



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

**EXTRACCION SUPERCRITICA DE
COLORANTES Y CAPSAICINA
DE CAPSICUM ANNUUM**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

ALINA MORENO MENENDEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

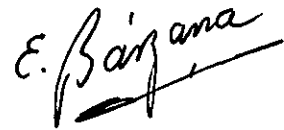
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Eduardo Bárzana García
Vocal	Prof. Francisca Iturbe Chiñas
Secretario	Prof. Hermilo Leal Lara
1er. Suplente	Prof. Amelia Ma. de G. Farrés González Saravia
2o. Suplente	Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén

Lugar donde se desarrolló el tema: Lab. 314 Edificio E Facultad de Química

Asesor del tema: Dr. Eduardo Barzana García



Supervisor Técnico: Mtra. Sandra Naranjo Modad



Sustentante: Alina Moreno Menéndez



A Enrique,

que sigue estando.

A mis padres, con todo el amor que tengo, gracias por el apoyo.

A Jorge, a quien adoro.

A mi abuela Adela, la mujer más fuerte que conozco, con amor.

A mis adorados tíos Manuel y Marisol,.....muchas gracias por todo.

A mis primitos Sergio y Marisol, con muchísimo cariño.

A los que extraño, Chichí, Tata y tío Roberto.

A Alma, Marisol, Mireya, Haru y Omar, con amor.

A todos los amigos que forman o formaron parte importante de mi vida.

GRACIAS.....

Al Dr. Eduardo Bárzana García, por la oportunidad, por el apoyo y por el asesoramiento.

A la Mtra. Sandra Naranjo Modad por su ayuda incondicional, sus ideas y su amistad.

A todas las personas del laboratorio 314, siempre con ideas valiosas y dispuestas a ayudar.

A los revisores de este trabajo: M. en C. Francisca Iturbe Chiñas, Dr. Hermilo Leal Lara, Dra. Amelia Farrés González y Mtra. Julieta Sandoval Guillén.

A quienes hicieron posible mi incorporación en el Subprograma 127, en el marco de la Facultad de Química, lo que significó un apoyo fundamental en la realización del presente trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1.RESUMEN.....	1
2.GENERALIDADES.....	3
2.1 LOS FRUTOS DEL GÉNERO CAPSICUM.....	3
2.1.1 <i>Breve historia y origen</i>	3
2.1.2 <i>Taxonomía</i>	4
2.1.3 <i>Estructura y composición</i>	6
2.2 LOS PIGMENTOS DEL CHILE.....	10
2.2.1 <i>Los carotenoides</i>	10
2.2.2 <i>Los carotenoides de los frutos Capsicum</i>	13
2.3 EL PRINCIPIO PUNGENTE DEL CHILE.....	17
2.4 EL PROCESO INDUSTRIAL DE EXTRACCIÓN DEL CHILE.....	22
2.5 EL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	24
2.5.1 <i>Definición</i>	24
2.5.2 <i>Factores que afectan el proceso de extracción</i>	25
2.6 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	30
2.6.1 <i>Naturaleza de los fluidos supercríticos</i>	30
2.6.2 <i>Utilización de fluidos supercríticos como medio de extracción</i>	32
2.6.3 <i>Ventajas y desventajas de la EFS</i>	35
2.6.4 <i>Aplicaciones industriales de la EFS</i>	36
2.6.5 <i>Uso de cosolventes en ESC con CO₂</i>	37
2.6.6 <i>Predicción de la solubilidad de compuestos en los fluidos supercríticos</i>	41
3.ANTECEDENTES.....	44
4.HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	49
5.OBJETIVOS.....	50
6.MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
6.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE <i>CAPSICUM ANNUUM</i>	52
6.2 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA.....	52
6.3 EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA.....	53
6.4 EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES.....	59
6.5 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.....	60
6.6 ANÁLISIS DE LOS COLORANTES EN LOS EXTRACTOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).....	61
7.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
7.1 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA.....	62
7.2 SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS.....	64

7.3 ANÁLISIS DE LOS COLORANTES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)	66
7.4 EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES LÍQUIDOS	68
7.5 EXTRACCIÓN CON CO ₂ SUPERCRÍTICO	72
7.5.1 <i>Condiciones iniciales de extracción</i>	72
7.5.2 <i>Extracción de capsaicinoides a densidades bajas</i>	78
7.5.3 <i>Utilización de cosolventes polares para la extracción de capsaicinoides a densidades bajas</i>	81
7.5.4 <i>Extracción supercrítica con y sin cosolventes a partir de perlas recubiertas con oleoresina de la muestra</i>	90
8.CONCLUSIONES.....	113
9.PERSPECTIVAS	116
10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y HEMEROGRÁFICAS.....	118

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
TABLA 1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS ESPECIES DE <i>CAPSICUM</i>	5
TABLA 2. COMPOSICIÓN PROMEDIO DE FRUTOS <i>CAPSICUM ANNUUM</i> L. Y DE ALGUNAS DE SUS PARTES	7
TABLA 3. COMPOSICIÓN PROMEDIO (%) DE ALGUNAS VARIEDADES MEXICANAS DE CHILES SECOS	9
TABLA 4. CONCENTRACIÓN RELATIVA (%) DE PIGMENTOS CAROTENOIDES EN EXTRACTOS SAPONIFICADOS DE PAPRIKA REPORTADOS EN LA LITERATURA	14
TABLA 5. CONTENIDO DE XANTOFILAS LIBRES Y ESTERIFICADAS DE FRUTOS DE <i>CAPSICUM ANNUUM</i> EN DOS ETAPAS DE MADUREZ, EXPRESADO COMO EL PORCENTAJE DEL TOTAL DE XANTOFILAS.....	15
TABLA 6 ESTRUCTURA DE LOS PIGMENTOS IDENTIFICADOS DE LA PAPRIKA.....	16
TABLA 7 COMPOSICIÓN DE UNA MEZCLA CRISTALINA DE CAPSAICINOIDES PURIFICADOS DE UNA MUESTRA DE CHILE DE ORIGEN JAPONÉS.....	17
TABLA 8. ANÁLISIS DE ALGUNAS VARIEDADES MEXICANAS DE CHILES	21
TABLA 9. ANÁLISIS DE ALGUNAS VARIEDADES DE CHILE	22
TABLA 10. PARÁMETROS CRÍTICOS DE SUSTANCIAS SELECCIONADAS ÚTILES COMO FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	31
TABLA 11 COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS GASES, LÍQUIDOS Y FSCS.....	32
TABLA 12. APLICACIONES INDUSTRIALES DE LA E.F.S.	37
TABLA 13 PARÁMETROS DE SOLUBILIDAD DE ALGUNOS DISOLVENTES COMUNES VS. PARÁMETROS DE SOLUBILIDAD DE ALGUNAS SUSTANCIAS UTILIZADAS COMO FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	43
TABLA 14. CONDICIONES DE LAS EXTRACCIONES SUPERCRÍTICAS REALIZADAS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.	58
TABLA 15. COMPOSICIÓN (G/100G) DE LA HARINA DE CHILE UTILIZADA COMO MATERIA PRIMA Y COMPARACIÓN DE LA MISMA CON ALGUNOS VALORES REPORTADOS EN LA LITERATURA.....	62
TABLA 16. COMPOSICIÓN (G/100G) EN BASE SECA DE LA HARINA DE CHILE UTILIZADA COMO MATERIA PRIMA Y COMPARACIÓN DE LA MISMA CON ALGUNOS VALORES REPORTADOS EN LA LITERATURA EN BASE SECA	63
TABLA 17. ABSORBANCIA PROMEDIO DE EXTRACTOS DE HARINA DE CHILE CON DISOLVENTES LÍQUIDOS.....	69

TABLA 18. CONDICIONES DE CALIBRACIÓN DEL EQUIPO A PARTIR DEL MÉTODO DE LA PAPIKA.....	73
TABLA 19. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA DEL MONITOREO DEL LAVADO DE LA TRAMPA CON HEXANO.....	74
TABLA 20. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA A DIFERENTES DENSIDADES AL EMPLEAR ACETONITRILLO PARA EL LAVADO DE LA TRAMPA.....	75
TABLA 21. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA DE LOS EXTRACTOS GENERADOS A PARTIR DE EXTRACCIONES CON CO ₂ SC A DIFERENTES DENSIDADES.....	78
TABLA 22. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA GENERADOS A DIFERENTES TIEMPOS ESTÁTICOS DE CONTACTO EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE COMPUESTOS QUE ABSORBEN A 280 NM.....	80
TABLA 23. CONCENTRACIÓN DE LOS DISTINTOS MODIFICADORES MANEJADOS DE ACUERDO A LAS CONDICIONES DEL EQUIPO DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA.....	82
TABLA 24. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA A 280 NM DE LOS EXTRACTOS GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE CAPSAICINOIDES CON VARIACIONES EN LA TEMPERATURA DEL RESTRICTOR Y DE LA TRAMPA UTILIZANDO METANOL AL 3 Y 5% EN VOLUMEN COMO MODIFICADOR.....	85
TABLA 25. CONDICIONES DE LOS MÉTODOS DE LIMPIEZA UTILIZADOS AL TRABAJAR CON MODIFICADORES.....	87
TABLA 26. VALORES DE ABSORBANCIA PROMEDIO GENERADOS DE EXTRACCIONES CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO Y MEZCLA DE CO ₂ SC- ETANOL 2.4% MOL A PARTIR DE DIFERENTES TAMAÑOS DE MUESTRA.....	88
TABLA 27. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS DE LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON METANOL 5.8% MOL COMO COSOLVENTE A PARTIR DE HARINA.....	93
TABLA 28. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON ETANOL 5.7% MOL COMO COSOLVENTE, A PARTIR DE HARINA.....	94
TABLA 29. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON ACETONITRILLO 5.4% MOL COMO COSOLVENTE, A PARTIR DE HARINA.....	94
TABLA 30. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON DIÓXIDO DE CARBONO SIN MODIFICADOR, A PARTIR DE HARINA.....	95
TABLA 31. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON METANOL 5.8% MOL COMO COSOLVENTE, A PARTIR DE PERLAS RECUBIERTAS CON OLEORRESINA.....	95
TABLA 32. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON ETANOL 5.7% MOL COMO COSOLVENTE, A PARTIR DE PERLAS RECUBIERTAS CON OLEORRESINA.....	96

TABLA 33. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON ACETONITRILLO 5.4% MOL COMO COSOLVENTE, A PARTIR DE PERLAS RECUBIERTAS CON OLEORRESINA.	96
TABLA 34. VALORES PROMEDIO DE ABSORBANCIA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO GENERADOS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA CON DIÓXIDO DE CARBONO SIN MODIFICADOR, A PARTIR DE PERLAS RECUBIERTAS CON OLEORRESINA.	97
TABLA 35. CÁLCULO DEL PARÁMETRO DE SOLUBILIDAD DE LA CAPSAICINA.	100
TABLA 36. CÁLCULO DEL PARÁMETRO DE SOLUBILIDAD DE LA CAPSANTINA.	101
TABLA 37. CÁLCULO DEL PARÁMETRO DE SOLUBILIDAD DE LA CAPSORUBINA.	102

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
FIG. 1. SECCIONES DE FRUTOS <i>CAPSICUM ANNUUM</i>	6
FIG 2. ESTRUCTURAS QUÍMICAS DE DIFERENTES CAPSAICINOIDES Y SUS ANÁLOGOS ..	18
FIG 3 ESTRUCTURA DE LA CAPSAICINA.....	20
FIG. 4 DIAGRAMA DE FASES DE UNA SUSTANCIA SIMPLE	30
FIG. 5. SOLUBILIDAD DEL NAFTALENO EN DIÓXIDO DE CARBONO A 45°C EN FUNCIÓN DE LA PRESIÓN.....	34
FIG. 6. ISOBARAS DE LA SOLUBILIDAD DEL NAFTALENO EN DIÓXIDO DE CARBONO EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA.....	34
FIG 7. DIAGRAMA GENERAL DE UN EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.	53
FIG. 8. FOTOGRAFÍAS DEL EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS HP 7680.	56
FIG. 9 DIAGRAMA SIMPLIFICADO DEL EXTRACTOR DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS HP 7680 CONECTADO A LA BOMBA DE COSOLVENTES HP 1050.....	56
FIG. 10. BARRIDO ESPECTRAL DE OLEORRESINA DE LA HARINA DE CHILE UTILIZADA COMO MATERIA PRIMA	65
FIG. 11. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DE OLEORRESINA DE CHILE.	68
FIG. 12. RESULTADOS DE ABSORBANCIA DE EXTRACTOS DE HARINA DE CHILE OBTENIDOS CON ACETONITRILLO Y HEXANO.	69
FIG. 13. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA A PARTIR DE EXTRACCIONES LÍQUIDO-LÍQUIDO CON ACETONITRILLO Y HEXANO DE HARINA DE CHILE.	71
FIG 14. RESULTADOS DEL MONITOREO DEL LAVADO DE LA TRAMPA CON HEXANO.	74
FIG. 15. INFLUENCIA DE LA DENSIDAD EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE LOS ANALITOS DE INTERÉS AL EMPLEAR ACETONITRILLO PARA EL LAVADO DE LA TRAMPA. ..	76
FIG. 16. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS EXTRACCIONES CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A 0.65 G/ML (104 BAR, 40°C) Y 0.95 G/ML (383 BAR, 40°C) Y LAS EXTRACCIONES CON DISOLVENTES ORGÁNICOS.	77
FIG. 17. RESULTADOS DE LA VARIACIÓN DE DENSIDADES EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE COLORANTES Y CAPSAICINOIDES DE <i>CAPSICUM ANNUUM</i>	79
FIG. 18. RESULTADOS DE ABSORBANCIA CON RESPECTO AL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE CAPSAICINOIDES.....	80
FIG. 19. DIAGRAMA DE FASES DE LA MEZCLA DIÓXIDO DE CARBONO- METANOL 3.5% MOL (3% VOL)	83

FIG. 20. DIAGRAMA DE FASES DE LA MEZCLA DIÓXIDO DE CARBONO- METANOL 5.8 % MOL (5% VOL)	84
FIG. 21. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DEL RESTRICTOR Y DE LA TRAMPA EN LA RECUPERACIÓN DE CAPSAICINOIDES EN LAS EXTRACCIONES SUPERCRÍTICAS CON 3 Y 5% VOL. METANOL Y SIN MODIFICADOR.	85
FIG. 22. DIAGRAMA DE FASES DE LA MEZCLA DIÓXIDO DE CARBONO- ETANOL 2.4% MOL.	88
FIG 23. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE CAPSAICINOIDES CON DIÓXIDO DE CARBONO Y MEZCLA DE DIÓXIDO DE CARBONO- ETANOL 2.4% MOL.....	89
FIG 24. DIAGRAMA DE FASES DE LA MEZCLA DIÓXIDO DE CARBONO- METANOL 5.8% MOL.	91
FIG 25. DIAGRAMA DE FASES DE LA MEZCLA DIÓXIDO DE CARBONO - ETANOL 5.7% MOL.	91
FIG 26. DIAGRAMA DE FASES DE LA MEZCLA DIÓXIDO DE CARBONO - ACETONITRILLO 5.4%MOL.....	92
FIG 27. CAMBIO DE ABSORBANCIA CON EL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE CAPSAICINOIDES CON DIÓXIDO DE CARBONO Y MEZCLAS DE DIÓXIDO DE CARBONO Y MODIFICADORES, A PARTIR DE HARINA DE CHILE Y DE PERLAS RECUBIERTAS CON LA OLEORRESINA.	97
FIG 28. CAMBIO DE ABSORBANCIA CON EL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE COLORANTES (447 NM) CON DIÓXIDO DE CARBONO Y MEZCLAS DE DIÓXIDO DE CARBONO Y MODIFICADORES, A PARTIR DE HARINA DE CHILE Y DE PERLAS RECUBIERTAS CON LA OLEORRESINA DE LA HARINA.	98
FIG 29. CAMBIO DE ABSORBANCIA CON EL TIEMPO ESTÁTICO DE CONTACTO EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE COLORANTES (470 NM) CON DIÓXIDO DE CARBONO Y MEZCLAS DE DIÓXIDO DE CARBONO Y MODIFICADORES, A PARTIR DE HARINA DE CHILE Y DE PERLAS RECUBIERTAS CON LA OLEORRESINA DE LA HARINA.	99
FIG 30. GRÁFICA DE COMPARACIÓN ENTRE LAS EXTRACCIONES CON DISOLVENTES, LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO A 0.95 G/ML Y LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO-ACETONITRILLO 5.4% MOL, 0.5 G/ML, DESPUÉS DE 15 MINUTOS DE TIEMPO DE EQUILIBRIO.....	110

1. RESUMEN

Debido a que en la actualidad existe una gran demanda a nivel mundial por parte del consumidor hacia los productos de origen natural, y surgen a su vez, cada vez más restricciones en cuanto a la utilización de productos sintéticos, es labor de la industria de alimentos realizar proyectos e investigaciones sobre la *sustitución de aditivos sintéticos por naturales*. Dichos proyectos e investigaciones están enfocados a la posible utilización de nuevas materias primas y a técnicas de extracción eficientes y explotables en la industria.

Los colorantes rojos del chile maduro del género *Capsicum* representan productos con una importante demanda como aditivos en la industria alimentaria. Asimismo, el chile contiene compuestos pungentes de la familia de los capsaicinoides que requieren ser separados para el uso de los colorantes, pues de otro modo su pungencia limita la aplicación de estos últimos en el área de alimentos para consumo humano. Por otro lado, también los capsaicinoides tienen una amplia aplicación como aditivos en industrias de diversa índole como la alimentaria, farmacéutica y tabacalera, entre otras.

En México existen industrias dedicadas a la actividad económica de la obtención y aplicación de los aditivos ya mencionados. Muchas de estas industrias basan sus procesos en la extracción con disolventes orgánicos como el hexano, lo cual implica riesgos ecológicos y toxicológicos, sin olvidar que es necesario eliminar casi la totalidad del disolvente del extracto para obtener un producto apto para uso alimentario, principalmente de consumo humano.

El empleo de CO₂ en condiciones supercríticas se plantea como una alternativa a estos solventes con ventajas de diversas índoles, entre las cuales destacan las ecológicas y toxicológicas debidas a la inocuidad de este compuesto y, por otro lado, también implica ventajas operativas como su fácil manipulación, nula inflamabilidad, temperatura crítica baja (31°C) y costo.

En la actualidad, el empleo de dióxido de carbono en condiciones supercríticas está limitado únicamente por su alto costo.

El presente trabajo estudia la influencia de diferentes factores en la eficiencia de la extracción supercrítica de colorantes y capsaicina de frutos del género *Capsicum*. De entre dichos factores pueden destacarse, principalmente, la densidad del CO₂ supercrítico, la adición de distintos cosolventes polares al CO₂SC, la concentración de los cosolventes y los impedimentos de la matriz. Por otro lado, se analiza de manera especial el efecto de los cosolventes en la eliminación de los impedimentos de la matriz que generan una deficiencia de la extracción. Se aborda también, el estudio de la selectividad en la extracción de los componentes de interés. En este rubro, se analiza la influencia de la densidad del dióxido de carbono supercrítico y de la adición de cosolventes polares sobre la selectividad de los componentes ya mencionados.

2. GENERALIDADES

2.1 LOS FRUTOS DEL GÉNERO *Capsicum*.

2.1.1 Breve historia y origen

Desde los inicios de la cultura mexicana, el chile ha formado parte sustancial de todos los alimentos y rituales de los mexicanos y, aunque numerosas variedades de chile se han dado en Centro y Sudamérica, México es considerado el principal país de origen de este fruto (Lomeli, 1986).

De 1492 a 1493, Colón observó que los nativos del Nuevo Mundo utilizaban un fruto rojo muy colorido llamado *aji* o *axi* en la mayoría de sus comidas. Este fruto resultó tener una pungencia mucho más fuerte que el pimiento negro de Asia (*Pepper nigrum* L.). Se llevaron muestras de este fruto a España y se le llamó "pimiento rojo".

En el Nuevo Mundo, los nativos utilizaban el fruto como condimento y como medicina (Govindarajan I, 1985; Sasián, 1992). Había una gran variación en cuanto a los colores, formas y tamaños del fruto en las diferentes regiones. Las distintas variedades de *Capsicum* eran, por lo tanto, conocidos bajo diferentes nombres, en los diversos dialectos. Se dice que la palabra *Chili* se origina del dialecto Náhuatl de México y América Central.

Los frutos *Capsicum* eran consumidos por los indios mexicanos probablemente desde el año 7000 A.C. Hacia finales del siglo XVI y principios del XVII, el cultivo de *Capsicum* se había extendido a lo largo del Mediterráneo y las regiones de Europa Central. Además de las diferencias de suelo, clima y condiciones de cultivo; la hibridación y selección natural jugó probablemente un papel importante en las características de los cultivos *Capsicum* que se establecieron en las diferentes regiones, esto es, con diferencias en forma, tamaño, color, pungencia y aroma. En Europa se desarrolló la "paprika" (*Capsicum annum*), una variedad altamente colorida y con pungencia moderada.

Las considerables variaciones en forma, tamaño y color, generaron mucha confusión en las primeras clasificaciones botánicas. La mayoría de los frutos rojos

de mayor tamaño, cultivados y comercializados en el mundo, incluyendo chiles y paprika pertenecen a la especie *Capsicum annuum*, mientras que las variedades más pequeñas, muy pungentes, pertenecen a la especie *Capsicum frutescens*.

El nombre *Capsicum* se deriva probablemente del griego "Kapso" que significa "picadura" o "punzada", haciendo referencia a la pungencia estimulada por el fruto; podría también derivarse del latín "Capsa" que significa "caja", refiriéndose a la forma del fruto (Govindarajan I, 1985)

Aún ahora, hay muchas confusiones en cuanto al nombre de los frutos del género *Capsicum*, y la palabra "pimiento" tiende a ser utilizada indistintamente para las diferentes especies y variedades del género, aún en la literatura científica.

2.1.2 Taxonomía

El género *Capsicum* pertenece a la familia Solanaceae y está estrechamente relacionada al género *Solanum*, el cual abarca muchos productos económicamente importantes, como la papa (*Solanum tuberosum* L.), el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y el tabaco (*Nicotiana glauca* L.).

Se ha reportado que unas 20 ó 30 especies de *Capsicum* tienen su origen en el Nuevo Mundo, abarcando la región tropical del área norte de Sudamérica, América central, México y algunas islas de esa región.

Actualmente, son generalmente reconocidas cinco especies domesticadas de *Capsicum*: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens*.

Las características morfológicas que conforman la clave para la clasificación de las especies anteriormente mencionadas, se resumen en la tabla 1, tomando como ejemplo una variedad de la especie en algunos casos.

Tabla 1. Características morfológicas de las especies de *Capsicum* (Govindarajan I, 1985).

Especie	Países en donde se encuentra	Características morfológicas
<i>Capsicum annuum</i> ej. var. <i>annuum</i> L.	México y América Central, diversos países de Europa	Flores: blancas; anteras: azules o violetas; pedicelo: solitario en el nodo, usualmente pendiente o erecto en algunos cultivos, semillas: color amarillo suave
<i>Capsicum frutescens</i> L.	India y Africa	Flores: amarillas a blancas; anteras: azules o violetas; pedicelos: largos y delgados, usualmente dos por nodo, típicamente erectos, semillas: color amarillo suave
<i>Capsicum chinense</i>	Indias occidentales, norte de Sudamérica, Perú, Bolivia	Flores: blancas o blancas amarillentas, pedicelo: corto y espeso, de tres a cinco por nodo; semillas: amarillas con arrugas al margen.
<i>Capsicum baccatum</i> ej. var. <i>pendulum</i>	Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia, Brasil.	Flores: blancas con amarillo; anteras: amarillas; pedicelos: uno o raramente dos por nodo, pendientes o erectos; semillas: color amarillo suave
<i>Capsicum pubescens</i>	Bolivia, Colombia	Flores: púrpuras con blanco, anteras: púrpuras; pedicelos: uno o raramente dos por nodo, erectos o pendientes; semillas: negras, arrugadas y curvadas.

En horticultura y comercio, los frutos *Capsicum* son agrupados de acuerdo al grado de pungencia que tienen como: dulces (no pungentes), moderados o picantes, y por sus formas y tamaños.

2.1.3 Estructura y composición.

Los frutos secos del chile tienen tamaños que varían de 6 a 300 mm de longitud y de 5 a 140 mm de ancho cerca del cáliz. Presentan diferentes formas, incluyendo puntas largas, cortas, delgadas, anchas, ovales, cónicas, agudas, redondeadas, ásperas o lisas; en los diversos cultivos se observan diferentes combinaciones de estas características. Las variedades de paprikas son de longitud mediana, anchas y redondeadas.

El pericarpio de los frutos *Capsicum* es liso y lustroso (arrugado en algunos cultivos) y el color varía generalmente de rojo intenso a rojo café o naranja; algunas variedades presentan pericarpio color verde en su etapa de madurez total. El fruto tiene de dos a cuatro lóculos marcados por protuberancias longitudinales y con una placenta central que se extiende desde la base debajo del cáliz hasta el final del ápice. Las semillas son numerosas, y están pegadas a la placenta central, son amarillas (o negras en algunas especies), lisas, de 1 a 5 mm con filo espeso y un micropilo prominente y puntiagudo.

En la figura 1, se muestran las secciones de los frutos capsicums :

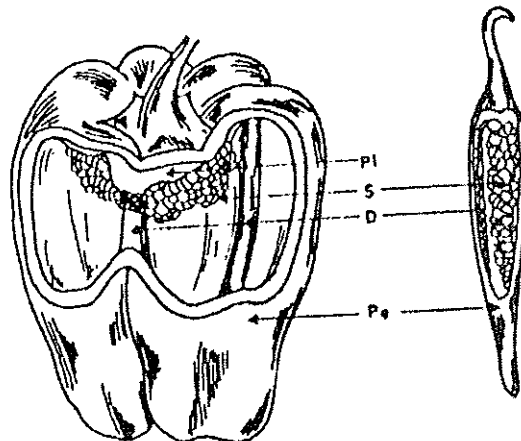


Figura 1. Secciones de frutos *Capsicum annuum*: Pe: pericarpio
D: disipimento, PI: placenta, S: semillas (Govindarajan I, 1985).

Dentro de los componentes del pericarpio (que incluyen la placenta y el disipimento) se encuentran: la capa cuticular de células, la epidermis de una capa

simple de células rectangulares regulares, la hipodermis de células tangencialmente ovales con paredes espesas en una o más capas, el mesocarpio de células parenquimáticas, oblongas, comprimidas tangencialmente, y con grandes variaciones de tamaño, conteniendo frecuentemente gotas de aceite rojo y a veces, cristales de oxalato de calcio; en las regiones interiores hay envoltorios vasculares y células gigantes que ocasionan "ampollas" en la superficie interior del pericarpio (una característica de todos los frutos *Capsicum*), y el endocarpio de células rectangulares con paredes espesas cavadas (Govindarajan I, 1985; Rylski, 1986).

En la tabla 2, se muestra la composición promedio de los frutos *Capsicum annum* L., así como la composición promedio de las diferentes partes de los mismos.

Tabla 2. Composición promedio de frutos *Capsicum annum* L. y de algunas de sus partes (Govindarajan I, 1985).

Constituyente	Entero	Pericarpio	Semilla	Tallo
Porcentaje del total	100	39.9	54.1	6.0
Humedad(%)	8.9	7.5	6.3	9.1
Extracto etereo, total(%)	22.1	8.2	26.0	4.1
Extracto etéreo volátil(%)	0.4	0.6	0.3	0.3
Extracto etéreo no volátil(%)	21.7	7.5	25.7	8.7
Cenizas totales(%)	6.3	9.8	4.5	4.5
Cenizas sol. en agua(%)	5.7	8.6	2.5	8.8
Cenizas insol ácido(%)	1.0	0.2	0.1	1.0
Proteína(Nx6.25)(%)	12.8	12.7	16.2	10.5
Fibra cruda(%)	31.8	34.9	37.2	25.0
Carbohidratos (dif)(%)	27.0	24.3	16.1	45.9
Capsaicinoides(µg/g)	177	394	35	trazas
Distribución de los capsaicinoides (%)	100	89.2	10.2	trazas
Color total (β-caroteno) (µg/g)	1733	3977	179	209
Distribución de colorantes (%)	100	94.6	4.9	0.5
Ácido ascórbico (mg/100g)	29	38.6	15.3	9.1
Hierro(mg/100g)	10.2	5.9	11.1	39.9
Fósforo(mg/100g)	356.6	262.8	464.1	102.1
Calcio(mg/100g)	210.0	200.0	70.0	1600.0

Los carbohidratos, proteínas y grasas son los componentes mayoritarios y aumentan rápidamente con la madurez del fruto. El contenido de fibra varía grandemente entre diferentes fuentes, y refleja la cantidad de pedicelo en la muestra. Las cenizas solubles en agua son la mayoría del total de las cenizas.

La fructosa es el azúcar mayoritario y, junto con la glucosa, forma el 70% de los azúcares reductores. Hay una mayor cantidad de carbohidratos libres en las semillas que en el pericarpio o la placenta. El ácido cítrico es el ácido mayoritario, pero también se encuentran el succínico, fumárico, y málico.

El contenido de vitamina C de los frutos del género *Capsicum* es de importancia nutricional dada la cantidad en que la contienen; sin embargo, durante el procesamiento de los frutos, hay una gran pérdida de esta vitamina (hasta de un 80%).

Los frutos también son una buena fuente de los complejos A y B. El contenido de vitamina E es dependiente de la etapa de madurez y de factores genéticos, pero podría representar una característica nutricional importante de los frutos. Por otro lado, la asparagina y la prolina son los aminoácidos predominantes.

Mientras que la proteína y la fibra cruda se encuentran bien distribuidas, el contenido de grasa en los frutos *Capsicum* se encuentra principalmente en las semillas. Los valores de grasa total varían de 9 a 16%, dependiendo del contenido de semillas de la variedad.

