaicinoids from L-valine, L-leucine and L-isoleucine."

- Planta Médica; 43; 272-279.
17. Leete Edward Y Mary C. Louden (1968) "Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in Capsicum frutescens." J. Amer. Chem. Soc.; 50; 6837-6841.
  18. Lega C. Mary (1984) "HPLC in the flavor/spice industry" Food Techn.; April; 84-87.
  19. Lindsey Keith y Col. (1984) "The synthetic potential of immobilised cells of Capsicum frutescens Mill c.v - annuum." Planta; 162; 495-501.
  20. Long Solis J. (1982) "El Capsicum y su influencia en la cultura." TESIS, Doctoral Universidad Iberoamericana.
  21. Maga A. Joseph (1975) "Capsicum." Critical. Rev. Food Sci.; 2; 177-199.
  22. Miller S. Matthew y Col. (1985) "Interaction of capsaicinoids with drug-metabolizing systems." Bioch. Pharm.; 32; (3); 547-551.
  23. Merck Index Tenth Ed.; 1741; 243-244.

24. Paredes L. (1986) "La biotecnología de las plantas: una herramienta estratégica en los programas agroalimentarios de México."  
Ciencia y Desarrollo; 68;
25. Ping Ki y Col. (1982) "Decreased total serum, myocardial and aortic cholesterol levels following capsaicine treatment."  
IRCS Medical Sci.; 10; 446-447.
26. Robert L.M. y Loyola V. (1985) "El cultivo de tejidos vegetales en México."  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
Ciudad Universitaria. 04510
27. Robert M. Virus y Col. (1979) "Pharmacologic actions of capsaicin; apparent involvement of substance P and serotonin."  
Life Sciences; 25; 1273-1284.
28. Rajalakshmi D. y Col. (1986) "Capsicum-production, technology, chemistry and quality."  
CRC Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition; 25;  
185-276.
29. Spanyar P. and Plazovich M. (1969) "A thin layer chromatographic method for the determination of capsaicin

in ground paprika."

Analyst; 94; 1084-1089.

30. Snyder L. and Kirkland J. (1979) "Introduction to modern liquid chromatography."  
2da. Ed. John Wiley and Sons.  
Inc, New York.
31. Tetsuya Suzuki (1980) "Effective separation of capsaicin and its analogues by reversed-phase high performance thin layer chromatography."  
J. of Chrom.; 198; 217-223.
32. Tetsuya Suzuki (1980) "Intracellular localization of capsaicin and its analogues capsaicinoid in Capsicum fruit."  
Plant & Cell. Physiol.; 21 (5); 839-853.
33. Tirimana A.S.L (1972) "Quantitative determination of the pungent principle (capsaicin) of ceylon chillies (Capsicum sp)."  
Analyst; 97; 372-375.
34. Tood P.H (1969) "Gas-liquid chromatography analysis of Capsicum amides."  
Food Techn.; 15; 269-272.
35. Tood. P.H y Col. (1975) "TLC screening techniques for the

quantitative determination of natural and synthetic capsaicinoids."

J. of Chrom. Sci.; 13; 577-579.

36. Yost R.W y Col. (1980) "Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica."

Perkin- Elmer.

U.S.A

37. Weaver Kenneth and Awdw Donald (1980) "Rapid high performance liquid chromatography method for the determination of very low capsaicin levels."

J. of Chem.; 367; 438-442.