

91
29



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EXTRACCION, CARACTERIZACION Y ESTABILIDAD
DE LOS PIGMENTOS DE CHILE ANCHO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A N :

JULIAN SAWAYA MANZUR

ALEJANDRO SOLANO PERALTA

ASESORES

DRA. SARA E. VALDES MARTINEZ

DR. PEDRO VALLE VEGA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

	PAG.
RESUMEN	1
1 OBJETIVOS	3
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos particulares	3
2 INTRODUCCION	4
3 GENERALIDADES	8
3.1 Colorantes	8
3.1.1 Importancia	8
3.1.2 Legislación y clasificación	9
3.2 Carotenoides	10
3.2.1 Características y clasificación	10
3.2.2 Carotenos: características y clasificación	14
3.2.3 Xantófilos: características y clasificación	16
3.2.4 Capsanteno: características físicas y químicas.	16
3.2.5 Métodos comunes de análisis	17
3.3 <i>Capsicum annuum</i> (chile)	20
3.3.1 <i>Capsicum annuum</i> var. <i>grossum</i> (chile ancho): características	21
3.3.2 <i>Capsicum annuum</i> var. <i>longum</i> (Paprika): características	24

4	DISEÑO EXPERIMENTAL	27
4.1	Extracción de los pigmentos	27
4.1.1	Método 1	29
4.1.2	Método 2	30
4.2	Determinación de rendimiento en peso seco	30
4.3	Determinación de longitud de onda de máxima absorbancia	31
4.4	Determinación de Unidades de Color (U.C.)	32
4.5	Pruebas de estabilidad (cinética)	33
4.5.1	Tratamiento matemático	36
4.6	Análisis Cromatográfico	39
4.6.1	<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución</i>	39
4.6.2	Cromatografía en capa fina (CCF)	42
4.7	<i>Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Rápidos</i>	42
4.8	Identificación de ácidos grasos presentes	44
4.8.1	Transesterificación	44
4.8.2	Cromatografía de gases-espectrometría de masas por impacto electrónico (CG-EMIE)	45
5	RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
5.1	Extracción de los pigmentos	47
5.2	Rendimiento en peso seco	47
5.3	Longitud de onda de máxima absorbancia	48
5.4	Unidades de Color (U.C.)	50
5.5	Pruebas de estabilidad (cinética)	50
5.5.1	Tratamiento matemático	53

INDICE DE FIGURAS, GRAFICAS Y TABLAS

	PAG.
F- 1 Clasificación y estructura de algunos carotenoides	12
F- 2 Esquema biosintético de algunos carotenoides	15
F- 3 Precursores del capsanteno	18
F- 4 Degradación del capsanteno	19
T- 1 Clasificación botánica del chile ancho	21
F- 5 Esquema general de las especies <i>Capsicum annuum</i>	22
T- 2 Clasificación botánica de la Paprika	25
F- 6 Diseño experimental (diagrama de flujo)	28
F- 7 Factores a los que se sometieron los pigmentos	34
G- 1 Flujo de solventes en la <i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución</i>	41
F- 8 Reacción de Transesterificación	44
T- 3 Condiciones de operación en la cromatografía de gases	46
G- 2 Longitud de onda de máxima absorbancia del capsanteno	49
F- 9 Mecanismo probable de la solubilidad del capsanteno en medio básico	52
T- 4 Datos de las gráficas 3 a 10	54
G- 3 Comportamiento del pigmento 1 a pH 2	55
G- 4 Comportamiento del pigmento 2 a pH 2	56
G- 5 Comportamiento del pigmento 3 a pH 2	57
G- 6 Comportamiento del pigmento 4 a pH 2	58
G- 7 Comportamiento del pigmento 1 a pH 12	59
G- 8 Comportamiento del pigmento 2 a pH 12	60
G- 9 Comportamiento del pigmento 3 a pH 12	61

5.6	Análisis Cromatográfico	63
5.6.1	<i>Cromatografía Líquida de Alta Resolución</i>	63
5.6.2	<i>Cromatografía en capa fina (CCF)</i>	68
5.7	<i>Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Rápidos</i>	69
5.8	Ácidos grasos presentes	70
6	CONCLUSIONES	75
7	BIBLIOGRAFIA Y HEMEROGRAFIA	79
8	APENDICE	89

G-10 Comportamiento del pigmento 4 a pH 12	62
G-11 Cromatograma del pigmento 1	64
G-12 Cromatograma del pigmento 2	65
G-13 Cromatograma del pigmento 4	66
G-14 Cromatograma del eluyente	67
T- 5 Cromatografía en capa fina	68
T- 6 Acidos grasos presentes en chile ancho y Paprika	70
G-15 Espectro de masas del pigmento 1 a t_R de 1:596	71
G-16 Espectro de masas del pigmento 1 a t_R de 2:128	72
G-17 Cromatograma de gases del pigmento 1 transesterificado	74

Apéndice

G-18 Espectro de masas (EMIE) del ác. Oleico para P1	89
G-19 Espectro de masas (EMIE) del ác. Palmítico para P1	90
G-20 Espectro de masas (EMIE) del éster del ácido Esteárico para P1	91
G-21 Espectro de masas (EMIE) del éster del ácido Linoleico para P1	92
G-22 Espectro de masas (EMIE) del éster del ácido Mirístico para P1	93
G-23 Espectro de masas (EMIE) posiblemente del éster del ácido Oleico para P1	94
G-24 Espectro de masas (EMIE) del éster del ácido Palmítico para P1	95

RESUMEN

EXTRACCION, CARACTERIZACION Y ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS DE CHILE ANCHO. Sawaya M.J. (1), Solano P.A. (1), Valdés M.E. (1) y Valle V.P. (2). (1) FESC-UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, (2) Facultad de Química, UNAM.

Dada la actual tendencia a la búsqueda y uso de colorantes naturales, se probaron 2 procesos de extracción diferentes para pigmentos de chile ancho: uno con antioxidante (P1), mismo que permitió el estudio del pigmento sin interferencia de degradación por oxígeno atmosférico, y otro sin él (P4); los pigmentos obtenidos (el capsanteno predomina) se compararon con oleorresina comercial de paprika (P2) y extracto comercial de chile ancho (P3). Se determinó el rendimiento en peso seco de P1 y P2, así como la longitud de onda de máxima absorbancia. Se realizaron pruebas de estabilidad en función de 3 variables (pH, luz visible y temperatura) en 2 niveles de trabajo por 16 días. Se efectuó el análisis cromatográfico vía *Cromatografía Líquida de Alta Resolución* (HPLC por sus siglas en Inglés) para P1, P2 y P4 en columna C₁₈ (no polar) de 25 cm de longitud con metanol y acetato de etilo como eluyentes, usando gradiente lineal por 20 min, y flujo de 1.8 ml / min, con detección espectrofotométrica a 460 nm. Se realizó el análisis de P1 vía *Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Rápidos* (FAB-MS por sus siglas en Inglés) para establecer su composición, así como la identificación de ácidos grasos vía *Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico* (EMIE).

Los rendimientos fueron: P1 = 2.77 %, P4 = 2.1 %. Lambda máxima fue de 460 nm; en general hubo mayor solubilidad en medio básico; en el análisis de estabilidad se observaron procesos de degradación, solubilidad y oxidación; la degradación de las diversas pruebas hechas a P1, P3 y P4 obedeció para una ecuación de reacción de primer orden ($\ln C/Co = -kt$), mientras que P2 para una de segundo orden ($1/C = 1/Co + kt$). La luz visible y la temperatura aceleraron los procesos en cuestión (solubilidad o degradación, siendo éste último más importante). El pigmento con vida media mayor (5594 hrs.) fue P1 a pH 12. Los 3 cromatogramas presentan 2 picos base en tiempos (t_R) cercanos a 2 y 13 minutos. Se concluye que P1 es el mejor de los pigmentos (aunque el método de extracción sea laborioso); la longitud de onda de absorbancia máxima en la mezcla de pigmentos de chile ancho es de 460 nm.; es importante la saponificación y uso de conservadores durante la extracción; el comportamiento general de los pigmentos es mejor a baja temperatura y sin luz, aunque se presentan probablemente procesos de saponificación, solubilidad, polimerización, isomerización y degradación; el pH básico permitió mayor solubilidad al parecer debido a la formación de sales y saponificación; el chile ancho presenta al capsanteno como el constituyente de un 80 % de sus pigmentos rojos y como ácido graso predominante al ácido palmítico.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar y caracterizar los pigmentos de chile ancho.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Implementar proceso de extracción para pigmentos de chile ancho, con un máximo rendimiento.

Comparar los pigmentos obtenidos con muestras de oleorresina de paprika y extracto de chile ancho comerciales.

Realizar pruebas de estabilidad en función de pH, luz y temperatura para las 4 muestras, con el fin de saber el orden de importancia de los mismos.

Realizar análisis vía *Cromatografía Líquida de Alta Resolución* (HPLC) de la oleorresina comercial de paprika y chile ancho comercial, así como de los extractos obtenidos, para comparar los picos base entre ellos y con los reportados en la literatura.

Establecer la composición del extracto de chile ancho vía *Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Rápidos* (FAB-MS).

2 INTRODUCCION

El primer contacto que tiene el hombre con cada uno de los objetos que le rodean es eminentemente visual. Decimos que de la vista nace el amor y no es para menos, ya que una cosa que nos es agradable a la vista frecuentemente lo es también para los demás sentidos.

Dentro de la apariencia de una cosa, el color constituye una propiedad importante, ya que sugiere diferentes características para los objetos y/o productos que lo poseen, acrecentando o disminuyendo el gusto del consumidor hacia ellos. De ahí la importancia del color a nivel industrial: éste es indispensable para el consumidor moderno en la rápida identificación y última aceptación de diversos productos, como por ejemplo los alimentos⁽²⁷⁾. El uso de colorantes naturales o artificiales permite cambiar, atenuar, acentuar o estabilizar el color de los productos.

Los colorantes empleados en alimentos para lograr los efectos antes mencionados, se clasifican en naturales (no certificados) y artificiales (certificados⁽²⁷⁾); estos últimos, a pesar de ser considerablemente más baratos, están siendo restringidos cada vez más por sus efectos tóxicos, sobre todo desde que se conocieron los efectos cancerígenos del alquitrán de hulla.

Los colorantes certificados están reglamentados para utilizarse en concentraciones límite en alimentos, medicamentos, etc., y requieren permiso de la Secretaría de Salud. Los colorantes no certificados, mismos que pueden obtenerse a partir de minerales, animales o vegetales, no se hallan reglamentados dado que a la fecha no se ha encontrado que provoquen daños a la salud⁽²⁷⁾.

Dentro de la aplicación de colorantes sintéticos rojos, existe restricción para su uso en alimentos, medicamentos y bebidas, debido a la evidencia toxicológica en su contra^(27, 62); esta situación ha provocado la búsqueda de otros colorantes rojos, entre ellos naturales, que sustituyan a los sintéticos existentes.

Los colorantes naturales así como los carotenos sintéticos de naturaleza idéntica a los naturales no han sido restringidos: la tendencia hacia lo natural está en apogeo.

Dentro de los colorantes rojos naturales se encuentra el capsantino (Fig. 1); éste pertenece a la familia de los xantófilos, que a su vez procede de la familia de los carotenos (fórmula general $C_{40}H_{56}$), que a su vez proceden de los carotenoides, los cuales son considerados lípidos y por ende son solubles en lípidos y disolventes como acetona, alcohol, cloroformo y dietil éter.

A pesar de provenir de un *beta-caroteno* no se ha encontrado que el **capsanteno**, (3R, 3'S, 5'R)-3, 3'- dihidroxi- β, η -caroten-6'ona, sea precursor de la vitamina A⁽⁷⁾, misma que si lo es de los retinoides, responsables directos de la visión en el ser humano.

Una fuente natural de **capsanteno** es el chile ancho (*Capsicum annuum* var. *grossum*); este vegetal ha sido común por siglos en la dieta diaria del mexicano y se le puede encontrar en prácticamente toda la república.

En el chile ancho el **capsanteno** es el pigmento predominante^(2, 29), siendo áltamente colorido gracias a los dobles enlaces conjugados que presenta en su estructura, los cuales a su vez le hacen sensible a la luz, el calor, el oxígeno y el pH.

Por otro lado, la oleoresina de **paprika** es un colorante de importancia a nivel industrial, que se extrae del *Capsicum annuum* L. y que contiene como pigmentos predominantes capsanteno y capsorrubina^(7, 30).

El enfoque del presente trabajo es meramente químico, con el fin de caracterizar un colorante obtenido a partir de chile ancho y compararlo con muestras de colorantes comerciales (oleoresina de paprika y extracto de chile ancho). Aunque los objetivos no incluyen la aplicación de los citados colorantes en alimentos,

aquellos, por su origen natural, constituyen un campo de aplicación potencial muy importante en la industria alimentaria.

3 GENERALIDADES

3.1 COLORANTES

Aunque cotidianamente y en éste trabajo se utilizan indistintamente las palabras "colorante" y "pigmento", algunos autores suelen definirlos como 2 cosas distintas. De este modo, colorante es "toda aquella sustancia soluble capaz de transmitir coloración a otros cuerpos de una forma más o menos permanente" (22), mientras que pigmento es "aquél compuesto químico capaz de dar color y que es insoluble en el compuesto en el cual se usa" (4).

De manera muy general podemos considerar 2 formas comerciales de colorantes, que son tinte: "Compuesto hidrosoluble que manifiesta su poder tintóreo al disolverse" (27), se le halla comercialmente en concentraciones cercanas al 90 % de principio activo y en diferentes presentaciones; y laca: "Compuesto soluble en disolventes orgánicos, tratado generalmente en un sustrato de alúmina hidratada, que imparte color por dispersión" y se le halla comercialmente del 10 al 50 % de principio activo (27).

3.1.1 IMPORTANCIA

La importancia de los colorantes radica en impartir un aspecto más agradable y atractivo sobre el producto a colorear.

En el caso de los colorantes naturales, éstos son especialmente importantes en la industria alimentaria, donde es esencial considerar el aspecto toxicológico (y en algunos casos hasta nutricional) que puede representar la ingestión de los mismos.

3.1.2 LEGISLACION Y CLASIFICACION

En el caso de los alimentos, el uso de colorantes está sujeto a restricciones, diferentes en cada país, aún cuando diversos organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en Inglés), traten de regularlos en busca de su libre comercio a nivel mundial.

En México, la Secretaría de Salud regula el uso de aditivos alimentarios (entre ellos los colorantes) mediante el *Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios* publicado en el Diario Oficial de la Federación el 18 de Enero de 1988, donde se define a un colorante como "aquella sustancia obtenida de los vegetales, animales o minerales, o por síntesis química para impartir o acentuar el color".

Dicho reglamento reconoce 3 subdivisiones de los colorantes, a saber:

I.- Colorantes orgánico-naturales. Son el aceite de zanahoria, achiote, annato, azafrán, β -apo-8-carotenal, betabel deshidratado, β -caroteno, caramelo, cochinilla, clorofila, cúrcuma, extracto de tegumento de uva, harina de semilla de algodón cocida, tostada y parcialmente desengrasada, jugos de frutas, jugos de vegetales, pimienta, pimienta-oleoresina, Riboflavina y Xantófilos.

Estos colorantes están exentos de certificación por considerarse inocuos.

II.- Colorantes orgánicos sintéticos o colorantes artificiales. Son el amarillo # 5 (Tartrazina), azul # 1 (azul brillante F.C.P.), azul # 2 (indigotina), rojo # 3 (eritrosina), rojo cítrico # 2 (solo se permite para colorear la corteza de naranja), rojo # 40 y verde # 3 (verde firme F.C.F.).

III.- Colorantes orgánico-mineral y mineral. Ellos son respectivamente el gluconato ferroso y el dióxido de titanio.

3.2 CAROTENOIDES

3.2.1 CARACTERISTICAS Y CLASIFICACION

Los carotenoides, al igual que las clorofilas, representan una de las clases más extendidas de colorantes en animales y

plantas superiores, siendo responsables de la coloración en zanahoria, tomate, chile, jugo de naranja, langosta, etc. Su esqueleto básicamente se compone de 8 unidades isoprenoides. Algunas de sus funciones biológicas importantes son las de proveer pigmentos para la fotosíntesis, proteger los aparatos fotosintéticos contra el posible daño de la luz visible; además, de los aproximadamente 600 carotenoides identificados, un 10% son precursores de retinoides⁽⁴⁷⁾. Los carotenoides se pueden clasificar en 2 grupos principales, "carotenos" y "xantófilos" (Fig. 1).

Los carotenoides se consideran lípidos, por lo que son solubles en lípidos y solventes como acetona, alcohol, dietil éter y cloroformo. Son además resistentes a medios alcalinos⁽³⁰⁾.

En general son fácilmente oxidables (la reacción se realiza vía radicales libres), sobretodo en presencia de luz y calor. Por lo anterior se suelen emplear antioxidantes en su preparación, principalmente fenoles (por ejemplo Butil hidroxitolueno), aminas aromáticas y compuestos sulfurados⁽²³⁾.

Existen en la naturaleza en forma *trans* y muchos presentan actividad óptica. Cuando son sometidos a luz, calor o ácido, ocurren isomerizaciones, resultando una mezcla de estereoisómeros⁽²⁰⁾.