El contenido de cenizas es alto en el tallo; por otra parte, los capsaicinoides se encuentran esencialmente en el pericarpio (el cual incluye el disipimento y la placenta, 90%), y en mucha menor cantidad en las semillas (10%), probablemente por contaminación procedente de la placenta. El color se encuentra casi en su totalidad en el pericarpio (95%) (Govindarajan I, 1985).

La composición de ácidos grasos de muestras de chile, evidencian un alto contenido de ácido oleico, seguido de ácido linoleico (52.2%), y un contenido más bajo de ácido mirístico (valores opuestos a los de la paprika).

En muestras de pimiento rojo se encontraron 82% de lípidos neutros, 16% de glicolípidos y 2% de fosfolípidos. Los triglicéridos conformaban la porción

dominante de los lípidos neutros, mientras que los glicolípidos eran predominantemente diglicéridos. El fosfolípido predominante resultó ser la fosfatidilcolina. Los principales ácidos grasos fueron el palmítico, esteárico, oleico y linoleico. El ácido linoleico resultó el predominante (65-70%) en los lípidos neutros y fosfolípidos, mientras que en el glicolípidos tanto el linoleico como el linolénico fueron los encontrados en mayor cantidad (ambos 30-36%) (Govindarajan I, 1985).

La tabla 3, resume la composición de algunos de los frutos del género *Capsicum* comunes en México.

Tabla 3. Composición promedio (%) de algunas variedades mexicanas de Chiles secos (Chávez *et al*, 1996).

Chile	Nombre científico	Porción comestible	Humedad	Fibra	Carbohidratos	Proteína total	Grasas totales
Ancho	<i>C. annuum</i> L. <i>grossum</i> Sendt	68	10.1	0.3	62.7	11.5	9.8
Cascabel	<i>C. annuum</i> L. v. <i>cerasiforme</i> Mill	84	9.1	11.1	63.6	12.9	6.4
Chipotle	<i>A. annuum</i> L. dulce <i>Hort</i>	84	11.7	16.9	57.6	14.1	6.3
Guajillo	<i>C. annuum</i> L. <i>longum</i> Sendt	84	16.5	9.0	56.7	11.6	8.6
Morita	<i>C. annuum</i> L. <i>abreblatum</i> Flng	84	13.2	10.4	61.6	13.2	5.4
Mulato	<i>C. annuum</i> L. <i>grossum</i> Sendt	68	11.8	9.6	65.0	9.6	5.1
Pasilla	<i>C. annuum</i> L. <i>logum</i> Sendt	60	14.3	12.7	60.6	12.7	9.6
Piquín	<i>C. frutescens</i> L. <i>baccalum</i>	84	10.5	3.5	64.9	14.4	6.4

Los datos de la tabla 3, corresponden a valores promedio provenientes de diversos análisis; no de un análisis simultáneo de todos los macronutrientes que sumados entre sí, y con los micronutrientes, deben de sumar 100. Los valores del contenido de grasa de las distintas variedades de chiles de la tabla 3, resultan

menores al valor reportado en la tabla 2, por lo que podemos suponer que el análisis de las variedades mexicanas no involucra las semillas del fruto, sino exclusivamente el pericarpio.

2.2 LOS PIGMENTOS DEL CHILE

2.2.1 Los carotenoides

El ojo humano es atraído por colores brillantes en materiales naturales, especialmente en frutas y verduras, valiosas como alimentos. Por lo tanto, no es de sorprenderse que los pigmentos naturales, incluyendo los carotenoides, sean ampliamente utilizados como aditivos para generar colores atractivos en alimentos manufacturados. Muchos extractos naturales han sido utilizados con este propósito durante siglos, especialmente annatto (bixina), azafrán (crocina) jitomate (licopeno) y frutos capsicum (capsantina). Actualmente existe una producción en gran escala de carotenoides sintéticos, idénticos al natural para la coloración de alimentos; sin embargo, los extractos naturales son también utilizados debido a su demanda por parte del consumidor, y hay un interés creciente de la producción industrial de carotenoides naturales obtenidos a partir de procesos biotecnológicos. Los carotenoides también son muy utilizados como aditivos en la alimentación animal, con el propósito de impartir el color deseado a los tejidos animales o a productos derivados (astaxantina en salmón, luteína y zeaxantina en gallinas y pollos para la coloración de la yema de huevo y la piel) o para proveer un suplemento adecuado de vitamina A (Britton *et al.*, 1995).

Algunos de los ejemplos mejor conocidos de carotenoides de ocurrencia natural son los colores amarillo-naranja de las flores (*e.g.* girasol, caléndula), los colores naranja-rojo de las frutas (*e.g.* jitomate, naranja), y las raíces naranja de las zanahorias, de cuyo nombre latino (*Daucus carota*) se deriva el nombre 'caroteno'. Sin embargo, la mayor producción de carotenoides ocurre en los tejidos fotosintéticos de plantas y algas. En ellas, los carotenoides se encuentran generalmente en el aparato fotosintético, si bien su presencia es comúnmente enmascarada por el color verde de la clorofila y es revelada únicamente cuando la

clorofila es degradada como se observa, por ejemplo, en las hojas de otoño (Britton *et al.*, 1995).

Comúnmente se piensa en los carotenoides como en pigmentos de plantas pero también se encuentran ampliamente distribuidos en microorganismos y animales. Además de una presencia universal en el aparato fotosintético de bacterias, los carotenoides también son responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de las bacterias no fototróficas, hongos y levaduras. La importancia de los carotenoides en estos microorganismos yace principalmente en la protección contra el daño por luz y oxígeno.

Los animales son aparentemente incapaces de biosintetizar carotenoides pero muchos animales presentan colores originados por los carotenoides provenientes de su comida. Algunos ejemplos de esto son las plumas de las aves (cetocarotenoides en las plumas rosas y rojas de los flamings) y la piel y carne de algunos peces (carpa dorada, salmón).

La coloración por carotenoides no es normalmente observada en mamíferos, aunque los humanos que consumen grandes cantidades de suplementos carotenoides (β,β -caroteno o cantaxantina) o alimentos ricos en carotenoides, pueden mostrar una coloración amarilla o naranja en la piel (Britton *et al.*, 1995).

Los carotenoides están constituidos por una clase de hidrocarburos denominados carotenos y sus derivados oxigenados, las xantofilas. El oxígeno puede estar presente como grupo hidroxilo, metoxilo, epoxi, carboxilo o carbonilo. Los derivados hidroxilos pueden existir en estado libre, o esterificados con ácidos grasos (Garrido-Fernández y Mínguez-Mosquera, 1983). La mayoría de los carotenoides son tetraterpenos, y, como tales, pueden ser visualizados como el resultado del agrupamiento de ocho moléculas de isopreno. La unión de estas unidades es en forma cabeza-cola, manteniendo la regla del isopreno, excepto en el centro de la molécula en donde el orden se revierte de modo que el esqueleto C_{40} es simétrico cuando es visto como un todo (Basil y Moss, 1995).

Estos pigmentos tienen diferentes grupos terminales, comprendiendo a unos 450 carotenoides conocidos y continuamente se están descubriendo otros nuevos.

Los carotenoides pueden presentarse en forma libre en los tejidos vegetales (como cristales o sólidos amorfos) o en disolución en lípidos. También se presentan como ésteres o en combinación con azúcares y proteínas (Fennema, 1993).

Muchos carotenoides tienen una gran importancia y algunos son utilizados por el hombre: beta-caroteno y beta-criptoxantina son pro-vitamina A, mientras que capsantina, capsorubina y criptocapsina, los cuales se encuentran casi exclusivamente en los frutos de *Capsicum*, son utilizados como colorantes naturales (Almeta *et al*; 1990).

Los carotenoides poseen propiedades especiales provenientes de sus estructuras químicas. Dichas propiedades determinan los procedimientos que deben ser seguidos y las precauciones que deben ser observadas en todos los trabajos con carotenoides.

La estructura más característica de los carotenoides y responsable del color es la cadena de polieno conjugada. La posibilidad de absorber fuertemente la luz, hace que estos pigmentos sean visibles al ojo humano en cantidades de únicamente microgramos. El color, que puede ser fácilmente detectable en solución y durante cromatografía, facilita la purificación de los pigmentos, así como el monitoreo de reacciones químicas. La pérdida o cambio en el color es una advertencia inmediata y sensible de la descomposición o modificación estructural de los carotenoides. La intensa absorción de luz también provee las bases para la determinación cuantitativa de carotenoides.

Por otro lado, la cadena de polieno es también en gran medida responsable de la inestabilidad de los carotenoides. Algunos ejemplos de ello, son su susceptibilidad a la oxidación por aire o peróxidos, adición de electrófilos incluyendo H^+ y ácidos de Lewis, y la isomerización E/Z causada por calor, luz o químicos. También se pueden dar reacciones químicas en otras partes de la molécula, especialmente en los grupos terminales, generando modificaciones estructurales indeseables.

Por todo lo anteriormente descrito, existen algunas precauciones generales al trabajar experimentalmente con carotenoides, como son la exclusión de oxígeno, la adición de antioxidantes, el trabajo a temperaturas menores de 40°C, el almacenamiento a -20°C, la exclusión de la luz solar y el evitar el contacto con ácidos o bases (Schiedt y Liaaen-Jensen, 1995).

2.2.2 Los carotenoides de los frutos *Capsicum*

Los frutos del género *Capsicum* son material ideal para el estudio de los carotenoides ya que los contienen en gran cantidad y diversidad (Almela *et al*; 1990).

El metabolismo de los carotenoides en los frutos rojos de *Capsicum* es de interés bioquímico debido a los espectaculares cambios producidos durante el proceso de maduración. Durante este proceso, el color verde del fruto desaparece y adopta varios tonos de naranja llegando, finalmente, a un intenso color rojo.

Existen procesos metabólicos simultáneos en el proceso de maduración; uno de ellos da lugar a la transformación de pigmentos ya existentes y el otro incluye la síntesis *de novo* de carotenoides. La existencia de este último proceso es evidente a partir del hecho de que el contenido total de carotenoides aumenta en un orden de magnitud variable.

De este modo, en el chile, las clorofilas desaparecen durante el proceso de maduración junto con otros pigmentos como luteína (β - ϵ -caroteno - 3- 3'- diol) y neoxantina (5'- 6'- epoxi- 6- 7- didehidro - 5,6,5',6' - tetrahidro - β - β -caroteno - 3, 5, 3' - triol). Simultáneamente, aumenta la concentración de otros pigmentos como β - caroteno y violaxantina (5, 6: diepoxi- 5 -6, 5', 6' - tetrahidro - β , β -caroteno - 3, 3' diol) y algunos otros se forman *de novo* como la capsantina (3, 3' - dihidroxi- β , κ - caroten - 6' - ona), capsorubina (3, 3'- dihidroxi - κ , κ - caroteno - 6 - 6' - diona), β - criptoxantina y capsoluteína (Minguez-Mosquera y Hornero-Méndez, 1994).

De estos últimos pigmentos, las xantofilas, capsantina y capsorubina son las principales responsables del color rojo intenso del fruto, y son encontradas únicamente en los frutos maduros del género *Capsicum* (Ittah *et al*, 1993).

La importancia comercial de la oleorresina del chile en cuanto a colorantes, radica en los pigmentos que generan el color rojo; debido a ello, está de más decir que la materia prima de partida para la extracción debe ser el fruto maduro.

Las xantofilas presentes en los frutos del género *Capsicum* se encuentran en forma de ésteres de ácidos grasos. En un estudio realizado acerca de la composición de carotenoides del fruto *Capsicum annuum* var Yolo Wonder A, se encontró que un 54.1% de las xantofilas se encontraban diesterificadas, 25.9% monoesterificadas y 19.9% se encontraban en forma libre. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la esterificación es un paso que afecta únicamente a las xantofilas sintetizadas *de novo* (Cámara y Monéger, 1978).

Los principales ácidos grasos con los que se asocian las xantofilas son: ácido palmítico, mirístico y láurico. La capsantina se encuentra en los frutos *Capsicum* principalmente en forma de dilaureato (Govindarajan III, 1986; Philip *et al*, 1971).

Las tablas 4 y 5, muestran la concentración relativa de los pigmentos en extractos saponificados y no saponificados de paprika, según varios autores:

Tabla 4. Concentración relativa (%) de pigmentos carotenoides en extractos saponificados de paprika reportados en la literatura (Fisher y Kocis, 1987).

	Curl (1962)	Davies (1970)	Camara(1978)	Baranyai (1982)
Capsantina	34.7	31.7	33.3	38.1
β -caroteno	11.6	12.3	15.4	18.6
Violaxantina	9.9	9.8	7.1	7.9
Criptoxantina	6.7	7.8	12.3	4.2
Capsorubina	6.4	7.5	10.3	9.5
Criptocapsina	4.3	5.0	5.1	1.8
Zeaxantina	2.3	6.5	3.1	4.0
Anteraxantina	1.6	9.2	9.2	5.0
Epóxido de capsantina	0.9	4.2	1.7	2.6

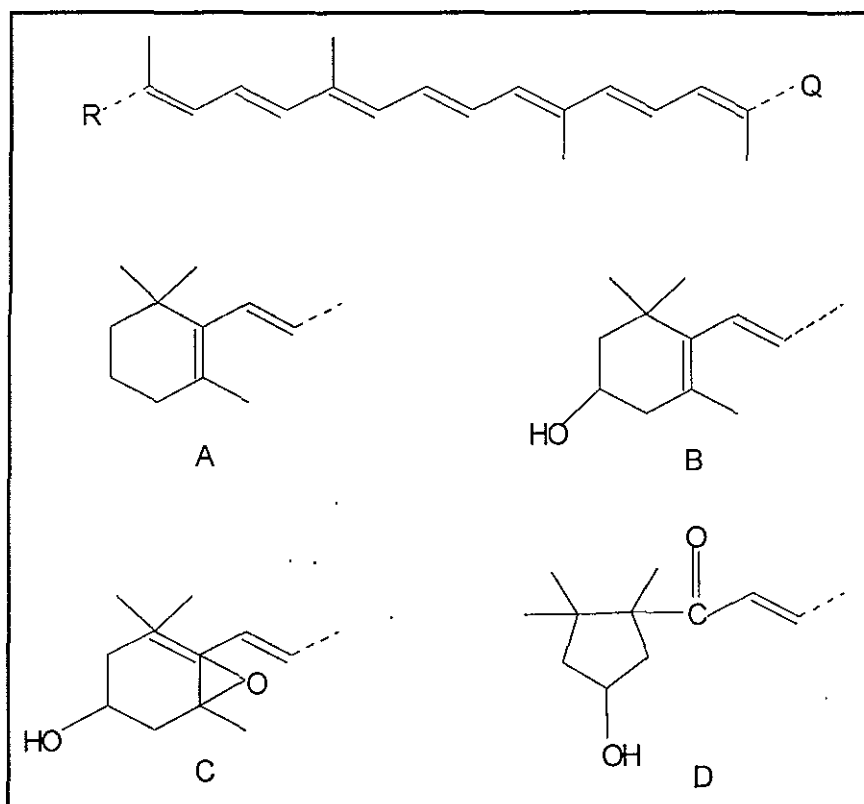
Tabla 5. Contenido de xantofilas libres y esterificadas de frutos de *Capsicum annuum* en dos etapas de madurez, expresado como el porcentaje del total de xantofilas (Cámara y Monéger, 1978).

Esterificación	Xantofila	Fruto verde (%)	Fruto rojo maduro (%)
Libre	β -criptoxantina	12.0	-
	Criptocapsina	-	6.1
	Luteina	45.9	-
	Violaxantina	19.5	8.5
	Capsantina	-	2.9
	Neoxantina	22.4	2.4
	Total	99.8	19.9
Monoester	β -criptoxantina	-	14.6
	Zeaxantina	-	3.7
	Capsantina	-	7.6
	Total	-	25.9
Diester	Anteraxantina	-	11.0
	5,6-epóxido de capsantina	-	2.1
	Capsantina	-	28.8
	Capsorubina	-	12.2
	Total	-	54.1

Las estructuras de los pigmentos identificados de la paprika, se muestran en la tabla 6. En ella, puede observarse la cadena de polieno conjugada y diferentes grupos terminales. La estructura de cada uno de los carotenoides de la tabla puede observarse a partir de la unión de la estructura de la cadena de polieno conjugada con grupos terminales específicos. Así, la estructura de la capsantina corresponde a la unión de los grupos terminales B y D con los extremos R y Q de la cadena de polieno.

Tabla 6. Estructura de los Pigmentos Identificados de la Paprika (Fisher y Kocis, 1987)

Pigmento	R	Q	Pigmento	R	Q
Capsantina	B	D	Criptocapsina	A	D
β -caroteno	A	A	Zeaxantina	B	B
Violaxantina	C	C	Anteraxantina	B	C
Criptoxantina	A	B	Epóxido de capsantina	C	D
Capsorubina	D	D			



2.3 EL PRINCIPIO PUNGENTE DEL CHILE

Hasta hace algunos años, la pungencia del chile se creía debida únicamente a la capsaicina, un alcaloide de fórmula molecular $C_{18}H_{27}NO_3$; sin embargo, se ha demostrado que la pungencia del chile se debe a una mezcla de sustancias con estructuras químicas muy similares, denominadas capsaicinoides, de las cuales, la capsaicina (N – [(4 – hidroxí – 3 – metoxi – fenil) – metil] – 8 – metil – 6 – noneamida) y su 6 – dihidroderivado, la dihidrocapsaicina (N – [(4 – hidroxí – 3 – metoxifenil) – metil] – 8 – metil – noneamida), son los más importantes. De hecho, la capsaicina y la dihidrocapsaicina son responsables de aproximadamente el 90% de la pungencia de los frutos del género *Capsicum* (Betts, 1999).

Algunos ejemplos de capsaicinoides también presentes en el chile, pero de menor importancia son: norcapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina y homodihidrocapsaicina. Otros capsaicinoides adicionales relacionados han sido identificados como constituyentes traza de estos productos (Hoffman *et al*; 1983). La concentración relativa de los diferentes capsaicinoides en una muestra de *Capsicum annum* puede verse en la tabla 7.

Tabla 7. Composición de una mezcla cristalina de capsaicinoides purificados de una muestra de chile de origen Japonés (Govindarajan III, 1986).

Capsaicinoide	Composición (%)
Capsaicina	48.6
Dihidrocapsaicina	36.0
Nordihidrocapsaicina	7.4
Homodihidrocapsaicina	2.0
Homocapsaicina	2.0
Nonoil vanillilamida	1.0
Decil vanillilamida	1.5

Todos estos capsaicinoides producen un efecto sensorial que se identifica como el sabor picante o pungencia de los chiles.

La figura 2, muestra las estructuras químicas de diferentes capsaicinoides y sus análogos:

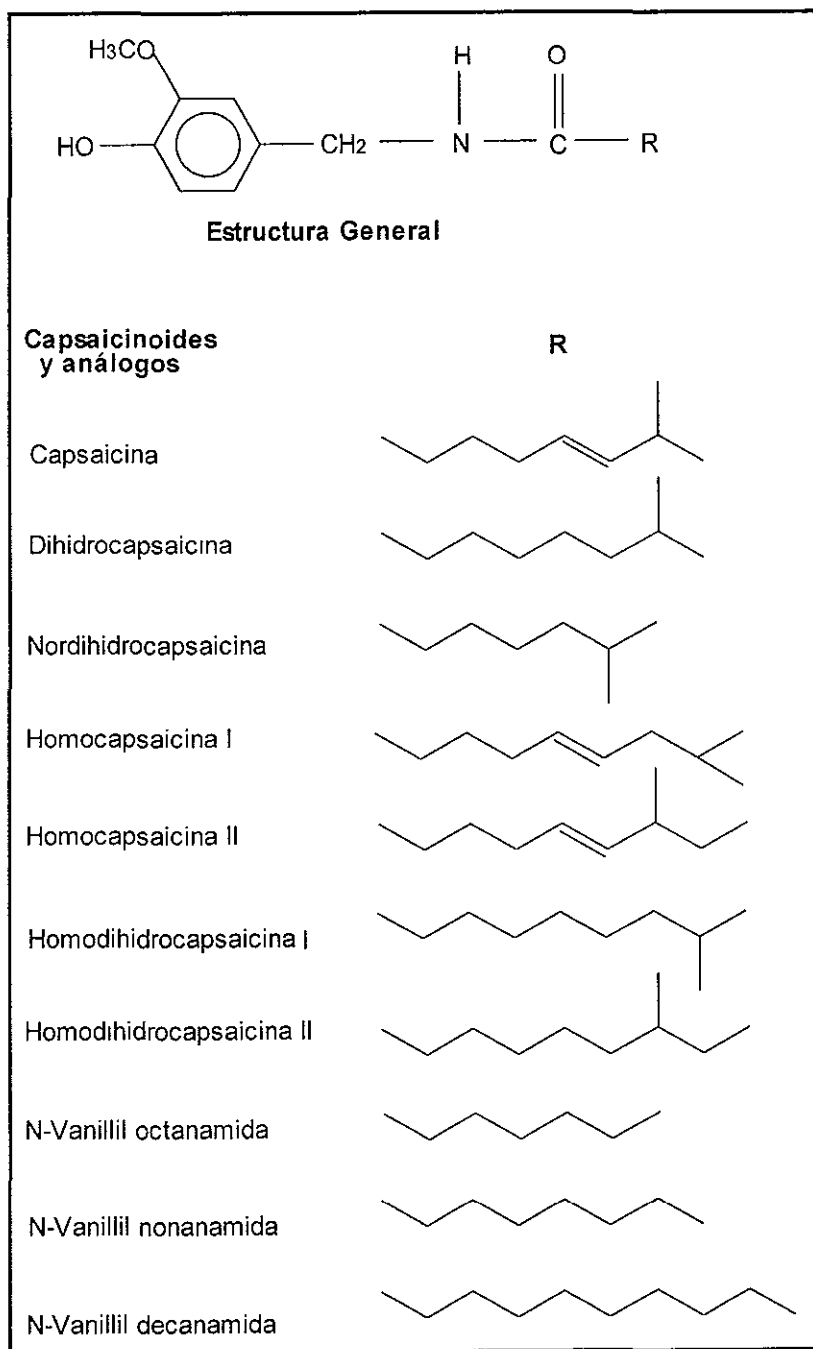


Fig. 2. Estructuras químicas de diferentes capsaicinoides y sus análogos. (Contreras-Padilla y Yahia, 1998).

El grupo vainillín y la cadena hidrocarbonada con una longitud apropiada parecen ser indispensables para que se presente la pungencia. De algunos estudios con derivados vanillilamidas se ha concluido que el grado de la pungencia depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada. El sustituyente alquilo con C_8H_{17} mostró la pungencia más alta, y ésta disminuyó con cadenas alquilo más largas y más cortas. Se concluyó también que la doble ligadura en la cadena alquilo no contribuye a la pungencia (Susuki e Iwai, 1984).

Se ha determinado que el sitio biosintético de los capsaicinoides es la placenta del fruto y que el grupo vanillilamida de la capsaicina se deriva de la L-fenilalanina, mientras que la cadena de ácido graso ramificada es derivada de la valina. Durante la biosíntesis de los capsaicinoides, se generan varios intermediarios fenólicos. Algunos experimentos con precursores de la capsaicina sugieren que la biosíntesis de este compuesto en pimientos picantes compite con una acumulación activa de sustancias similares a la lignina en las paredes celulares, que son probablemente derivadas de precursores fenilpropanoides y de la capsaicina en sí (Bernal y Barceló, 1996; Bernal *et al*, 1995).

Por otro lado, se ha sugerido que la producción de los capsaicinoides se incrementa con la maduración hasta un máximo a partir del cual disminuye en parte por degradación hasta un 60% del contenido máximo. La enzimología de los últimos pasos del metabolismo y degradación de la capsaicina, no es enteramente conocido hasta ahora.

Algunos investigadores han sugerido que la degradación de los capsaicinoides se debe a la presencia de peroxidasas y que la oxidación de la dihidrocapsaicina por la peroxidasa en los frutos *Capsicum* es estrictamente dependiente de la presencia de H_2O_2 (Bernal *et al*, 1993). Además, al igual que la capsaicina, la peroxidasa se encuentra principalmente localizada en la placenta y en las capas celulares epidermales exteriores (Contreras-Padilla y Yahia, 1998). Este hecho, es un argumento a favor de la participación de la peroxidasa en ruta metabólica de degradación de capsaicinoides.

La capsaicina puede detectarse sensorialmente en diluciones de hasta 1 en 15-17 millones. Es insoluble en agua fría, y muy soluble en alcohol, acetona, éter y otros disolventes. La molécula de capsaicina tiene tres características primordiales:

- a) el grupo vainillín
- b) el enlace ácido-amida
- c) la cadena lateral hidrocarbonada

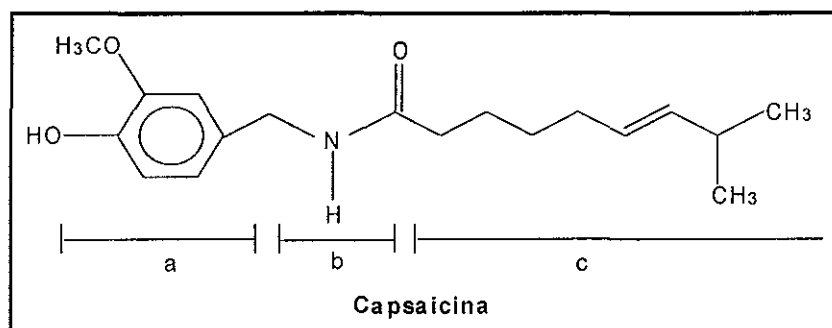


Fig 3. Estructura de la capsaicina.

La capsaicina puede ser degradada térmicamente a temperaturas del orden de 200°C, generando productos tales como la vainillina, 8-metil-6-nonenamida, y ácido 8-metil-6-nonenoico (Henderson y Henderson, 1992)

Los capsaicinoides se utilizan tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica, ya que también tienen propiedades medicinales; son estimulantes en el tracto digestivo y bloqueadores de la transmisión del dolor (producen insensibilización).

Los usos conocidos hasta ahora son los siguientes:

- a) condimentos para carnes, mayonesas, aderezos, etc;
- b) en la industria tabacalera proporciona el sabor picante (Govindarajan II, 1986);
- c) repelentes de protección personal, en aerosol (Norton, 1998);
- d) repelente en productos químicos en la agricultura; evita que los animales domésticos la ingieran (Lomeli, 1986);

- e) alimentos para aves; estos animales no perciben el sabor picante, pero sí las ardillas y otros roedores que pudieran alimentarse de estos productos (Rouhi, 1998);
- f) pinturas marinas, evita que los caracoles y otros crustáceos se adhieran a los cascos de los barcos (Norton, 1998);
- g) en medicamentos contra el dolor (principalmente cáncer de boca y artritis) (Norton, 1998);

Las tablas 8 y 9 muestran la concentración de capsaicina en algunas variedades de chiles mexicanos y otras.

Tabla 8. Análisis de algunas variedades mexicanas de chiles (Yuste *et al*; 1979).

Chile	% de oleoresina	% de capsaicina	% de capsaicina en la oleoresina
<i>Capsicum annuum grossum</i> (ancho)	13.65	0.048	0.3514
<i>Capsicum annuum ceraciforme</i> (cascabel)	13.76	0.088	0.6395
<i>Capsicum annuum longum</i> (guajillo)	13.48	0.112	0.8308
<i>Capsicum annuum</i> (catarina)	18.80	0.256	1.3617
<i>Capsicum frutescens baccatum</i> (piquín)	22.16	0.352	1.5884
<i>Casicum frutescens</i> (árbol)	18.68	0.416	2.2200

Tabla 9. Análisis de algunas variedades de chile (Yuste *et al*, 1979).

Chile	Origen	%de oleorresina	% de capsaicina	% de capsaicina en la oleorresina
<i>Capsicum annuum</i> (sannam)	India	16.5	0.33	2.0
<i>Capsicum annuum</i> (mundu)	India	16.0	0.23	1.4
<i>Capsicum frutescens</i> (usimulagu)	India	8.7	0.36	4.1
<i>Capsicum frutescens</i> (mombasa)	Africa	13.1	0.42	3.2
<i>Capsicum frutescens</i> (bahamian)	Bahamas	12.5	0.51	4.0
<i>Capsicum annuum</i> (santaka)	Japón	11.5	0.30	2.6
<i>Capsicum annuum</i> (hontaka)	Japón	s/d	0.33	s/d
<i>Capsicum frutescens</i> (uganda)	Africa	s/d	0.85	s/d

Puede observarse, a partir de los datos anteriores, que la concentración de capsaicina en los frutos del género *Capsicum* varía significativamente dependiendo de la variedad. Así, el chile ancho contiene 0.048% de capsaicina, mientras que el chile de árbol contiene 0.416%, casi diez veces más. El contenido de capsaicinoides en el fruto puede jugar un papel importante dentro de los criterios de selección de la materia prima para la obtención de diversos productos industriales.

2.4 EL PROCESO INDUSTRIAL DE EXTRACCIÓN DEL CHILE

De la extracción con disolventes orgánicos del polvo de chile, se obtiene su oleorresina, esto es, el extracto del chile, obtenido en forma de aceite de viscosidad media con un intenso color rojo y con el aroma característico del fruto. La oleorresina contiene todos los componentes del chile que son extraídos selectivamente por un disolvente adecuado, de los frutos deshidratados y molidos del chile (*Capsicum annuum*), y se entiende como el resultado de la extracción y la posterior eliminación del disolvente utilizado (Albaladejo y García, 1993).

Los pasos tecnológicos para la producción en lote de oleorresinas de especias, se enlistan a continuación:

1. Limpieza de la materia prima, remoción del material extraño, incluyendo trozos de metales; es práctica común la remoción de las semillas.
2. Trituración y molienda hasta un tamaño de partícula que favorezca la extracción por el disolvente adecuado, seguido de una granulación o peletizado que facilite la difusión del soluto entre las dos fases y evite al máximo la formación de partículas muy finas.
3. Empaque del material en el extractor y rociamiento del mismo con el disolvente para un remojo uniforme.
4. Tiempo de maceración, obtención del equilibrio y la remoción de la micela por filtración (generalmente, el material molido actúa como filtro).
5. Reemplazo de la solución por disolvente fresco o extracto diluido.
6. Remoción del disolvente del extracto a la temperatura más baja posible para evitar la pérdida de compuestos volátiles con la alteración del perfil del aroma; generalmente se hace en dos etapas, la primera remueve aproximadamente el 95% del disolvente en un evaporador al vacío; la segunda implica la remoción del disolvente restante con un tratamiento al vacío o con una corriente de vapor caliente, hasta que el contenido del disolvente residual en el producto se encuentre por debajo del permitido por la legislación sanitaria.
7. Recuperación del disolvente retenido en la masa de la especia extraída, por medio de un desolventizador haciendo pasar por la masa una corriente de vapor caliente, y recuperando el disolvente por condensación.
8. Dilución de la oleorresina, si es necesaria, con aceite de girasol o de soya.
9. Disposición del bagazo o material residual.

La materia prima para la extracción industrial de los frutos de género *Capsicum* se prepara a partir de los frutos maduros y deshidratados de las variedades seleccionadas de chiles. Dicha selección depende principalmente del fin último que desea darse al producto derivado de la extracción.

Dentro de los disolventes que se han utilizado para la extracción de los frutos del género *Capsicum*, se encuentran: acetona, diclorometano, etanol, éter de petróleo, dicloro-etileno, tricloro-etileno, hexano y acetato de etilo. La utilización de estos disolventes genera diferencias en cuanto a selectividad y rendimiento de la extracción. La utilización de un alcohol, por ejemplo, genera un muy alto rendimiento de oleorresina pero no extrae óptimamente los colorantes; el hexano extrae mucho mejor los colorantes y es un mal disolvente de extracción de capsaicinoides. El dicloro-etileno es un disolvente práctico y bueno para la extracción tanto de los colorantes como de los capsaicinoides; el acetato de etilo genera rendimientos similares de colorantes y capsaicinoides en la oleorresina (Albaladejo y García, 1993, Govindarajan II, 1986). Todas estas diferencias en rendimiento y selectividad son debidas a la naturaleza de los disolventes y al contenido y características de los diversos compuestos presentes en los frutos.

La extracción industrial de oleorresina de chile puede hacerse en un proceso en *batch* o por lotes; generalmente por percolación del disolvente a través de columnas de acero inoxidable empacadas con el fruto molido a temperatura ambiente. Para optimizar la extracción, es esencial la uniformidad del empaquetado y el mojado con el disolvente para evitar la canalización. Otra forma de llevar a cabo la extracción es la descrita anteriormente, esto es, con el remojo uniforme de la materia prima con el disolvente y posterior separación del mismo.

Por otro lado, también existen plantas industriales de extracción continua. El extractor para la extracción continua sólido-líquido es versátil y consta de un sistema automático para el relleno de la materia prima y la descarga del material extraído; la extracción, en este caso, se lleva a cabo en continuo; durante el proceso, el disolvente es recuperado por condensación (Govindarajan II, 1986).

2.5 EL PROCESO DE EXTRACCIÓN

2.5.1 Definición

La extracción sólido-líquido se puede definir como el retiro de una fracción soluble en la forma de solución de una fase sólida permeable e insoluble con que

se asocia. La separación implica, por lo general, la disolución selectiva con difusión; pero en el caso extremo del lavado simple, consiste sólo en el desplazamiento (con cierta combinación) de un líquido intersticial por otro, con el que es miscible. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o adsorbido, o bien, mantenido mecánicamente en la estructura porosa del material insoluble. El mecanismo de la extracción puede incluir una solución física simple o la disolución facilitada por una reacción química. La velocidad de transporte de disolvente en la masa que se va a extraer o de la fracción soluble en el disolvente o la solución de extracto del material insoluble, o alguna combinación de estas velocidades, pueden ser importantes.

Debido a su gran variedad de aplicaciones y su importancia para varias industrias, la extracción tiene varios otros nombres, entre los que se encuentran la lixiviación, la percolación, el lavado y la decantación por sedimentación (Perry y Chilton, 1987).

2.5.2 Factores que afectan el proceso de extracción.

Un proceso de extracción, se puede ver afectado por un gran número de factores; a continuación se analizan los más importantes:

◆ Solubilidad.

Para que se pueda llevar a cabo una extracción, el soluto debe ser soluble en el disolvente. El hecho de que un soluto sea soluble en un disolvente depende tanto de la naturaleza del soluto como de la del disolvente. Las fuerzas intermoleculares (fuerzas de atracción entre las moléculas), aquéllas responsables de la existencia de los gases y los estados condensados de la materia, son las que determinan también la posibilidad de que un soluto se disuelva en un disolvente determinado. Las fuerzas intermoleculares más importantes son las siguientes:

1. Fuerzas dipolo-dipolo.- Éstas son fuerzas que actúan entre moléculas polares, esto es, entre moléculas que tienen momento dipolo permanente.

2. Fuerzas ion-dipolo.- Ocurren entre un ión y un dipolo (molécula que tiene un momento dipolo permanente).

3. Fuerzas dipolo-dipolo inducido.- Son fuerzas que se dan entre una molécula polar (con momento dipolo permanente) y una molécula (o átomo) no polar, en la cual se induce un momento dipolo momentáneo gracias a la presencia del dipolo de la molécula polar. Este tipo de interacción es dependiente de la polarizabilidad de la molécula no polar y de la magnitud del momento dipolo de la molécula polar.

4. Fuerzas ion-dipolo-inducido.- Se dan entre un ion y una molécula (o átomo) no polar en la cual se ha inducido un momento dipolo instantáneo; dicha inducción es promovida por la proximidad del ion, a partir de la cual, se logra una separación entre las cargas positiva y negativa en la molécula (o átomo) neutra. Al igual que en el caso anterior, este tipo de fuerza depende no sólo de la carga del ion, sino de la polarizabilidad de la molécula no polar.

5. Fuerzas de dispersión.- Se da entre moléculas o átomos no polares y depende de la polarizabilidad de los mismos. Esta interacción se da, por lo tanto, entre momentos dipolos instantáneos creados por los movimientos de electrones en uno de los átomos o moléculas que inducen a su vez, un momento dipolo instantáneo en el otro átomo o molécula no polar. Esta fuerza de atracción es significativa sólo cuando las moléculas están muy próximas entre sí.

6. Enlaces de hidrógeno.- Son un tipo especial de interacción dipolo-dipolo entre el átomo de hidrógeno de un enlace polar como el OH, y un átomo electronegativo como O, N o F.

7- Fuerzas ácido-base.- Consisten en interacciones electrostáticas entre grupos capaces de donar electrones y grupos con la capacidad de aceptar electrones, esto es, entre bases y ácidos de Lewis.

Las fuerzas dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, ion-dipolo inducido, y de dispersión constituyen las fuerzas de van der Waals.

La solubilidad de un soluto en un disolvente depende, por lo tanto, de la fuerza relativa de tres tipos de interacciones:

- interacciones disolvente-disolvente
- interacciones disolvente-soluto
- interacciones soluto-soluto

Es lógico pensar que para que dos sustancias sean fácilmente solubles, las fuerzas de interacción entre ambas deben ser mayores a las fuerzas de interacción que se dan entre las moléculas de la misma sustancia; esto es, la atracción disolvente-soluto debe ser mayor que la atracción disolvente-disolvente y que la atracción soluto-soluto (Brown, 1993, Chang, 1992).

El que el soluto sea soluble en el disolvente es una condición muy importante para que una extracción sea exitosa; sin embargo, no es la única ya que se dan casos en los cuales el rendimiento de una extracción es muy bajo independientemente de que el soluto sea soluble en el disolvente debido a factores de otro género que también se analizarán aquí.

◆ Difusión y tamaño de partícula.

El compuesto de interés debe ser transportado lo suficientemente rápido por difusión desde el interior de la matriz en la cual está contenido. El proceso de transporte comprende generalmente la difusión del fluido en la matriz, seguido por la difusión del analito hacia el fluido por entre los poros de la matriz. La relación tiempo/transporte dependerá de la forma y las dimensiones de la matriz o sus partículas. El que las dimensiones sean pequeñas es de gran importancia ya que el tiempo de transporte por difusión depende del inverso del cuadrado del valor de dichas dimensiones (Clifford, 1996).

$$t = f(1 / d^2)$$

Este hecho resulta evidente ya que el proceso de extracción se verá favorecido por el aumento de la superficie por unidad de volumen de sólidos que se deban extraer y por la disminución de distancias radiales que se deben atravesar al interior de los sólidos. La disminución del tamaño de las partículas contribuye a ambas cosas. Por otra parte, los sólidos finos provocan una velocidad

lenta de percolación, dificultan la separación de sólidos. Estas características establecen las bases para un tamaño óptimo de partícula (Perry y Chilton, 1987).

- ◆ Efectos de la matriz.

Además de la importancia de la forma y tamaño de partículas de la matriz en el proceso de difusión llevado a cabo en una extracción, existen otros efectos de la matriz que pueden ser determinantes en la eficiencia del proceso como el hecho de que el analito de interés pueda estar unido fuertemente a la matriz por sitios activos de sorción o pueda encontrarse físicamente encapsulado dentro de la matriz.

- ◆ Temperatura de la extracción.

El aumento de la temperatura en la extracción tiene una gran importancia que se manifiesta en el aumento de la solubilidad y en el mejoramiento de la difusión del soluto en el disolvente. El aumento de temperatura puede mejorar el mojado, por disminución de la tensión superficial y las condiciones de flujo y por disminución de la viscosidad de las fases líquidas que se desplazan a través de sólidos. Sin embargo, junto con estas ventajas, se presentan algunos inconvenientes dentro de los cuales, uno de los más importantes es la disminución de la selectividad del disolvente (Albaladejo y García, 1993).

- ◆ Extracción estática y extracción dinámica.

Una extracción estática es aquella en la que el material a ser extraído se pone en contacto con un volumen fijo del disolvente de extracción durante un tiempo determinado y generalmente con agitación y/o ultrasonido. Durante esta extracción, no hay recambio de disolvente y si la cantidad de soluto es suficiente para saturar al disolvente, se llega a una condición de equilibrio entre las moléculas de soluto que se disuelven en el disolvente y las que vuelven a formar parte del material sólido. Esto significa que llega un momento en el cual la cantidad de soluto extraída no varía con respecto al tiempo de extracción. Por otro lado, puede observarse esta constante con respecto al tiempo sin que exista

una saturación, ya que la extracción puede estar limitada por la cantidad del analito de interés presente en la muestra, su solubilidad en el disolvente o la imposibilidad de éste para romper las interacciones analito-matriz.

En una extracción dinámica el recambio de disolvente es continuo. Si el flujo del solvente es bajo, y la cantidad de soluto suficiente, puede llegarse a una saturación del disolvente durante el tiempo en que se encuentra en contacto con la muestra. En ocasiones, sin embargo, el tiempo de contacto no es suficiente para que se establezca un equilibrio. La adición continua de disolvente fresco evita la limitación de la extracción por saturación del mismo. Claramente, en una extracción dinámica, hay un mayor gasto de disolvente que en una estática. En ambos casos, el disolvente puede ser recuperado.

- ◆ Tiempo de extracción.

Cuando hablamos de una extracción estática, el tiempo de extracción debe estar determinado por el tiempo de equilibrio. Una vez alcanzado el equilibrio entre el disolvente y el soluto, un aumento en el tiempo de extracción no se traduce en un mayor rendimiento mientras que sí implica un costo innecesario.

En una extracción dinámica, el tiempo de extracción deberá determinarse en función del aumento de la cantidad de soluto extraído con respecto al tiempo, es decir, cuando llega el momento en que la adición de disolvente fresco ya no implica un aumento en el rendimiento de extracción, ésta deberá concluir.

- ◆ Agitación y ultrasonido.

La agitación tiene también una influencia favorable al aumentar el contacto íntimo entre el sólido y el disolvente, renovando continuamente la superficie de transferencia sólido-líquido, pero hay que tener presente que esto puede dar lugar a formación de partículas muy finas (Albaladejo y García, 1993) El ultrasonido facilita la penetración del disolvente en la matriz ya que ayuda a la ruptura de interacciones matriz-matriz.

La extracción con disolventes orgánicos implica riesgos ecológicos y toxicológicos; generalmente, después de la extracción, se requieren algunos pasos de purificación para remover impurezas y gomas formadas, especialmente en productos alimentarios destinados a consumo humano (Yamaguchi *et al*, 1986). Por otro lado, la selectividad de la extracción con disolventes orgánicos es limitada y la recuperación de sustancias termolábiles es difícil (Knez, 1992).

2.6 EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

2.6.1 Naturaleza de los fluidos supercríticos.

La utilización de varios gases en el estado líquido o supercrítico como disolventes ha estado en desarrollo por lo menos durante los últimos 25 años. Una gran cantidad de productos naturales han sido extraídos con dióxido de carbono.

Se ha demostrado que existe una temperatura por encima de la cual una sustancia puede existir únicamente como fluido en un estado intermedio entre líquido y gas.

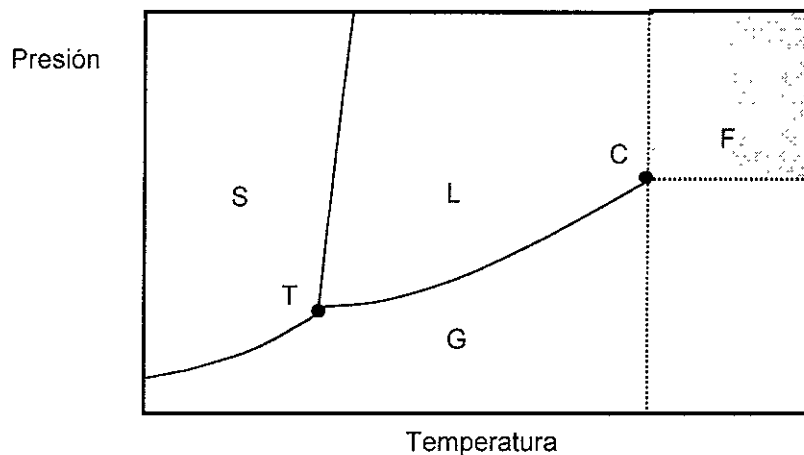


Fig. 4. Diagrama de Fases de una Sustancia Simple

S= sólido; L= líquido; G= gas; F= fluido supercrítico; T= punto triple; C= punto crítico.

La figura 4 corresponde al diagrama de fases de una sustancia simple. Las áreas marcadas como S, L, y G, muestran dónde existe la sustancia como un

sólido, líquido o gas respectivamente; y T es el punto triple en el cual estas tres fases coexisten. Las líneas representan coexistencia entre dos fases. Si nos movemos hacia arriba en la curva de coexistencia gas-líquido, tanto la presión como la temperatura aumentan. El líquido se vuelve menos denso por la expansión térmica y el gas se vuelve más denso conforme la presión aumenta. En el punto crítico C, las densidades de las dos fases se igualan y la distinción entre gas y líquido desaparece.

Muchos fluidos han sido explotados por encima de su temperatura y presión críticas, y se ha acuñado el término de "fluido supercrítico" para describir este medio (Clifford, 1996). El punto crítico C, es una combinación de presión y temperatura dentro del diagrama de fases para cada sustancia en particular; es decir, cada sustancia tiene una combinación de presión y temperatura críticas, a partir de la cual se convierte en un fluido intermedio entre líquido y gas.

Algunos parámetros críticos de sustancias seleccionadas, se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros críticos de sustancias seleccionadas útiles como fluidos supercríticos (Clifford, 1996)

Sustancia	T _c (°C)	P _c (atm)	ρ (10 ³ kg/m ³)
CO ₂	31.3	72.9	0.47
N ₂ O	36.5	72.5	0.45
SF ₆	45.5	37.1	0.74
NH ₃	132.5	112.5	0.24
H ₂ O	374	227	0.34
n-C ₅ H ₁₂	152	37.5	0.23
n-C ₅ H ₁₂	197	33.3	0.23
Xe	16.6	58.4	1.10
CCl ₂ F ₂	112	40.7	0.56
CHF ₃	25.9	46.9	0.52

T_c = Temperatura crítica

P_c = Presión crítica

ρ = Densidad

2.6.2 Utilización de fluidos supercríticos como medio de extracción.

El potencial de los fluidos supercríticos como medios de extracción, radica en que presentan propiedades medias entre las asociadas a gases y a líquidos y, también a que sus propiedades extractivas pueden ser controladas por la densidad (a través de presión y temperatura). A esta metodología de extracción se le denomina Extracción Supercrítica (ESC) (Clifford y Bartle; 1995). Comparados con los líquidos, los fluidos supercríticos tienen densidades y viscosidades menores, mientras que poseen mayores difusividades. Así, los poderes solventes de los fluidos supercríticos son parecidos a los de los líquidos, mientras que sus densidades y viscosidades son similares a las de los gases (Phelps *et al*; 1996).

Las diferencias en las propiedades físicas a las que nos referimos, se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Comparación de las propiedades físicas de los gases, líquidos y FSCs (Randolph, 1990).

Fluido	Densidad (g/cm)	Viscosidad (g/cms)	Viscosidad cinemática (cm ² /s)	Difusividad (cm ² /s)
Gas	(0.6-2)x10 ⁻³	(1-3)x10 ⁻⁴	1x10 ⁻¹	0.1-0.4
Líquido	0.6-1.6	(0.2-3)x10 ⁻²	1x10 ⁻²	(0.2-2)x10 ⁻⁵
^a FSC	0.2-0.9	(1-9)x10 ⁻⁴	1x10 ⁻³	(2-7)x10 ⁻⁴

^aFSC: Fluido Supercrítico.

De esta manera, las ventajas de la Extracción Supercrítica nacen de las grandes difusividades y la mayor rapidez de transferencia de masa que ocurre en los fluidos supercríticos. En ESC, existe una difusión más rápida por los canales y poros en una matriz natural y la extracción es, por lo tanto, más rápida que en un líquido (Clifford, 1996).

El dióxido de carbono ha sido, hasta ahora, el compuesto más ampliamente utilizado como fluido supercrítico debido a sus condiciones críticas convenientes,

costo, carácter no explosivo y ausencia de toxicidad. Es clasificado como un disolvente no polar, y tiene alguna afinidad limitada con ciertos solutos polares.

En adición a lo ya mencionado, es importante señalar que el dióxido de carbono es aplicable a una amplia gama de extracciones industriales, ya que por sus características de polaridad similares a las del hexano y pentano, puede disolver compuestos orgánicos diversos como alcanos y naftaleno, alquenos, alcoholes, aldehídos, fenoles, ésteres, ácidos carboxílicos, compuestos heterocíclicos, aromáticos, cetonas, éteres, amidas y nitrilos (Atkinson y Maviturna, 1991).

Controlando la temperatura y presión del disolvente, la extracción puede ser hasta cierto punto selectiva. La extracción con un fluido supercrítico (o cualquier otro solvente), nunca es completa en un tiempo finito. Es relativamente rápida inicialmente, pero después sigue una cola larga en la curva de % extraído vs. tiempo. En una situación típica, el 50% del soluto es extraído en 10 minutos, pero pueden pasar más de 100 minutos antes de que se extraiga aproximadamente el 99% del soluto (Clifford, 1996).

Una extracción supercrítica se ve afectada básicamente por los mismos factores que influyen en cualquier otra extracción además de ser dependiente de los cambios en las propiedades del fluido supercrítico en función de la variación de la densidad. Las interacciones intermoleculares disolvente-disolvente, soluto-soluto y soluto-disolvente, el tamaño de partícula, la matriz, la agitación, etc, son todas variables que juegan un papel importante en el éxito de la extracción.

Por otro lado, dada la sensibilidad de los fluidos supercríticos a cambios en la densidad, la solubilidad del soluto en el fluido varía de manera especial. La solubilidad aumenta con la presión a temperatura constante, mientras que puede aumentar o disminuir cuando la temperatura aumenta a presión constante. (Perrut, 1990).

Esto puede ejemplificarse a partir del comportamiento de la solubilidad del naftaleno en fluidos supercríticos ya que es representativo del de muchos otros compuestos. Las figuras 5 y 6, muestran la solubilidad del naftaleno en función de la presión y de la temperatura.

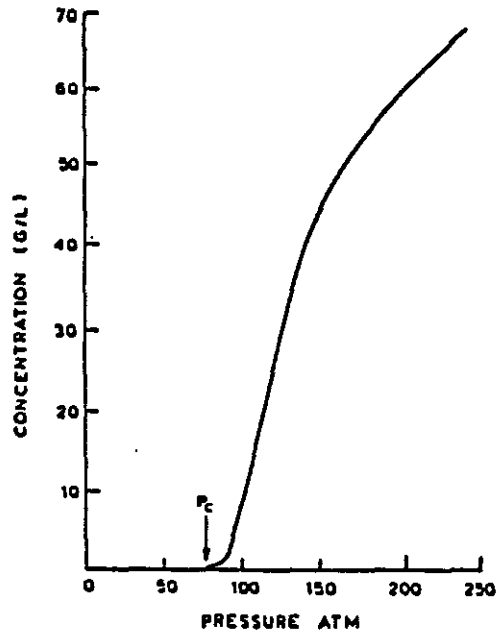


Fig. 5. Solubilidad del Naftaleno en Dióxido de Carbono a 45°C en función de la presión (Krukonis, 1985).

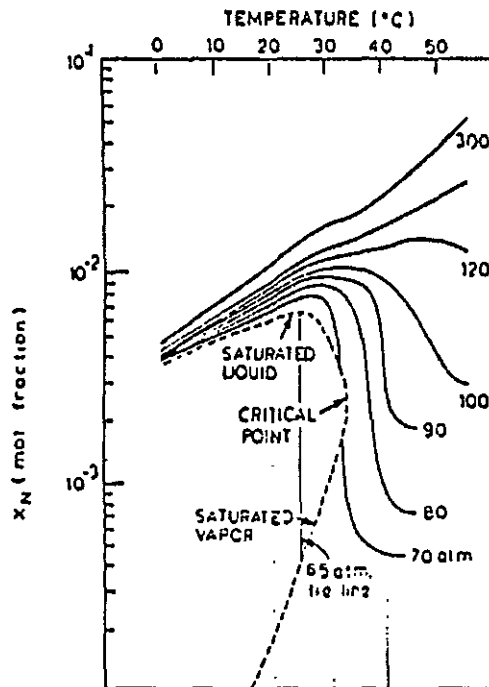


Fig. 6. Isobaras de la solubilidad del Naftaleno en Dióxido de Carbono en función de la temperatura. (Krukonis, 1985).

Como puede observarse a partir de la figura 5, la solubilidad del naftaleno aumenta dramáticamente cuando la presión se incrementa por encima de la presión crítica de 73 atm. Por otro lado, en la figura 6, puede verse que la solubilidad del naftaleno aumenta o disminuye en función de la temperatura dependiendo de las condiciones de presión. Un aumento de temperatura a presiones altas, genera un aumento en la solubilidad del naftaleno, mientras que el incremento de temperatura a presiones bajas, resulta en una disminución de la misma.

En los métodos de extracción con fluidos supercríticos puede combinarse la extracción estática con la dinámica.

2.6.3 Ventajas y desventajas de la EFS.

La dependencia de capacidad solvente en la presión y las propiedades favorables de los fluidos supercríticos se combinan para conferir algunas ventajas al proceso de extracción supercrítica:

- La alta difusividad reduce limitaciones de transferencia de masa; para la extracción a partir de matrices sólidas porosas (como por ejemplo, las de las plantas), las altas difusividades exhibidas por los fluidos supercríticos pueden dar lugar a tasas de extracción altamente intensificadas.
- La tensión superficial baja permite una mejor penetración y mojado de poros pequeños que aquellos accesibles con disolventes líquidos.
- La pronunciada sensibilidad de la solubilidad a cambios en presión y temperatura provee la posibilidad de manipulación de la selectividad en una extracción.
- Los compuestos sólidos pueden ser cristalizados a partir de los fluidos supercríticos y el tamaño de los cristales puede ser controlado durante la etapa de despresurización.
- Los disolventes supercríticos permiten un proceso de baja temperatura permitiendo el manejo de compuestos con inestabilidad térmica.

- La baja reactividad y toxicidad de algunos fluidos supercríticos (tales como el dióxido de carbono y el etano) y su carácter gaseoso a temperatura ambiente (residuo de disolvente despreciable en el producto), puede hacer a los fluidos supercríticos, disolventes adecuados para bioprocesamientos y en productos de uso humano.

Sin embargo, los fluidos supercríticos no son convenientes para todos los procesos de extracción; sus desventajas principales son:

- Las solubilidades, en algunos casos, pueden ser menores que aquellas logradas con muchos disolventes líquidos.
- Los costos son muy altos debido al equipo necesario para el manejo de sustancias a presiones muy altas.
- Existen datos insuficientes acerca de las propiedades físicas de muchas biomoléculas, haciendo extremadamente difícil una confiable predicción del comportamiento de fase.
- La selectividad puede mejorarse por el uso de cosolventes, pero esto puede obviar en cierta medida la ventaja de cantidades mínimas de disolvente residual en el producto (Randolph, 1990).

2.6.4 Aplicaciones industriales de la EFS

Actualmente existen varias aplicaciones a gran escala de la extracción con fluidos supercríticos de ciertos compuestos a partir de materias primas, principalmente vegetales, según se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Aplicaciones industriales de la E.F.S. (Perrut, 1990).

Aplicación	Solvente	Desarrollo industrial	Comentarios
Descafeinización del café	CO ₂	RFA; E.U.A.; numerosas patentes	Fijación de la cafeína sobre carbón activado. Recuperación de la cafeína en fase acuosa
Descafeinización de té	CO ₂	RFA	CO ₂ líquido o supercrítico
Resinas de lúpulo	CO ₂	Australia; G.B.; RFA; E.U.A	
Espicias: pimienta, chile, paprika, apio	CO ₂	R.F.A; Francia. Numerosos laboratorios	Gran actividad en este sector
Aromas: frutas, carne, pescados, vainilla	CO ₂	Francia, R.F.A, Suiza, numerosos laboratorios	Mejoramiento por la utilización de cosolventes
Aceites esenciales	CO ₂	Piloto. Numerosas patentes	
Aceites vegetales	CO ₂		
Extracción de colesterol:yemas de huevos	CO ₂	Desarrollo industrial en curso	Actividad fuerte en E.U.A, Europa y Japón
Desengrasado de productos alimentarios		Piloto	Interés importante en los E.U.A.
Nicotina del tabaco	CO ₂	E.U.A	
Plantas medicinales	CO ₂ -N ₂ O	Numerosos laboratorios	
Destoxificación de suelos contaminados	CO ₂	Piloto	Extracción selectiva de poliaromáticos, DDT, pesticidas...
Tratamiento de lodos de refinería	C ₃ H ₈	E.U.A	

2.6.5 Uso de cosolventes en ESC con CO₂

El motivo original de la adición de cosolventes o modificadores era incrementar las solubilidades de compuestos polares, pero ahora se sabe que las interacciones de los modificadores con una matriz sólida durante la extracción provocan efectos igualmente importantes en el proceso de extracción (Clifford, 1996).

Es práctica común el modificar el CO₂ supercrítico en algunos casos con cosolventes (modificadores) tales como metanol, etanol, acetona, y halocarburos, entre otros. Así, la solubilidad tanto de solutos polares como no polares puede ser intensificada por medio de la adición de cosolventes (Phelps *et al*; 1996).

Se pueden utilizar tanto cosolventes polares como no polares. Los polares tienen un uso mucho más frecuente dada la naturaleza no polar del dióxido de

carbono y su solubilidad limitada con compuestos polares; pero también se pueden añadir modificadores no polares con el fin de aumentar el poder solvente del fluido en caso de que los compuestos de interés sean moléculas como triglicéridos (Perrut, 1990).

La adición de cosolventes es común cuando:

- ◆ El dióxido de carbono, en su forma pura, no extrae lo suficiente los componentes de interés, dentro del rango de operación típico efectivo de densidad (0.15-0.95 g/ml) debido a que la solubilidad del soluto en el disolvente supercrítico es muy baja (Sunol *et al*, 1985).
- ◆ Se desea una alta selectividad en la extracción (Sunol *et al*, 1985).
- ◆ Los componentes de interés son solubles en dióxido de carbono supercrítico, pero están unidos a la matriz tan fuertemente (sitios activos de sorción), que el fluido no puede competir y la eficiencia de la extracción es mala (Hawthorne *et al*, 1995).
- ◆ Los componentes de interés son solubles en el fluido supercrítico pero se encuentran físicamente encapsulados dentro de la matriz, de modo que la extracción se dificulta y la eficiencia de la misma, es mala.
- ◆ Se desea trabajar a densidades bajas, disminuyendo así los costos de operación, sin sacrificar el rendimiento de la extracción (Dobbs *et al*, 1987).

En cualquiera de estos casos, el uso de un modificador adecuado puede representar la solución al problema. La adición de disolventes orgánicos al fluido supercrítico modifica las fuerzas intermoleculares atractivas entre disolvente, los solutos y la matriz.

La polarizabilidad del CO₂ es del orden de 26.5×10^{-25} , un valor menor al de todos los hidrocarburos, con excepción del metano (Dobbs *et al*, 1987), y no posee momento dipolo. La adición de un modificador aumenta la polarizabilidad del dióxido de carbono (Phelps *et al*, 1996).