CLASIFICACION Y ESTRUCTURA DE ALGUNOS CAROTENOIDES (7)

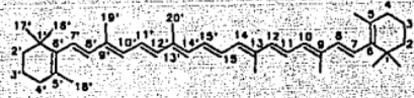
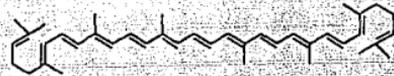
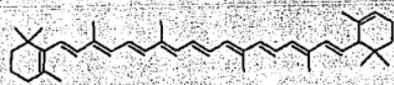
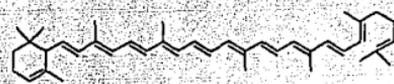
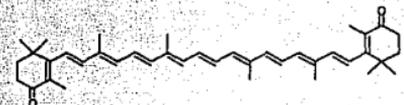
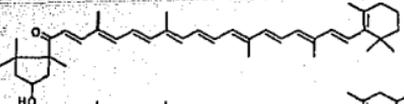
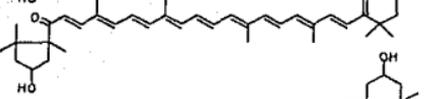
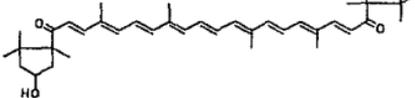
Nombre trivial	Estructura	Actividad Provit. A
CAROTENOS		
β -CAROTENO		100 %
LICOPENO		INACTIVO
α -CAROTENO		50 - 54 %
δ -CAROTENO		INACTIVO
XANTOFILOS		
CANTAXANTINA		INACTIVO
CRIPTOCAPSINA		Posib. activo
CAPSANTENO		INACTIVO
CAPSORRUBINA		INACTIVO

Fig. 1

Los carotenoides funcionales requieren, para la absorción en el visible, de un cromóforo de tamaño adecuado; éste debe contener suficientes dobles enlaces olefínicos conjugados para dar lugar a carotenoides amarillos (de 7 a 11 de esos enlaces), naranjas (de 9 a 12) o rojos (de 11 a 13). Para una buena función de fotoprotección, el carotenoide requiere de al menos 9 dobles enlaces conjugados. La molécula debe ser lo suficientemente larga como para acomodar los cromóforos conjugados y tener cierta rigidez (del cromóforo) que imparta dureza estructural contra cualquier membrana de la que el carotenoide sea constituyente. Además de una mínima longitud, la molécula debe tener suficientes sustituyentes no polares (ej. grupos metilo) para tener afinidad lipofílica a los componentes de las membranas bicapa y suficientes sitios polares (ej. oxígeno) en uno ó 2 extremos por si se requiere anclar la molécula, como en el caso de complejos proteínicos⁽¹⁸⁾.

Los carotenoides más usados como colorantes son el β -apo-8'-carotenal (rojo), la cantaxantina (rojo púrpura) y el β -caroteno (rojo-naranja); este último emplea en su síntesis para darle estabilidad, antioxidantes como butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), Alfa-tocoferol y palmitato ascórbico^(20, 30).

A nivel comercial tienen aplicaciones como colorantes de mantequillas, margarinas, helados, aceites, bebidas, sistemas acuosos, etc.⁽⁴³⁾, así como en huevo de gallina y otros

productos⁽⁷⁾. El cuerpo humano absorbe y almacena carotenoides de manera relativamente inselectiva, por lo que podemos hallarlos en hígado, sangre y grasa de la leche materna⁽⁷⁾, así como en la piel, donde una de sus funciones es proteger al organismo contra radiaciones de alta energía⁽⁴⁶⁾; la biosíntesis de diversos carotenoides se esquematiza en la Fig. 2.

Las compañías que a nivel mundial obtienen mejores ingresos por la venta de carotenoides, retinoides y vitamina A son Hoffmann La-Roche y BASF AG⁽⁵⁷⁾; en México es la empresa Bioquimex.

3.2.2 CAROTENOS: CARACTERISTICAS Y CLASIFICACION

Los carotenos son derivados de naturaleza hidrocarbonada directos de los carotenoides; su fórmula general es $C_{40}H_{56}$; son solubles principalmente en disolventes no polares como el éter de petróleo y el *n*-hexano, debido sobre todo a su estructura hidrocarbonada.

Los carotenos existen en forma *toda-trans*; en el caso de beta-carotenos, teóricamente su número posible de estereoisómeros es 272.

Los principales son los alfa, beta y gamma carotenos, así como el licopeno⁽²⁰⁾ (Fig. 1). En menor proporción se hallan los delta y kappa carotenos, cuya formación depende de la forma adoptada de uno o ambos extremos de la molécula⁽³⁰⁾.

ESQUEMA BIOSINTETICO DE ALGUNOS CAROTENOIDES (7)

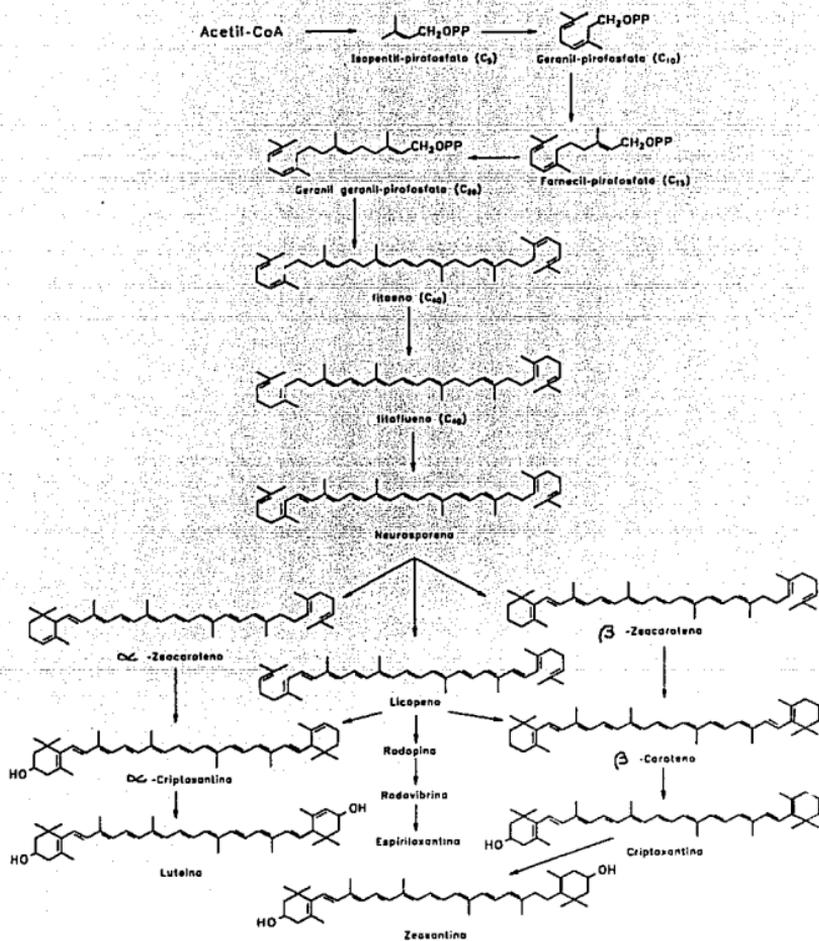


Fig. 2

3.2.3 XANTÓFILOS: CARACTERISTICAS Y CLASIFICACION

Los Xantófilos son los derivados oxigenados de los carotenos⁽²⁰⁾ (Fig. 1); los principales son la zeaxantina, el β -apo-8'-carotenal, la cantaxantina y la bixina, de los cuales además derivan otros. Los Xantófilos son en general más polares que los carotenos debido a la presencia de oxígeno en su estructura (el cual puede formar grupos polares como epóxidos, alcoholes, ésteres, etc.); por lo anterior, son principalmente solubles en disolventes polares como son acetona, metanol, etanol y otros alcoholes.

3.2.4 CAPSANTENO: CARACTERISTICAS FISICAS Y QUIMICAS

(3R, 3'S, 5'R)-3,3'-Dihidroxi- β , η -caroten-6'-ona. En diversas publicaciones se suele utilizar indistintamente los términos capsanteno y capsantina; en el presente trabajo se utilizó la primera. El capsanteno ($C_{40}H_{56}O_3$) es el principal carotenoide de las especies *Capsicum annuum* (chile) y representa el 35 % del total de carotenoides en chile rojo⁽⁶²⁾. Las variedades citadas contienen carotenoides con el grupo carbonilo en la cadena central y un anillo ciclopentanol en un extremo; los cetocarotenoides más abundantes que presentan son el capsanteno, seguido de capsorrubina y criptocapsina⁽³⁰⁾ (Fig. 1).

Existe evidencia de que los epóxidos de xantófilos son precursores de capsanteno y capsorrubina⁽²⁸⁾; se cree que el

precursor del capsanteno es la anteraxantina (los cromoplastos llevan a cabo esta reacción), cuyo precursor a su vez es la zeaxantina⁽³⁰⁾; las reacciones se muestran en la Fig. 3.

El capsanteno se descompone principalmente por oxidación, en la cual al parecer los grupos hidroxilo pasan a grupos ceto donde la luz actúa como catalizador; la escisión de la cadena en los enlaces C-C alfa al carbonilo, da lugar a la formación de un nuevo carbonilo^(61, 62), o bien, como en este caso a un grupo aldehído (Fig. 4).

En cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, forma agujas color rojo oscuro en éter de petróleo, tiene un punto de fusión de 181 - 182 °C, absorción máxima de 483 nm (CHCl₃), es altamente soluble en acetona y cloroformo, soluble en metanol, etanol, éter y benceno^(28, 50). $[\alpha]_{\text{Cd}} + 36^\circ$ (CHCl₃)⁽⁵⁰⁾.

3.2.5 METODOS COMUNES DE ANALISIS

Algunos métodos analíticos para el estudio de carotenoides son los siguientes: cromatografía de gases, cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en columna, cromatografía gas-líquido, electroforesis, espectrofotometría de absorción (usando reactivos cromogénicos), espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE), espectroscopía electrónica (IR, UV, visible), resonancia magnética nuclear (RMN), de carbono 13 (RMN-C₁₃) y de hidrógeno (RMN-H), así como polarografía. Sin embargo, algunos métodos

PRECURSORES DEL CAPSANTENO ⁽³¹⁾

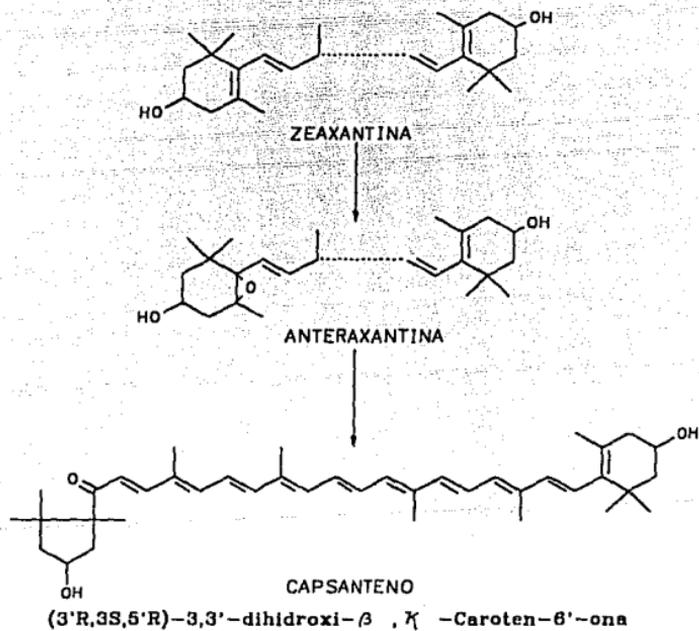


Fig. 3

ESQUEMA PARA LA DEGRADACION DEL CAPSANTENO ⁽⁶¹⁾

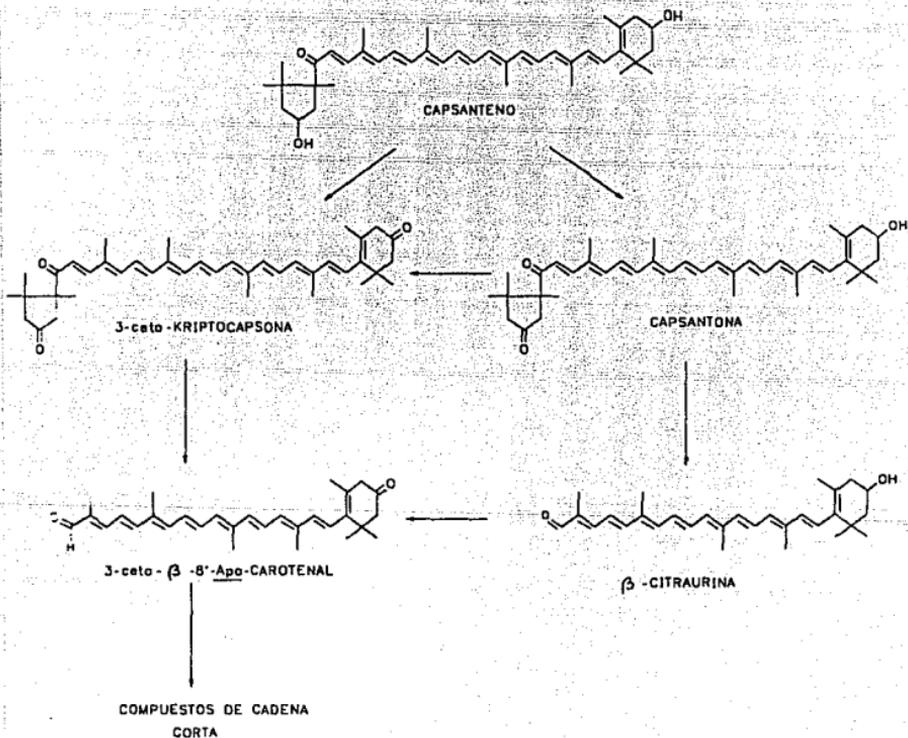


Fig. 4

más eficientes y modernos son la cromatografía líquida de alta resolución (más comúnmente mencionada como HPLC por las siglas en Inglés de *High Performance Liquid Chromatography*), la cromatografía en capa de alta presión (OPLC por sus siglas en Inglés)⁽²⁾ y la espectrometría de masas por bombardeo de átomos rápidos (más comúnmente mencionada como FAB-MS por las siglas en Inglés de *Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry*). Un método adecuado de cuantificación de capsanteno es precisamente vía HPLC, donde se requiere de cantaxantina como estándar interno^(28, 29)

3.3 CAPSICUM ANNUUM (CHILE)

El chile pertenece a la familia *Solanaceae*, género *Capsicum* y especie *annuum*. Ha sido un ingrediente obligado en la comida mexicana como condimento por mucho tiempo, además de usarse como medicina e incluso como tributo; se le encuentra en diversos códigos y se han hallado restos arqueológicos de su cultivo en el valle de Tehuacán, Pue. fechados en el 7,000 A.C.; se sabe también de su cultivo en la época prehispánica en Brasil y las Antillas. Existen muchas evidencias que indican claramente que el chile es y ha sido una constante cultural a través de las diferentes épocas de la historia de México, abarcando todos los estratos sociales⁽³⁴⁾.

El chile es una planta sensible al frío y muere a temperaturas de 0 °C o menores; se le suele cultivar en almacigos para protegerla del frío y conservar la humedad⁽³⁴⁾. El fruto se

cosecha por lo regular entre mayo y septiembre, aunque lo anterior depende de su demanda en el mercado; puede venderse verde o dejarse secar para la fabricación de chile en polvo, mole, para la extracción de sus colorantes, etc.

La figura 5 muestra un diagrama general de las especies *Capsicum annuum* (aplicable a chile ancho y paprika), donde: a, rama con hojas, flores y frutos; b, hojas; c, flor; d, córola abierta mostrando los estambres; e, pistilo sobre pedicelo; f, anteras; g, fruto; h, corte transversal del fruto; i, semilla.

3.3.1 *CAPSICUM ANNUM GROSSUM* (CHILE ANCHO): CARACTERISTICAS

Su clasificación botánica es la siguiente:

CHILE ANCHO (16)	
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Subclase	Metachlamydeae
Orden	Tubiflorae
Familia	Solanaceae
Género	Capsicum
Especie	Annum
Variedad	Grossum

Tabla 1

Esquema General para las Especies *Capsicum Annuum* (54)

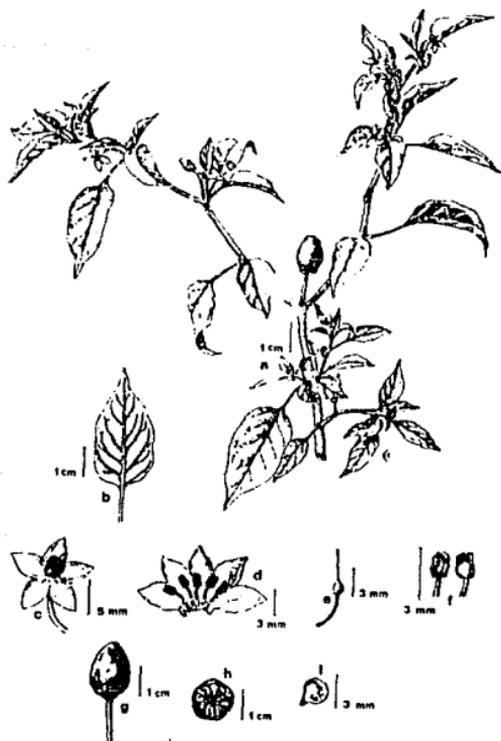


Fig. 5

Dentro del tipo chile ancho hay variedad en cuanto a características, como altura y hábito de crecimiento de la planta, tamaño y color de hojas, tamaño, forma, número de lóculos y color del fruto⁽³⁴⁾.

Generalmente son plantas sin pubescencia (con bajo contenido de capsaicinoides), de aspecto herbáceo y altura cercana a los 70 cm., conteniendo por lo regular de 2 a 3 ramas, a su vez ramificadas unas 4 ó 5 veces.

Las hojas son color verde oscuro brillante, de forma ovado-acuminada, con venación prominente. La flor tiene 5 pétalos de color blanco "sucio". El fruto mide entre 8 y 15 cm; tiene forma cónica o de cono truncado, cuerpo cilíndrico o aplanado, con un hundimiento bien definido en la base; el ápice suele ser puntiagudo. Tiene 2 ó 4 lóculos; la superficie es más o menos surcada y con pared gruesa; el fruto inmaduro es liso y de color verde, mientras que el maduro es rugoso y de color rojo⁽³⁴⁾.

El chile es un fuente natural de carotenoides, y es el único fruto cuyos carotenoides presentan anillos acilciclopentanoles⁽³⁰⁾.

En México se cultivan anualmente más de 15,000 hectáreas con este tipo de chile bajo condiciones de riego⁽³⁴⁾. Las zonas productoras se ubican principalmente en los valles semiáridos del área central del país, correspondientes a los estados de

Guanajuato, San Luis Potosí, Durango, Zacatecas y Aguascalientes; se estima un rendimiento por m² de 1 kg.⁽³⁴⁾ del fruto.