El uso de cosolventes puede ser la clave para lograr una extracción selectiva puesto que la selectividad del dióxido de carbono supercrítico es insuficiente para separar compuestos de una misma familia química o de peso

molecular similar (Perrut, 1990). Esto se puede ejemplificar a partir de la extracción de fosfolípidos de frijol de soya. En dicha extracción, la presencia y concentración de etanol como cosolvente influye no sólo en la cantidad total de fosfolípidos extraídos, sino en la composición de la fracción de fosfolípidos en el extracto. De hecho, una fracción molar de etanol por encima de 0.15, puede optimizar la extracción de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (Montanari *et al.*, 1994)

Se puede lograr también un aumento en la solubilidad de solutos polares sin que implique necesariamente un aumento de solubilidad de solutos no polares; esto puede ser aplicable incluso al trabajar con densidades bajas de dióxido de carbono supercrítico en las que generalmente se observa un bajo poder solvente del mismo.

Algunos autores han llegado a la conclusión de que en la región supercrítica, la modificación de la densidad del disolvente debida a la adición de cosolvente, contribuye muy poco en la intensificación de la solubilidad. El aumento de solubilidad por adición de cosolvente, que es prácticamente independiente de la presión, se entiende más bien como una función de las fuerzas intermoleculares entre el soluto y la mezcla CO₂/cosolvente, y a la concentración del cosolvente (Dobbs *et al.*, 1987).

En el caso de que los componentes de interés sean solubles en el fluido supercrítico pero estén unidos a la matriz por medio de sitios activos, se debe utilizar un disolvente específico como modificador para romper la interacción soluto/sitio activo (Hawthorne *et al.*, 1995). Si los solutos están físicamente encapsulados en la matriz, el uso de un modificador puede hinchar la matriz o lograr una redistribución de la misma de modo que los analitos queden liberados y la extracción sea más eficiente (Knipe *et al.*, 1993).

Un punto importante al trabajar con mezclas de fluido supercrítico /cosolvente, radica en lograr una fase homogénea al elegir las condiciones de presión y temperatura de trabajo.

Si el sistema se encuentra en o por encima de la temperatura crítica, pero a una presión relativamente baja, consistirá de dos fases: una de cosolvente líquido saturado con dióxido de carbono y otra de dióxido de carbono supercrítico

solvatado con cosolvente. Conforme la presión se incrementa, la fase líquida disolverá más dióxido de carbono y la fase supercrítica solvatará más cosolvente. Eventualmente, a la presión crítica de la mezcla, las dos fases serán iguales y la mezcla existirá sólo como una fase supercrítica (Clifford, 1996). Mientras mayor sea la concentración del modificador en la mezcla CO₂/modificador, mayores serán las condiciones de presión y temperatura requeridas para lograr una fase homogénea (Gurdial *et al*, 1993).

En ciertas ocasiones, la temperatura requerida para obtener una mezcla supercrítica bajo ciertas condiciones deseadas de presión, puede ser muy elevada y degradar, por lo tanto, los analitos de interés, sobre todo si estos últimos son termolábiles, como los carotenoides. Debido a ello, las mezclas se deben manejar en condiciones cercanas al punto crítico.

Un líquido subcrítico, homogéneo, compresible y cercano al punto crítico, tiene esencialmente el mismo poder solvente máximo que un fluido supercrítico por lo que sus propiedades de transporte son aún ligeramente favorables; sin embargo, la posibilidad de ajuste del poder solvente (por manipulación de presión y temperatura) es mucho menor en un fluido subcrítico que en uno supercrítico (Knipe *et al*, 1993).

La selección de un modificador adecuado para la resolución de un problema específico debería basarse en consideraciones termodinámicas que incluyen tanto al cosolvente como al soluto. Sin embargo, no hay muchos datos disponibles para mezclas de multicomponentes. Asumiendo que se requiere el uso de un modificador cuando la interacción soluto-modificador es la interacción dominante en el paso de extracción, entonces, la selección debe llevarse a cabo con base en las fuerzas intermoleculares que existan entre el soluto y el cosolvente (solubilidad soluto/cosolvente). Por otro lado, no debemos olvidar los efectos del modificador en la matriz y en la polarizabilidad del CO₂.

La selección de un disolvente líquido para una extracción líquido-sólido podría ser un buen comienzo en la selección del cosolvente adecuado (Sunol *et al*, 1985)

2.6.6 Predicción de la solubilidad de compuestos en los fluidos supercríticos.

Muchos investigadores han buscado la forma de poder predecir por modelamiento, la solubilidad de un soluto en un fluido supercrítico. Algunos intentos tratan de relacionar la solubilidad directamente con la presión y la temperatura a partir de ecuaciones de estado complejas y cuyos resultados no siempre coinciden con las observaciones experimentales.

Chrastil, en 1982, realizó un trabajo en el que relacionaba las solubilidades de líquidos y sólidos en fluidos supercríticos directamente con la densidad (concentración) del fluido, evitando la complejidad de las ecuaciones de estado. La relación anteriormente descrita, fue resumida en la siguiente expresión:

$$C = d^k \exp \left(\frac{a + b}{T} \right)$$

C es la concentración de un soluto en el fluido en g/L, d es la densidad del fluido en g/L, k es un número de asociación y a y b son constantes. La determinación de k, a y b puede realizarse experimentalmente a partir de las pendientes de las curvas de equilibrio de concentración del soluto en el fluido supercrítico en función de la densidad (a temperatura constante) y de la temperatura (a densidad constante) (Chrastil, 1982).

Por otra parte, la determinación del parámetro de solubilidad de un soluto es una alternativa para la predicción de la solubilidad de dicho soluto en cualquier disolvente, incluyendo a los fluidos supercríticos. Fedors propuso un método para la estimación del parámetro de solubilidad de un compuesto a partir de las contribuciones de energía de vaporización y volumen molar de los grupos funcionales del mismo. Para ello, reportó una tabla de las contribuciones antes mencionadas, a 25°C. Teniendo estos valores, puede determinarse la sumatoria de las contribuciones individuales de los grupos o átomos de un compuesto en la energía de vaporización y el volumen molar. El parámetro de solubilidad δ se calcula como sigue:

$$\delta = \sqrt{\frac{\sum_i \Delta e_i}{\sum_i \Delta V_i}}$$

Esto es, el parámetro de solubilidad de un compuesto se define como la raíz cuadrada de la relación de las sumatorias de las contribuciones individuales de sus grupos o átomos en la energía de vaporización y el volumen molar (Fedors, 1974). La solubilidad de un soluto en cualquier fluido será máxima cuando los parámetros de solubilidad de ambos, sean iguales o muy próximos.

Dado que las propiedades de un fluido supercrítico pueden cambiar con la variación de la presión y la temperatura, esto es, con la variación de la densidad, su poder solvente puede imitar una amplia variedad de disolventes líquidos. Esto se ilustra en la tabla 13.

Como puede verse en esta tabla, gracias a la variación de temperatura y presión, el CO₂ puede asumir las propiedades solventes equivalentes a cierto rango de disolventes convencionales, desde pentano hasta piridina.

El parámetro de solubilidad de la tabla es una medida numérica de la habilidad de un disolvente para solubilizar un soluto determinado. Cuando coinciden los parámetros de solubilidad del fluido supercrítico y del disolvente líquido, se dice que tienen el mismo poder solvente.

Tabla 13. Parámetros de solubilidad de algunos disolventes comunes vs. parámetros de solubilidad de algunas sustancias utilizadas como fluidos supercríticos

Líquido	Parámetro de solubilidad ^a	Fluido supercrítico
Metanol	14-15	
	13-14	NH ₃
Etanol	12-13	NO ₂
2-Propanol	11-12	H ₂ S, HBr, HCl
Piridina, Dioxano	10-11	N ₂ O/CH ₃ SH, Cl ₂ , CH ₃ Cl
Benceno, Cloroformo, Acetato de etilo, Acetona	9-10	CH ₂ CHF/(CH ₃) ₂ NH
Ciclohexano, Tetracloruro de carbono, Tolueno	8-9	CH ₃ CHF ₂ , CHF ₃ , Freón, C ₂ H ₄
Eter etílico, Pentano	7-8	CCl ₂ F ₂ , CClF ₃ , SF ₆ , CO

^aEl parámetro de solubilidad se calcula con base en la siguiente ecuación:

$$\delta = \frac{\Delta E_v}{V} = \frac{\rho(\Delta H_v - RT)}{M}$$

en donde ΔE_v es la energía de vaporización, V el volumen molar, ρ la densidad, ΔH_v el calor de vaporización, M el peso molecular del soluto, R la constante de los gases, y T la temperatura.

^bEl parámetro de solubilidad del CO₂ a la densidad de 1.23 g/cm³ corresponde al de los disolventes líquidos en este rango

^cEl CO₂ a densidad de 0.9 g/cm³ tiene un parámetro de solubilidad correspondiente al de los disolventes líquidos en este rango

^dEl CO₂ a densidad de 0.6 g/cm³ puede reemplazar disolventes en este rango. (Phelps *et al*, 1996)

3. ANTECEDENTES

En este segmento pretende darse un panorama general de las investigaciones que se han llevado a cabo en cuanto a la aplicación de fluidos supercríticos en la industria de los alimentos, así como describir algunos de los trabajos directamente relacionados con el presente estudio, esto es, con la solubilidad de carotenoides y capsaicinoides en los fluidos supercríticos y la extracción supercrítica de los mismos.

La solubilidad de sólidos en fluidos supercríticos fue reportada por primera vez por Hannay y Hogarth en 1879. A partir de entonces surgió un interés por el estudio de las propiedades de los fluidos supercríticos y sus aplicaciones. No obstante, no fue sino hasta mediados y finales de los años 70's del siglo XX que los disolventes supercríticos recibieron una especial y creciente atención. A la fecha, las industrias química, farmacéutica, de polímeros y de alimentos, entre otras, han desarrollado diversas investigaciones enfocadas a las posibles aplicaciones de los fluidos supercríticos (Krukonis, 1985; Larson y King, 1986).

La extracción con fluidos supercríticos ha sido investigada y utilizada durante muchos años para la extracción de compuestos volátiles como aceites esenciales, aromas y sabores a partir de fuentes vegetales. Ejemplos de ello son la extracción de tiosulfatos de ajo y cebolla (Calvey *et al*, 1994), la remoción de terpenos de aceite de cítricos (Sato *et al*, 1994) y la extracción de diversos compuestos de sabor, aroma y color a partir de apio, paprika, raíces de diente de león y salvia (Peplonski *et al*, 1994).

Smith y Burford, en 1992, realizaron un estudio para determinar las condiciones óptimas de extracción con dióxido de carbono supercrítico de algunos constituyentes típicos de plantas (limoneno, eugenol, carvona, santotina, etc) utilizando a la α -celulosa como modelo de una matriz original (Smith y Burford, 1992)

En la industria de alimentos, la utilización de los fluidos supercríticos para la extracción de aceites y grasas a partir de fuentes animales y vegetales, tanto para la producción de dichos aceites, como para el desengrasado de alimentos, ha sido objeto de estudio intenso. Dentro de los trabajos reportados en esta rama destacan, entre otros, la extracción de aceites de semillas de soya, girasol y colza

(Stahl *et al.*, 1980); extracción de aceite de germen de maíz (Christianson *et al.*, 1984) y de trigo (Taniguchi *et al.*, 1985); el desengrasado de cacahuates tostados y almendras (Chiou *et al.*, 1996) y la extracción de aceites de pescados (Yamaguchi *et al.*, 1986) En todos ellos se reporta una fuerte influencia de la presión en los rendimientos de la extracción (aumento de los rendimientos conforme se incrementa la presión), una importancia significativa del tamaño y forma de las partículas y un efecto variable de la temperatura en función de la naturaleza del soluto que se desea extraer y de las condiciones de presión. También se ha estudiado la solubilidad de diferentes ésteres de ácidos grasos en CO₂ supercrítico, observándose un aumento de la solubilidad de los compuestos con incrementos en la presión, y un efecto contrario con incrementos en la temperatura (Liang y Yeh, 1991).

De especial relevancia para la presente investigación, son aquellos estudios relacionados con la extracción de colorantes a partir de fuentes vegetales tales como zanahoria, paprika y chile, entre otras.

En ese renglón, Subra *et al.* reportaron un estudio sobre la influencia de las condiciones del fluido de extracción y el tamaño de partícula de la matriz de la materia prima en la extracción supercrítica de carotenoides de zanahorias liofilizadas, utilizando CO₂ como disolvente. En dicho estudio se determinó, primero, la solubilidad del β -caroteno puro en el fluido supercrítico a 37, 57 y 67°C y 150-280 bar, y se observó un aumento en la solubilidad al incrementar la temperatura o la densidad. Dicha tendencia también fue observada en la extracción directa de zanahorias pero la cantidad extraída siempre resultó inferior que el valor de solubilidad, diferencia que resultó ser variable dependiendo de las condiciones de extracción y del tamaño de partícula. Se concluyó que existen diferentes mecanismos de transferencia de masa en la extracción, dependiendo del tamaño de partícula y que, la mayor cantidad extraída en este caso se daba cuando se extraían partículas de diámetro un poco mayor a 0.16 mm, seguida por la extracción de partículas de diámetro inferior a 0.16mm (polvo) y, por último, la extracción de las partículas más grandes (Subra *et al.*, 1994). Por lo tanto, el tamaño de partícula y las condiciones de extracción, son factores que influyeron en los rendimientos de extracción obtenidos en este estudio.

En otro estudio de extracción de carotenoides de zanahorias con CO₂ supercrítico, realizado por Barth *et al.* en 1995, se analizó, además de la influencia de las condiciones del disolvente en los rendimientos de extracción, el efecto de la adición de etanol como cosolvente. A partir de los resultados se concluyó que las condiciones óptimas para la extracción de α - y β - caroteno eran 50°C, 300 atm y 10% de etanol. Una observación interesante fue que la adición continua (dinámica) de etanol no resultó en una mejora significativa del rendimiento de la extracción en comparación con la adición no continua (estática) (Barth *et al.*, 1995).

Spanos *et al.* estudiaron el efecto del pretratamiento de la materia prima (secado en horno, liofilización y disminución del tamaño de partícula) y las condiciones del fluido de extracción (CO₂SC) en la extracción de β -caroteno de camote. Observaron que un alto contenido de humedad en las muestras (75%) resultaba en una extracción deficiente. Por otro lado, el secado por horno generaba un incremento en la cantidad de carotenoides extraídos por gramo de muestra pero causaba pérdidas de aproximadamente el 50% de los carotenoides debido a su termolabilidad. El mayor rendimiento de carotenoides se observó al utilizar muestras liofilizadas. La disminución del tamaño de partícula resultaba en un mejoramiento en el rendimiento de la extracción. Se observó que el incremento de la presión a temperatura constante resultaba en un aumento en el rendimiento de extracción; mientras que, un aumento de la temperatura a presión constante (disminución de la densidad) influía de manera variable en los rendimientos dependiendo de la magnitud de la presión. A presiones bajas (13.8MPa) la extracción se veía favorecida por temperaturas bajas; a presiones más altas (41.4 MPa), la elevación de la temperatura mostraba un efecto positivo en la extracción, mientras que, a presiones intermedias (27.6MPa), un incremento en la temperatura no influía significativamente en los rendimientos (Spanos *et al.*, 1993).

Favati *et al.* estudiaron la extracción supercrítica de caroteno y luteína a partir de concentrados de proteínas de alfalfa. El alto contenido de estos pigmentos en los concentrados, significa un obstáculo para su utilización en dietas para consumo humano. Las condiciones de la extracción fueron 40°C y 10, 30, 50 y 70 MPa. La solubilidad de ambos pigmentos aumentó en función de un

incremento de presión; sin embargo la cantidad de luteína extraída a presiones bajas resultó insignificante comparada con la del caroteno; ello sugiere la posibilidad de una extracción selectiva (fraccionamiento de ambos pigmentos), especialmente a 30 MPa, condición en que la cantidad de caroteno extraída fue aproximadamente cuatro veces mayor que la de luteína. En este trabajo, los autores relacionaron las observaciones experimentales con la teoría del parámetro de solubilidad (Fedors, 1974) para racionalizar los resultados obtenidos (Favati *et al*, 1988).

En lo que concierne a la solubilidad de capsaicinoides en fluidos supercríticos y a la extracción de los mismos, Knez y Steiner, en 1992, reportaron un estudio de solubilidad de capsaicina en CO₂SC. Los autores recurrieron a un método estático con el objeto de llegar al equilibrio en la extracción y estudiaron la dependencia de la solubilidad en función de la densidad en un intervalo de 70 a 400 bar y de la temperatura a 25, 40 y 60°C. Observaron un incremento de la fracción mol de equilibrio del soluto en los extractos en función de un aumento de presión. Por otro lado, observaron un efecto diferente de la temperatura; a presiones bajas se registró una disminución de la solubilidad en función de un aumento de la temperatura debido a que las densidades del disolvente disminuyen con pequeños aumentos en la temperatura y, por lo tanto, el efecto de la densidad es dominante en esta región; por el contrario, a presiones altas se observó un aumento de la solubilidad principalmente debido al aumento de la presión de vapor del sólido; lo cual indica que en este caso la densidad del disolvente es menos dependiente de la temperatura (Knez y Steiner, 1992). Los resultados de variación de la solubilidad en función de la temperatura a presión constante obtenidos por estos autores, muestran las mismas tendencias observadas en el estudio de extracción de β-caroteno del camote reportado por Spanos *et al*.

Skerget y Knez en 1997, realizaron una investigación acerca de la solubilidad de una mezcla sólida de β-caroteno y capsaicina en dióxido de carbono supercrítico. En muchos de los sistemas reportados en la literatura, se ha observado que la solubilidad de un componente sólido, en particular en un sistema terciario, es significativamente diferente a la solubilidad de dicho componente en un sistema sólido puro- FSC a las mismas condiciones de presión y temperatura.

Los autores observaron que a diferentes condiciones de presión y temperatura, la solubilidad del β -caroteno no dependía de la presencia de la capsaicina, mientras que la solubilidad de la capsaicina disminuía con la presencia del pigmento. En este estudio se propuso que en el sistema terciario β -caroteno-capsaicina-CO₂ hay una gran disminución del punto de fusión de la capsaicina. De los datos de solubilidad obtenidos se concluyó que se puede obtener una mayor separación de los componentes estudiados a presiones bajas (Skerget y Knez, 1997).

Finalmente, en 1994, Yao *et al.* reportaron los resultados de una investigación enfocada a la comparación de la extracción supercrítica de capsaicina y dihidrocapsaicina de *C. annuum* var. Scotch Bonnet, y la extracción a partir de disolventes orgánicos tales como hexano, cloroformo y metanol. Esta variedad de *Capsicum* es considerada la más pungente en el mercado y tiene su origen en Jamaica y las Indias Orientales. La extracción supercrítica se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: extracción inicial con CO₂ supercrítico a 50°C y 400 atm durante 30 min seguida de una extracción a 600 atm durante 90 min. Los rendimientos de capsaicina y dihidrocapsaicina en los extractos previamente combinados fueron de 3.2 y 0.58% respectivamente. Por otro lado, los extractos de hexano y metanol combinados generaron 0.5% de capsaicina y 0.09% de dihidrocapsaicina. De ello se concluyó que el CO₂ supercrítico es un mejor disolvente para la extracción de capsaicina y dihidrocapsaicina a partir de los frutos *Capsicum* de esta variedad que los disolventes orgánicos (Yao *et al.*, 1994).

A partir de estos antecedentes, es posible plantear generalidades en cuanto al efecto de la densidad, la presión y la temperatura en una extracción supercrítica. Un aumento en la densidad se traduce en un incremento del poder solvente del fluido y, por lo tanto, en un aumento en la solubilidad de los solutos y una disminución en la selectividad de la extracción. Un aumento de presión a temperatura constante genera un aumento en la densidad del fluido y, por lo tanto, un aumento en la solubilidad de los solutos. Por otro lado, el incremento de la temperatura a presión constante influye de manera variable en los rendimientos de extracción, dependiendo de la magnitud de la presión.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- ◆ Los rendimientos de extracción con CO₂ supercrítico de colorantes y capsaicina a partir de frutos maduros del género *Capsicum*, son comparables a los obtenidos de la extracción de estos productos a partir de disolventes orgánicos.
- ◆ La densidad del CO₂ supercrítico influye en el rendimiento y selectividad de la extracción de los colorantes y los capsaicinoides a partir de frutos *Capsicum* maduros.
- ◆ La adición de cosolventes polares al dióxido de carbono supercrítico, genera cambios en el rendimiento y la selectividad de la extracción de los colorantes y los capsaicinoides de los frutos *Capsicum*.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

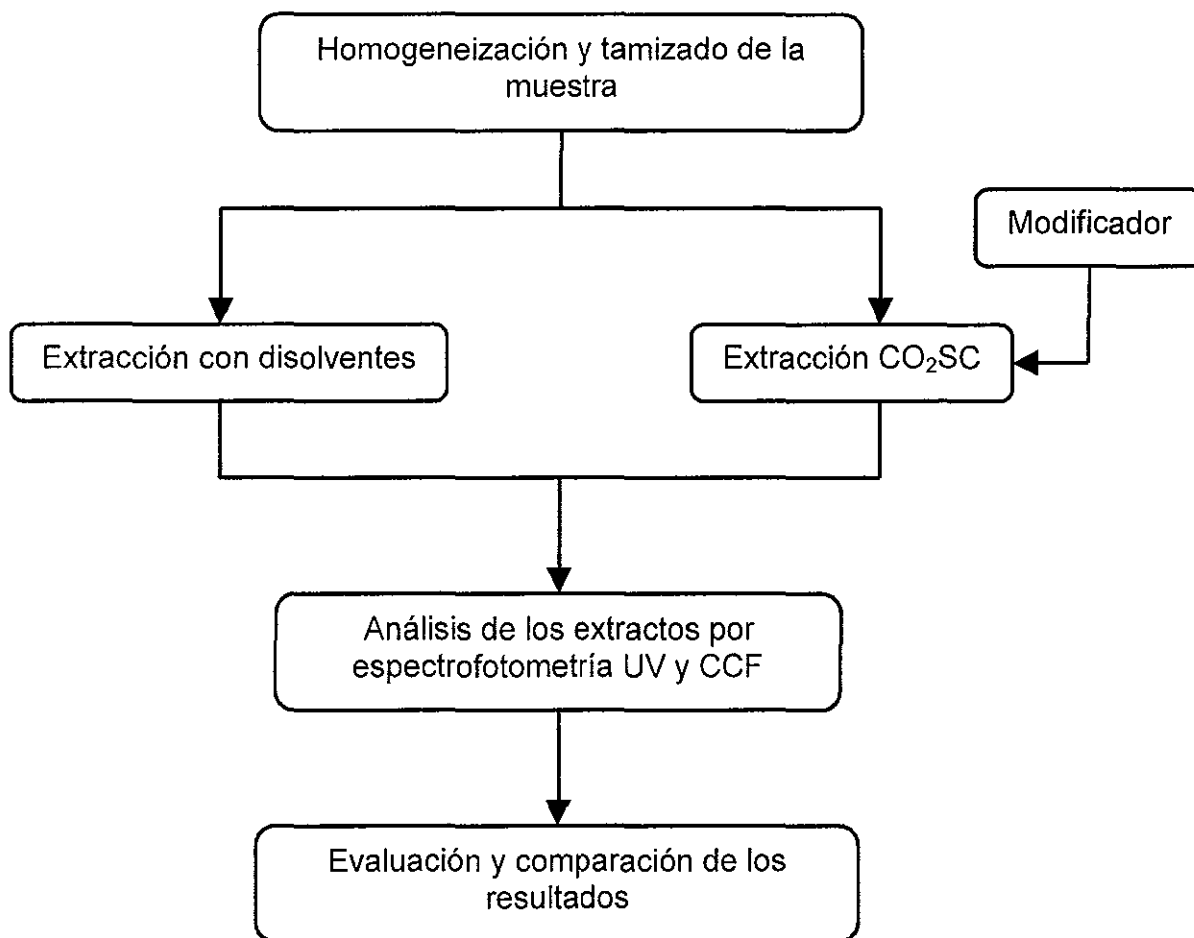
Determinar el potencial de la extracción supercrítica con CO₂ de capsaicina y colorantes a partir de frutos rojos, secos y maduros de *Capsicum annuum*.

Objetivos particulares:

- ◆ Analizar la influencia de la densidad del dióxido de carbono supercrítico en la extracción de capsaicinoides y colorantes de los frutos *Capsicum annuum*.
- ◆ Estudiar la extracción supercrítica de capsaicinoides a densidades bajas.
- ◆ Analizar el efecto de diferentes modificadores en el rendimiento y la selectividad de la extracción supercrítica de colorantes y capsaicinoides.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se presenta un diagrama de flujo en el que se esquematiza la metodología general seguida para la realización de la presente investigación.



6.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE *Capsicum annuum*.

La materia prima a partir de la cual se realizaron los experimentos descritos en esta investigación, es una mezcla de varias especies de *Capsicum annuum* en su etapa de madurez suministrada por una empresa dedicada a la extracción de los colorantes con disolventes orgánicos.

A lo largo de la investigación, la harina fue almacenada a una temperatura de 0°C y protegida de la luz.

Antes de realizar extracciones, la harina fue tamizada y homogeneizada con ayuda de una tamizadora de marca Tyler Combustion Ingeneering Inc., Modelo RX24. El tamizado se realizó durante diez minutos utilizando mallas de número 25 y 40, obteniendo de esta manera tres fracciones de la harina de chile original; 43.2% de fracción de partícula gruesa, 26.4% de fracción de partícula mediana y 30.4% de fracción de partícula fina.

6.2 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA.

Antes de proceder a las extracciones, se realizó un análisis proximal de la harina. Las determinaciones llevadas a cabo fueron las siguientes:

- ◆ Humedad.- Secado en horno a 90°C hasta peso constante.
- ◆ Grasa.- Extracción Goldfish con éter anhidro, 100°C/8 h.
- ◆ Proteína.- Método de Kjeldahl, factor 6.25.
- ◆ Cenizas.- Ignición de la muestra y calcinación en mufla a 550°C hasta peso constante.
- ◆ Fibra.- Digestión de la muestra con H₂SO₄ al 1.35% y NaOH al 1.25%
- ◆ Carbohidratos.- Cálculo por diferencia.

Los resultados de dicho análisis se reportan, en el presente trabajo, en la tabla de resultados correspondiente. Las determinaciones referidas se realizaron con base en los métodos oficiales de la A.O.A.C. (A.O.A.C., 1990) para el análisis de especias, con algunas modificaciones en ciertos casos.

6.3 EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA (ESC).

Existen algunos componentes comunes a los extractores de fluidos supercríticos, así como etapas generales implicadas en un proceso de extracción de este tipo.

En la figura 7, se resumen estos componentes y etapas:

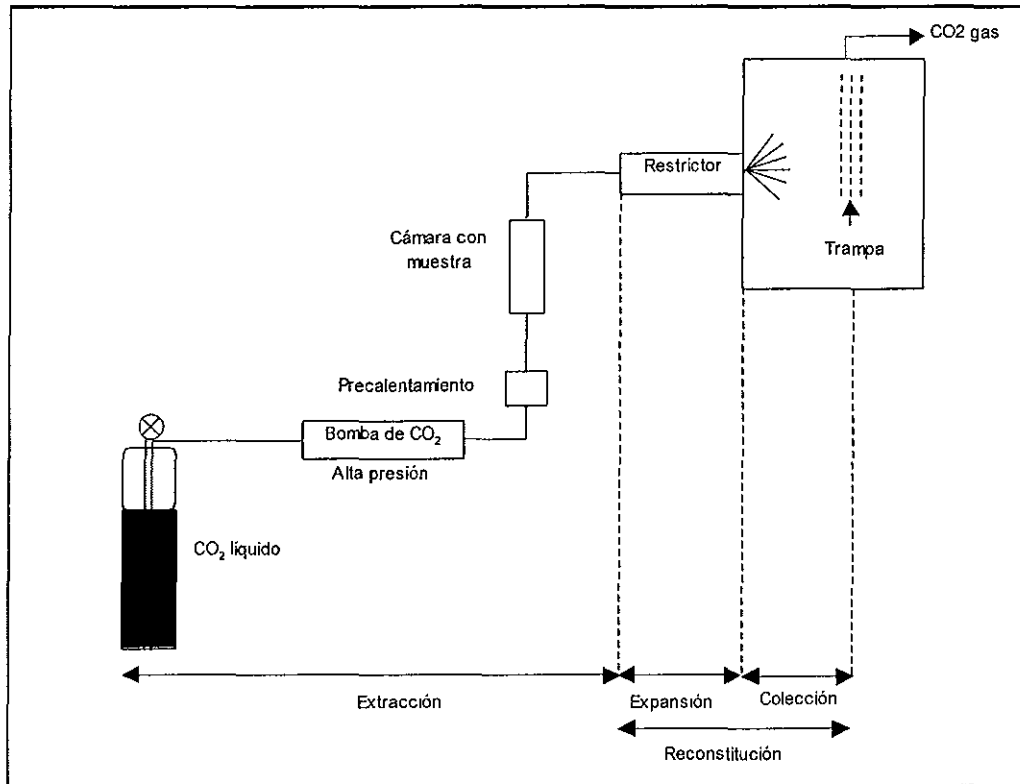


Fig. 7. Diagrama General de un Extractor de Fluidos Supercríticos.

Tal y como se observa a partir de la figura anterior, las etapas generales implicadas en una extracción con fluidos supercríticos pueden resumirse en las siguientes:

◆ Extracción.

El CO₂ líquido es removido del fondo del cilindro y conducido a una bomba para ser comprimido hasta la presión deseada. Se requiere algún tipo de precalentamiento (horno o zona de precalentamiento) para llevar al fluido a la temperatura deseada antes de entrar en la cámara de extracción que contiene la muestra. Por medio de una válvula, se puede controlar la extracción en los modos estático y dinámico. El modo "estático" describe una condición sin flujo en donde se permite a la muestra empaparse con el fluido de extracción mantenido a la densidad, temperatura y composición deseadas; el modo "dinámico" describe una condición en la que el fluido de extracción, mantenido a la densidad, temperatura y composición deseadas, fluye a través de la muestra en forma constante.

◆ Expansión.

En algún punto en la secuencia de extracción, la mezcla del fluido se mueve hacia el restrictor en donde ocurre la expansión. En el modo de extracción dinámico, los procesos de extracción y expansión ocurren en serie. Un lado del restrictor se encuentra a la presión alta de extracción mientras que el otro lado se encuentra generalmente a menor presión de modo que la caída de presión se da a lo largo del restrictor. Tan pronto como se da el choque del cambio de presión, la densidad de la solución cae, los componentes extraídos se separan de la solución, colapsándose unos con otros para formar agregados y revestir aquellas superficies de las secciones del restrictor en donde la densidad es demasiado baja para mantener la solvatación. Este proceso de expansión enfría el restrictor de modo que se requiere un control térmico para compensar el enfriamiento y mantener la expansión ininterrumpida.

◆ Colección.

Algunos de los agregados de los componentes extraídos no alcanzan las superficies del restrictor, sino que son acarreados por corrientes de gas a alta velocidad hasta que golpean una superficie. La superficie en que caen es parte de la región de colección. Durante el movimiento con la corriente de gas, los

agregados de los componentes se colapsarán con ellos mismos o con la superficie de choque, redistribuyendo la energía cinética.

En ese punto, las moléculas pueden volatilizarse y moverse como moléculas simples en la corriente del "disolvente" en estado gaseoso de acuerdo con el comportamiento de equilibrio gas a presión ambiental/líquido/sólido. Mientras más volátil sea un componente en el punto de colección, mayor será su tendencia a vaporizarse y moverse de la zona de colección con el flujo del disolvente expandido. Frecuentemente se emplean parámetros como la temperatura y atracciones químicas para minimizar la evaporación.

Cuando el fluido de extracción es una mezcla de modificador y CO₂, es importante que la temperatura de la zona de restricción supere al punto de ebullición del modificador; si la región de colección se encuentra a menor temperatura, el modificador se condensará bloqueando el flujo. Por el contrario, si la región de colección se mantiene por encima del punto de ebullición del modificador, éste se vaporizará y se moverá con el disolvente expandido.

◆ Reconstitución.

En el caso de los extractores de fluidos supercríticos a nivel analítico, la tarea final es la recuperación de los solutos precipitados de forma que sean compatibles con la técnica analítica a emplearse posteriormente. Esto usualmente significa la disolución de los solutos en una solución líquida y la transferencia de dicha solución a un vial. Dado que los solutos precipitados pueden encontrarse salpicados sobre varias superficies del restrictor y la región de colección, los detalles de la reconstitución serán específicos para las características del equipo empleado (Knipe *et al*, 1993). En los casos más sofisticados, las soluciones ya diluidas pueden pasar directamente a un instrumento de análisis como por ejemplo a un cromatógrafo.

El equipo de extracción supercrítica utilizado en la presente investigación es el Extractor de Fluidos Supercríticos HP 7680. Como se muestra en la figura 8, el extractor está conectado a una computadora a partir de la cual se controlan las variables de extracción.

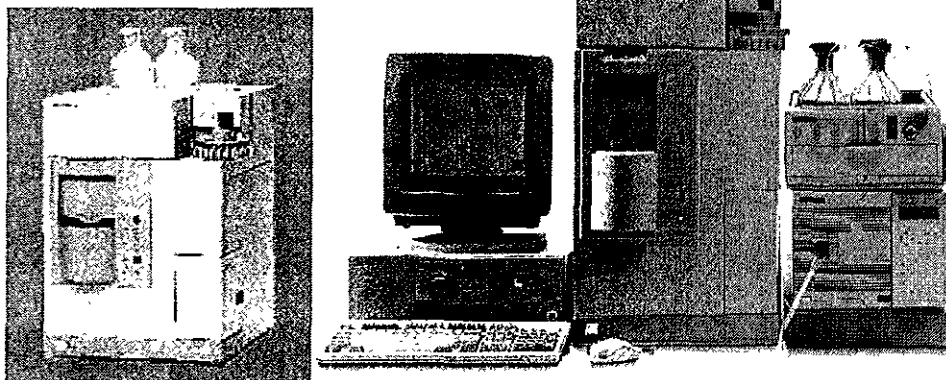


Figura. 8. Fotografías del Extractor de Fluidos Supercríticos HP 7680. A la izquierda fotografía del extractor, a la derecha, fotografía del extractor conectado a una computadora HP 486 con software especialmente diseñado para este equipo, y a la bomba de modificador HP 1050.

En la figura 9 se muestra un diagrama simplificado del extractor HP 7680.

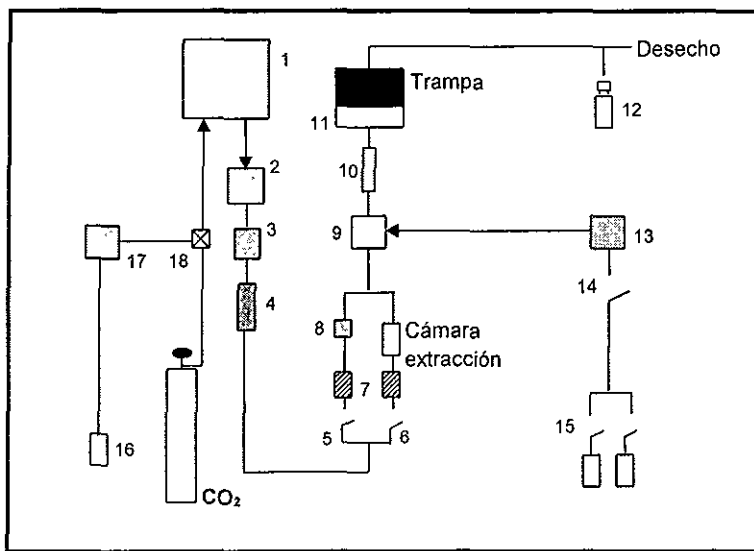


Fig. 9. Diagrama simplificado del Extractor de Fluidos Supercríticos HP 7680 conectado a la bomba de cosolventes HP 1050. 1. Bomba de alta presión; 2. Controlador de pulsos; 3. Transductor de sobrepresión; 4. Filtro pre-válvula; 5. Válvula bypass; 6. Válvula de la cámara; 7. Precalentadores; 8. Transductor de control de presión; 9. Válvula de aislamiento de presión; 10. Filtro pre-restrictor; 11. Restrictor; 12. Charola de viales; 13. Bomba de disolventes para enjuague de trampa; 14. Válvula de bomba de cosolventes; 15. Válvulas de selección de disolvente de enjuague; 16. Cosolvente; 17. Bomba 1050 para cosolventes; 18. Válvula *check*.

Especificaciones del Extractor de Fluidos Supercríticos HP 7680:

- ◆ Bombas y fluidos: bomba recíproca dual (bomba de cromatografía líquida modificada) enfriada criogénicamente optimizada para entregar CO₂ líquido. Rango de operación 77 a 386 bar (1,100 a 5,560 psi). Temperatura de operación 4°C. Rango de flujo de CO₂ líquido: 0.5-4.0 ml/min programable para cada paso de extracción. Exactitud de ±2% para una presión de 340 bar.
- ◆ Cámara de extracción: capacidad de 8 cartuchos de extracción. Modos de extracción estático y dinámico. Temperatura de 25 a 150°C programable para cada paso de extracción. Rango de densidad 1.5 a 0.95 g/ml CO₂ programado automáticamente para cada paso de extracción. Hasta 300 min de tiempo programable por extracción dinámica, (6000 min total por método) y hasta 60 min extracción estática (1200 min total por método). Pasos de extracción por muestra: 20.
- ◆ Cartuchos de extracción: Cartuchos de sello automático a fuerza constante de cerrado. 7 ml de capacidad con sellos *peek*, orientación vertical y tamaño de poro de 2.0 micras en los sellos. Tapones colocables a mano. Presión máxima 540 bar. Detección de fugas por computadora.
- ◆ Sistema de back-Pressure: Un restrictor variable controla la presión del sistema seleccionada para cada paso de extracción independientemente del flujo de CO₂. Rango de temperatura de 5 a 150°C.
- ◆ Trampas para recuperación de analitos: Diol, tenax, C₁₈, ciano y acero inoxidable. Rango de temperatura de operación: -30 a 150°C. Opción de dos disolventes de enjuague.
- ◆ Colección de fracciones: Capacidad del carrusel: 21 viales de 2 ml cada uno. Capacidad de los viales de 0.2 a 1.8 ml. Capacidad del puerto de desecho: 0.2 a 10 mL ajustable para cada fracción.

Los disolventes utilizados para el lavado de la trampa en las extracciones supercríticas fueron los siguientes:

- ◆ Acetonitrilo grado HPLC
- ◆ Hexano grado HPLC

Los modificadores utilizados en las extracciones fueron los siguientes:

- ◆ Metanol grado HPLC
- ◆ Etanol grado HPLC
- ◆ Acetonitrilo grado HPLC

La tabla 14 resume todas las condiciones de las extracciones supercríticas realizadas con CO₂:

Tabla 14. Condiciones de las Extracciones Supercríticas realizadas en la presente investigación.

Condiciones de las extracciones supercríticas realizadas		
Condiciones de extracción	Flujo CO ₂	2.4 ml/min
	Densidad CO ₂	0.25-0.95 g/ml
	Temperatura cámara	40°C
	Tiempo de equilibrio	0-45 min
	Tiempo dinámico de extracción	5 min
	Volumen total de CO ₂	19 ml
	Modificador	<i>Metanol / Etanol / Acetonitrilo</i>
	Concentración de modificador	2.4-5.8% mol
Condiciones de la trampa	Temperatura restrictor	40-82°C
	Temperatura trampa	40-82°C
	Trampa	Acero inoxidable
	Vol. compensación	1.0 ml
Condiciones de lavado	Disolvente	<i>Hexano / Acetonitrilo</i>
	Volumen	1.5 ml
	Flujo disolvente	1.0 ml/min
	Temperatura restrictor	45°C
	Temperatura trampa	45°C

Existen parámetros que se variaron en las diferentes extracciones por lo que se presentan en *itálicas* dentro de la tabla. En cada una de las extracciones supercríticas reportadas en los resultados, se especifican las condiciones correspondientes.

Todas las demás condiciones no se especifican ya que son constantes para todos los experimentos, los cuales fueron realizados, al menos, por duplicado.

Para las extracciones con CO₂ supercrítico, se decidió utilizar 10 mg de la fracción más fina de la harina homogeneizada, esto es, la fracción de harina compuesta por partículas que pasan por la malla #40; es decir, partículas con un diámetro menor a 0.425 mm. Esta decisión se tomó con el objetivo de aumentar el área de contacto entre la muestra y el fluido supercrítico.

En la presente investigación, la utilización del programa EQFASES 2.0 resultó de vital importancia para la obtención de los diagramas de fases y el cálculo de puntos críticos de mezclas de dióxido de carbono y modificadores. El programa EQFASES 2.0 es un programa para la predicción rigurosa del equilibrio de fases mediante la utilización de ecuaciones de estado cúbicas en el volumen; desarrollado en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM, en noviembre de 1998 por: Fernando Barragán Aroche, Alejandro Guzmán Reyna y Enrique Bazúa Rueda.

6.4 EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

Los materiales y disolventes utilizados para la realización de las extracciones con disolventes, fueron los siguientes:

- ◆ Equipo de extracción Soxhlet.
- ◆ Mantilla para calentamiento con termostato y agitación magnética
- ◆ Etanol 95% grado reactivo.
- ◆ Hexano grado reactivo.
- ◆ Acetonitrilo grado reactivo.

Se realizaron extracciones en un sistema Soxhlet a partir de la harina de chile con temperatura controlada de 65-75°C; el disolvente de extracción en todos los casos fue etanol debido a que tal y como se reporta en la literatura, la capsaicina es libremente soluble en él, mientras que los colorantes, si bien se encuentran esterificados, también son solubles en cierto grado. La temperatura de la extracción se fijó por debajo del punto de ebullición del etanol (79°C) ya que al

utilizar un sistema al vacío no es necesario trabajar en o por encima del punto de ebullición del disolvente. El tiempo de cada extracción fue variable y se especifica junto con el reporte de los resultados que se obtuvieron en cada experimento; en todos los casos se llevó a cabo la extracción con agitación.

Con la finalidad de tener resultados generados a partir de extracciones con disolventes comparables a los obtenidos a partir de las extracciones supercríticas, se realizaron también extracciones en batch con 1.5 ml hexano y con 1.5 ml acetonitrilo a partir de 10 mg de la harina de chile. Después de poner en contacto la muestra con el disolvente se realizó una agitación durante 15 min a temperatura ambiente y después de la decantación, se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro.

6.5 ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.

Para el análisis de los extractos obtenidos con CO₂ o con disolventes, se recurrió a la espectrofotometría UV-VIS; el equipo y los disolventes utilizados para ello fueron los siguientes:

- ◆ Espectrofotómetro marca PERKIN ELMER, modelo LAMBDA 2.
- ◆ Acetonitrilo grado HPLC.
- ◆ Hexano grado HPLC.

Las longitudes de onda a las que se analizaron los compuestos de interés fueron 280 nm para los capsaicinoides y 447 y 470 nm para los colorantes. Dichas longitudes de onda se eligieron de acuerdo a los resultados experimentales preliminares.

Todas las mediciones de absorbancia se realizaron en un volumen de 1.5 ml de disolvente (acetonitrilo o hexano) con los solutos disueltos. El blanco utilizado en cada una de las mediciones fue el disolvente puro en el cual se encontraban disueltos los compuestos de interés.

6.6 ANÁLISIS DE LOS COLORANTES EN LOS EXTRACTOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

El análisis por cromatografía en placa fina se llevó a cabo con la finalidad de obtener resultados cualitativos que reflejaran ciertas características generales de los colorantes obtenidos. Las cromatografías en capa fina se realizaron con placas de sílica gel activadas (40°C, 2 horas). Después de la aplicación de la muestra (oleorresina) en la placa, ésta se introdujo en una cámara saturada con el sistema eluyente a utilizarse hasta lograr una separación adecuada. Una vez conseguido esto se sacó la placa de la cámara, se marcaron las manchas de interés y se determinó el RF de las mismas.

Con el objetivo de tener un estándar con el cual se pudieran comparar las manchas de grasa de la materia prima, se realizaron cromatografías en capa fina en las cuales se colocaron muestras de aceite de olivo; en estos casos el sistema de revelado para las manchas no coloridas se realizó con iodo.

Para la realización de las capas finas, se utilizaron los siguientes materiales y disolventes:

- ◆ Placas de sílica gel activadas (40°C, 2 h)
- ◆ Fases móviles: hexano-acetato de etilo 4:1

hexano-éter etílico-acetato de etilo 90:9:1

En la sección de resultados, se especifica la fase móvil utilizada en cada una de las capas finas reportadas. La naturaleza de las fases móviles seleccionadas, permite la separación de los colorantes según su grado de esterificación y las características de los ácidos grasos con los cuales se encuentran esterificados. Todos los disolventes utilizados en este procedimiento fueron grado reactivo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA

Se desconoce la especie particular de chile a partir del cual se obtuvo la harina utilizada como materia prima de partida en la presente investigación; probablemente sea una mezcla de varias especies rojas en su etapa de madurez como chile ancho, cascabel y guajillo, entre otros.

En la tabla 15, se presenta el análisis proximal obtenido para la harina:

Tabla 15. Composición (g/100g) de la harina de chile utilizada como materia prima y comparación de la misma con algunos valores reportados en la literatura.

Componente	Muestra	Chile guajillo	Chile cascabel
Humedad (90°C)	4.43 ± 0.03	16.5	9.1
Cenizas totales	36.31 ± 0.85	6.3 ^{&}	6.3 ^{&}
Proteína (N x 6.25)	14.07 ± 0.20	11.6 [*]	12.9 [*]
Grasa (Goldfish)	4.99 ± 0.20	8.6 [*]	6.4 [*]
Fibra	11.79 ± 0.47	9.0 [*]	31.1 [*]
Carbohidratos (diferencia)	28.41	56.7 [*]	63.6 [*]

n= 3

^{*}(Chávez *et al*, 1992)

[&](Govindarajan I, 1985).

Resulta difícil la comparación de los valores obtenidos a partir del análisis proximal de cada uno de los componentes de la materia prima utilizada con aquéllos reportados en la literatura para diferentes tipos de frutos de *Capsicum annuum* existentes en nuestro país, debido a que la materia prima puede ser, como ya se ha dicho antes, una mezcla de varias especies. Por otro lado, los valores de los componentes reportados en la literatura varían de forma importante entre las diferentes especies. Sin embargo es notoria una menor cantidad de humedad en la muestra en comparación con los valores reportados en la literatura. Las diferencias en contenido de humedad (4.43% de la muestra bajo estudio y 9.1-

16.5% de los valores reportados en la literatura) dependen de las condiciones en las que el producto haya sido almacenado antes del análisis. Incluso es probable que la disminución de humedad sea el resultado de un proceso cuya finalidad haya sido la de aumentar el tiempo de conservación de la harina ya que se encuentra expuesta a contaminación por bacterias y hongos por lo que se recomienda almacenar a una humedad de menos del 10% (Govindarajan I, 1985).

En la tabla 16 se muestra la composición de la muestra en base seca, así como los valores de composición obtenidos de la literatura de dos especies diferentes de chile también en base seca; esto, con el objetivo de comparar los valores a partir de una base homogénea de humedad.

Tabla 16. Composición (g/100g) en base seca de la harina de chile utilizada como materia prima y comparación de la misma con algunos valores reportados en la literatura en base seca.

Componente	Muestra	Chile guajillo	Chile cascabel
Cenizas totales	37.99	6.83	5.23
Proteína (Nx6.25)	14.72	12.58	10.72
Grasa (Goldfish)	5.22	9.32	5.32
Fibra	12.33	9.76	25.85
Carbohidratos (diferencia)	29.72	61.49	52.86

Se observa que el contenido de cenizas de la muestra es excesivamente alto en comparación con los valores reportados en la literatura. El alto valor en cenizas podría atribuirse a un cierto contenido de tierra mezclada con la harina. El valor de carbohidratos resulta bastante menor que el reportado en la literatura, pero en vista que el determinado aquí es por diferencia y dado el alto contenido de cenizas, el valor de la concentración de los carbohidratos disminuye considerablemente. El porcentaje de grasa determinado para la muestra, es comparable con los valores reportados en la literatura, sin embargo, se debe recordar que el alto contenido de cenizas calculado, se refleja en una disminución de los valores de contenido de los demás constituyentes debido a que están expresados en porcentaje. Cabe decir que el contenido de grasa de una muestra, depende de la cantidad de semillas en la misma, debido a que, como ya se

mencionó anteriormente, la mayor parte de las grasas de los frutos *Capsicum* se encuentra en las semillas. Por todo lo anteriormente referido, resulta difícil la comparación del contenido de grasa de la muestra con los valores de la literatura. Por otro lado, el contenido de proteína de la muestra, es comparable con los valores reportados en la literatura, aún cuando el alto porcentaje de cenizas genera una disminución del valor de porcentaje de proteínas en la muestra. Se podría pensar que la harina contiene residuos de insectos, los cuales aumentan el contenido de nitrógeno en la muestra, así como el contenido de cenizas.

7.2 SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS

Inicialmente, se realizó una extracción Soxhlet a partir de 25 g de la porción de grosor medio de la harina (partículas que pasan por la malla #25, esto es, partículas con un diámetro menor a 0.71 mm) con 200 ml de etanol al 95%, durante 5 horas. Con la oleoresina obtenida se hicieron diluciones con etanol con el objeto de realizar barridos en el espectrofotómetro y elegir las longitudes de onda a las que se analizarían los compuestos de interés. Dado que la longitud de onda a la que absorbe un compuesto varía, por un lado, en función del disolvente en el que está disuelto y, por el otro, en relación con la muestra y las características del equipo utilizado, es importante obtener experimentalmente las longitudes de onda adecuadas, tomando como referencia las longitudes de onda reportadas en la literatura para un compuesto determinado, pero sin fiarse totalmente de ellas. Con base en lo anterior, se decidió analizar los capsaicinoides a una longitud de onda de 280 nm y los colorantes a 447 y 470 nm.

La figura 10 corresponde a un barrido espectral de oleoresina de la harina utilizada como materia prima en la presente investigación. Dicha figura muestra claramente las longitudes de onda máximas de absorción de los compuestos de interés; 280nm en el caso de los capsaicinoides y 447 y 470 nm en el caso de los colorantes.

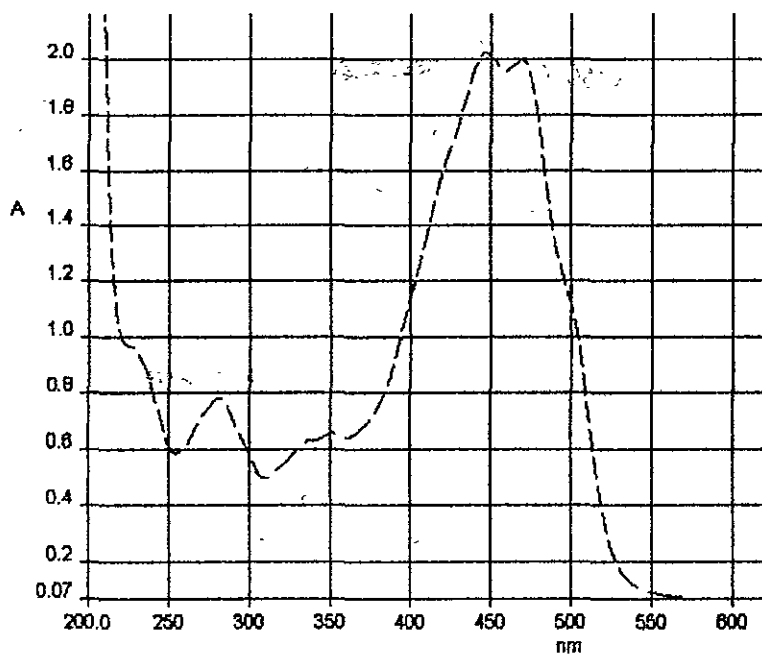


Fig. 10. Barrido espectral de oleoresina de la harina de chile utilizada como materia prima.

Cabe destacar que el hecho de que los capsaicinoides tengan una longitud de onda máxima de absorción a 280 nm, tal y como se reporta en la literatura, no implica, en el caso de la presente investigación, que el valor de absorbancia obtenido a 280 nm refleje únicamente la concentración de capsaicinoides extraídos de la muestra debido a que esta longitud de onda es propia de grupos aromáticos y es posible que se extraigan algunos otros compuestos que absorban a la misma longitud de onda o muy cercanos a ella; un ejemplo de ellos es la vitamina E. Por otro lado, la concentración promedio de vitamina E en los frutos *Capsicum* es de 0.003 - 0.01 g/100g (Govindarajan I, 1985), mientras que la concentración promedio de los capsaicinoides en los frutos de origen mexicano varía de 0.048 a 0.416 g/100g entre las diferentes especies de chiles (Yuste *et al.* 1979); así, la concentración de vitamina E es mucho menor que la de capsaicinoides y podemos considerar que no representa una parte importante de los valores de absorbancia que se leen a 280 nm. Otros compuestos que podrían absorber la luz en la región UV, a una longitud de onda cercana a 280 nm son los triglicéridos que contienen dobles ligaduras conjugadas; sin embargo, a partir de un barrido espectrofotométrico de triglicéridos de aceite de olivo, se determinó que absorben

a una longitud de onda del orden de 200 nm, y no influyen, por lo tanto, en la cuantificación de los capsaicinoides. Por último, si bien es cierto que algunas reacciones de oxidación de carotenoides producen ionona, la cual absorbe luz a una longitud de onda cercana a 280 nm, no la consideramos presente de forma importante en los extractos analizados, ya que a lo largo de esta investigación se realizó un monitoreo de la pérdida del color de los pigmentos por oxidación, y no se observó una disminución considerable del mismo, por lo que se puede afirmar que la harina de chile no contiene una cantidad importante de iononas.

Por todo lo anteriormente dicho, se consideró que el estudio de los capsaicinoides por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 280 nm representa una medición válida y que refleja la concentración de los capsaicinoides en los extractos.

En lo que concierne a los colorantes, se sabe que las longitudes de onda de máxima absorción de la capsantina son 518 y 482 nm, mientras que las de la capsorubina son 422 y 481 nm (Govindarajan III, 1986). Sin embargo, no se encontró en la literatura el valor óptimo de longitud de onda para la cuantificación de los colorantes por espectrofotometría VIS, tomando en cuenta que la cuantificación en este caso no corresponde a cada uno de los colorantes en lo individual. Debido a ello, se decidió monitorear el valor de absorbancia de los pigmentos a las dos longitudes de onda obtenidas experimentalmente, con la finalidad de detectar posibles diferencias. Tal y como se podrá apreciar posteriormente, ambas longitudes de onda son representativas del contenido de colorantes en los extractos.

7.3 ANÁLISIS DE COLORANTES POR CROMATOLOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).

Con la misma oleoresina antes mencionada, se realizaron varias cromatografías de capa fina, utilizando placas de sílica gel activada (40°C, 2 h) y con un sistema eluyente de hexano-acetato de etilo (4:1). Las manchas más intensas se registraron prácticamente al frente del disolvente y corresponden a los

colorantes menos polares. Es importante hacer notar que la capsantina y la capsorubina en el chile se encuentran generalmente mono o diesterificados con ácidos grasos de cadena larga y que los valores de Rf de los colorantes esterificados y los no esterificados son diferentes como resultado de su carácter de mayor y menor polaridad respectivamente. Con la finalidad de comprobar que, efectivamente, los colorantes presentes en la muestra se encuentran esterificados, se realizó una saponificación (A.O.A.C., 1990) a partir de 4g de la fracción de grosor medio de la harina. A partir del extracto saponificado se obtuvieron placas de cromatografía en placa fina, cuyas manchas de color más intenso se observaron a valores de Rf del orden de 0.1 a 0.24 y se atenuaron las manchas observadas al frente del disolvente, detectadas en el extracto no saponificado.

La figura 11 representa una de las placas de cromatografía en capa fina anteriormente descritas, así como los valores de Rf de las manchas correspondientes a los colorantes de los extractos saponificado y no saponificado. El hecho de que las manchas obtenidas al frente del disolvente no hayan desaparecido completamente después de la saponificación, se debe a la presencia de colorantes no polares diferentes a las xantofilas diesterificadas como el β -caroteno, el cual se encuentra presente en el fruto maduro (Mínguez-Mosquera y Hornero Méndez, 1994). Los resultados obtenidos a partir de estas placas finas son indicio claro de que las xantofilas en la harina de chile usada, se encuentran efectivamente esterificadas ya que dicha esterificación les confiere un carácter más no polar y, por lo tanto, mayores valores de Rf en el sistema de elución. Al saponificar los extractos, las xantofilas pierden los ácidos grasos y, por lo tanto, adquieren un carácter mucho más polar, reflejándose en valores de Rf más bajos.

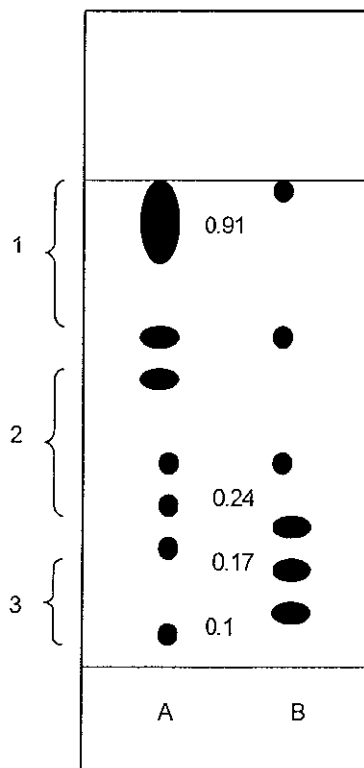


Fig 11. Cromatografía en capa fina a partir de oleorresina de chile. Fase móvil: hexano-acetato de etilo (4 1) A: extracto no saponificado; B: extracto saponificado. 1: xantofilas diesterificadas, β -caroteno; 2: xantofilas monoesterificadas; 3: xantofilas no esterificadas.

7.4 EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES LÍQUIDOS

Con la finalidad de realizar extracciones con disolventes líquidos que permitieran la comparación de las mismas con las extracciones supercríticas, y de observar la diferencia en la selectividad de la extracción entre diferentes disolventes, se llevó a cabo un experimento en el cual se puso en contacto 10 mg de la harina de chile con 1.5 ml de hexano o bien 1.5 ml de acetonitrilo. Se midió la absorbancia generada por los solutos extraídos por los disolventes después de aforar el extracto a 1.5 ml en caso de que se registrara una disminución del volumen por evaporación del disolvente. Para la realización de este experimento se determinó previamente el tiempo de equilibrio en cada uno de los casos, poniendo en contacto la muestra con el disolvente a diferentes tiempos hasta que no se registrara un aumento en los valores de absorbancia. Tanto para

acetónitrilo, como para de hexano, 15 min de contacto con agitación continua resultaban suficientes para alcanzar el equilibrio.

Los resultados de estas extracciones pueden advertirse en la tabla 17 y en la figura 12.

Tabla 17. Absorbancia promedio de extractos de harina de chile con disolventes líquidos.

Solvente	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
Acetonitrilo	0.7161 ± 0.0270	0.5190 ± 0.0270	0.4866 ± 0.0339
Hexano	0.5599 ± 0.0153	1.2157 ± 0.0478	1.1863 ± 0.0465

Condiciones de extracción: 10 mg de harina de chile con 1.5ml de disolvente, 15 min. de agitación constante. D.S.: Desviación estándar. n=10.

En esta tabla, al igual que en todas las demás contenidas en el presente trabajo, se especifica el número de repeticiones realizadas en cada uno de los experimentos (n).