3.3.2 CAPSICUM ANNUUM LONGUM (PAPRIKA): CARACTERISTICAS

Capsicum annuum var. 1. Es un tipo de chile poco pungente ("dulce"). El pimiento (también conocido como Paprika) agrupa variedades como "Delphin", "Valeta", "Evident", "Luteus" y "Pantser"; aunque es de origen americano, su cultivo se extiende cuando menos a Europa y Asia⁽⁶⁵⁾.

Es muy utilizada como condimento y en la extracción de colorantes a nivel industrial. Como alimento presenta un pequeño valor energético, pero un alto contenido de vitamina C⁽⁶⁶⁾, misma que funciona como antioxidante natural.

La Paprika proviene de una planta anual de la familia *Solanaceae*, de la que también forman parte la papa, el tomate y la berenjena. Sus tallos son erectos y muy ramificados; alcanza hasta 1 metro de altura y sus hojas son ovaladas y de bordes enteros; las flores que nacen aisladas de color blanco⁽⁶⁶⁾ (Fig. 6).

Cada m² de su cultivo llega a dar un rendimiento de 4.5 kgs.⁽⁶⁵⁾ del fruto. Es estable a medios alcalinos⁽³⁰⁾.

Su clasificación botánica es la siguiente:

PAPRIKA (16)	
División	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
SubClase	Metachlamydeae
Orden	Tubiflorae
Familia	Solanaceae
Género	Capsicum
Especie	Annum
Variedad	Longum

Tabla 2

En la paprika el capsanteno es el colorante principal, seguido de la capsorrubina⁽⁷⁾; se encuentra en gran medida esterificado, lo cual reduce su capacidad de absorción pero aumenta su estabilidad⁽⁶¹⁾.

Los cambios de color en la paprika durante su almacenaje y procesamiento se atribuyen a la oxidación de sus pigmentos, catalizada por luz⁽⁶²⁾.

A pesar de ser un producto de origen natural, su empleo (así como el de su oleoresina) como aditivo en carne fresca tiene algunas restricciones(4, 25).

4 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajó con 4 muestras, a saber:

Pigmento 1 (P1): Extracto preparado mediante el método 1 (ver 4.1.1), a partir de chile ancho fresco de Puebla, Pue.

Pigmento 2 (P2): Oleorresina comercial de paprika, proporcionada por Productos de Maiz S.A. de C.V.

Pigmento 3 (P3): Extracto comercial de chile ancho, proporcionado por Productos de Maiz S.A. de C.V.

Pigmento 4 (P4): Extracto preparado mediante el método 2 (ver 4.1.2), a partir de chile ancho fresco de Puebla, Pue.

En la figura 8 se muestra de manera general la metodología empleada en el presente trabajo, misma que se describe detalladamente a continuación.

4.1 EXTRACCION DE LOS PIGMENTOS

Debido a que el capsanteno (y en general los carotenoides) se halla en material biológico muy diverso, no existe una técnica estándar para su obtención, por lo que se buscaron 2 métodos de extracción diferentes (ver Fig. 6); por un lado uno que empleara antioxidantes con el fin de obtener un pigmento durable, de buenas

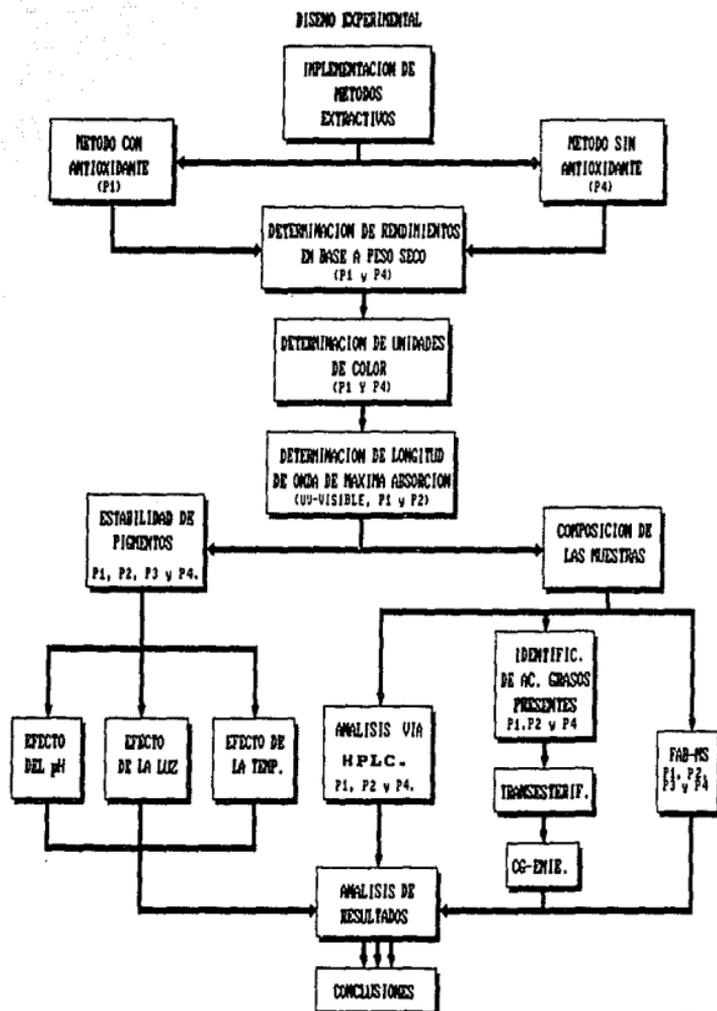


Fig. 6

características y que durante las pruebas de estabilidad fuera insensible al oxígeno atmosférico, y por otro lado uno que fuera sencillo, requiriera pocos solventes para su extracción y no empleara antioxidantes, con el fin de cotejar con el anterior extracto el efecto del oxígeno atmosférico.

En algunos métodos de extracción se saponifica la muestra para remover los lípidos no deseados; sin embargo algunos autores⁽⁴⁰⁾ consideran que el proceso de saponificación puede causar la transformación estructural y/o destrucción de algunos carotenoides.

4.1.1 METODO 1

Para extraer el pigmento 1 (P1) se realizan los siguientes pasos⁽³³⁾:

El chile ancho se deja secar, para posteriormente quitarle las semillas y molerlo. 10 g. de la muestra (chile ancho en polvo) se extraen con 200 ml de una mezcla 99 / 1 en peso de acetona y Butil Hidroxitolueno (BHT) como antioxidante. Se filtra al vacío. Se concentra el filtrado; se repite la extracción al menos 3 veces. Se saponifica durante toda la noche usando una mezcla de 5 ml de KOH al 50 % + 50 ml de etanol + 20 ml de agua + 1 g. de ácido ascórbico como antioxidante. Se diluye con una solución de NaCl al 10 %. Se extrae con *n*-hexano / Et₂O (7:3) + BHT (1% en *n*-hexano). Se evaporan los

disolventes.

4.1.2 METODO 2

Para obtener el pigmento 4 (P4) se realizan los siguientes pasos (29):

El chile ancho se deja secar, para posteriormente quitarle las semillas y molerlo. 3 g. de chile ancho (polvo) se homogenizan, mediante un vortex (5 min a 2500 rpm), con 50 ml de metanol y 1 g. de $MgCO_3$. Se filtra al vacío. El residuo se extrae con 100 ml de acetona / *n*-hexano (8:2) y se filtra al vacío. El filtrado se transfiere a un embudo de separación con 150 ml de agua destilada. Se elimina la fase acuosa. Se filtra la fase orgánica, preferentemente con malla de 4 micrómetros.

4.2 DETERMINACION DE RENDIMIENTO EN PESO SECO

Una vez obtenido cada extracto con base en los métodos citados, se deja secar perfectamente y se pesa; el peso seco de cada extracto se divide entre los gramos de chile ancho en polvo usados originalmente en cada método para determinar el % de rendimiento en peso seco de la mezcla de pigmentos, según la fórmula 1:

$$1) \quad \% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{g. obtenidos} \times 100}{\text{g. de chile en polvo}}$$

4.3 DETERMINACION DE LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORBANCIA

La literatura reporta la existencia de 3 bandas en la región del visible para los carotenoides⁽³⁰⁾, sin embargo, debido a la presencia del grupo carbonilo en la cadena insaturada, se pierde esta firmeza en la señal. Lo anterior, aunado a la presencia de otros pigmentos (con otras características espectrales), ocasiona que la gráfica a obtenerse tenga una sola longitud de onda de máxima absorbanca.

Para la determinación se utilizaron los pigmentos P1 y P2; de cada uno se prepararon 100 ml al 0.004 % en NaOH 0.02 M⁽⁶³⁾. Se buscó la absorbanca máxima de c/u usando como blanco NaOH 0.02 M y realizando el barrido en la región del visible mediante un espectrofotómetro Beckman mod. 25, de doble celda.

Existe además un método matemático (reglas de Fieser-Kuhn) para calcular la longitud de onda de máxima absorbanca de cadenas largas de polienos, como los β -carotenos⁽²⁰⁾. La fórmula es:

$$2) \quad \text{Lambda máx.} = 114 + 5M + n(48 - 1.7n) - 16.5 R_{\text{endo}} - 10 R_{\text{exo}}$$

en donde:

M = número de grupos alquilo (sustituyentes)

n = número de dobles enlaces conjugados totales

R_{endo} = número de anillos con dobles enlaces endocíclicos

R_{exo} = número de anillos con dobles enlaces exocíclicos

4.4 DETERMINACION DE UNIDADES DE COLOR (U.C.)

Las unidades internacionales de color se determinaron mediante el método proporcionado por la compañía Amco Internacional S.A. de C.V.:

En un matraz ámbar aforado de 100 ml se pesan 30 a 50 mg de la muestra y se afora con acetona al 100 %. En un segundo matraz ámbar aforado de 100 ml se agrega 1 ml de la solución anterior y se afora usando acetona al 100 %. Se lee la absorbancia a 460 nm usando acetona al 100 % como blanco; dicha lectura debe tomarse en un tiempo de máximo 5' a partir de la primera dilución. Se trabajó en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-64.

El cálculo de las unidades de color se realiza empleando la fórmula 3:

$$3) \quad U.C. = \frac{(Absorbancia) (66,000)}{g. \text{ de muestra}}$$

Según los datos proporcionados por la empresa citada, un colorante de calidad aceptable debe tener al menos 20,000 unidades de color.

4.5 PRUEBAS DE ESTABILIDAD (CINETICA)

Con base en los espectros obtenidos, se designa la longitud de onda de trabajo, a fin de evaluar la estabilidad, la cual se maneja como absorbancia relativa (A.R.)⁽⁶³⁾, siendo esta una medida del contenido de colorante que permanece sin cambio en la muestra, y equivale a dividir la absorbancia de un tiempo dado entre la absorbancia inicial.

Para conocer el comportamiento degradativo de las muestras, éstas fueron sometidas al efecto de pH, luz, temperatura y oxígeno atmosférico, a fin de conocer la influencia de estos factores en la estabilidad de los pigmentos en estudio⁽⁶³⁾. La última variable se controló usando un extracto con antioxidante (sensibilidad al oxígeno atmosférico despreciable) y otro sin él.

Se prepararon de cada uno de nuestros 4 pigmentos (P1, P2, P3 Y P4) 500 ml de solución al 0.004 % en NaOH a pH = 12 y 500 ml de solución al 0.004 % en etanol + HCl a pH = 2 (ningún pigmento fue soluble en el sistema HCl / agua, por lo que se tuvo que emplear el sistema HCl / etanol), que nos dan un total de 8 disoluciones.

De cada una de las 8 disoluciones anteriores se tomaron 4 muestras (total 32), de las cuales 1 se aisló de la luz y se sometió a temperatura baja constante de 7 °C, 1 se aisló de la luz

FACTORES A LOS QUE SE SOMETIERON LOS PIGMENTOS

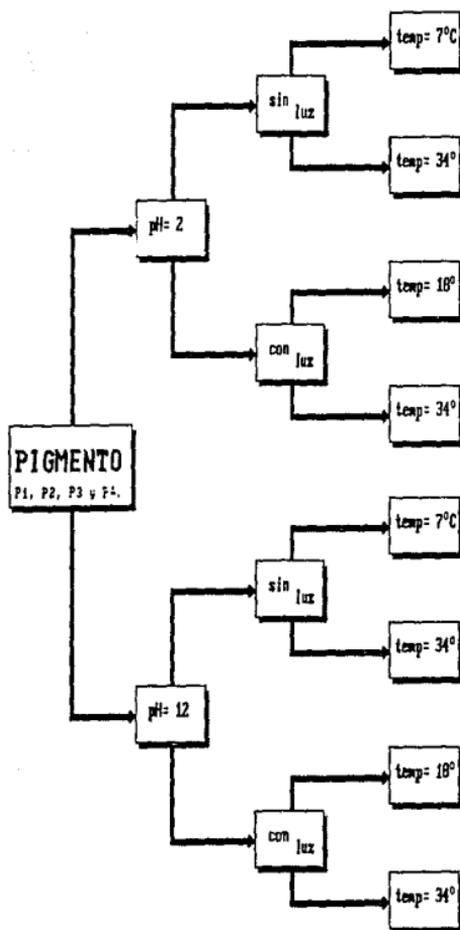


Fig. 7

y se sometió a temperatura alta constante de 34 °C, 1 se sometió a la acción de un foco de 10 watts a 20 cm de ella y temperatura constante de 34 °C y 1 se sometió al efecto de luz y temperatura ambientes (no controlados).

Durante 10 días se verificó la absorbancia (a 460 nm) de la muestra de c/u de los 32 frascos mediante un espectrofotómetro Bausch & Lomb mod. Spectronic 20, usando como blancos NaOH a pH = 12 para los pigmentos en medio básico (16 frascos) y HCl / etanol a pH = 2 para los pigmentos en medio ácido (16 frascos). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

La degradación de los colorantes se determinó mediante la lectura de absorbancia a intervalos regulares de tiempo, para posteriormente calcular la A.R., la cual es una medida del colorante que se conserva a un tiempo dado.

La A.R. se calcula mediante la ecuación 4:

$$4) \quad A.R. = \frac{\text{(Absorbancia a } t = x)}{\text{(Absorbancia a } t = 0)} = \frac{(A_x)}{(A_0)}$$

donde:

A.R. = Absorbancia relativa al tiempo x

A_x = Absorbancia al tiempo x

A_0 = Absorbancia inicial (t = 0)

4.5.1 TRATAMIENTO MATEMATICO

Una manera de cuantificar la pérdida o formación de un componente alimenticio durante un determinado proceso o almacenaje, es mediante el uso de modelos cinéticos, entre los que se encuentra la determinación del orden de reacción del "proceso" involucrado.

Dentro de los alimentos, sus componentes presentan principalmente cinéticas de ordenes cero (lineal) y uno (comportamiento exponencial), aunque hay sistemas que presentan cinéticas de segundo orden (como el reportado para los polvos de Paprika⁽²⁸⁾) y hasta de pseudo-primer orden.

Si la cinética de una reacción dada es de primer orden, se tiene que la velocidad de reacción por unidad de volumen es igual a:

$$5) \quad \frac{d(E/V)}{dt} = Kc$$

donde:

E = avance de la reacción

c = concentración del reactivo en cualquier momento

t = tiempo

K = constante de velocidad del proceso

Integrando lo anterior⁽¹⁵⁾ se tiene que

$$6) \quad \ln \frac{c}{c_0} = -Kt$$

Por la ley de Beer-Lambert⁽¹⁵⁾ se sabe que

$$7) \quad c = \frac{A_x}{el}$$

donde:

A_x = absorbancia

e = coeficiente de absortividad molar (constante)

l = longitud de la celda

Por lo anterior, se tiene que

$$8) \quad \ln \frac{c}{c_0} = \ln \frac{A_x}{A_0} = -Kt$$

donde:

A_0 = Absorbancia inicial.

Por lo anterior, si se grafica $\ln A_x / A_0$ (absorbancia relativa) en función de t , es posible saber si una reacción dada es de primer orden. Si los puntos experimentales yacen sobre una línea recta, entonces la reacción será de dicho orden

en D⁽¹⁵⁾ que es el reactivo, y la pendiente de la recta será igual a -K. La ordenada al origen (idealmente cero) se representa como b.

Un parámetro importante dentro de los estudios de cinética es la vida media, la cual se define como el tiempo en el que $A_x = 1/2 A_0$ ($c = 1/2 c_0$), por lo que la vida media estará dada por

$$9) \quad t_{1/2} = \frac{(\text{Ln } 2) + b}{K} = \frac{0.693 + b}{K}$$

Si la cinética de una reacción es de segundo orden, se tiene que la velocidad de reacción por unidad de volumen es igual a

$$10) \quad \frac{d(E/V)}{dt} = Kc^2$$

donde:

c = concentración del reactivo en cualquier momento.

Integrando lo anterior se obtiene

$$11) \quad \frac{1}{c} = \frac{1}{c_0} + Kt$$

Aplicando la ley de Beer-Lambert⁽¹⁵⁾ se tiene que

$$12) \quad \frac{1}{c} = \frac{1}{A_0} + Kt = \frac{1}{A_x}$$

Para confirmar si la reacción es de segundo orden, se prueban los datos graficando $1 / A_x$ en función de t . Si los datos experimentales caen sobre una línea recta, la reacción es de segundo orden⁽¹⁵⁾, en cuyo caso la pendiente de la recta es igual a K .

La vida media (tiempo en el cual $A_x = 1/2 A_0$) estará dada por:

$$13) \quad t^{1/2} = \frac{1}{KA_0} = \frac{b}{K} = \frac{b}{m}$$

donde:

b = ordenada al origen.

4.6 ANALISIS CROMATOGRAFICO

4.6.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography (HPLC) en Inglés) es una de las técnicas analíticas más adecuadas para la identificación de pigmentos fotosensibles presentes en mezclas, ya que no sufre de los problemas que presentan otras técnicas, por ejemplo

degradación térmica (cromatografía de gases), fotosensibilidad (polarografía), efectos adversos propios del sistema (acidez ocasionada por los adsorbentes en la cromatografía de capa fina y de columna), así como oxidación.