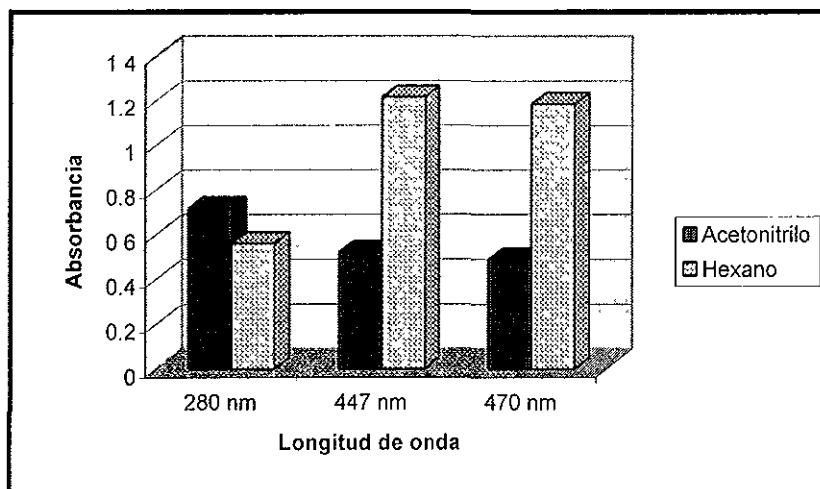


Fig 12. Resultados de absorbancia de extractos de harina de chile obtenidos con acetónitrilo y hexano. Condiciones de extracción: 10 mg de harina de chile con 1 5 ml de solvente, 15 min. de agitación constante

Como se observa, el acetonitrilo y el hexano presentan diferente afinidad hacia los compuestos de interés. El acetonitrilo presenta una mayor afinidad hacia los capsaicinoides mientras que el hexano presenta una afinidad notoria hacia los colorantes. Es lógico que los colorantes se extraigan mejor con el hexano dado que, en su mayoría, se encuentran esterificados con ácidos grasos de cadena larga y ello hace que presenten un carácter más hidrofóbico. La selectividad del acetonitrilo hacia los capsaicinoides puede ser explicada con base en las fuerzas intermoleculares que intervienen entre solutos y disolvente, lo cual se analizará más adelante.

Esta selectividad de los disolventes fue también evidente en el experimento que se describe a continuación en el cual se llevó a cabo una extracción de 100 mg de la harina con 15 ml de acetonitrilo (15 minutos de agitación). La solución obtenida fue filtrada y de ella se separaron 1.5 ml. El resto de la solución se puso en contacto con 13.5 ml de hexano y se llevó a cabo una extracción líquido-líquido; quedando, al final, separadas las fases de acetonitrilo y hexano. A las tres fracciones se les eliminó el disolvente prácticamente hasta la sequedad y, con ellas, se realizó una capa fina en la cual también se colocó un estándar de aceite de olivo (50 μ l de aceite en 1 ml de hexano) con la finalidad de analizar la afinidad de los disolventes estudiados hacia compuestos poco polares como son los contenidos en los aceites. La fase móvil utilizada fue hexano:eter etílico: acetato de etilo (90:9:1). Para revelar las manchas correspondientes al aceite y las grasas de la muestra se utilizó yodo. La capa fina obtenida se muestra en la figura 13.

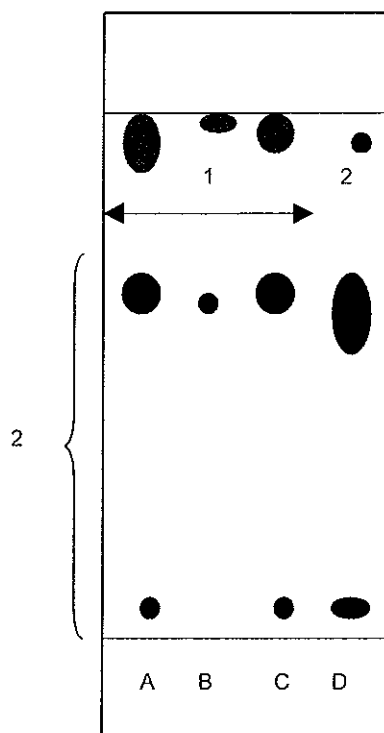


Fig 13. Cromatografía en capa fina a partir de extracciones líquido-líquido con acetonitrilo y hexano de harina de chile. A: Fracción de acetonitrilo antes de la extracción líquido-líquido; B: Fracción de acetonitrilo después de la extracción líquido-líquido; C: Fracción de hexano después de la extracción líquido-líquido; D: Estándar de aceite de olivo. 1: Pigmentos rojos; 2: Manchas correspondientes al aceite y las grasas de la muestra reveladas con yodo.

Las manchas observadas al frente del disolvente en las fracciones de acetonitrilo y hexano tenían un intenso color rojo y corresponden a los colorantes diesterificados de la muestra. Después de la extracción líquido-líquido fue evidente que gran parte de dichos colorantes pasó a la fase de hexano dado que la mancha en la fase de acetonitrilo se atenuó notoriamente después de dicha extracción. Lo mismo se observó con la mancha correspondiente a los aceites contenidos en la muestra, cuyos valores de RF resultaron similares a los del estándar de aceite de olivo. Saltan a la vista las diferencias en selectividad entre disolventes; el acetonitrilo, por su naturaleza más polar, tiene afinidad hacia moléculas polares y no es selectivo para la disolución de los colorantes de la muestra, en su mayoría esterificados con ácidos grasos de cadena larga. El hexano, por otro lado, los

disuelve mucho mejor al igual que a las grasas que pudieran encontrarse en la muestra.

7.5 EXTRACCIÓN CON CO₂ SUPERCRÍTICO

7.5.1 Condiciones iniciales de extracción.

Todas las extracciones supercríticas llevadas a cabo en esta investigación se realizaron al menos por duplicado a partir de 10 mg de harina de chile. Aunque antes de cada una de las extracciones se realizó una homogeneización de la harina, resulta difícil asegurar que, dado el pequeño tamaño de las muestras cargadas en el cartucho, cada una sea igual a las demás, de modo que una carga puede contener una mayor proporción del tejido que contiene los analitos de interés y otra puede contener mucho menos. De ahí que sea normal advertir una cierta variación de los resultados obtenidos en extracciones llevadas a cabo bajo las mismas condiciones, además de la variación propia del experimento de extracción.

Las primeras extracciones supercríticas de la harina de chile se realizaron con base en el método de calibración del equipo de extracción supercrítica HP, el cual se realiza a partir de paprika, un fruto también del género *Capsicum*. Este método consiste en tres etapas de extracción a partir de la misma muestra (10 mg de harina de chile) con densidad variable en cada una de las etapas: 0.25, 0.65 y 0.95 g/ml sin la utilización de modificador tal y como se resume en la tabla que se presenta en la tabla 18.

En las dos primeras etapas, se realizó un lavado de la trampa con 1.5 ml de hexano, y en la tercera se realizaron dos lavados representados en la tabla por los viales #3 y 4.

El método se repitió un total de cinco veces con la finalidad de obtener una tendencia clara en los resultados a diferentes densidades.

Tabla 18. Condiciones de calibración del equipo a partir del método de la paprika

Condición	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	
Condiciones de extracción	Fluido de extracción	CO ₂	CO ₂	CO ₂
	Flujo	1.0 ml/min	2.4 ml/min	2.9 ml/min
	Densidad CO ₂	0.25 g/ml	0.65 g/ml	0.95 g/ml
	T cámara	40°C	40°C	40°C
	Tiempo equilibrio	0.50 min	0.50 min	0.50 min
	Tiempo extracción	3.70 min	3.80 min	5.00 min
Condiciones de la trampa	T restrictor	45°C	45°C	45°C
	T trampa	40°C	40°C	40°C
	Trampa	Acero inoxidable	Acero inoxidable	Acero inoxidable
	Vol. compensación	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Condiciones de lavado	Disolvente	Hexano	Hexano	Hexano
	Volumen	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
	Flujo	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min
	T restrictor	45°C	45°C	45°C
	T trampa	35°C	40°C	40°C
	# vial	1	2	3 y 4

En un principio, los resultados obtenidos a 280 nm fueron muy poco reproducibles ya que se registraron valores de desviaciones estándar excesivamente grandes (0.2-0.3) en comparación con los valores de absorbancia promedio (0.5-0.7) y en algunas extracciones se registró una señal indicativa de una concentración muy alta, únicamente analizable con diluciones de 1:100. Estos resultados se atribuyeron a la presencia de suciedad en la trampa de acero inoxidable de donde se recuperan los analitos extraídos, por lo que se decidió probar diferentes sistemas de lavado de la trampa con el propósito de encontrar aquel que generara resultados más reproducibles a 280 nm.

Inicialmente se realizó un experimento en el que se verificó que el hexano, utilizado hasta este momento para lavar la trampa, realmente lograba agotar los compuestos que absorbían a 280 nm en la etapa de lavado. Para ello, se realizaron cinco extracciones a una densidad de 0.5 g/ml y se monitoreó, en cada una de ellas, el agotamiento de los analitos a lo largo de un total de ocho lavados de la trampa con 1.5 ml de hexano cada uno. Los resultados de dichas extracciones se muestran en la tabla 19 y se esquematizan en la figura 14.

Tabla 19. Valores promedio de absorbancia del monitoreo del lavado de la trampa con hexano.

Lavado	A 280nm	A 447nm	A 470nm
1	0.2290 ± 0.0426	6.06x10 ⁻³ ± 3.54x10 ⁻³	3.28x10 ⁻³ ± 2.88x10 ⁻³
2	0.1035 ± 0.0566	2.04x10 ⁻³ ± 2.04x10 ⁻³	1.9x10 ⁻³ ± 1.69x10 ⁻³
3	0.0863 ± 0.0142	0.0	0.0
4	0.1225 ± 9.1x10 ⁻³	0.0	0.0
5	0.0693 ± 0.0620	0.0	0.0
6	0.1001 ± 0.0330	0.0	0.0
7	0.0883 ± 0.0433	0.0	0.0
8	0.1217 ± 0.0509	0.0	0.0

Condiciones de extracción: 10 mg muestra, $\delta=0.5\text{g/ml}$ (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, T trampa= 40°C, T restrictor= 40°C. Disolvente de lavado: hexano. n=5.

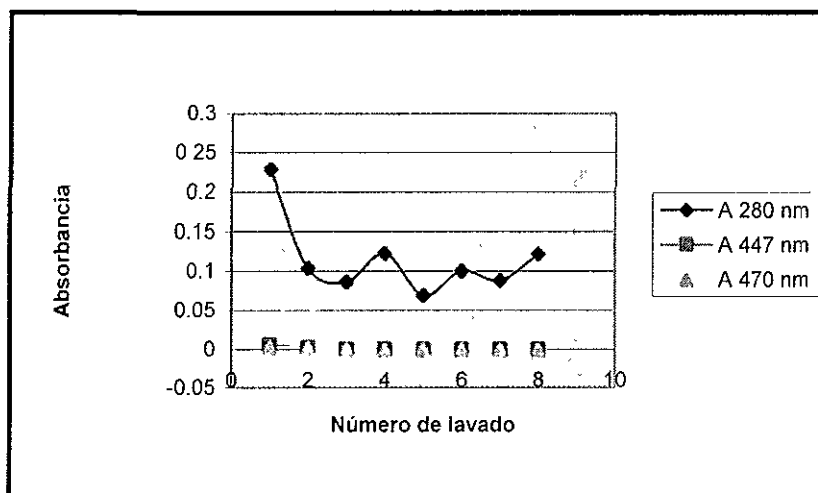


Fig 14. Resultados del monitoreo del lavado de la trampa con hexano.

Condiciones de las extracciones: 10 mg muestra, $\delta=0.5\text{g/ml}$ (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, T trampa= 40°C, T restrictor= 40°C. Disolvente de lavado: hexano.

Tal y como se puede observar, los colorantes se eliminan totalmente de la trampa en el segundo lavado con hexano; los compuestos que absorben a 280 nm, sin embargo, no logran eliminarse totalmente con este disolvente lo cual ocasiona una acumulación de estos analitos en la trampa y una consecuente deficiencia en la reproducibilidad de los resultados en las extracciones. Con base en ello, se probaron otros sistemas de lavado incluyendo etanol, acetonitrilo y una

mezcla de acetonitrilo-agua. Finalmente, se decidió utilizar el acetonitrilo como sistema de lavado ya que por ese medio se lograba solubilizar todos los compuestos que absorben a 280 nm depositados en la trampa desde el primer lavado. Asimismo, al lavar la trampa con hexano después del lavado con acetonitrilo, no se registró una importante recuperación de colorantes a pesar de la diferencia en la selectividad, evidente en las extracciones de la harina con ambos solventes. Este último hecho podría atribuirse a que los colorantes se encontraban en cantidades pequeñas en la trampa que, sin embargo, tienden a acumularse después de varias corridas de extracción si no son removidos en forma constante.

Una vez que se encontró el sistema óptimo de lavado, se obtuvieron resultados mucho más reproducibles en los experimentos posteriores. En la tabla 20, se reportan los resultados de absorbancia promedio obtenidos a las tres diferentes longitudes de onda de análisis en función de una densidad variable con base en el método de calibración con paprika y un solo lavado con acetonitrilo.

Tabla 20. Valores promedio de absorbancia a diferentes densidades al emplear acetonitrilo para el lavado de la trampa.

Densidad	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0.25	0.0941 ± 6.13x10 ⁻³	0.0045 ± 1.41x10 ⁻³	0.0043 ± 9.07x10 ⁻⁴
0.65	0.2453 ± 8.21x10 ⁻³	0.1280 ± 0.0189	0.1030 ± 0.0153
0.95 lav 1	0.6923 ± 0.0212	1.1729 ± 0.0765	1.1663 ± 0.0745
0.95 lav 2	0.0670 ± 7.92x10 ⁻³	0.0506 ± 3.78x10 ⁻³	0.0531 ± 3.83x10 ⁻³

Condiciones de extracción: densidad CO₂: 0.25 g/ml (77 bar, 40°C), 0.65 g/ml (104 bar, 40°C) y 0.95 g/ml (383 bar, 40°C); tiempo de equilibrio 0.5 min; temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C. n=3

En la figura 15, se observa claramente la variación de la eficiencia de la extracción supercrítica de los analitos estudiados en función de la densidad del dióxido de carbono supercrítico. El valor de absorbancia a 0.95 g/ml de la gráfica, corresponde al que se registró del primer lavado.

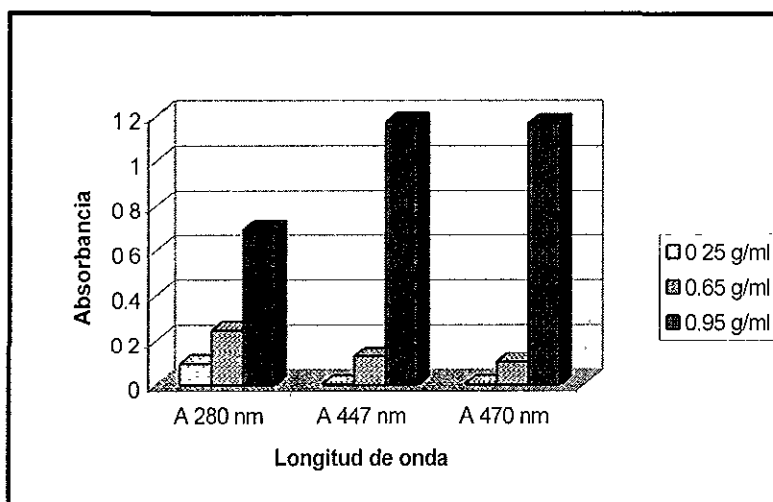


Fig 15 Influencia de la densidad en la extracción supercrítica de los analitos de interés al emplear acetónitrilo para el lavado de la trampa.

Condiciones de extracción: densidad CO_2 : 0.25 g/ml (77 bar, 40°C), 0.65 g/ml (104 bar, 40°C) y 0.95 g/ml (383 bar, 40°C); tiempo de equilibrio 0.5 min; temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C.

Se puede observar que la extracción de los colorantes, monitoreados a 447 y 470 nm, es prácticamente nula a densidades muy bajas, y va aumentando conforme aumenta la densidad hasta 0.95 g/ml.

En cuanto a la extracción de compuestos que absorben a 280 nm, la tendencia fue similar, ya que la cantidad extraída aumentó en función del incremento de densidad. Por otro lado, resulta de gran interés destacar el hecho de que a densidades bajas, también se registra la extracción de compuestos que absorben a 280. Esto es, para las densidades de CO_2 evaluadas (en un rango de 0.25 a 0.95 g/ml), tanto los colorantes como los capsaicinoides fueron extraídos en forma importante con densidades del orden de 0.95 g/ml (383 bar, 40°C). Por su parte, los compuestos que absorben a 280 nm también fueron extraídos (en una menor proporción), a densidades menores a 0.65 g/ml (104 bar, 40°C), densidades a las cuales se observó una mucho menor extracción de colorantes. Todos estos resultados abrieron la posibilidad de hacer selectiva la extracción y la investigación se enfocó al análisis de la extracción supercrítica de capsaicinoides a densidades bajas, con la finalidad de aumentar los rendimientos de extracción

de dichos compuestos sin aumentar al mismo tiempo aquéllos correspondientes a los colorantes.

La figura 16 compara los resultados obtenidos de las extracciones supercríticas realizadas con aquéllos anteriormente reportados de las extracciones con hexano y acetonitrilo a partir de la harina de chile.

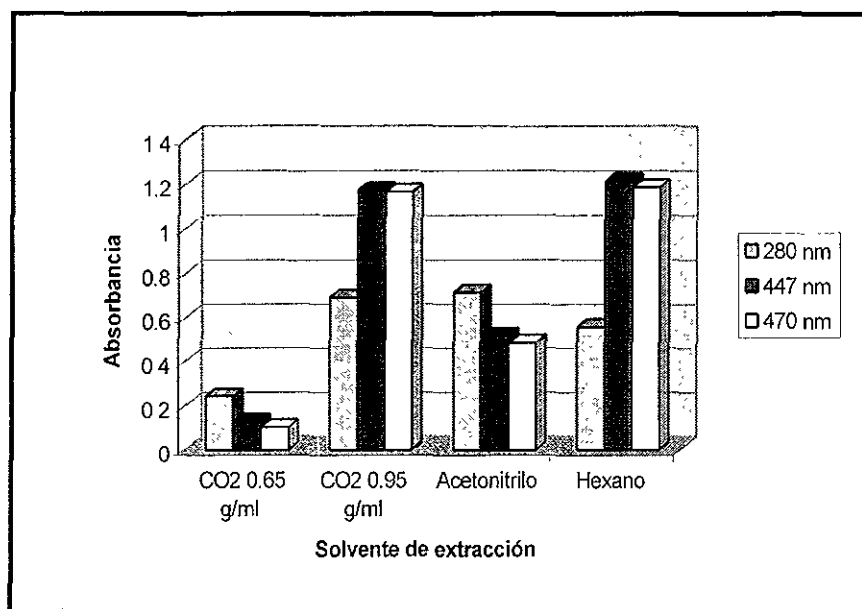


Fig 16 Comparación de los resultados de las extracciones con dióxido de carbono supercrítico a 0.65 g/ml (104 bar, 40°C) y 0.95 g/ml (383 bar, 40°C) y las extracciones con disolventes orgánicos.

Puede observarse que los valores de absorbancia de la extracción con dióxido de carbono supercrítico a 0.95 g/ml de los compuestos que absorben a 280 nm son muy similares a los obtenidos a partir de la extracción con acetonitrilo. Asimismo, la extracción de los colorantes con dióxido de carbono a esta densidad mostró resultados similares a los obtenidos con hexano. De ello, podemos afirmar que la extracción supercrítica de los analitos de interés a densidades altas presenta una eficiencia equivalente a la obtenida con disolventes orgánicos. Por otro lado, la tendencia en la proporción capsaicinoides:colorantes en los extractos obtenidos con CO₂SC a densidad de 0.65 g/ml, es similar a aquélla observada para acetonitrilo, mientras que esta proporción es similar en los extractos obtenidos con CO₂SC a densidad de 0.95 g/ml y hexano.

Por lo anterior, resulta deseable incrementar la eficiencia de extracción de capsaicinoides a densidades bajas, conservando una proporción capsaicinoides:colorantes similar a la que se observa CO₂SC a densidad de 0.65 g/ml. Con ello, se buscaría obtener extractos similares a los obtenidos con acetonitrilo, esto es, con la selectividad mostrada hacia la extracción de los capsaicinoides.

7.5.2 Extracción de capsaicinoides a densidades bajas.

Con el objetivo de seleccionar la densidad apropiada para extraer los capsaicinoides, se llevaron a cabo extracciones con diferentes densidades de dióxido de carbono supercrítico. Los resultados obtenidos de dichos experimentos, se presentan en la tabla 21 y en la figura 17.

Tabla 21. Valores promedio de absorbancia de los extractos generados a partir de extracciones con CO₂SC a diferentes densidades.

Densidad	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0.25 g/ml	0.0941 ± 6.13x10 ⁻³	0.0045 ± 1.41x10 ⁻³	0.0043 ± 9.07x10 ⁻⁴
0.40 g/ml	0.1088 ± 4.80x10 ⁻³	0.0072 ± 8.48x10 ⁻⁴	0.0055 ± 5.65x10 ⁻⁴
0.50 g/ml	0.1312 ± 2.40x10 ⁻³	0.0091 ± 3.53x10 ⁻⁴	0.0075 ± 3.58x10 ⁻⁴
0.65 g/ml	0.2453 ± 8.21x10 ⁻³	0.1280 ± 0.0189	0.1030 ± 0.0153

Condiciones de extracción: densidad CO₂SC: 0.25 g/ml (77 bar, 40°C), 40 g/ml (87 bar, 40°C), 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), 0.65 g/ml (104 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

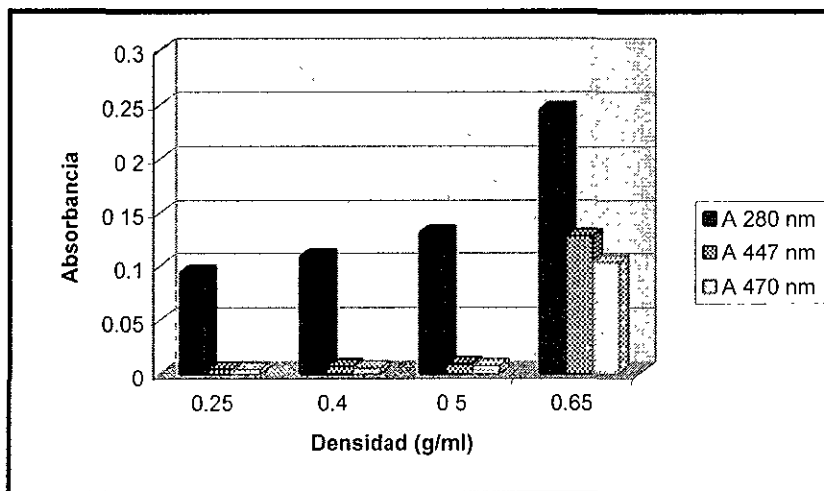


Fig 17. Resultados de la variación de densidades en la extracción supercrítica de colorantes y capsaicinoides de *Capsicum annum*. Condiciones de extracción: densidad CO₂SC: 0.25 g/ml (77 bar, 40°C), 0.4 g/ml (87 bar, 40°C), 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), 0.65 g/ml (104 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.

A partir de estos resultados, se decidió trabajar a una densidad constante de 0.5 g/ml con el objetivo de incrementar los rendimientos de extracción de compuestos que absorben a 280 nm. A este valor se logra extraer una cantidad importante de capsaicinoides sin una extracción evidente de colorantes, a diferencia de lo que se observa en las extracciones a 0.65 g/ml en la que, a pesar de que se extrae una cantidad mayor de capsaicinoides, también aumenta considerablemente la presencia de colorantes en los extractos. Podemos considerar entonces que el valor de densidad de dióxido de carbono de 0.65 g/ml es el umbral para la extracción de los colorantes, esto es, el valor en el cual se empiezan a extraer de forma importante.

Para estudiar la extracción de capsaicinoides a esta densidad, resultaba importante la determinación del tiempo de equilibrio de la extracción, tiempo en el cual se igualan la velocidad en que las moléculas de soluto pasan a la fase supercrítica y la velocidad en que regresan a formar parte de la matriz. Así, se realizó un experimento a densidad de 0.5 g/ml con diferentes tiempos estáticos de contacto y con un tiempo constante dinámico de extracción de 5 min. Los resultados se muestran en la tabla 22 y en la figura 18.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla 22. Valores promedio de absorbancia generados a diferentes tiempos estáticos de contacto en la extracción supercrítica de compuestos que absorben a 280 nm.

T equilibrio	A 280 nm
0	0.1542 ± 0.0118
0.5	0.0889 ± 1.24x10 ⁻³
1.0	0.0959 ± 2.4x10 ⁻³
1.5	0.1350 ± 0.0169
3.0	0.1084 ± 0.0229
5.0	0.0990 ± 0.0155
10.0	0.1401 ± 0.0163
20.0	0.1259 ± 6.92x10 ⁻³

Condiciones de extracción: densidad CO₂SC: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-20min, temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

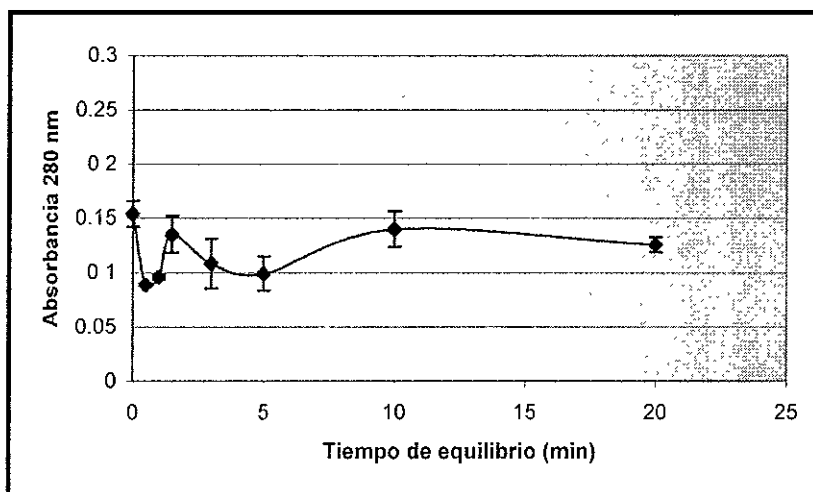


Fig 18. Resultados de absorbancia con respecto al tiempo estático de contacto en la extracción supercrítica de capsaicinoides. Condiciones de extracción: densidad CO₂SC: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0- 20min, temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.

Los resultados obtenidos no muestran el aumento esperado de la cantidad extraída en función de dicho tiempo de contacto. La gran variación entre los datos, reflejada por los valores de desviación estándar, permiten concluir que no hay un cambio importante de absorbancia con respecto al tiempo, es decir, permanece relativamente constante. Tales datos permiten establecer la suposición de que el dióxido de carbono, en las condiciones de operación utilizadas, puede encontrarse saturado desde los primeros momentos del contacto. Con saturación, nos referimos a la condición en la cual ya no existe la posibilidad de que se solubilicen más moléculas de soluto en el disolvente de extracción. Por otro lado, los resultados obtenidos pueden también estar relacionados con las características de la matriz; esto es, que la extracción puede estar limitada por posibles interacciones de la matriz con los solutos estudiados. En caso de existir dichos impedimentos, es posible que la matriz interactúe con los solutos o los encapsule, impidiendo un aumento de la cantidad extraída con respecto al tiempo.

7.5.3 Utilización de cosolventes polares para la extracción de capsaicinoides a densidades bajas.

Tal y como ya se ha discutido anteriormente, la solución a cualquiera de los problemas mencionados puede encontrarse mediante la utilización de un modificador adecuado, el cual puede lograr, por un lado, aumentar la solubilidad de los solutos polares en el sistema dióxido de carbono-modificador y, por el otro, lograr una redistribución o hinchamiento de la matriz de forma que se debiliten las interacciones que limitan la extracción.

Con base en lo anterior, se decidió trabajar con metanol, etanol y acetonitrilo como cosolventes, con el objetivo planteado anteriormente, es decir, el de aumentar el rendimiento de extracción de los capsaicinoides a densidades bajas sin el aumento en la extracción de los colorantes.

El equipo de extracción supercrítica utilizado permite fijar distintas concentraciones de modificadores en función de su flujo de entrada y de su porcentaje en volumen con respecto al dióxido de carbono supercrítico. El equipo funciona de manera que la concentración de distintos modificadores puede igualarse en porcentaje en volumen, pero no en porcentaje en mol. Las condiciones para la utilización de modificadores del equipo se resumen en la tabla que se añade a continuación.

Tabla 23. Concentración de los distintos modificadores manejados de acuerdo a las condiciones del equipo de extracción supercrítica.

% Volumen	Flujo (g/ml)	% Mol		
		Metanol	Étanol	Acetonitrilo
1	0.024	1.2	0.8	0.9
2	0.048	2.3	1.6	1.8
3	0.072	3.5	2.4	2.7
4	0.096	4.6	3.2	3.6
5	0.120	5.8	4.0	4.5
6	0.144	6.9	4.9	5.4
7	0.168	8.1	5.7	6.3

Al trabajar con modificadores es necesario tomar en cuenta algunos puntos operativos del equipo de extracción supercrítica; uno de estos puntos concierne a la temperatura del restrictor, la cual debe estar por encima de la temperatura de ebullición del modificador para evitar que éste se condense en el momento de la despresurización, solubilizando parte de los analitos extraídos y drenándose por la tubería de deshechos. Es importante considerar que, en el caso de la utilización de ciertos modificadores, como el acetonitrilo, cuya temperatura de ebullición es de alrededor de 82°C, la elevada temperatura del restrictor podría significar una descomposición de los solutos.

Por lo anterior, se decidió realizar experimentos con modificadores comparando la recuperación de analitos a diferentes temperaturas del restrictor. Para ello, se realizaron extracciones con metanol a 3 y 5% en volumen

estableciendo las temperaturas del restrictor en 45, 55 y 65°C, fijadas de esta forma debido a que la temperatura de ebullición del metanol es de 64.7°C.