El proceso consiste en inyectar una mezcla de sustancias en el cromatógrafo; una mezcla de solventes, llamada fase móvil (cuya composición puede variar según se quiera), arrastrará la mezcla problema a través de una columna donde se irá separando, según la afinidad de cada componente de la mezcla con el o los solventes en cuestión y la fase estacionaria, para finalmente ser identificadas con ayuda del detector.

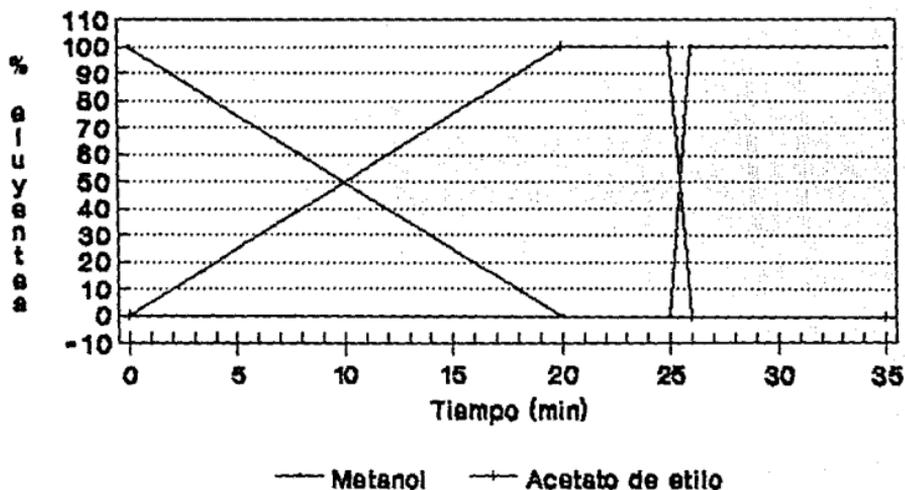
Por medio del uso de un detector espectrofotométrico (a λ fija), solo es posible detectar aquellos compuestos que presenten absorbancia a esa longitud de onda: de los carotenoides presentes solo el capsanteno y capsorrubina, así como sus derivados, se determinan.

Para el presente trabajo se siguió la técnica descrita por Gregory G. (29), análisis para el cual se usaron los siguientes aparatos:

Bomba binaria para cromatografía líquida Perkin-Elmer modelo 250, columna C₁₈ (no polar) Pecosil Cartridge de 25 cm, detector espectrofotométrico UV/Vis Perkin-Elmer modelo LC 290 e integrador Hewlett Packard modelo HP 3396 serie II.

ELUYENTE EN HPLC

Sistema Metanol / Acetato de Etilo



Flujo = 1.8 ml / min.

Gráfica 1.

La Fase móvil consistió en una mezcla de metanol-acetato de etilo, usando gradiente lineal por 20', el porcentaje usado de cada solvente a un tiempo dado lo indica la gráfica 1.

El flujo de la fase móvil fue de 1.8 ml / min; la velocidad de la gráfica de 1 cm / min., la detección se hizo a 460 nm, la inyección de la muestra fue de 20 microlitros cada vez, previa filtración en malla de 0.4 micrometros.

Se utilizaron únicamente las muestras P1, P2 y P4, pues aún no se contaba con P3. Se aislaron los picos principales de P1 para someterlos posteriormente a análisis vía Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Rápidos (ver 4.7).

4.6.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF)

Para identificar los componentes de la muestra P1, se procede a analizar su comportamiento cromatográfico en capa fina (CCF). Para lo anterior se usaron placas cromatográficas de Sílica-gel Merck AL-60 (200 X 50 X 0.2 mm), usando el sistema Me₂CO / n-hexano (2:8) y correlacionarlo con lo reportado en la literatura (60).

4.7 ESPECTROMETRIA DE MASAS POR BOMBARDEO DE ATOMOS RAPIDOS

La Espectrometría de Masas por Bombardeo de Átomos Rápidos (Fast Atom Bombardment (FAB-MS) en Inglés) se ha establecido como

el método de ionización a elegir para los análisis de espectrometría de masas en compuestos no volátiles y térmicamente lábiles. FAB-MS es simple y rápido en operación; no sufre de la contaminación de la fuente iónica ni de problemas derivados de las técnicas de filamento caliente de impacto electrónico (IE) y más particularmente de la ionización química, dando predominantemente iones cuasimoleculares. Es un método especialmente bueno para compuestos de cadena larga⁽⁵⁾.

La fuente de átomos rápidos consiste en un cátodo frío y una cámara de colisión. La fuente produce iones Argón (Ar^+) de energía controlada, los cuales se conducen a la cámara de colisión que contiene Argón a presión, lo que genera escape de Ar^+ y Ar . Con dichos átomos se bombardea la muestra, misma que antes de llegar al detector pasará por 4 barras (cuadripolo), que se encargan de separar los iones formados. En el presente trabajo se usó un espectrómetro de masas Heienigan-Mat modelo Incos 50-B de inserción directa "DEP" (*Direct Exposure Probe*). Se trabajó con los 2 picos principales obtenidos del análisis cromatográfico vía HPLC del pigmento 1 (t_R de 1.596 y 2.128 min respectivamente).

Una gota de la muestra (P1) se pone a secar en el retenedor de muestra ("probe") y se introduce en la cámara de ionización; se trabajó con un potencial de ionización de 70 eV; el calentamiento del probe fue de 20 mA / seg, equivalente a 20 °C / seg durante 3', lo que dió una temperatura de operación de 60 °C.

4.8 IDENTIFICACION DE ACIDOS GRASOS PRESENTES

Los Xantófilos presentan grupos hidroxilo, los cuales tanto en Chile ancho como en paprika por lo regular se hallan esterificados con ácidos grasos, mismos que interfieren en la interpretación de los espectros de masas, por lo que conviene identificarlos.

4.8.1 TRANSESTERIFICACION

Se extrajo el pigmento 1 mediante la técnica descrita (ver 4.1.1), pero omitiendo lo referente a saponificación, dado que no deben eliminarse los ácidos grasos. Para determinar si los colorantes (carotenoides), se encuentran esterificados y con qué ácidos grasos lo están, la mayor parte de las técnicas requiere de convertir a éstos primero a los ésteres metílicos correspondientes (36).

REACCION DE TRANSESTERIFICACION

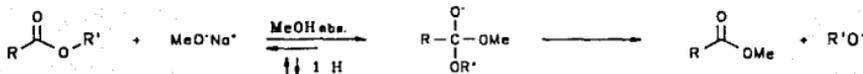


Fig. 8

El aceite extraído se transesterifica para obtener los ésteres metílicos que se inyectarán al cromatógrafo de gases. Se usó la técnica de Jamieson y Reid⁽³⁶⁾, que es una sustitución acilnucleofílica realizada en medio básico, consistente en reflujar entre 40 min y una hora 5.0 g. de la muestra (extracto) con 16 ml de metóxido de sodio 0.2 N en metanol. La mezcla se enfría y se acidifica con H_2SO_4 2.0 N (1 ml); a dicha mezcla se le vierte un volumen igual o al doble de una solución saturada y fría de NaCl.

El metóxido de sodio usado se prepara agregando 0.5 g. de metóxido de sodio en 50 ml. de $MeOH_{abs}$.

Los ésteres metílicos se extraen con 3 porciones de 10 ml de éter de petróleo, éter etílico absoluto y/o acetato de etilo, lavándose con pequeñas porciones de agua fría hasta pH neutro.

El éter de petróleo extraído es secado con sulfato de sodio anhidro y se filtra, para luego evaporar el disolvente a presión reducida y finalmente ser inyectado al sistema acoplado cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas.

4.8.2 CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS POR IMPACTO ELECTRONICO (CG-EMIE)

Se usó un equipo marca Shimadzu (cromatógrafo de gases mod. GC-14A y espectrómetro de masas mod. QP-2000A); las condiciones de

operación en la cromatografía fueron las siguientes:

CROMATOGRAFIA DE GASES		
Temperaturas	Horno	300 ° C
	Columna	35 - 250 ° C
	Inyector	275 ° C
	Gradiente	14.3 °C / min.
Tiempo de Operación		30 min.
Gas portador		Helio
Flujo		1.5 ml. / min.

Tabla 3

5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 EXTRACCION DE LOS PIGMENTOS

La extracción por el método 1 es más laboriosa que por el método 2, pero permitió la obtención de un extracto de mejor color, dado que al hacerles el barrido en la región del visible, P1 presentó una absorbancia a 460 nm de 0.17, mientras que P4 en iguales condiciones presentó una absorbancia de 0.09 .

5.2 RENDIMIENTO EN PESO SECO

Los extractos obtenidos por el método 1 de 10 g. de muestra dieron los siguientes resultados:

1) 0.3 g. (rendimiento del 3 %)	} --- Promedio = 2.77 %
2) 0.2620 g. (rendimiento del 2.62 %)	
3) 0.2705 g. (rendimiento del 2.7 %)	

Los extractos obtenidos por el método 2 dieron los siguientes resultados:

1) 0.069 g. de 3 g. (rendimiento del 2.3 %)	} --- Promedio = 2.1 %
2) 0.0815 g. de 4 g. (rendimiento del 2.04 %)	
3) 0.2967 g. de 15 g. (rendimiento del 1.97 %)	

El tratamiento estadístico (tabla de ANOVA) hecho a los

datos anteriores indica que el rendimiento de ambos métodos presenta una diferencia significativa con un alfa igual al 5 %, es decir, hay diferencia significativa entre los métodos empleados mas no así entre los rendimientos obtenidos de un mismo proceso.

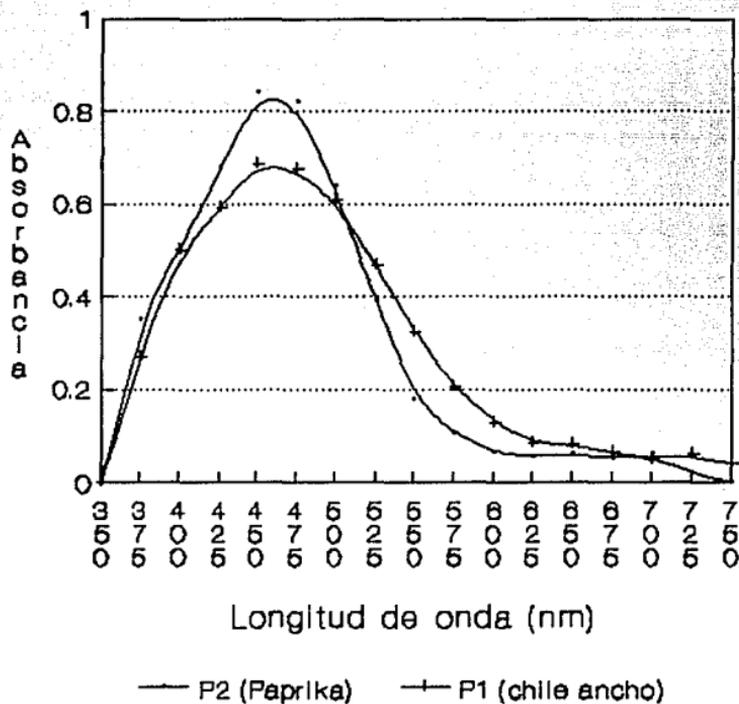
La literatura reporta diferentes rendimientos en peso seco de pigmentos "puros" para diferentes especies de *Capsicum*⁽²⁸⁾, entre ellos la Paprika Húngara (0.3 % a 0.8 %), la Paprika "decolorada" (2.2%), la Paprika estadounidense (0.336 %) y el chile estadounidense (0.323% a 0.734 %). La paprika "decolorada" presenta un rendimiento "extraordinariamente alto"⁽²⁸⁾.

Con base en lo anterior se puede decir que los rendimientos obtenidos son buenos, aún tomando en cuenta que presentan residuos de ácidos grasos (ver 5.7 y 5.8).

5.3 LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORBANCIA

Para el cálculo de longitud de onda de absorbancia máxima por las reglas de Fieser-Kuhn tenemos que el capsanteno presenta 8 grupos alquilo sustituyentes, 11 dobles enlaces conjugados, 1 anillo con doble enlace endocíclico y no presenta anillos con dobles enlaces exocíclicos; sustituyendo los anteriores valores en la fórmula correspondiente se obtiene un valor de 459.8 nm, muy cercano al valor de 460 nm (NaOH como disolvente) determinado experimentalmente (ver gráfica 2) y a valores reportados por otros autores, mismos que caen en un ancho de banda ubicado entre 455 y

ESPECTRO DE ABSORBANCIA región visible



Ref: NaOH 0.02 M.

Gráfica 2

470 nm^(3, 24, 49, 60), que es precisamente el rango donde se ubican los "rojos".

5.4 UNIDADES DE COLOR (U.C.)

Para P1 se obtuvo una lectura de absorbancia de 0.015 usando 0.048 g. de muestra, lo que nos da un total de 20,625 Unidades de Color, en tanto que para P4 se obtuvo una lectura de absorbancia de 0.013 usando 0.069 g. de muestra, lo que nos da un total de 12,435 Unidades de Color, el cual corrobora una mejor capacidad tintórea por parte del pigmento 1; sin embargo es menor al obtenido en la oleoresina comercial de paprika (P2), cuyo valor fue de 38,600 U.C.

Lo anterior indica que el pigmento 1 (P1) satisface el requerimiento estándar de color proporcionado por la empresa en cuestión (20,000 U.C.) en un 103.12 %, mientras que P4 lo hace en un 62.17 %.

5.5 PRUEBAS DE ESTABILIDAD (CINETICA)

Se realizaron pruebas de solubilidad en medio ácido (pH = 2) y básico (pH = 12), hallándose en general una mayor absorbancia en medio básico para los 4 pigmentos (gráficas 3 a 10), sobre todo después de haber transcurrido 24 horas. Ningún pigmento fue soluble en medio ácido (HCl / H₂O), por lo se debió usar un sistema HCl / EtOH con el fin de disolver el pigmento en el medio.

El uso del etanol no afecta las lecturas de absorbancia, debido a que tiene efecto nulo sobre el espectro⁽³⁰⁾.

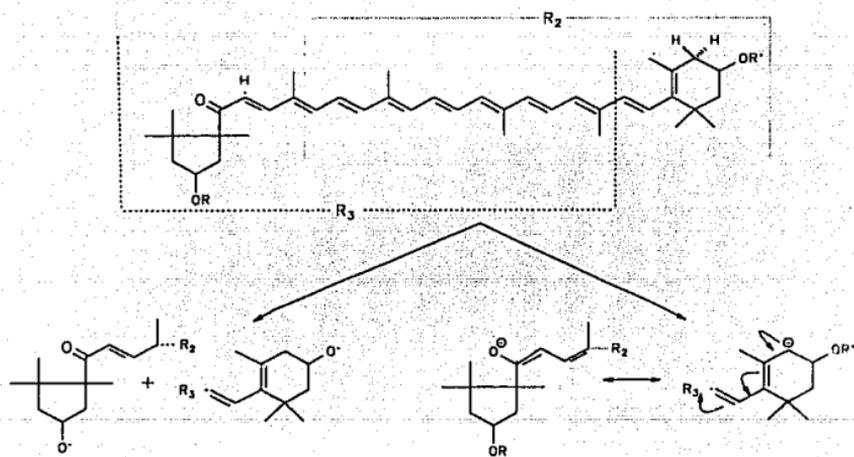
Al parecer, la mejor solubilidad de los pigmentos en medio básico se debe a la formación de sales, ya que el xantófilo presenta hidrógenos que, por su posición alfa al grupo carbonilo y sobre todo por efectos de resonancia, son ácidos (ver Fig. 9). También contribuye la hidrólisis del enlace éster que une al ácido graso con el xantófilo (saponificación).

En cuanto a estabilidad, se observó que los 4 pigmentos fueron más estables en medio básico y que el comportamiento de P1, P3 y P4 obedece una ecuación de primer orden, mientras que el comportamiento de P2 obedece una ecuación de 2^{do} orden⁽²⁸⁾ (ver tabla 4).

En cuanto al efecto de la luz en la estabilidad, se tiene que al comparar la constante de reacción (K) de las pruebas con y sin luz a 34 °C, se obtuvo la desviación estándar con un coeficiente de variación mayor al 10 %. Se observó que la luz aceleró el proceso en cuestión (solubilidad o degradación), como se observa en la tabla 4.

Respecto al factor temperatura, se observó que al comparar la constante de reacción (K) de las pruebas sin luz a 7 y 34 °C, se obtuvo la desviación estándar con un coeficiente de variación mayor al 10 %; se observó que dicho factor afecta en mayor medida

**MECANISMO PROPUESTO DE SOLUBILIDAD DEL CAPSANTENO
EN MEDIO BASICO.**



Donde;

$R, R' = H, Ac, Graso, Proteina, etc.$

Fig. 9

al proceso en cuestión (degradación o solubilidad) que el factor luz, como se observa en la tabla 4.

Sobre las pruebas hechas a luz y temperatura ambiente, su comportamiento coincide con los razonamientos y tendencias anteriores, a pesar de ser condiciones no controladas.

Finalmente, es importante indicar que los xantófilos presentan grupos -OH, los cuales pueden esterificarse con ácidos grasos (ver 5.7 y 5.8); estos últimos pueden influir en la estabilidad del pigmento debido a la capacidad natural de los mismos a sufrir procesos de oxidación.

5.5.1 TRATAMIENTO MATEMATICO

Se anexa la tabla 4, en la cual se incluyen los valores de vida media en las pruebas de estabilidad para cada pigmento contra cada factor, así como la constante de velocidad de reacción "K". También contiene los datos de las pendientes, ordenadas al origen y correlaciones, correspondientes a las gráficas 3 a 10. La energía de activación no se determinó debido a que los experimentos se realizaron en 2 niveles de trabajo, siendo arbitrario hacer una gráfica ($\log_{10}K$ en función de $1/T$) con solo 2 puntos.