Antes del reporte de los resultados del experimento anteriormente descrito, es importante mencionar que otro punto a tomar en cuenta al trabajar con mezclas CO₂-modificadores es saber si se encuentran efectivamente en la región supercrítica o en una región cercana a la misma.

Las figuras 19 y 20 corresponden a diagramas de presión contra temperatura obtenidos a partir del programa Eqfases 2.0 para cada uno de los sistemas de dióxido de carbono-modificador analizados. En estos diagramas se representan cuatro regiones de interés en el presente trabajo para cada una de las mezclas empleadas. La región a la izquierda cercana a la curva corresponde a aquella en donde la mezcla se encuentra en estado líquido; la región de la parte central corresponde a la fase en donde el sistema se encuentra en un equilibrio líquido-vapor; la región a la derecha representa la mezcla en fase de vapor y, finalmente, la región alrededor del punto crítico (especificado para cada caso), representa la fase supercrítica.

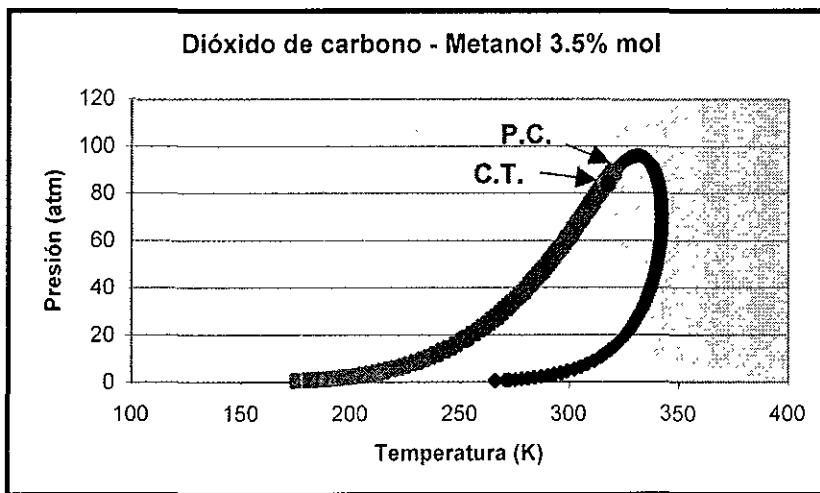


Fig 19. Diagrama de fases de la mezcla dióxido de carbono- metanol 3.5% mol (3% vol)

Punto crítico de la mezcla (P.C.): 320.64K, 89.20 atm (47.64°C, 90.38 bar)

Condiciones de trabajo (C.T.): 313K, 88.1 atm (40°C, 91 bar)

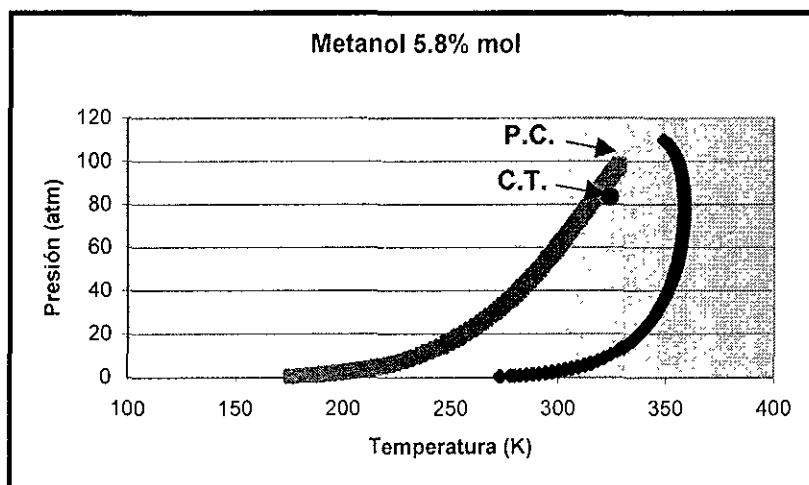


Fig 20 Diagrama de fases de la mezcla dióxido de carbono- metanol 5.8% mol (5% vol)
 Punto crítico de la mezcla (P.C.). 328.48K, 98.27 atm (55.48°C, 99.57 bar)
 Condiciones de trabajo (C.T.): 313K, 88.1 atm (40°C, 91 bar)

Al localizar en estos diagramas las coordenadas de las condiciones de trabajo, esto es 91 bar, 40°C (88.1 atm, 313K), podemos darnos cuenta que en el caso de la mezcla dióxido de carbono supercrítico- metanol 3.5% mol, nos encontramos en un punto muy cercano al punto crítico, pero por debajo de él, esto es, en una región muy cercana a la supercrítica. Para la mezcla dióxido de carbono supercrítico- metanol 5.8% mol nos encontramos ligeramente por debajo del punto crítico, en la región de equilibrio líquido de vapor. En este experimento, por lo tanto, se trabajó con mezclas subcríticas cercanas al punto crítico, las cuales, tal y como ya se ha mencionado, tienen esencialmente el mismo poder solvente máximo que un fluido supercrítico, conservan propiedades de transporte ligeramente favorables, pero la posibilidad de ajuste de su poder solvente por densidad, es mucho menor (Knipe *et al*, 1993).

Los resultados obtenidos en el experimento relacionado con la influencia de la temperatura del restrictor en la recuperación de los analitos, se resumen y esquematizan en la tabla 24 y la figura 21.

Tabla 24. Valores promedio de absorbancia a 280 nm de los extractos generados en la extracción supercrítica de capsaicinoides con variaciones en la temperatura del restrictor y de la trampa utilizando metanol al 3 y 5% en volumen como modificador.

Temperatura (°C)	A 280 nm sin modificador	A 280 nm 3% vol. metanol	A 280 nm 5% vol. metanol
45	$0.1500 \pm 7.30 \times 10^{-3}$	$0.1307 \pm 7.88 \times 10^{-3}$	-
55	$0.1515 \pm 7.06 \times 10^{-3}$	$0.1604 \pm 7.93 \times 10^{-4}$	$0.1875 \pm 5.36 \times 10^{-3}$
65	$0.1509 \pm 9.69 \times 10^{-3}$	$0.1971 \pm 3.76 \times 10^{-3}$	$0.2411 \pm 5.27 \times 10^{-3}$

Condiciones de extracción: densidad CO₂SC: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, modificador: concentración del modificador: 3 y 5% vol., flujo del modificador: 0.072 y 0.12 ml/min, temperatura del restrictor: 45, 55, 65°C, temperatura de la trampa: 45,55,65°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

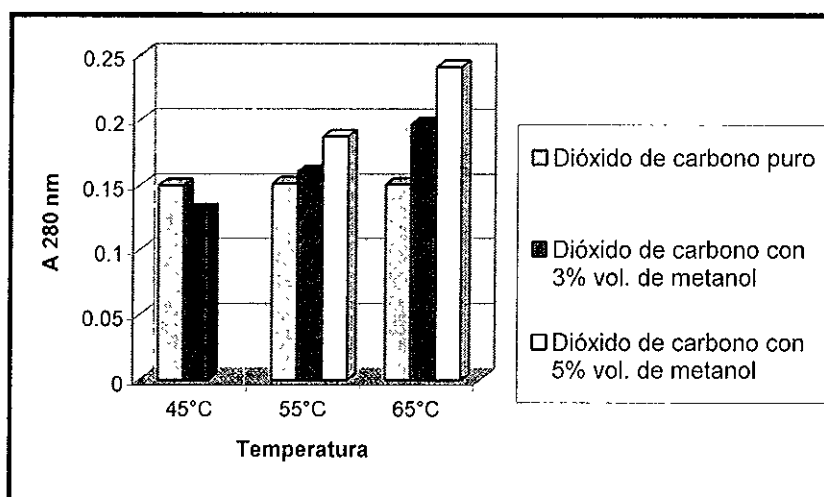


Fig 21. Influencia de la temperatura del restrictor y de la trampa en la recuperación de capsaicinoides en las extracciones supercríticas con 3 y 5% vol. metanol y sin modificador. Condiciones de extracción: densidad CO₂SC: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, flujo del modificador: 0.072 y 0.12 ml/min, temperatura del restrictor: 45, 55, 65°C, temperatura de la trampa: 45,55,65°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.

De los resultados obtenidos en el experimento descrito anteriormente, podemos concluir que efectivamente la temperatura del restrictor influye en la recuperación de los analitos extraídos. Puede observarse que en las extracciones con dióxido de carbono sin modificador, la temperatura del restrictor no influye en

la recuperación de los compuestos que absorben a 280nm, pero que, por otro lado, al utilizar modificador, la recuperación de dichos compuestos disminuye al fijar la temperatura del restrictor por debajo de la temperatura de ebullición del modificador utilizado. Cabe decir, que en los experimentos en los que el restrictor funcionó a temperaturas de 45 y 55°C, se observó efectivamente salida de una pequeña cantidad de metanol por el tubo de deshecho, lo cual confirmó el hecho de que la pérdida en la recuperación de analitos a estas temperaturas, se debe a la condensación del modificador con el consecuente arrastre de analitos hacia la tubería de deshecho.

De los resultados hasta aquí obtenidos puede notarse que un aumento en la concentración del modificador genera un incremento en la eficiencia de la extracción tal y como puede observarse en las extracciones con metanol al 3% y 5% en volumen.

Otra consideración también importante al trabajar con modificadores se relaciona con la limpieza de las líneas después de cada una de las extracciones. En el manual del equipo se recomienda realizar una extracción blanco, esto es con un cartucho sin muestra, con dióxido de carbono puro después de cada extracción con modificador, con el objetivo de limpiar las líneas de cualquier residuo de disolvente que pudiera quedar. A lo largo de la investigación y a partir de los resultados obtenidos, este método de limpieza se fue modificando y mejorando. Así, después de probar varios métodos de limpieza que generaran resultados confiables, se llegó a la conclusión de que era necesario realizar una extracción blanco (cartucho sin muestra) con modificador, seguida de una extracción blanco con dióxido de carbono puro después de cada una de las extracciones.

Las condiciones de los métodos de limpieza que generaron resultados más confiables se muestran en la tabla 25.

Tabla 25. Condiciones de los métodos de limpieza utilizados al trabajar con modificadores.

Condiciones		Limpieza 1	Limpieza 2
Condiciones de extracción	Fluido de extracción	CO ₂	CO ₂
	Flujo CO ₂	2.0 ml/min	2 ml/min
	Densidad CO ₂	0.8 g/ml	0.9 g/ml
	T cámara	40°C	50°C
	Tiempo de equilibrio	5 min	5 min
	Tiempo de extracción	15 min	15 min
	Modificador	Etanol/metanol/ acetoniitrilo	-
	Conc. modificador	5% vol.	-
	Flujo de modificador	0.12 g/ml	-
Condiciones de la trampa	T restrictor	65-82°C	45°C
	T trampa	65-82°C	45°C
	Trampa	Acero inoxidable	Acero inoxidable
	Vol. compensación	1.0 ml	1.0 ml
Condiciones de lavado	Disolvente	Acetonitrilo	Acetonitrilo
	Volumen	1.0 ml	1.0 ml
	Flujo del disolvente	1.0 ml /min	1.0 ml/min
	T restrictor	45°C	45°C
	T trampa	45°C	45°C

El modificador utilizado en las limpiezas era el mismo que se utilizaba para las extracciones con muestra. Este método de limpieza resultó ser de gran importancia para la obtención de resultados reproducibles.

Por otro lado, se realizó un experimento con diferentes tamaños de muestra utilizando como disolvente de extracción el dióxido de carbono puro, y una mezcla de dióxido de carbono - etanol 2.4% mol (3% vol).

En la figura 22 se presenta la gráfica de presión contra temperatura para esta mezcla, que a 88.1 atm y 313K, refleja una ubicación ligeramente por debajo del punto crítico.

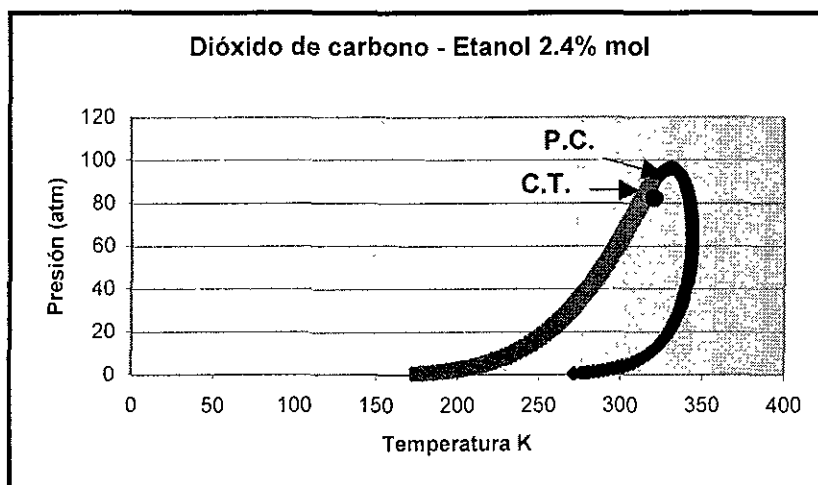


Fig 22. Diagrama de fases de la mezcla dióxido de carbono- etanol 2.4% mol.

Puntos críticos de la mezcla: 318.47 K, 87.88 atm (45.47°C, 89.04 bar)

Condiciones de trabajo (C.T.): 313K, 88.1 atm (40°C, 91 bar)

Los resultados obtenidos a partir de este experimento, se presentan en la tabla 26 y figura 23.

Tabla 26. Valores de absorbancia promedio generados de extracciones con dióxido de carbono supercrítico y mezcla de CO₂SC- etanol 2.4% mol a partir de diferentes tamaños de muestra.

Peso (mg)	A 280nm Con modificador	A 280nm Sin modificador
10	0.1102 ± 1.41x10 ⁻⁴	0.0956 ± 3.60x10 ⁻³
15	0.1801 ± 7.14x10 ⁻³	0.1157 ± 4.24x10 ⁻⁴
20	0.2131 ± 1.83x10 ⁻³	0.1284 ± 4.03x10 ⁻³
25	0.2297 ± 1.06x10 ⁻³	0.1372 ± 4.20x10 ⁻³
30	0.2294 ± 7.70x10 ⁻⁴	0.1298 ± 8.62x10 ⁻³

Condiciones de extracción: Densidad CO₂SC : 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, flujo de modificador: 0.072 ml/min, temperatura del restrictor: 79°C, temperatura de la trampa: 79°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.n=3.

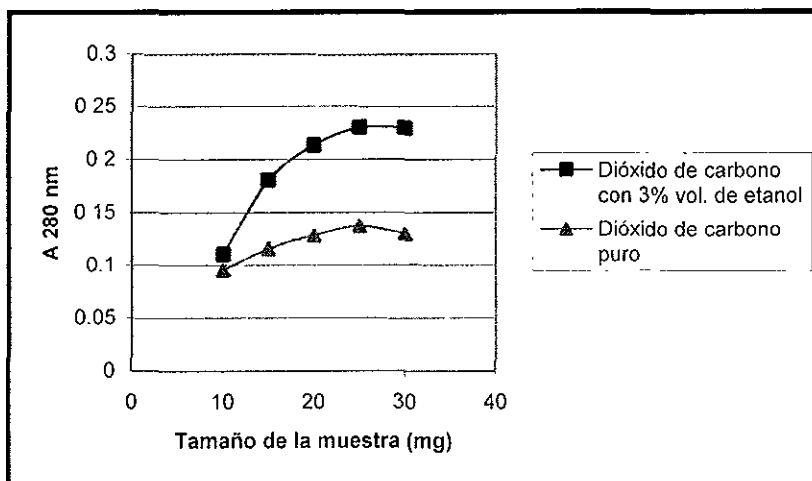


Fig 23. Influencia del tamaño de la muestra en la extracción supercrítica de capsaicinoides con dióxido de carbono y mezcla de dióxido de carbono-etanol 2.4% mol. Condiciones de extracción: Densidad CO₂SC : 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0.5 min, flujo de modificador: 0.072 ml/min, temperatura del restrictor: 79°C, temperatura de la trampa: 79°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.

Puede advertirse que al aumentar la cantidad de muestra, hay un ligero aumento en la cantidad de compuestos que absorben a 280 nm en los extractos al extraer sin modificador. Este aumento se encuentra lejos de ser lo que se esperaba, lo cual es un argumento más para afirmar que el dióxido de carbono, en esa cantidad y en esas condiciones, se encuentra saturado y es incapaz de disolver una mayor cantidad de soluto o que, por otro lado, existen efectivamente impedimentos de la matriz. Con la utilización de etanol se observa un aumento en la cantidad de capsaicinoides extraídos conforme se incrementa el tamaño de la muestra; sin embargo, la diferencia no es muy relevante. Ello puede significar que la mezcla se encuentra saturada y no tiene la capacidad de disolver una mayor cantidad de capsaicinoides o que, por otro lado, sí existen impedimentos relacionados con la matriz que no fueron disminuídos por el disolvente (en caso de ser capaz de ello), debido a que el tiempo de contacto es insuficiente.

7.5.4 Extracción supercrítica con y sin cosolventes a partir de perlas recubiertas con oleorresina de la muestra.

Con el objetivo de comprobar si la matriz influía efectivamente en la cantidad de analitos recuperados y de analizar el papel de los modificadores ante los posibles impedimentos de la matriz y la solubilidad de los analitos en las mezclas dióxido de carbono-modificador, se realizó un experimento en el cual se eliminó la variable de la matriz al emplear perlas recubiertas con oleorresina de la harina de chile como materia prima.

Aunque previamente se realizaron experimentos para determinar el tiempo de equilibrio en la extracción supercrítica de los analitos con dióxido de carbono a partir de la matriz, debemos recordar que al agregar un modificador el sistema cambia, y la mezcla dióxido de carbono-modificador asume características únicas que influyen de manera específica en una extracción determinada. Así, en el experimento al que nos referimos, se determinó el tiempo de equilibrio de la extracción supercrítica para cada uno de los sistemas dióxido de carbono-modificador a partir de la harina de chile y las perlas recubiertas de oleorresina.

En este caso, se decidió que las concentraciones de los modificadores elegidos, metanol, etanol y acetonitrilo, debían tratar de igualarse en % en mol para hacer más comparables los resultados obtenidos a partir de las distintas mezclas. Con base en ello, los sistemas elegidos para trabajar fueron los siguientes:

- ◆ Dióxido de carbono - metanol 5.8% mol.
- ◆ Dióxido de carbono - etanol 5.7% mol.
- ◆ Dióxido de carbono - acetonitrilo 5.4% mol.

Las figuras 24, 25 y 26 exponen las gráficas presión vs. temperatura para cada una de las mezclas con las que se trabajó en este experimento.

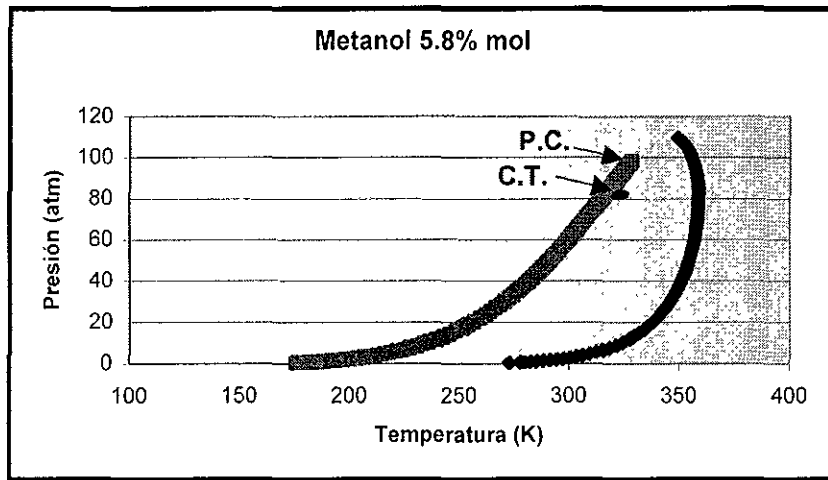


Fig 24 Diagrama de fases de la mezcla dióxido de carbono- metanol 5.8% mol.

Punto crítico de la mezcla (P.C.): 328.48K, 98.27 atm (55.48°C, 99.57 bar)

Condiciones de trabajo (C.T.): 313K, 88.1 atm (40°C, 91 bar)

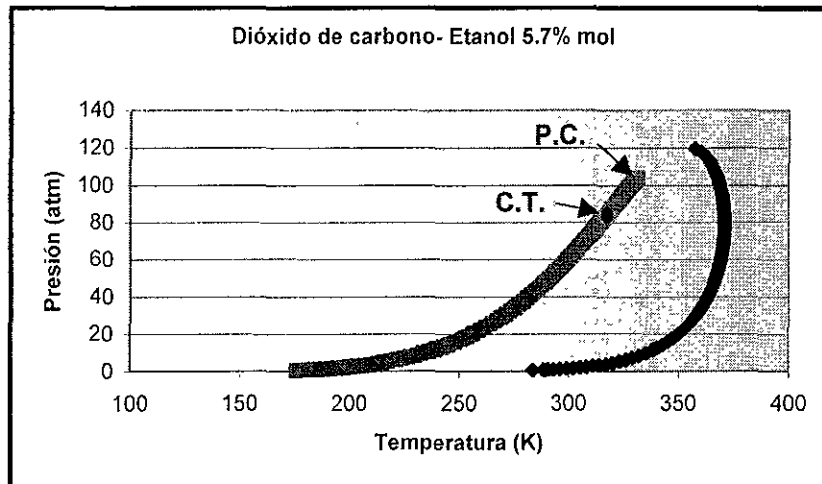


Fig 25. Diagrama de fases de la mezcla dióxido de carbono - etanol 5.7% mol.

Punto crítico de la mezcla (P.C.): 331.57K, 104.10 atm (58.57°C, 105.48 bar).

Condiciones de trabajo (C.T.): 313K, 88.1 atm (40°C, 91 bar)

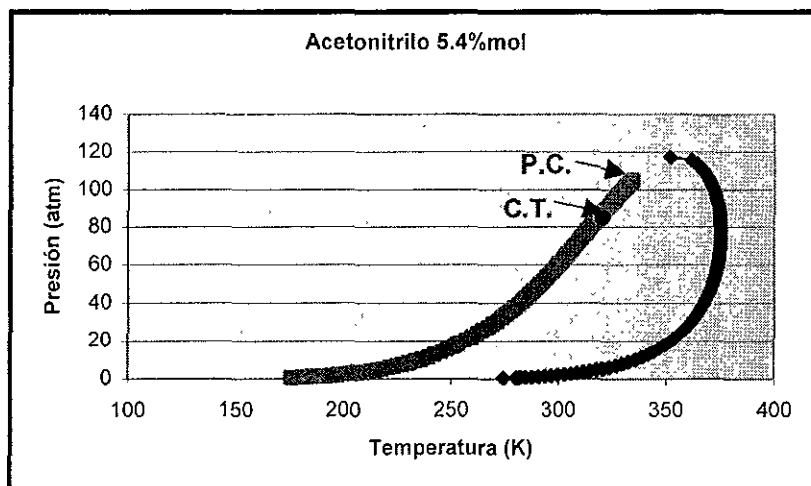


Fig 26 Diagrama de fases de la mezcla dióxido de carbono - acetonitrilo 5.4%mol.

Punto crítico de la mezcla (P.C.): 334.41K, 105.10 atm.(61.41°C, 106.49 bar).

Condiciones de trabajo (C.T.). 313K, 88.1 atm (40°C, 91 bar)

Al ubicar en los diagramas las coordenadas de presión y temperatura de trabajo, esto es, 40°C y 91 bar (313 K, 88.17 atm), podemos reconocer nuestra mezcla en alguna de las regiones antes mencionadas. Así, se observa que las tres mezclas: dióxido de carbono- metanol 5.8% mol, dióxido de carbono- etanol 5.7% mol y dióxido de carbono- acetonitrilo 5.4% mol, se encuentran muy cerca del punto crítico aunque ligeramente por debajo de él.

En este experimento se trabajó, por lo tanto, en regiones muy cercanas a la región supercrítica pero por debajo de ella, con los inconvenientes y ventajas ya discutidos anteriormente en el presente estudio.

Para la extracción supercrítica a partir de perlas recubiertas con la oleorresina, se realizó una extracción Soxhlet a partir de 5 g de harina de chile con 200 ml de etanol a una temperatura controlada de 65-75°C durante 2 horas. Después de la evaporación del solvente a presión reducida, se puso en contacto una cantidad determinada de la oleorresina con aproximadamente 6 g de perlas con ayuda de un poco de etanol.

A continuación, se removió por evaporación el disolvente de las perlas con una corriente de N₂ hasta que las perlas quedaron recubiertas con la oleorresina. La relación entre la oleorresina y las perlas determinada gravimétricamente fue de

3×10^{-3} g de oleo por gramo de perlas, con pequeñas variaciones en las diferentes preparaciones.

Se realizaron pruebas espectrofotométricas con la finalidad de determinar la cantidad de perlas recubiertas a utilizar en cada extracción supercrítica, poniendo en contacto las perlas con 1.5 ml de acetonitrilo y midiendo la absorbancia resultante de la solución. A partir de dichas lecturas en el espectro UV-Visible, se decidió que una cantidad de 0.2 g de perlas era adecuada para la extracción supercrítica. El valor de absorbancia de la extracción de 10 mg de la harina de chile con 1.5 ml de acetonitrilo a 280 nm es muy semejante al valor obtenido al tratar 0.2 g de perlas con oleo con el mismo volumen, esto es, aproximadamente 0.7 unidades de absorbancia.

Este experimento, por lo tanto, se realizó con la finalidad de analizar el papel de los impedimentos de la matriz en la eficiencia de la extracción, así como la influencia de distintos cosolventes polares en la eficiencia y selectividad de la misma. Los resultados del experimento hasta ahora descrito se presentan de las tablas 27 a 34 y se esquematizan en las figuras 27, 28 y 29.

Tabla 27 Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados de la extracción supercrítica con metanol 5.8% mol como cosolvente a partir de harina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0	0.1450 ± 0.0173	$0.0839 \pm 5.37 \times 10^{-3}$	$0.0743 \pm 1.55 \times 10^{-3}$
15	$0.1642 \pm 2.96 \times 10^{-3}$	$0.0919 \pm 2.12 \times 10^{-4}$	$0.0896 \pm 2.80 \times 10^{-4}$
30	$0.2185 \pm 3.60 \times 10^{-3}$	$0.1058 \pm 6.08 \times 10^{-3}$	$0.1032 \pm 3.30 \times 10^{-3}$
45	$0.3385 \pm 3.80 \times 10^{-3}$	$0.1185 \pm 8.13 \times 10^{-3}$	$0.1164 \pm 8.80 \times 10^{-3}$

Condiciones de extracción: 10 mg harina de chile, densidad de la mezcla: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, flujo del modificador: 0.120 ml/min, temperatura del restrictor: 65°C, temperatura de la trampa: 65°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=4.

Tabla 28. Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados en la extracción supercrítica con etanol 5.7% mol como cosolvente, a partir de harina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0	0.2437 ± 0.0103	0.0989 ± 7.77x10 ⁻³	0.0859 ± 2.19x10 ⁻³
15	0.2699 ± 0.0188	0.1226 ± 2.19x10 ⁻³	0.1174 ± 4.73x10 ⁻³
30	0.2988 ± 0.0113	0.1441 ± 6.73x10 ⁻³	0.1436 ± 5.23x10 ⁻³
45	0.4014 ± 4.04x10 ⁻³	0.1649 ± 4.87x10 ⁻³	0.1623 ± 3.18x10 ⁻³

Condiciones de extracción: 10 mg harina de chile, densidad de la mezcla: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, modificador: flujo del modificador: 0.168 ml/min, temperatura del restrictor: 79°C, temperatura de la trampa: 79°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo n=3.