Datos de las Gráficas 3 a 10

Gráfica	Prueba	De Día	A Día	Pendiente (m) ^{**}	Ordenada al origen (b)	Correlación (r)	Cte. de velocidad (K)	Vida media ($t_{1/2}$) en horas
P1pH2	01	0	2	-.640465	.01756	-.99887	.640465	26.6256 (D)
		2	10	.08845	-1.47852	.9828	-.08845	213.12 (F)
	02	0	2	-.896	-.1283	-.9706	.896	15.1259 (D)
		2	10	-.12086	-1.748	.948	-.12086	209.4966 (F)
03	0	2	-1.4452	.05477	-.99785	1.4452	12.408 (D)	
	2	10	.2071	-2.74	.9273	-.2071	237.216 (F)	
04	0	2	-.7695	-.035	-.9918	.7695	20.52 (D)	
	2	10	-.10396	-1.5095	.9434	-.10396	188.496 (F)	
P2pH2	01	0	10	.701	12.076	.9488	.701	413.4432 (D)
	02	0	10	8.801	17.041	.959	8.801	46.368 (D)
	03	0	10	2.465	10.674	.9267	2.465	103.9248 (D)
	04	0	10	3.3311	14.4968	.9155	3.3311	104.448 (D)
P3pH2	01	0	10	-.7664	-.1181	-.9554	.7664	18.0024 (D)
	02	0	10	-1.472	-.1063	-.9923	1.472	13.032 (D)
	03	0	10	-1.4722	.3086	-.94	1.4722	16.3272 (D)
	04	0	10	-1.846	0	*	1.846	9.0096 (D)
P4pH2	01	0	10	-4.855	0	*	4.855	34.2576 (D)
	02	0	10	-2.565	0	*	2.565	6.4848 (D)
	03	0	10	-.65969	.23631	-.959	.65969	33.8088 (D)
	04	0	10	-2.565	0	*	2.565	6.4848 (D)
P1pH12	01	1	10	.0606	1.165	.988	-.0606	735.84 (F)
	02	1	10	-.0107	1.801	-.901	.0107	5594.0187 (D)
	03	1	10	-.05766	2.01	-.9511	.05766	1162.344 (D)
	04	1	10	-.0312	1.943	-.9764	.0312	2028.72 (D)
P2pH12	01	1	10	.1204	2.1616	.9585	.1204	430.884 (D)
	02	1	10	.2902	2.8213	.9425	.2902	233.328 (D)
	03	1	10	.8182	3.9608	.9255	.8182	116.1816 (D)
	04	1	10	.4504	2.1914	.9679	.4504	116.7696 (D)
P3pH12	01	0	10	-.24917	.04076	-.9593	.24917	70.68 (D)
	02	0	10	-.1685	-.2723	-.9422	.1685	59.904 (D)
	03	0	10	-.2053	-.0945	-.9694	.2053	69.936 (D)
	04	0	10	-.19	-.2044	-.909	.19	61.68 (D)
P4pH12	01	1	10	.34	-2.244	.971	-.34	109.488 (F)
	02	1	10	.0408	.0237	.909	-.0408	421.68 (F)
	03	1	10	.045	-.0579	.903	-.045	340.8 (F)
	04	1	10	-.1396	-.636	.9045	-.1396	9.8304 (F)

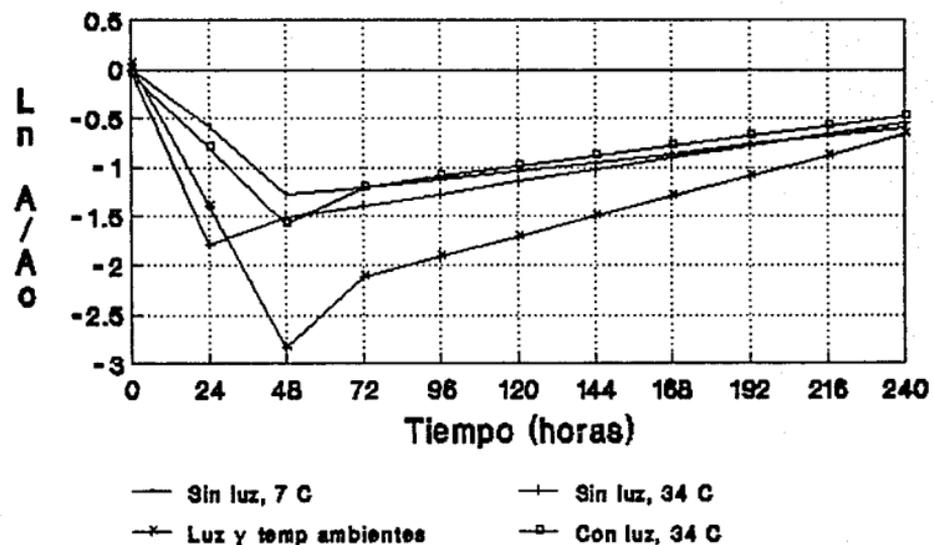
Prueba 01 = Sin luz a 7 °C (280 °K)
 Prueba 02 = Sin luz a 34 °C (307.15 °K)
 Prueba 03 = Luz y temperatura ambiente
 Prueba 04 = Con luz a 34 °C (307.15 °K)

F = Vida media de formación de la sal
 D = Vida media de desintegración de la sal
 * = Pruebas con vida media muy corta
 ** = Pendientes expresadas en $\ln(A_x/A_0)/\text{días}$
 y $\text{días}/A_x$

Tabla 4

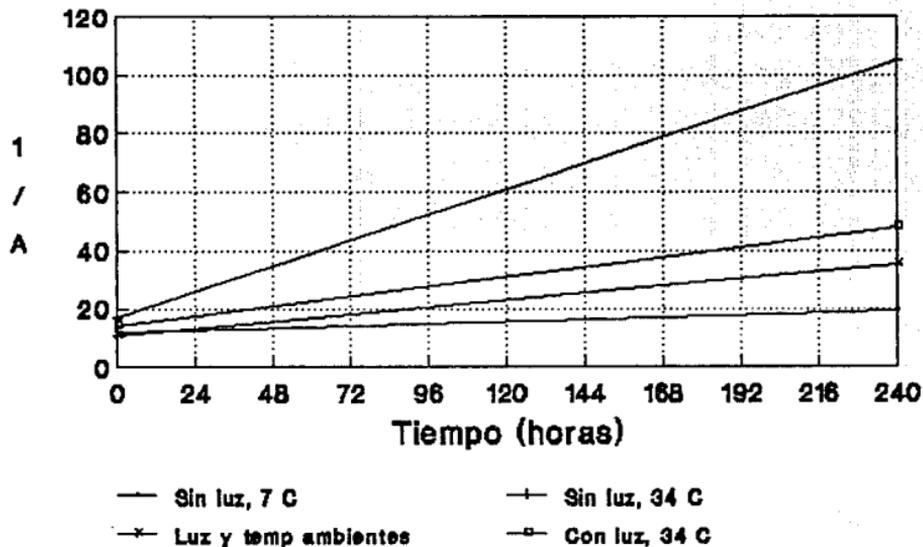
ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 1 a pH 2. (Orden 1)

55



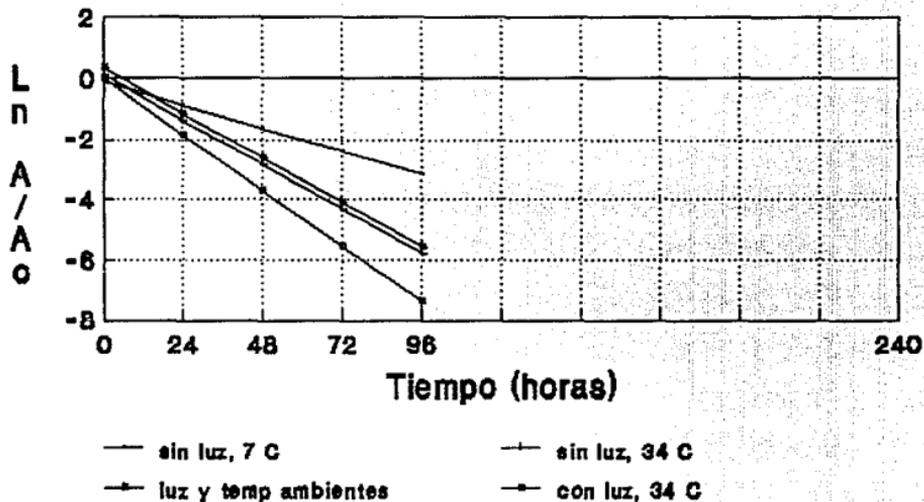
Gráfica 3.

ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 2 a pH 2. (Orden 2)



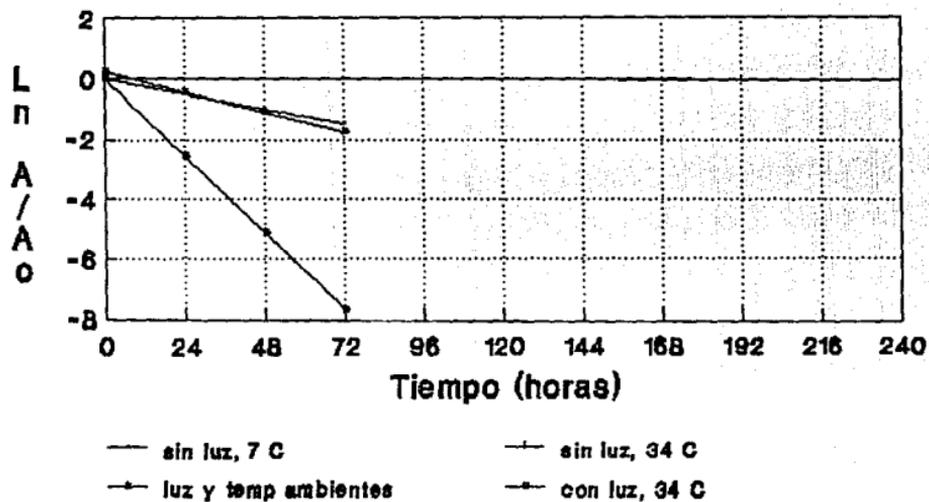
Gráfica 4.

ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 3 a pH 2. (Orden 1)



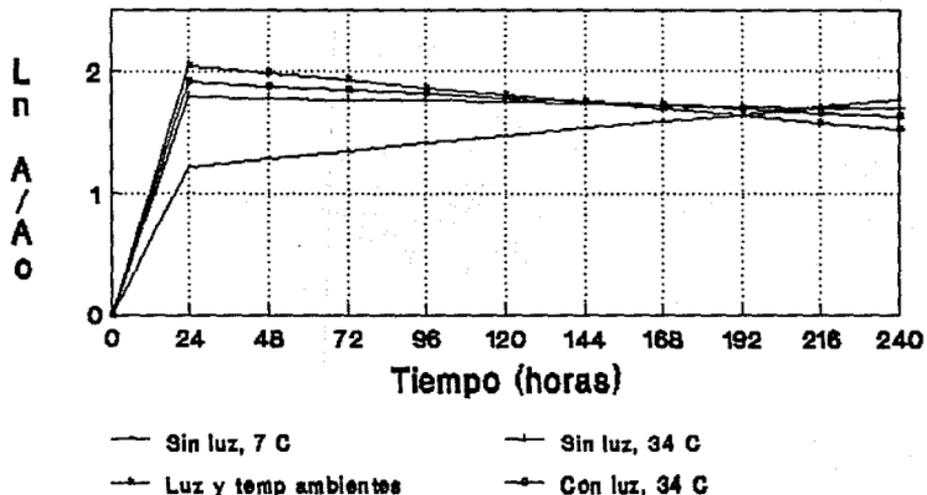
Gráfica 5.

ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 4 a pH 2. (Orden 1)



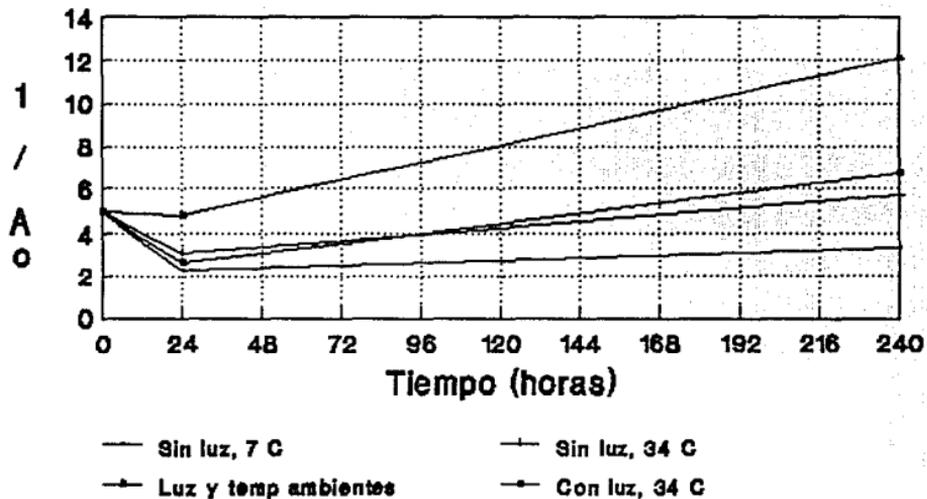
Gráfica 6.

ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 1 a pH 12 (Orden 1)



Gráfica 7.

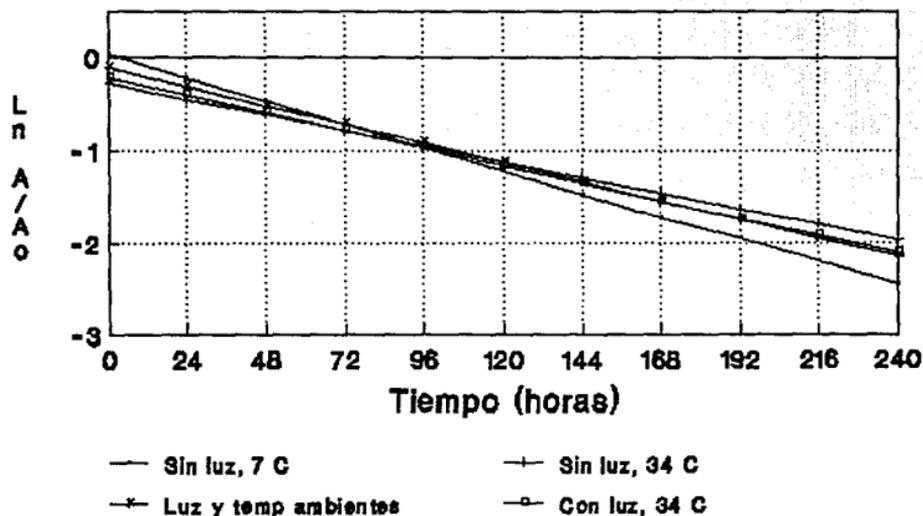
ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 2 a pH 12 (Orden 2)



Gráfica 8.

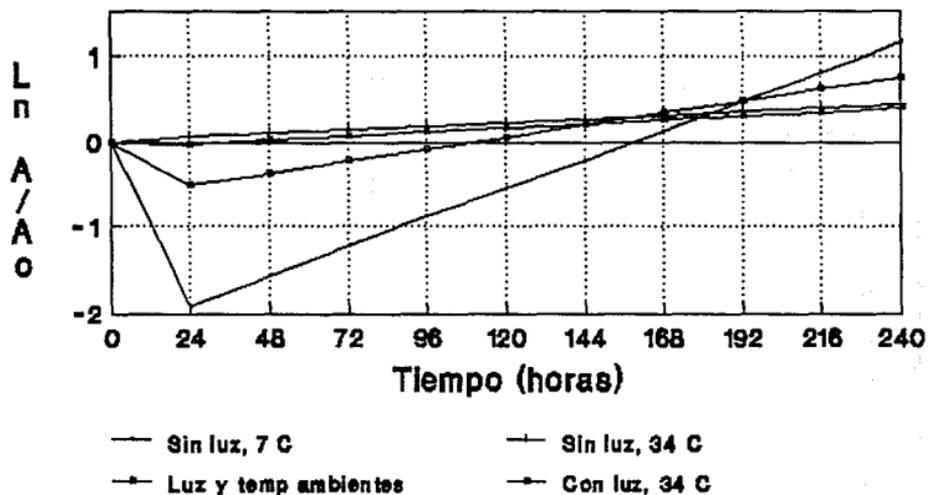
ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 3 a pH 12 (Orden 1)

19



Gráfica 9.

ESTABILIDAD DEL PIGMENTO 4 a pH 12 (Orden 1)



Gráfica 10.

5.6 ANALISIS CROMATOGRAFICO

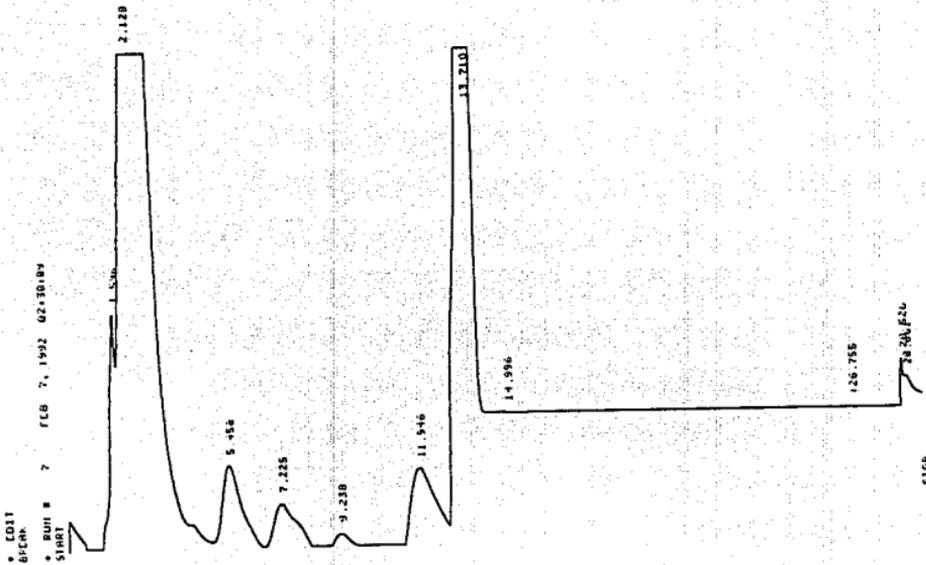
5.6.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

Comparando los cromatogramas obtenidos con los reportados en la literatura (10, 23, 27, 28) se encontró que las primeras bandas (t_R más bajos) corresponden a compuestos libres (primeramente capsorrubina (t_R cercano a 1.2 min.) y luego capsanteno (t_R cercano a 2 min.)), los siguientes a compuestos monoesterificados y los últimos a compuestos diesterificados (ver gráficas 11 a 14).

Referente a la abundancia, con base en las áreas relativas que se obtienen de los cromatogramas (gráficas 11 a 14) para el chile ancho (P1) el pigmento mayoritario es el capsanteno, con cerca del 80% de los pigmentos rojos presentes (gráfica 11).

Es apreciable que en P1 (extraído mediante el método de extracción 1 (4.1.1)) es más abundante la forma diesterificada del capsanteno que en P2 y P4, lo cual debió ser causado por una baja efectividad de la saponificación. En estos casos, la literatura (40) recomienda un calentamiento suave (no mayor a 40 °C) de la mezcla de reacción, mismo que no fue realizado para evitar toda posibilidad de descomposición de los pigmentos.

En los 3 pigmentos (P1, P2 y P4) se hallaron 2 bandas principales en tiempos de retención cercanos a 2 y 13 minutos respectivamente, lo que indica la presencia de capsanteno en sus



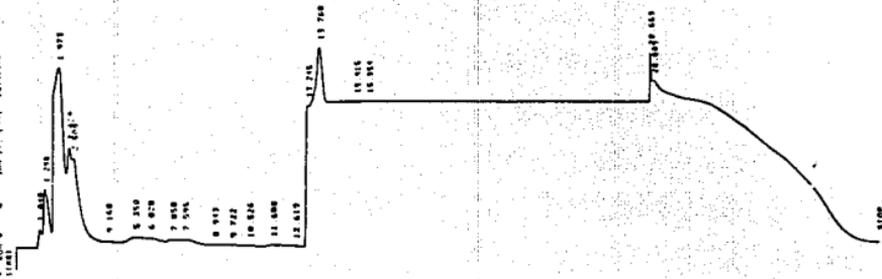
RUN# 7 FEB 7, 1992 02:30:02

AREA#	RT	AREA	%	TYPE	WIDTH	AREA#
1	1.536	5420768	40.0	UV	.280	3
2	2.128	3863448	28.6	UV	.273	4
3	5.454	3458780	25.6	UV	.270	5
4	7.235	2588965	19.1	UV	.268	6
5	11.546	9622194	71.1	UV	.266	7
6	13.710	5185153	38.4	UV	.266	8
7	14.996	4751488	35.2	UV	.281	9

TOTAL AREA=1.538E+08
 MIN FWHM=1.000E+01

Gráfica 11: Cromatograma del pigmento 1

Form ID NAVECO (revised)
 1. 8000 6 6 Jan 17, 1967 1844725



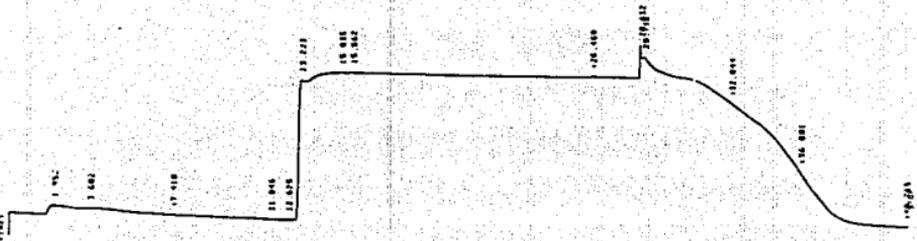
FORM 6 Jan 17, 1967 1844725

AREA	AREA %	TIME	CONC
1.165	0.002	1.165	0.002
1.215	0.004	1.215	0.004
1.973	10.000	1.973	10.000
2.645	0.001	2.645	0.001
32.245	100.000	32.245	100.000
18.915	0.001	18.915	0.001
18.945	0.001	18.945	0.001
38.347	0.001	38.347	0.001
64.5	0.001	64.5	0.001

Gráfica 12: Cromatograma del pigmento 2

110 7, 1992 01:06:17
 -2- JIM FEAR'S SLIDER

110 7, 1992 01:06:17
 110 7, 1992 01:06:17

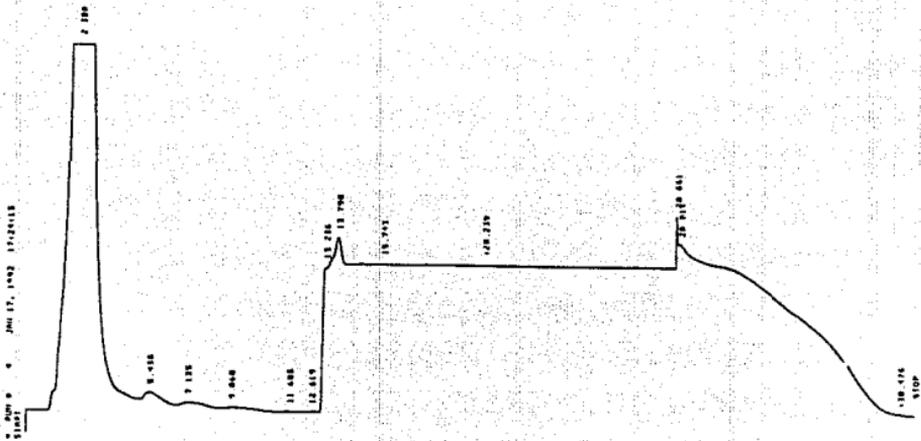


110 7, 1992 01:06:17

TIME	AREA	PERCENT
1.942	10000	0.0000
3.682	10000	0.0000
17.018	10000	0.0000
11.916	10000	0.0000
12.028	10000	0.0000
13.223	10000	0.0000
15.015	10000	0.0000
15.562	10000	0.0000
176.450	10000	0.0000
176.452	10000	0.0000
182.004	10000	0.0000
186.081	10000	0.0000
190.214	10000	0.0000

TOTAL AREA: 1000000.00
 TOTAL PERCENT: 100.0000

Gráfica 14: Cromatograma del eluyente



4 JUN 17, 1962 17122118
 4000
 3000
 2000
 1000
 0

7.138
 5.018
 7.138
 9.048
 11.088
 12.618
 13.218
 13.798
 15.748
 17.278
 25.518
 38.476
 STOP

4000
 3000
 2000
 1000
 0

Gráfica 13: Cromatograma del pigmento 4

formas libre y diesterificada (t_R cercano a 13 min). Cabe señalar que esta técnica no permitió separar varios pigmentos con un rendimiento suficiente (se obtienen microgramos en algunos casos) para su posterior identificación por otros métodos⁽³⁾. Al hacer el barrido con el blanco, el eluyente formó una especie de "montaña" en los cromatogramas, en un tiempo de retención comprendido entre 13 y 38 min, lo cual no afecta por ser simplemente una variable aditiva. Cabe señalar que de las gráficas 11 a 14, aunque no están a la misma escala, lo más importante son los datos sobre las áreas relativas que presentan.

5.6.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCF)

Se anexa la tabla 5, que contiene los coeficientes de partición y los tiempos de retención obtenidos, asociados con los obtenidos en la cromatografía de alta resolución.

HPLC	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (60)		
t_R (min)	R_f	R_f Lit.*	Pigmento
----	.92	----	Compuestos amarillos (2 bandas juntas)
----	.64	----	Banda color naranja
13.71	.55	.52	Capsanteno diéster
5.458	.276	.21	Capsanteno monoéster
2.128	.1149		Capsanteno libre

Tabla 5

La tabla anterior confirma la prevaencia del capsanteno es esta especie del gnero *capsicum*, así como la poca eficiencia de la saponificación efectuada (ver 5.1.1).

5.7 ESPECTROMETRIA DE MASAS POR BOMBARDEO DE ATOMOS RAPIDOS

Se realizó este análisis a partir de 2 picos representativos que se obtuvieron del análisis de *Cromatografía Líquida de Alta Resolución* del pigmento 1 (ver 5.6.1), en tiempos de retención (t_R) de 1.596 y 2.128 min.

En la gráfica 15 ($t_R = 1.596$ min) se observan picos a 551 m/z , correspondientes probablemente a zeaxantina o capsorrubina con la pérdida de un grupo $OH^- (M-17)^+$ y la pérdida de 92 unidades correspondientes a un Tolueno $(M-92)^+ = 476 m/z$, característico para los carotenoides; sin embargo, está opacada por diversos compuestos, probablemente productos de degradación de zeaxantina.

En el espectro correspondiente a la gráfica 16 ($t_R = 2.128$ min) se aprecian pérdidas de $(M-18-92)^+ = 474 m/z$, lo que hace suponer al compuesto como capsanteno no esterificado. Lo anterior es validado por la separación vía *Cromatografía Líquida de Alta Resolución* a $t_R = 2.128$, que es el tiempo en el cual se aísla el capsanteno. Además, en el mismo espectro se aprecian fragmentos de m/z a 380 y 430, característicos del capsanteno. Sin embargo, la interpretación de los espectros fue difícil debido a la presencia de ácidos grasos (se observan en picos m/z 55(100) y

69(70), característicos de cadenas hidrocarbonadas grandes (ver espectros correspondientes a las gráficas 15 y 16)), los cuales interfieren grandemente con la caracterización espectral. Además, comparando los espectros obtenidos con los datos reportados en la literatura⁽¹³⁾, en la zona de aparición del ion molecular (M^+ 584) no se aprecia el mismo, ya que los ácidos grasos libres enmascaran el espectro característico del carotenoide en estudio.

5.8 ACIDOS GRASOS PRESENTES

Con base en el cromatograma correspondiente a la transesterificación del pigmento 1 (gráfica 17) y a los espectros (gráficas 18 - 24) obtenidos del sistema acoplado cromatografía de gases-espectrometría de masas por impacto electrónico, se obtuvo la siguiente tabla:

t_R (min)	Acido Graso	Fl s/sap (%)	Paprika Lit. (61) (%)
12.05	Laurico (C_{12} sat.)	Trazas	1
13.33	Mirístico (C_{14} sat.)	15.25	2
15.51	Palmítico (C_{16} sat.)	52.2	14
16.33	Linoléico (C_{18} insat.)	5	66
16.65	Oléico (C_{18} insat.)	28.79	12
17.86	Esteárico (C_{18} sat.)	3.76	Trazas
18.45	Linolénico (C_{18} insat.)	2	5

Tabla 6

MASS SPECTRUM

12-18-92 12:16:00 + 01:31

SAMPLE: MUESTRA "CAPOTEINDS "B". FES-CUAUTITLAN, ALEJANDRO

CONDOS.: DEP (PROBE), RATE=20, SCAN 7 SECUENCIA "T0".

TEMP: 60 DEC. C

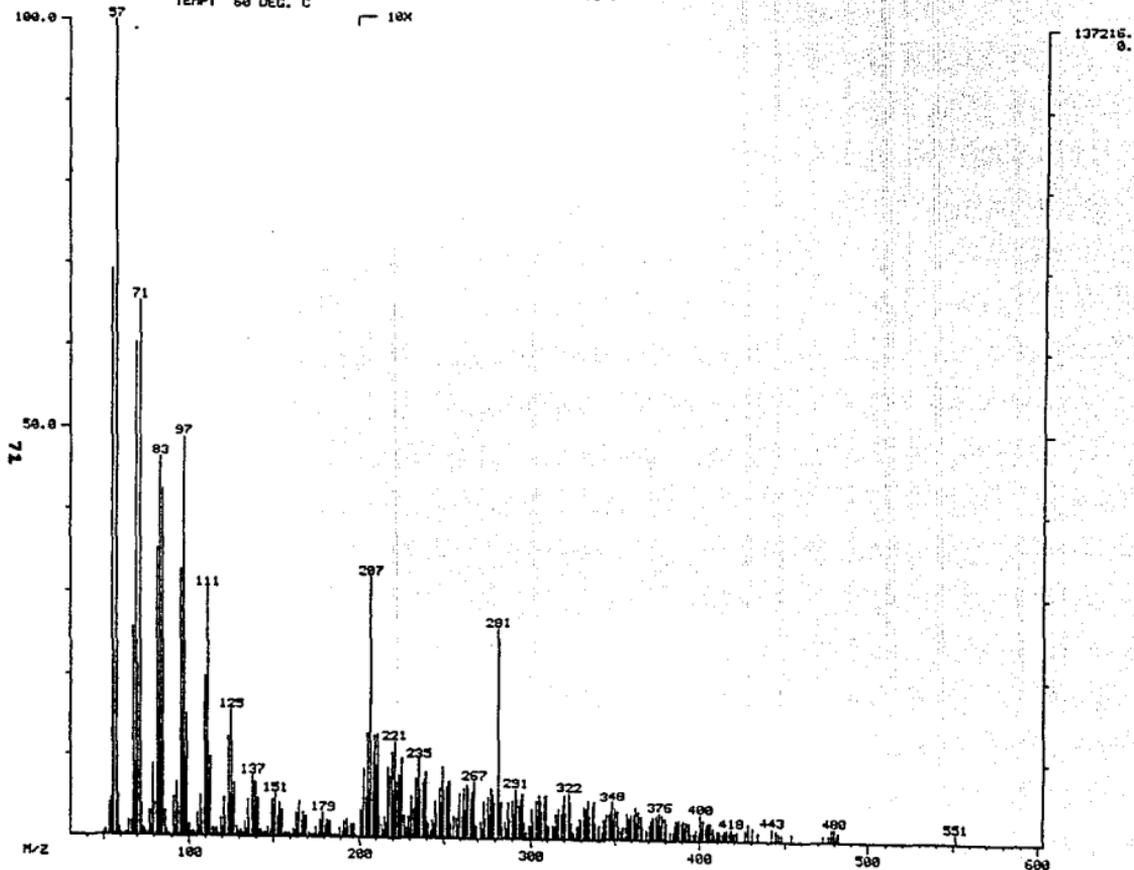
DATA: 52273 045

CALI: ALE13 03

SOLANO

BASE M/Z: 57

RIC: 1374216.

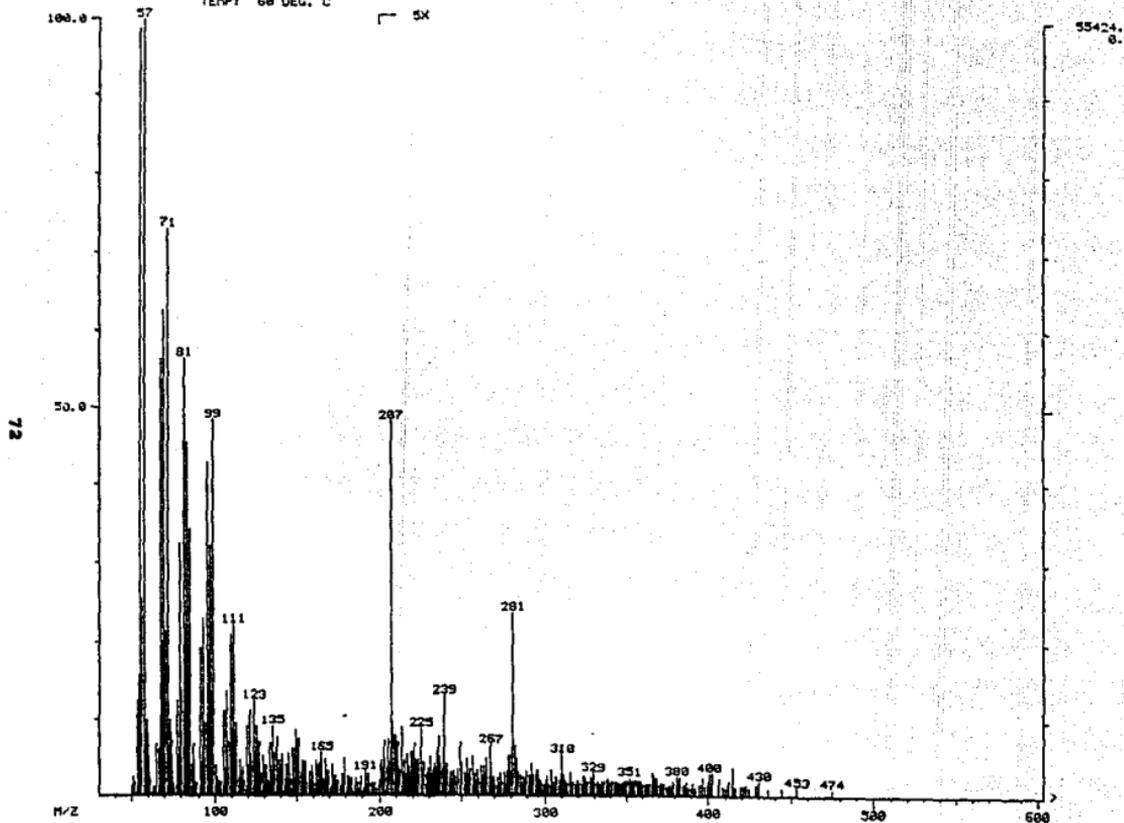


Gráfica 15: Espectro de Masas del pigmento 1 a t_R de 1.596 min.

MASS SPECTRUM
12/18/92 12:38:00 + 0:35
SAMPLE: MUESTRA CAROTENOS "0". FES-CUAUTITLAN. ALEJANDRO
COMOS. DEP (PROBE). RATE=20. SCAN Y SECUENCIA "10".
TEMP: 60 DEG. C

DATA: S2277 #51
CALI: ALE15 #3
SOLANO.

BASE M/Z: 57
RIC: 829440.



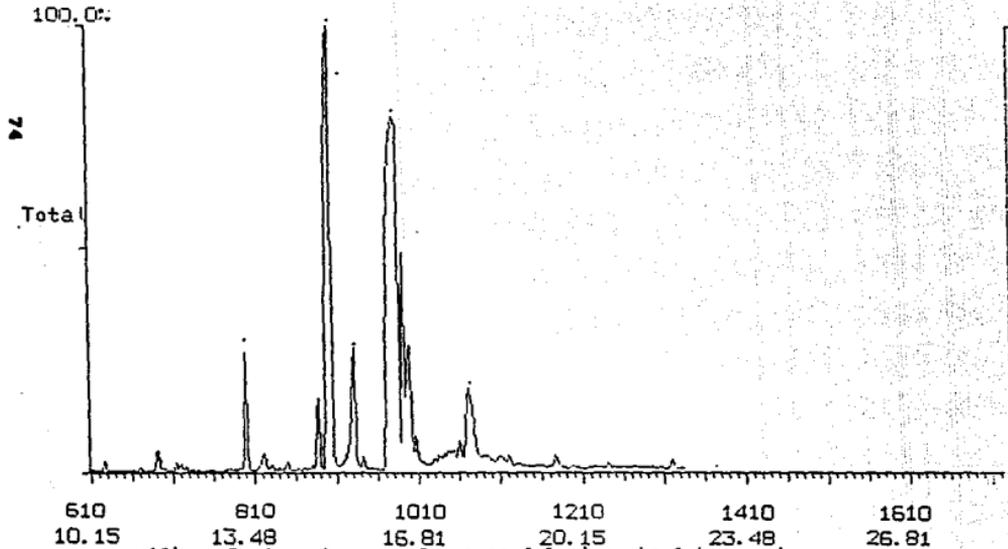
Gráfica 16: Espectro de Masas del pigmento 1 a t_R de 2.128 min.

Lo anterior indica que el ácido palmítico es el predominante en el chile ancho, mientras que el linoleico lo es en la paprika⁽⁶¹⁾. Los espectros obtenidos se correlacionaron con los reportados en la literatura⁽⁴⁸⁾.

Este resultado es muy importante ya que el ácido linoléico por su número de insaturaciones, es más susceptible de oxidación que ácidos más saturados, no solo por efecto del oxígeno atmosférico sino también por efecto de luz y temperatura⁽⁴⁰⁾; esto puede ser una posible causa de la menor estabilidad de P2 comparada con P1.

Chromatogram File: 000068.01 92-10-15 19:40
Comment: Alé::Transesterificacion I

Scan: 610 to 1335 Int: 2125227(=100%) Scan No.: Int:



Gráfica 17: Cromatograma de gases del pigmento 1 transest.

6 CONCLUSIONES

1) A pesar de la importancia del capsanteno como uno de los pigmentos predominantes en algunos frutos del género *Capsicum*, la bibliografía reporta poca información del mismo; sería interesante realizar más estudios al respecto, por ejemplo su contenido en chiles mexicanos.

2) En cuanto a la extracción, el método que emplea antioxidantes (4.1.1) es bastante aceptable; sin embargo, se pudo ver que la saponificación efectuada en P1 no es del todo eficiente, dado que los espectros obtenidos vía FAB-MS así como los cromatogramas obtenidos vía HPLC indican la presencia de ácidos grasos.

3) Los 4 pigmentos son aceptablemente solubles en medio básico (debido muy probablemente a procesos de formación de sales y saponificación de los pigmentos), poco solubles en medio neutro y prácticamente insolubles en medio ácido.

4) El rendimiento obtenido de ambos pigmentos (P1 y P4), que fue de 2.77 % y 2.1 % respectivamente, es aceptable para ambos procesos, ya que fueron mayores a otros reportados en la bibliografía para diversas variedades de esta especie.

5) Los pigmentos obtenidos por los métodos empleados presentan, tanto para paprika como para chile ancho, una longitud de onda de

absorbancia máxima de 460 nm; son solubles en medio básico y prácticamente insolubles en medio ácido (HCl/H₂O).

6) El pigmento 1 satisface los requerimientos mínimos de color (su poder tintóreo es de 20,625 U.C.), sobre todo si se considera que el polvo de chile ancho sufre procesos degradativos durante su almacenaje. El pigmento 4, cuyo poder tintóreo es de 12,435 U.C., no satisfizo los requerimientos mínimos de color (20,000 U.C.). Por lo anterior, el método de extracción más adecuado entre los realizados es el 1 (ver 4.1.1).

7) En cuanto a la estabilidad, se observaron comportamientos distintos para los diferentes pigmentos obtenidos a diferentes condiciones; se presentan al menos 3 procesos: oxidación, degradación y solubilidad. Sin embargo, también es importante tomar en consideración otras reacciones o procesos que se pueden presentar, como son polimerización, isomerización, saponificación, formación de sales, etc., lo cual demuestra que el estudio de la estabilidad es complejo.

8) Los pigmentos en general tuvieron vidas medias más altas a baja temperatura, pH básico, en presencia de antioxidantes y en ausencia de luz. Bajo éstas condiciones, como se indica en los resultados (tabla 4) la vida media mayor obtenida fue:

P1 = 735.84 hrs (Formación de la sal del o los pigmentos)

P2 = 430.884 hrs. (Desintegración de la sal del o los pigmentos)

P3 = 70.68 hrs. (Desintegración de la sal del o los pigmentos)

P4 = 109.488 hrs. (Formación de la sal del o los pigmentos)

9) En el presente trabajo, el factor más importante en la estabilidad es la temperatura, seguida por la luz.

10) El comportamiento de los pigmentos P1, P3 y P4 (todos ellos de chile ancho) obedece una ecuación de 1^{er} orden.

11) Se observó que en varias pruebas, la estabilidad (medida en función del color) iba en aumento aún después de varios días; lo anterior se puede deber a reacciones o procesos graduales entre los pigmentos y el medio, como lo son la solubilidad de los carotenoides tomando en cuenta que tienen secciones hidrofóbicas (sobre todo si están formando ésteres con ácidos grasos) e hidrofílicas, formación de sales, saponificación de los mismos, etc., que incluso se observó, en general fueron catalizados por luz y temperatura.

12) Por otro lado, el comportamiento de P2 (Paprika) obedece una ecuación de 2^{do} orden. En base a lo que indican sus diagramas de estabilidad, su preparación debió incluir conservadores; sería interesante saber si durante el proceso de su extracción se le sometió a algún proceso de saponificación.

13) Se observó la importancia de la saponificación y el uso de antioxidantes en la extracción de los pigmentos, pues P1 tuvo

notables cualidades de color y estabilidad, mismas que no presentó P4.

14) El contenido de ácidos grasos afecta la estabilidad de los pigmentos, siendo ésta mayor cuando dichos ácidos son saturados, y menor para los correspondientes ácidos grasos insaturados.

15) Los 3 pigmentos analizados vía HPLC presentan 2 picos principales en tiempos de retención similares, lo que nos sugiere composiciones parecidas. Los compuestos libres salen en primer plano, seguidos de monoésteres y diésteres, los cuales son comprobables vía CCF, dado que los R_f son particulares para cada compuesto.

16) El espectro de masas del pico obtenido a t_R 1.596 min indica la presencia de capsorrubina y zeaxantina no esterificados, mientras que el espectro del pico obtenido a t_R 2.128 min. indica la presencia de capsanteno no esterificado, así como ácidos grasos libres.

17) El ácido Palmítico es el que se encuentra predominantemente en el chile ancho, mientras que el Linoleico en la paprika.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

7 BIBLIOGRAFIA Y HEMEROGRAFIA

- 1.- Ackman, R., Progress in the Chemistry of Fats and Others Lipids, 1972, 12, 254-257.
- 2.- Aczél, A., APPLICATION OF OVERPRESSURED LAYER CROMATOGRAPHY IN RED PEPPER ANALYSIS. STUDY OF THE CAROTENOIDS RESPONSIBLE FOR THE RED COLOR IN GROUND RED PEPPER, J. High Res. Chromatogr. & Chromatogr. Commun., 1986, 9 (7), 407-408.
- 3.- Almela L., López J., Candela E. and Alcázar D. SEPARATION AND DETERMINATION OF INDIVIDUAL CAROTENOIDS IN A CAPSICUM CULTIVAR BY NORMAL -PHASE HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, J. Chromatogr., 1990, 502, 95-106.
- 4.- Aurand, J. Woods E. and Wells C., FOOD COMPOSITION AND ANALISIS, Van Nostrand Reinhold Company, New York 1987.
- 5.- Baldwin M., Welham K., Toth Istvan and Gibbons W., HYDRIDE ABSTRACTION IN FAST ATOM BOMBARDMENT, Org. Mass Spectrom., 1988, 23, 697-699.
- 6.- Barber M., Bordoli R., Sedgwick D. and Tyler A., FAST ATOM BOMBARDMENT OF SOLIDS (F.A.B.): A NEW ION SOURCE OF MASS SPECTROMETRY, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, 325-327.

- 7.- Bauernfeind, J., CAROTENOID VITAMIN A PRECURSORS AND ANALOGS IN FOODS AND FEEDS, *J. Agric. Food Chem.*, 1972, 20 (3), 456-473.
- 8.- Bertelsen & Nguyen, STRUCTURAL ELUCIDATION OF LONG-CHAIN FATTY ACIDS AND ALCOHOLS BY MASS SPECTROMETRY OF THEIR CYCLIC AMIDE DERIVATES, *Fette-Seifen-Anstrichmittel*, 1985, 87 (8), 318-323.
- 9.- Biacs P., Czinkotai B. and Hoschke A., FACTORS AFFECTING STABILITY OF COLORED SUBSTANCES IN PAPRIKA POWDERS, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, 40 (3), 363-366.
- 10.- Biacs P., Daoud H., Pavisa A. and Hajdu F., STUDIES ON THE CAROTENOID PIGMENTS OF PAPRIKA, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, 37, 350-353.
- 11.- Boumahraz M., Davydov V., Elizalde M. and Kiselev A., INTERMOLECULAR INTERACTIONS IN LIQUID ADSORPTION CHROMATOGRAPHY, *Chromatographia*, 1983, 17 (3), 143.
- 12.- Bureau J. and Bushway R., HPLC DETERMINATION OF CAROTENOIDS IN FRUITS AND VEGETABLES IN THE UNITED STATES, *J. Food Sci.* 1986, 51 (1), 128-130.
- 13.- Caccamese S. and Garozzo D., ODD-ELECTRON MOLECULAR ION AND LOSS OF TOLUENE IN FAST ATOM BOMBARDMENT MASS SPECTRA OF

SOME CAROTENOIDS, *Org. Mass Spectrom.*, 1990, 25, 137-140.

- 14.- Carnevale J., Cole E. and Crank G., PHOTOCATALYZED OXIDATION OF PAPRIKA PIGMENTS, *J. Agric. Food. Chem.*, 1980, 28, 953-955.
- 15.- Castellan, Gilbert, FISICOQUIMICA, 2ª edición, Ed. SITESA, México D.F. 1987, pp 620-621 y 841-865.
- 16.- Castro, V., DETERMINACION DE CAPSAICINA EN ALGUNAS VARIETADES MEXICANAS DE CAPSICUM, Tesis Profesional, Instituto de Química, UNAM 1979.
- 17.- Considine, D., FOODS AND FOOD PRODUCTION ENCYCLOPEDIA, Van Nostrand Reinhold Co., New York 1982, pp 1453-1456.
- 18.- Davies B., CAROTENOID METABOLISM AS A PREPARATION OF FUNCTION, *Ninth International Symposium of Carotenoids, Pure & Appl. Chem.*, 1991, 63 (1), 131-132.
- 19.- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACION, Enero 18 de 1988, artículos 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696 y 701.
- 20.- Dominic, W., MECHANISM AND THEORY IN FOOD CHEMISTRY, Van Nostrand Reinhold Co., New York 1989.
- 21.- Edwards, C. and Lee C., DETERMINATION OF BETA-CAROTENE

STEREISOMERS BY SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS, *J. Food Sci.*,
1986, 51 (2), 528-530.

- 22.- ENCICLOPEDIA SALVAT, Salvat Editores S.A., México D.F. 1976,
pp 817.
- 23.- ENCICLOPEDIA OF FOOD, AGRIC. AND NUTRITION, Mc Graw Hill
Co., New York, USA 1977, pp 112-114, 427, 435 y 584-585.
- 24.- Fisher C. and Kocis J., SEPARATION OF PAPRIKA PIGMENTS BY
HPLC, *J. Agric. Food Chem.*, 1987, 35, 55-57.
- 25.- FOOD CHEMICALS CODEX, 3rd edition, Nac. Academic Press, New
York 1981, pp 27-28, 37-38, 67-68 y 310-311.
- 26.- Furia, T., HANDBOOK OF FOOD ADDITIVES, Chemical Rubber, Co.,
Cleveland 1968, pp 25-49.
- 27.- García Z. y Zaragoza S., ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL
COLORANTE DE COCHINILLA Y SU APLICACION EN ALIMENTOS, Tesis
Profesional, PES-Cuautitlán, UNAM 1991.
- 28.- Govindarajan, V.S., CAPSICUM.- PRODUCTION, TECHNOLOGY,
CHEMISTRY AND QUALITY, *CRC-Critical Rev. Food Science and
Nutrition*, 1986, 24 (3), 245-355.
- 29.- Gregory G., Chen T. and Philip T., QUANTITATIVE ANALYSIS OF

CAROTENOIDS AND CAROTENOID ESTERS IN FRUITS BY HPLC: RED BELL PEPPERS, *J. Food Sci.*, 1987, 52 (4), 1071-1073.

- 30.- Gross, Jeana, **PIGMENTS IN FRUITS**, Academic Press, London 1987, pp 87-155.
- 31.- Gruyter, Walter, **CONCISE ENCYCLOPEDIA BIOCHEMISTRY**, 2nd edition, New York 1988, pp 100-101 y 584-585.
- 32.- Hayashi H., Tasumi M. and Atkinson G., **VIBRATIONALLY EXCITED STATES IN CAROTENOIDS: PICOSECOND TIME-RESOLVED ANTI-STOKES RESONANCE RAMAN SPECTROSCOPY**, *Chem. Phys. Lett.*, 1991, 178 (4), 388-392.
- 33.- Heinonen M., Ollilainen V., Linkola E., Varo P. and Koivistoinen P., **CAROTENOIDS IN FINISH FOODS: VEGETABLES, FRUITS AND BERRIES**, *J. Agric. Food Chem.*, 1982, 37, 655-659.
- 34.- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (SARH), **PRESENTE Y PASADO DEL CHILE EN MEXICO**, México 1984.
- 35.- Ireland, P., **HPLC IN FOOD ANALYSIS**, 2nd Edition, Academic Press, New York 1988, pp 471-474 y 485.
- 36.- Jamieson, R. and Reid E., **THE ANALYSIS OF OIL AND FATS BY GAS CHROMATOGRAPHY**, *J. Chromatogr.*, 1965, 17, 230-237.

- 37.- Jellum, M. and Worthington R., **RAPID GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHIC PROCEDURE FOR THE ANALYSIS OF METHYL ESTERS OF LONG CHAIN FATTY ACIDS**, *J.A.O.C.S.*, 1966, **43**, 661-664.
- 38.- Kanner J. and Mendel H., **CAROTENE OXIDIZING FACTORS IN RED PEPPER FRUITS (CAPSICUM ANNUUM L.)**. ASCORBIC ACID. *J. Food Sci.*, 1976, **41**, 183-185.
- 39.- Kanner J. and Mendel H., **CAROTENE OXIDIZING FACTORS IN RED PEPPERS FRUITS (CAPSICUM ANNUUM L.): PEROXIDASE ACTIVITY**, *J. Food Sci.*, 1977, **42** (6), 1549-1551.
- 40.- Khachik F., Beecher G., Goli M. and Lusby W., **SEPARATION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF CAROTENOIDS IN FRUITS, VEGETABLES AND HUMAN PLASMA BY HPLC**, *Ninth International Symposium of Carotenoids, Pure & Appl. Chem.*, 1991, **63** (1), 71-80.
- 41.- Kohler, Bryan, **A SIMPLE MODEL FOR LINEAR POLYENE ELECTRONIC STRUCTURE**, *J. Chem. Phys.*, 1990, **93** (8), 5838-5842.
- 42.- Lam, Kai et al, **TENTATIVE IDENTIFICATION OF HUMULENE DIEPOXIDES BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY / CHEMICAL IONIZATION MASS SPECTROMETRY**, *J. Agric. Food Chem.*, 1987, **35**, 57-59.
- 43.- Lea A., **HPLC IN FOOD ANALYSIS**, 2nd Edition, Academic Press,

New York, USA 1988, pp 298-315.

- 44.- Marmion D., **HANDBOOK OF US COLORANTS**, 3rd Edition, John Wiley & Sons Inc., New York 1991, pp 264-266.
- 45.- Masada Y., Hashimoto K., Inoue T. y Suzuki M., **ANALYSIS OF THE PUNGENT PRINCIPLES OF CAPSICUM ANNUM BY COMBINED GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY**, *J. Food Sci.*, 1971, 36, 858-860.
- 46.- Mathews M., **RECENT PROGRESS IN THE MEDICAL APPLICATIONS OF CAROTENOIDS**, *International Simposium of Carotenoids, Pure & Appl. Chem.*, 1991, 63 (1), 147-156.
- 47.- Matsuno T., **XANTHOPHYLLS AS PRECURSORS OF RETINOIDS**, *International Simposium of Carotenoids, Pure & Appl. Chem.*, 1990, 63 (1), 81-88.
- 48.- Mc Lafferty, F., **MASS SPECTROMETRY OF ORGANIC IONS**, Academic Press, New York 1963, pp 399-430.
- 49.- Mejía L., Hudson E., González B. and Vázquez F., **CAROTENOID CONTENT AND VITAMIN A ACTIVITY OF SOME COMMON CULTIVARS OF MEXICAN PEPPERS**, *J. Food Sci.*, 1988, 53 (5), 1448-1451.
- 50.- Merck Publishers Co, **THE MERCK INDEX**, 11th Edition, New Jersey 1989.

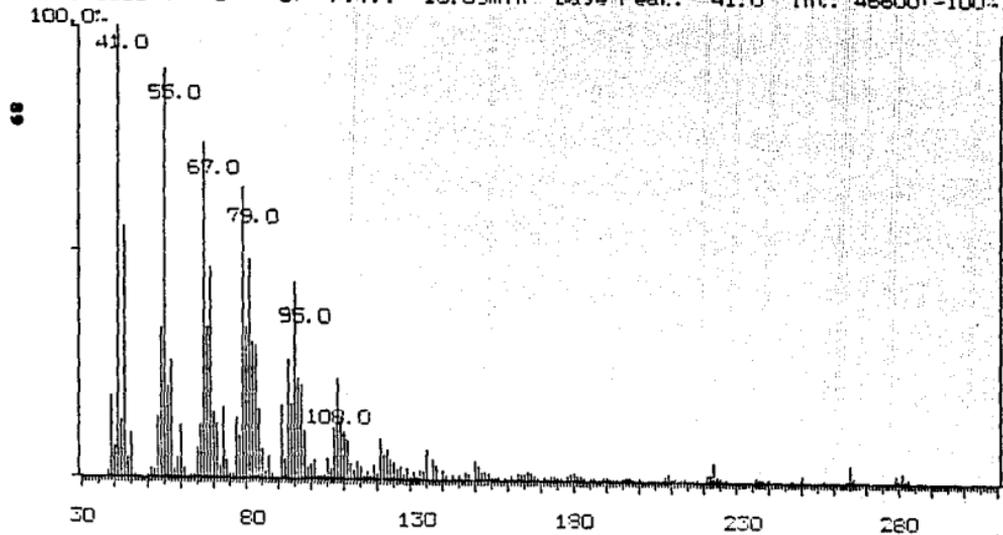
- 51.- Mimuro M. and Katoh T., CAROTENOIDS IN PHOTOSYNTHESIS: ABSORPTION, TRANSFER AND DISSIPATION OF LIGHT ENERGY, *Ninth International Simposium of Carotenoids, Pure & Appl. Chem.*, 1991, 63 (1), 123-130.
- 52.- Murray, R. et al, BIOQUIMICA DE HARPER, 11ª edición, Ed. Manual Moderno, México D.F. 1988, pp 129-133.
- 53.- Nagle B., Villalon B. and Burns E., COLOR EVALUATION OF SELECTED CAPSICUMS, *J. Food Sci.*, 1979, 44 (2), 416-418.
- 54.- Nee, M., FLORA DE VERACRUZ, *Inst. Nal. de Investigaciones sobre Recursos Bióticos*, Jalapa Ver. 1986, fascículo 49.
- 55.- Noga G. y Lenz F., SEPARATION OF CITRUS CAROTENOIDS BY REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CROMATOGRAPHY, *Cromatographia*, 1983, 17 (3), 139-142.
- 56.- Ollilainen, V, THE ANALYSIS OF CAROTENOIDS AND RETINOIDS, *Helsingin-Yliopisto-Elitärvikekemian-Ja-Technologian-Laitos -EKT-Sari*, 1987, 734, 93 .
- 57.- Paredes A. y Ruvalcava L., ESTUDIO SOBRE LA ESTABILIDAD DE POLVO DE BETABEL Y SU POSIBLE APLICACION EN ALIMENTOS, Tesis Profesional, FES-Cuautitlán, UNAM 1991.

- 58.- Paust J., RECENT PROGRESS IN COMMERCIAL RETINOIDS AND CAROTENOIDS, *Ninth International Simposium of Carotenoids, Fuke & Appl. Chem.*, 1991, 63 (1), 45-49.
- 59.- Pavisá, AC, HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC CONTROL OF THE STANDARD SPECIFICATION OF GROUND PAPRIKA, *Acta Alimentaria*, 1987, 16 (2), 129-142.
- 60.- Philip T. and Francis F., ISOLATION AND CHEMICAL PROPERTIES OF CAPSANTHIN AND DERIVATIVES, *J. Food Sci.*, 1971, 36, 823-827.
- 61.- Philip T., Nawar W. and Francis F., THE NATURE OF FATTY ACIDS AND CAPSANTHIN ESTERS IN PAPRIKA, *J. Food Sci.*, 1971, 36, 98-100.
- 62.- Philip T. and Francis F., OXIDATION OF CAPSANTHIN, *J. Food Sci.*, 1971, 36, 96-97.
- 63.- Reyes, R., EVALUACION DE LA ESTABILIDAD Y APLICACION DE UNA MEZCLA DE COLORANTES DE ROJO COCHINILLA Y ROJO # 3, Tesis Profesional, FES-Cuautitlán, UNAM 1991.
- 64.- Rodríguez C. y Martínez E., ESTUDIO QUIMICO DE LA OLEORRESINA DE CHILE DE ARBOL, Tesis Profesional, FES-Cuautitlán, UNAM 1990.

- 65.- Sande, J., CAPSICUMS. WITH ROCKWOOL, GROWERS USING WARM AIR HEATING CAN ALSO FOLLOW SUIT, Groeten-en-Fruit, 1990, 45 (26), 32-33 (CAB Abst. 060-05296).
- 66.- Schery, R., PLANTS FOR MAN, 2nd Edition, Prentice-Hall, New Jersey, USA 1972, pp 475-476.
- 67.- Surman D. and Vickerman J., FAST ATOM BOMBARDMENT QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1981, 324-325
- 68.- Van Niekerk P., HPLC IN FOOD ANALYSIS, 2nd Edition, Academic Press, New York 1988, pp 134-143.
- 69.- Walpole, R.E., PROBABILIDAD Y ESTADISTICA PARA INGENIEROS, 3^a edición, Ed. Interamericana, México D.F. 1986, pp 357-393.
- 70.- Wingrove A. y Caret R., QUIMICA ORGANICA, Ed. Harla, México D.F. 1984, pp 327-405 y 1106-1108.
- 71.- Yuste F., Castro V. y Walls F., DETERMINACION DE CAPSAICINA EN ALGUNAS VARIEDADES MEXICANAS DEL GENERO CAPSICUM, Rev. Soc. Quím. Mex., 1970, 24 (4), 166-167.

Mass Spectrum File: 000068.01 92-10-15 19:40
Comment: Ale:-Transesterificacion I

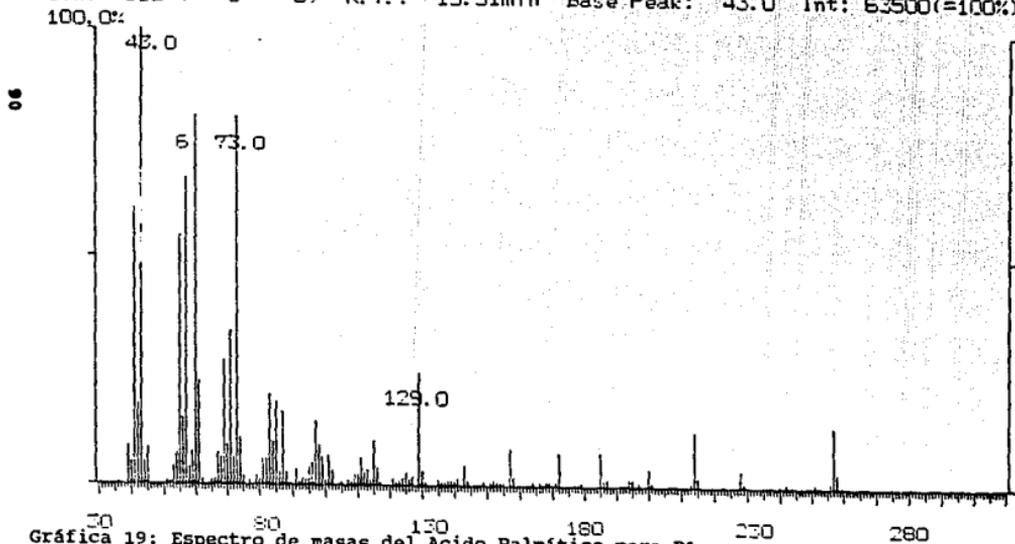
Scan: 1000 (0- 0) P.T.: 16.65min Base Peak: 41.0 Int: 46800(=100%)



Gráfica 18: Espectro de masas del Acido Oleico para P1

Mass Spectrum File: 000068.01 92-10-15 19:40
Comment: Alex-Tranesterificacion I

Scan: 932 (0- 0) R.T.: 15.51min Base Peak: 43.0 Int: 63500(=100%)

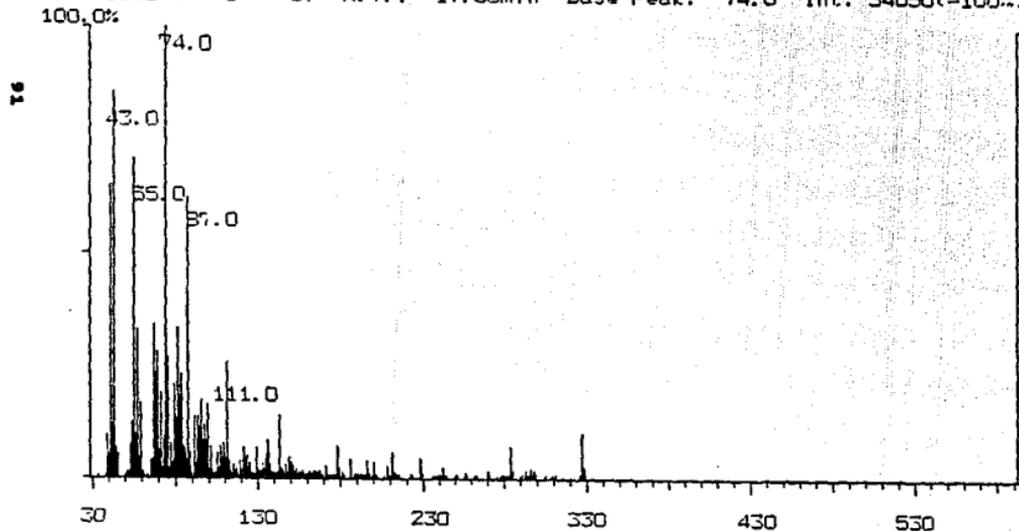


Gráfica 19: Espectro de masas del Acido Palmítico para P1

Apéndice

Mass Spectrum File: 000068.01 92-10-15 19:40
Comment: Alex-Transesterificacion I

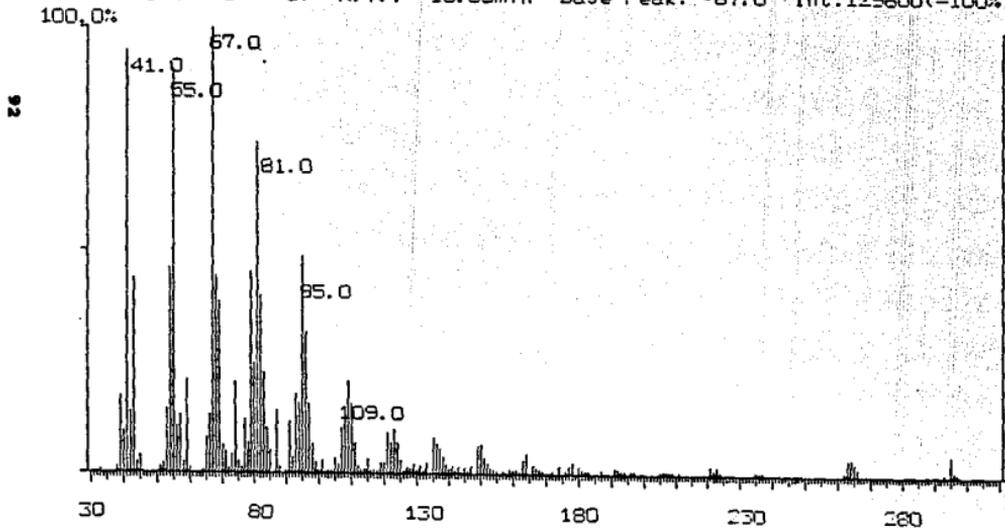
Scan: 1073 (0- 0) R.T.: 17.86min Base Peak: 74.0 Int: 34050(=100%)



Gráfica 20: Espectro de masas del éster del ác. esteárico para P1

Mass Spectrum File: 000068.01 92-10-15 19:40
Comment: Alex-Transesterificacion I

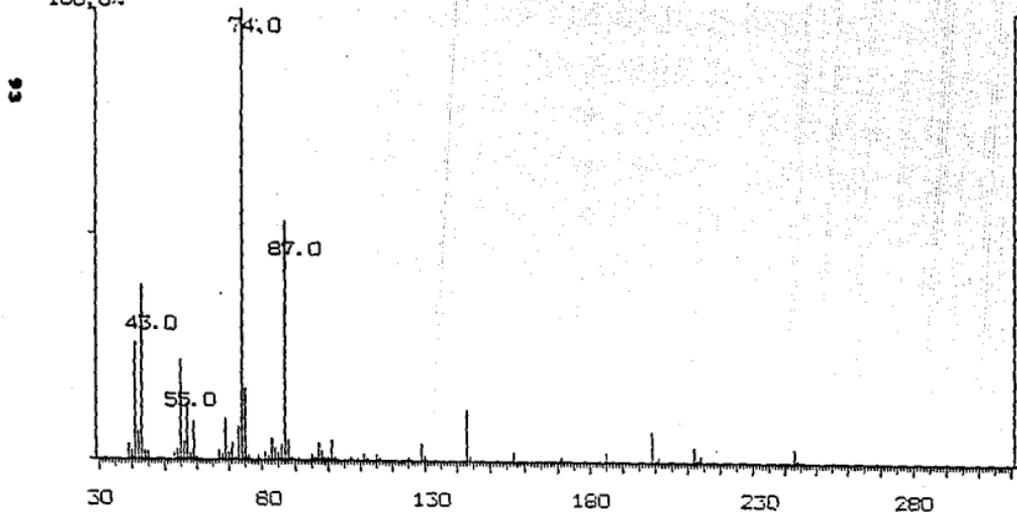
Scan: 981 (0- 0) R.T.: 15.33min Base Peak: 67.0 Int:129600(=100%)



Gráfica 21: Espectro de masas del éster del ácido linoleico para P1

Mass Spectrum File: 00068.01 92-10-15 19:40
Comment: Alex-Transesterificacion I

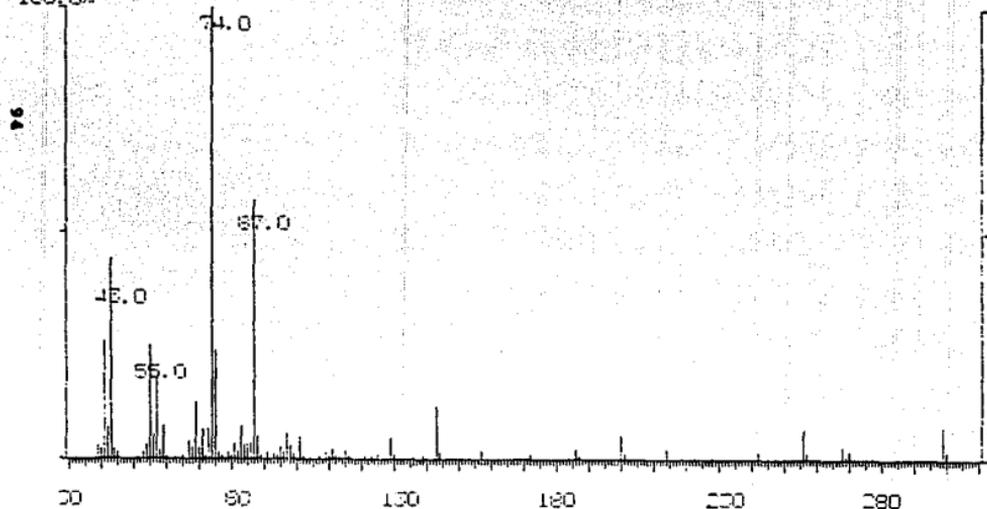
Scan: 801 (0- 0) R.T.: 13.33min Base Peak: 74.0 Int:158100(=100%)
100.0%



Gráfica 22: Espectro de masas del éster del ácido Mirístico para P1

Mass Spectrum File: 000068.01 92-10-15 19:40
Comment: Alex-Transesterificacion I

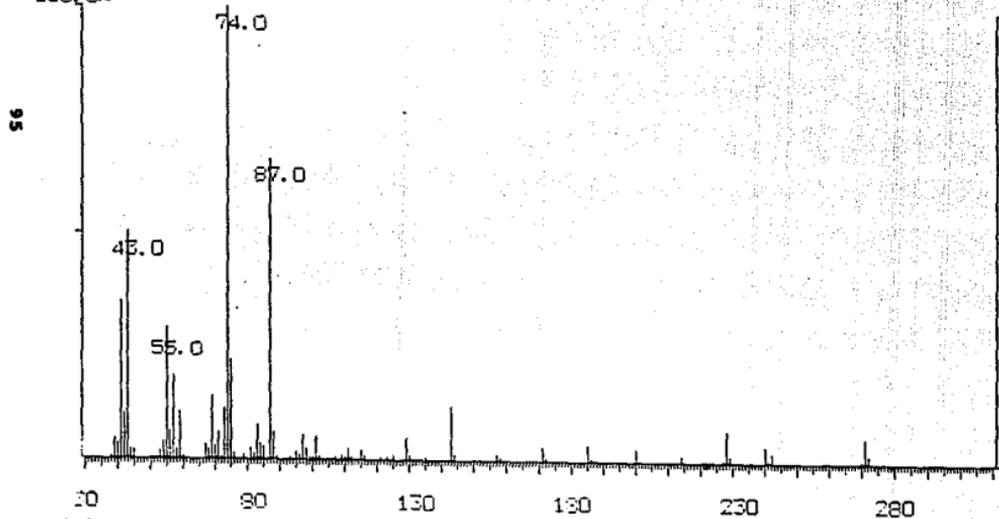
Scan: 992 (0- 0) P.T.: 16.51min Base Peak: 74.0 Int:214000(=100%)
100.0%



Gráfica 23: Espectro de masas del éster del ác. Oleico para PI

Mass Spectrum File: 000068.01 92-10-15 19:40
 Comment: Alex-Transesterificacion I

Scan: 904 (0- 0) R.T.: 15.05min Base Peak: 74.0 Int:409400(=100%)
 100.0%



Gráfica 24: Espectro de masas del éster del ác. Palmítico para P1