Tabla 29. Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados en la extracción supercrítica con acetonitrilo 5.4% mol como cosolvente, a partir de harina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0	0.3170 ± 5.37x10 ⁻³	0.1230 ± 3.30x10 ⁻³	0.1253 ± 0.0170
15	0.3513 ± 4.10x10 ⁻³	0.1870 ± 6.08x10 ⁻³	0.1738 ± 2.40x10 ⁻³
30	0.4532 ± 5.79x10 ⁻³	0.2179 ± 0.0235	0.1922 ± 3.04x10 ⁻³
45	0.5104 ± 0.0128	0.2338 ± 9.80x10 ⁻³	0.2157 ± 3.67x10 ⁻³

Condiciones de extracción: 10 mg de harina de chile, densidad de la mezcla: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, flujo del modificador: 0.144 ml/min, temperatura del restrictor: 82°C, temperatura de la trampa: 82°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

Tabla 30. Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados en la extracción supercrítica con dióxido de carbono sin modificador, a partir de harina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 460 nm
0	$0.1254 \pm 2.96 \times 10^{-3}$	$7.30 \times 10^{-3} \pm 1.41 \times 10^{-3}$	$6.90 \times 10^{-3} \pm 1.13 \times 10^{-3}$
15	$0.1290 \pm 8.98 \times 10^{-3}$	$9.85 \times 10^{-3} \pm 6.36 \times 10^{-4}$	$9.30 \times 10^{-3} \pm 7.07 \times 10^{-4}$
30	0.1297 ± 0.0119	$7.75 \times 10^{-3} \pm 7.77 \times 10^{-4}$	$7.20 \times 10^{-3} \pm 7.07 \times 10^{-4}$
45	$0.1340 \pm 2.68 \times 10^{-3}$	$0.0130 \pm 1.69 \times 10^{-3}$	$9.45 \times 10^{-3} \pm 9.19 \times 10^{-4}$

Condiciones de extracción: 10 mg de harina de chile, densidad CO₂SC: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

Tabla 31. Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados en la extracción supercrítica con metanol 5.8%mol como cosolvente, a partir de perlas recubiertas con oleorresina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0	$0.2533 \pm 3.39 \times 10^{-3}$	$0.1572 \pm 6.71 \times 10^{-3}$	$0.1497 \pm 6.08 \times 10^{-3}$
15	$0.4228 \pm 5.02 \times 10^{-3}$	$0.2029 \pm 1.13 \times 10^{-3}$	$0.1993 \pm 9.80 \times 10^{-4}$
30	$0.5017 \pm 1.20 \times 10^{-3}$	$0.2213 \pm 7.42 \times 10^{-3}$	$0.2152 \pm 7.42 \times 10^{-3}$
45	$0.4997 \pm 3.18 \times 10^{-3}$	$0.2305 \pm 9.89 \times 10^{-3}$	$0.2288 \pm 2.12 \times 10^{-4}$

Condiciones de extracción: 0.2 g perlas, densidad de la mezcla: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, modificador, flujo del modificador: 0.120 ml/min, temperatura del restrictor 65°C, temperatura de la trampa: 65°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

Tabla 32 Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados en la extracción supercrítica con etanol 5.7% mol como cosolvente a partir de perlas recubiertas con oleorresina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0	$0.2848 \pm 4.31 \times 10^{-3}$	$0.1217 \pm 2.19 \times 10^{-3}$	$0.1199 \pm 1.48 \times 10^{-3}$
15	$0.4776 \pm 5.72 \times 10^{-3}$	0.2262 ± 0.0117	0.1897 ± 0.0122
30	$0.5188 \pm 2.75 \times 10^{-3}$	0.2397 ± 0.0109	$0.2197 \pm 2.82 \times 10^{-3}$
45	$0.5312 \pm 6.92 \times 10^{-3}$	0.2403 ± 0.0305	0.2206 ± 0.0277

Condiciones de extracción: 0.2g de perlas, densidad de la mezcla: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, flujo del modificador: 0.168 ml/min, temperatura del restrictor: 79°C, temperatura de la trampa: 79°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

Tabla 33. Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados en la extracción supercrítica con acetonitrilo 5.4% mol como cosolvente, a partir de perlas recubiertas con oleorresina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0	$0.3560 \pm 6.57 \times 10^{-3}$	$0.1787 \pm 7.70 \times 10^{-3}$	$0.1714 \pm 2.26 \times 10^{-3}$
15	$0.5228 \pm 2.80 \times 10^{-3}$	$0.2246 \pm 4.40 \times 10^{-3}$	$0.2124 \pm 2.68 \times 10^{-3}$
30	$0.5434 \pm 1.83 \times 10^{-3}$	$0.2411 \pm 1.13 \times 10^{-3}$	$0.2397 \pm 4.87 \times 10^{-3}$
45	$0.5597 \pm 5.65 \times 10^{-4}$	$0.2464 \pm 7.00 \times 10^{-3}$	$0.2435 \pm 7.99 \times 10^{-3}$

Condiciones de extracción: 0.2g de perlas, densidad de la mezcla: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, flujo del modificador: 0.144 ml/min, temperatura del restrictor: 82°C, temperatura de la trampa: 82°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

Tabla 34. Valores promedio de absorbancia en función del tiempo estático de contacto generados en la extracción supercrítica con dióxido de carbono sin modificador, a partir de perlas recubiertas con oleorresina.

Tiempo de Equilibrio	A 280 nm	A 447 nm	A 470 nm
0	$0.1511 \pm 2.05 \times 10^{-3}$	$0.0184 \pm 1.62 \times 10^{-3}$	$0.0136 \pm 2.19 \times 10^{-3}$
15	0.1840 ± 0.0135	$0.0215 \pm 1.62 \times 10^{-3}$	$0.0207 \pm 1.29 \times 10^{-3}$
30	$0.1859 \pm 4.80 \times 10^{-3}$	$0.0251 \pm 6.36 \times 10^{-4}$	$0.0211 \pm 9.19 \times 10^{-4}$
45	$0.1918 \pm 6.36 \times 10^{-4}$	$0.0262 \pm 7.77 \times 10^{-4}$	$0.0235 \pm 1.62 \times 10^{-3}$

Condiciones de extracción: 0.2 g perlas, densidad CO₂SC: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, temperatura del restrictor: 40°C, temperatura de la trampa: 40°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo. n=3.

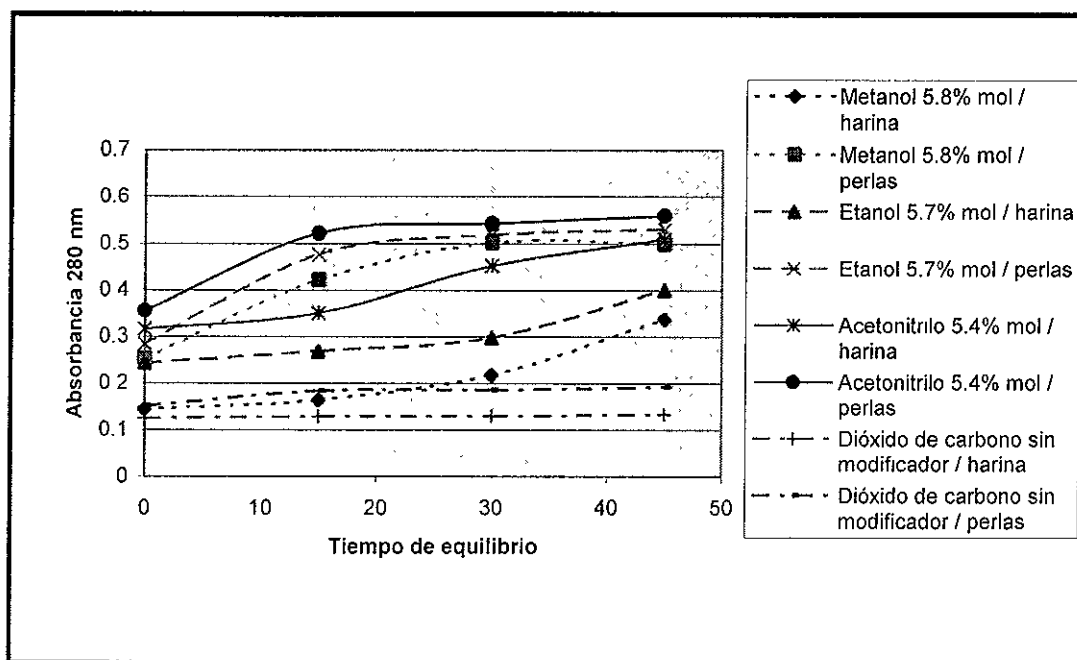


Fig 27. Cambio de absorbancia con el tiempo estático de contacto en la extracción supercrítica de capsaicinoides con dióxido de carbono y mezclas de dióxido de carbono y modificadores, a partir de harina de chile y de perlas recubiertas con la oleorresina. Condiciones de extracción: densidad CO₂SC: 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, temperatura del restrictor: 40-82°C, temperatura de la trampa: 40-82°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.

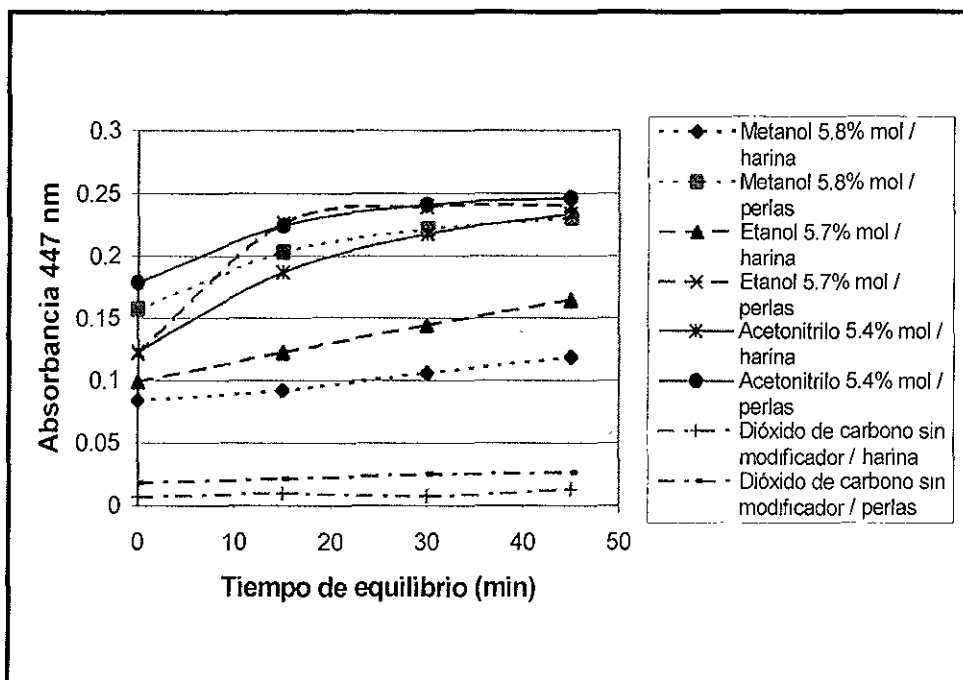


Fig 28 Cambio de absorbancia con el tiempo estático de contacto en la extracción supercrítica de colorantes (447 nm) con dióxido de carbono y mezclas de dióxido de carbono y modificadores, a partir de harina de chile y de perlas recubiertas con la oleorresina de la harina. Condiciones de extracción: densidad CO_2SC : 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, temperatura del restrictor: 40-82°C, temperatura de la trampa: 40-82°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.

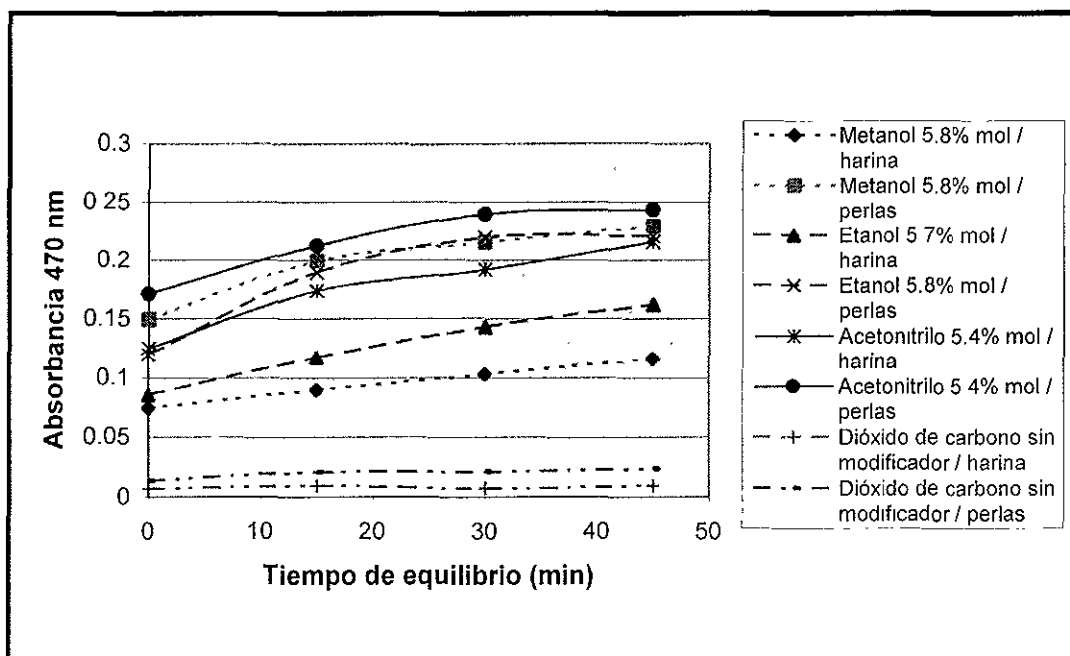


Fig 29. Cambio de absorbancia con el tiempo estático de contacto en la extracción supercrítica de colorantes (470 nm) con dióxido de carbono y mezclas de dióxido de carbono y modificadores, a partir de harina de chile y de perlas recubiertas con la oleorresina de la harina. Condiciones de extracción: densidad CO_2SC : 0.5 g/ml (91 bar, 40°C), tiempo de equilibrio: 0-45 min, temperatura del restrictor: 40-82°C, temperatura de la trampa: 40-82°C. Disolvente de lavado: acetonitrilo.

Tanto para los compuestos que absorben a 280 nm como para los colorantes, las extracciones más deficientes correspondieron a aquellas realizadas con dióxido de carbono sin modificador. Esto se debe, en el caso de los capsaicinoides, a que contienen grupos funcionales que les confieren cierto grado de polaridad, mientras que, por otro lado, el dióxido de carbono es una molécula con baja polaridad. Los colorantes, a pesar de tener un carácter no polar resultado de la esterificación con ácidos grasos de cadena larga, son extraídos también en forma deficiente, hecho que podemos atribuir a que el dióxido de carbono, a la densidad manejada en este experimento, tiene un menor poder solvente que a densidades altas.

Los parámetros de solubilidad de los analitos de interés, así como la tabla 13 presentada en su oportunidad y en la que se resumen los parámetros de solubilidad de algunos disolventes comunes y otros utilizados como fluidos

supercríticos, pueden ser herramientas útiles para comprender mejor los resultados obtenidos en el caso de las extracciones supercríticas sin modificadores.

A continuación se presentan los cálculos para la determinación del parámetro de solubilidad de cada uno de los analitos de interés por medio de un método de contribución de grupos (Fedors, 1974).

Capsaicina

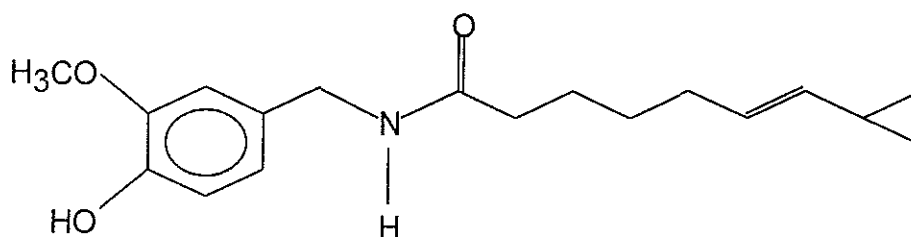


Tabla 35. Cálculo del parámetro de solubilidad de la capsaicina.

Grupo	Número	Δe (cal/mol)	Δv (cm ³ /mol)
CH ₃	3	3375	100.5
CH ₂	5	5900	80.5
CH	1	820	-1
-CH=	5	5150	67.5
-C=O	1	4150	10.8
-C=	3	3090	-16.5
NH	1	2000	4.5
-OH	1	5220	13
O	1	800	3.8
Anillo de 5 o más miembros	1	250	16
Dobles ligaduras de los anillos	3	1200	-6.6
Sumatoria		31955	272.5

$$\delta = \sqrt{\frac{31955}{272.5}} = 10.8289$$

Capsantina

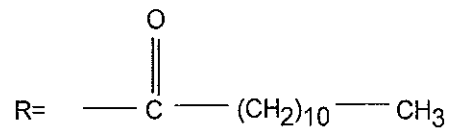
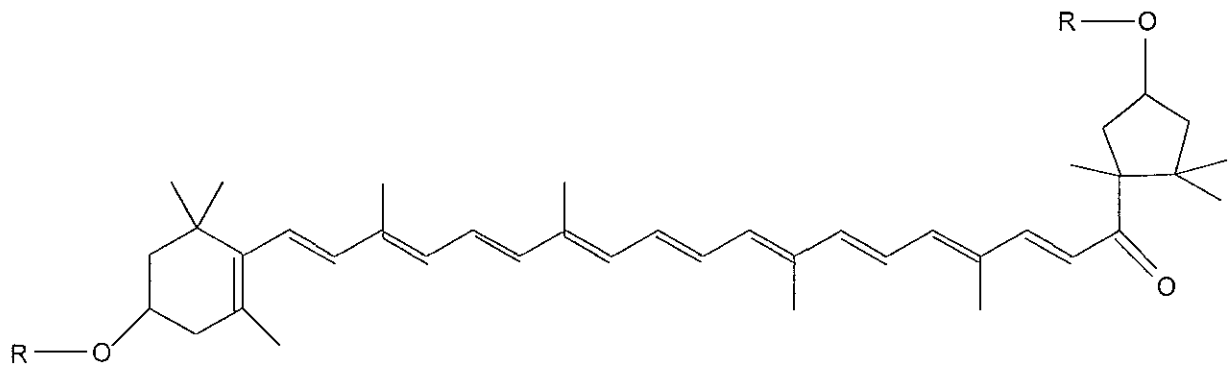


Tabla 36. Cálculo del parámetro de solubilidad de la capsantina.

Grupo	Número	Δe (cal/mol)	Δv (cm ³ /mol)
CH ₃	12	13500	402
CH ₂	24	28320	386.4
CH	2	1640	-2
C	3	1050	-57.6
-CH=	14	14420	189
-C=	6	6180	-33
-CO ₂	2	8600	36
-C=O	1	4150	10.8
Anillos de 5 o más miembros	2	500	32
Dobles ligaduras de los anillos	1	400	-2.2
Sumatoria		78760	961.4

$$\delta = \sqrt{\frac{78760}{961.4}} = 9.051$$

Capsorubina

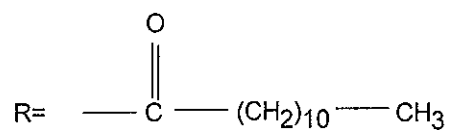
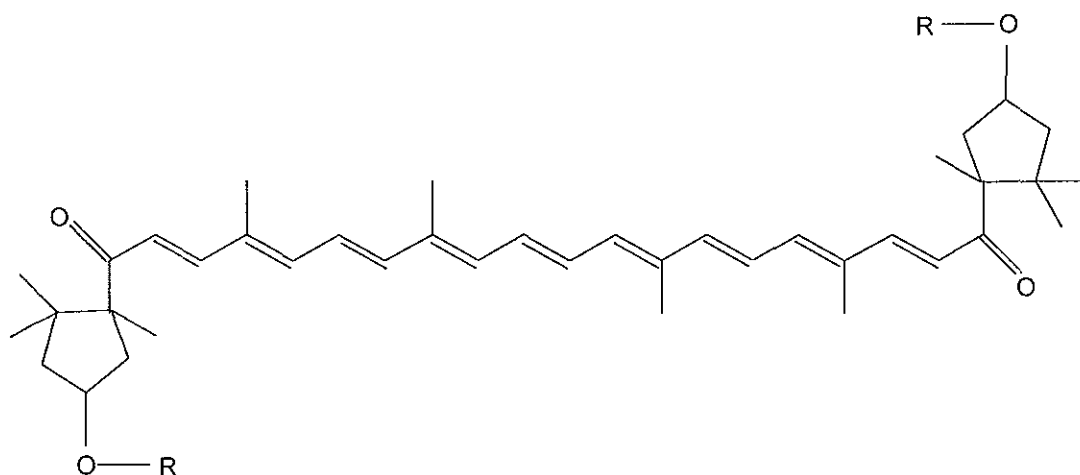


Tabla 37. Cálculo del parámetro de solubilidad de la capsorubina.

Grupo	Número	Δe (cal/mol)	Δv (cm ³ /mol)
CH ₃	12	13500	402
CH ₂	24	28320	386.4
CH	2	1640	-2
C	4	1400	-76.8
-CH=	14	14420	189
-C=	4	4120	-22
-CO ₂	2	8600	36
-C=O	2	8300	21.6
Anillos de 5 o más miembros	2	500	32
Sumatoria		80800	966.2

$$\delta = \frac{80800}{966.2} = 9.1447$$

Cabe hacer notar que los valores de parámetros de solubilidad aquí presentados para los colorantes (capsantina y capsorrubina), corresponden a los de los colorantes esterificados con ácido láurico (12:0) ya que, tal y como se reporta en la literatura, es la forma en que se encuentran la mayoría de las xantofilas en los frutos *Capsicum*.

Al comparar estos parámetros de solubilidad con el del dióxido de carbono supercrítico, podemos ver que resultan ser muy similares únicamente cuando el dióxido de carbono se encuentra a una densidad del orden de 0.9-1.23 g/ml. El dióxido de carbono a densidad de 0.6 g/ml, tiene un parámetro de solubilidad de 7-8, menor que los parámetros de solubilidad de los compuestos de interés. Esta densidad es mayor al valor de 0.5 g/ml que se utilizó en las extracciones realizadas. Por todo lo anterior, resulta lógico el hecho de que el dióxido de carbono no haya extraído eficientemente los analitos a la densidad de 0.5g/ml, en la que el intervalo de disolventes a los que puede imitar se reduce considerablemente en comparación a densidades más altas. Debe aclararse que el método de contribución de grupos para la estimación de los parámetros de solubilidad de la capsaicina y los colorantes, considera sus valores a una temperatura de 25°C. A temperaturas mayores el parámetro de solubilidad cambiaría reflejando una mayor capacidad del soluto de disolverse, ya que un aumento de temperatura se asocia con un aumento en la solubilidad.

El ligero aumento en la extracción con dióxido de carbono sin modificador al utilizar perlas recubiertas con la oleoresina, más notorio en el caso de los capsaicinoides a densidad de 0.5 g/ml, es un argumento a favor de la suposición establecida previamente, referente a ciertos impedimentos en la extracción ocasionados por la matriz. En las extracciones con perlas es posible decir que el dióxido de carbono se encuentra saturado, es decir, que por su baja afinidad hacia los solutos es incapaz de disolver importantes cantidades de los mismos. En el caso de la extracción a partir de harina, no se puede hablar de una saturación ya que no es posible para el disolvente contactar a los solutos por impedimentos de la matriz.

Es notorio el hecho de que en todas las extracciones realizadas a densidades bajas, se observó una selectividad hacia la extracción de capsaicinoides, independientemente de la eficiencia con la que se extraen los analitos. Los resultados obtenidos, en su conjunto, sientan las bases para un análisis más detallado de este hecho y de algunos otros ya discutidos anteriormente. Como ya se ha dicho anteriormente, el dióxido de carbono es una molécula no polar e interacciona con otras moléculas y consigo mismo únicamente en función de sus fuerzas de dispersión, dependientes de su polarizabilidad. El aumento en la densidad del dióxido de carbono supercrítico implica un aumento en su poder solvente y tiene la capacidad de imitar a un mayor número de disolventes orgánicos y, en consecuencia, de disolver a una mucho mayor cantidad de solutos, incluyendo posiblemente algunos solutos ligeramente polares. De ahí que los resultados observados a altas densidades sean lógicos. El aumento del poder solvente ocasiona que el dióxido de carbono pueda solubilizar tanto a los capsaicinoides como a los colorantes, ya que su selectividad a esas condiciones es muy baja y, por otro lado, los solubiliza en grandes cantidades.

A partir de todo esto, es lógico pensar que el dióxido de carbono a densidades bajas (bajo poder solvente) tenga la capacidad de solubilizar únicamente a moléculas muy afines a él, esto es, a moléculas no polares y/o de bajo peso molecular.

Sin embargo, no resulta predecible el hecho de que el dióxido de carbono a densidades bajas disuelva mejor los capsaicinoides que los colorantes, cuando estos últimos son mucho menos polares. Sin embargo, además de la polaridad, el peso molecular es otro factor importante a considerar. La capsantina y la capsorubina, al estar esterificadas, tienen un peso molecular mucho mayor al de la capsaicina; 948, 964 y 305.4 g/mol respectivamente. Esto no sólo desfavorece su solubilidad en el dióxido de carbono, sino que dificulta su difusión entre los poros de la matriz al ser extraídos a partir de la harina.

Por otro lado, los resultados parecen indicar que la selectividad en los rendimientos de extracción es altamente influenciada por impedimentos de la matriz al transporte. De ahí que es posible establecer la hipótesis de que las

interacciones de la matriz con los colorantes son superiores a las que existen con los capsaicinoides y de tal magnitud que son imposibles de ser eliminadas a densidades bajas. El hecho de que el aumento en la solubilidad de los colorantes en la mezcla no sea relevante al utilizar modificadores, aún suponiendo que estos últimos logren la eliminación de los impedimentos de la matriz, puede deberse entonces a que no son afines a los modificadores con los que se trabajó, ya que todos los utilizados tienen un carácter mucho más polar que el de los colorantes.

De ser el caso, el aumento en la solubilidad de los colorantes al usar modificadores a partir de la harina de chile se debe, en mucho mayor grado, a la eliminación de los impedimentos de la matriz, que a un aumento de la solubilidad de los mismos en la mezcla dióxido de carbono-modificador.

Tal y como se puede observar en la figura 27, la utilización de modificadores favorece notablemente la extracción de compuestos que absorben a 280 nm. Al haber obtenido resultados indicativos de una mejor extracción de estos compuestos depositados en perlas con la utilización de modificadores, en comparación con la extracción con dióxido de carbono sin modificador, también a partir de las perlas, podemos afirmar con confianza que los modificadores efectivamente logran una mayor solubilidad de estos compuestos; es decir, los compuestos que absorben a 280 nm son más solubles en mezclas de dióxido de carbono-modificador (en diferentes grados) que con el dióxido de carbono puro, a pesar de que dichas mezclas se encontraban en un punto cercano, pero por debajo del punto crítico.

Algunos aspectos en la extracción con acetonitrilo a partir de harina y a partir de las perlas son de gran interés. Se puede observar que la curva de la extracción de acetonitrilo a partir de perlas, llega a un equilibrio en aproximadamente 15 min, tiempo en el que se alcanza la capacidad máxima de extracción bajo las condiciones manejadas. Por otro lado, en la extracción con acetonitrilo a partir de la harina, se llega a un valor de absorbancia cercano al máximo conseguido en la extracción a partir de las perlas en un lapso de 45 minutos. En la extracción a partir de una matriz natural, entran en juego procesos de difusión y es lógico pensar que una misma cantidad de analitos serán extraídos

en un mayor tiempo que cuando no se tiene la matriz presente; sin embargo, también podría pensarse, en este caso, que durante los 45 minutos de extracción el acetonitrilo también influye en la distribución de la matriz de modo que conforme pasa el tiempo de contacto, los impedimentos de la misma son poco a poco eliminados y los analitos son más fácilmente extraídos. Es probable que el modificador penetre lentamente en la matriz aumentando el diámetro de poros y la difusión.

La extracción con la mezcla que contiene etanol 5.7% mol a partir de perlas, resultó ser consistentemente poco menos eficiente que al utilizar acetonitrilo; al no estar presente la matriz en este caso, esta diferencia se atribuye exclusivamente a una mayor afinidad de los solutos hacia la mezcla con acetonitrilo, en comparación con etanol. Por otra parte, los resultados de la extracción con dióxido de carbono-etanol 5.7% mol a partir de la harina indican que a pesar de que los solutos son similarmente solubles en esta mezcla que en la mezcla con acetonitrilo, el etanol no logra eliminar los impedimentos de la matriz igual que el acetonitrilo y la extracción, por lo tanto, es mucho más deficiente. Por último, la mezcla dióxido de carbono-metanol 5.8% mol generó una extracción un poco más deficiente que aquella con etanol a partir de perlas, y resultó ser la más deficiente en términos de lograr la eliminación de los impedimentos de la matriz y facilitar la solubilidad.

En el caso de la extracción de colorantes se observa también un aumento en la cantidad extraída al utilizar modificadores; sin embargo, el incremento no es tan notorio como en el caso de los capsaicinoides a la densidad establecida. Cuando se partió de perlas recubiertas con la oleoresina se observó que las mezclas con los distintos modificadores aumentaron la cantidad de colorantes extraídos de manera muy similar. Quizás el metanol fue el que generó extracciones ligeramente menos eficientes que en los otros dos casos. Por otro lado, los resultados de las extracciones a partir de la harina hacen pensar que al igual que en el caso de los capsaicinoides, la extracción de los colorantes también se encuentra limitada por impedimentos de la matriz. Todo lo anterior nos lleva a suponer que la diferencia en los resultados registrados en las extracciones a partir de la matriz con los distintos modificadores, no pueden atribuirse a diferencias en

la solubilidad de los colorantes en las distintas mezclas, sino a la capacidad de los modificadores para lograr una redistribución de la matriz que rompa cualquier interacción posible con los solutos. En cuanto a esto último, el acetonitrilo resultó ser, una vez más, el cosolvente más exitoso, seguido por el etanol y, finalmente, por el metanol.

Dado que el método de contribución de grupos para la estimación de los parámetros de solubilidad no considera la utilización de modificadores junto con el dióxido de carbono supercrítico, es necesario tratar de entender los resultados en términos cualitativos referidos a las características de cada uno de los solutos y modificadores utilizados con enfoque a las fuerzas intermoleculares que predominan en cada uno de ellos.

Para ello, se analizan a continuación las características de cada uno de los analitos de interés y de los modificadores.

La capsaicina contiene varios grupos funcionales en su molécula con momento dipolo permanente tales como el grupo eter (1.2 debyes), el grupo hidroxilo (1.7 debyes) y los grupos =N-H (0.8-1.4 debyes) y -C=O (2.7 debyes) que conforman, al estar unidos, el grupo amida; de todos estos grupos funcionales, el que tiene el mayor momento dipolo es el grupo amida en el cual existe una carga parcial positiva en el átomo de carbono, producto de su unión a un oxígeno y un nitrógeno, ambos átomos más electronegativos y cargados con una carga parcial negativa. Todos los grupos anteriormente mencionados le confieren a la molécula de capsaicina un cierto carácter polar a pesar de la cadena lateral hidrocarbonada que contiene. Por otro lado, el grupo -OH de la molécula puede fungir como aceptor o donador fuerte de protones, comportándose así como ácido o como base. Las amidas con -N-H son donadores medios de protones y pueden actuar también como aceptores, mientras que el grupo éter tiene una ligera capacidad de aceptar protones. Los compuestos fuertemente donadores interactúan con compuestos aceptores de protones.

Por otra parte, los colorantes contienen grupos -C=O con momentos dipolo permanentes de 2.7 debyes y al encontrarse esterificados con ácidos grasos, contienen también grupos éster, que tienen un momento dipolo permanente (1.8

debyes) y que tienen una cierta capacidad para actuar como grupos aceptores de protones.

Por todo ello, sería lógico pensar que tanto la capsantina como la capsorubina tienen un cierto grado de polaridad; sin embargo, debemos tomar en cuenta que la esterificación con ácidos grasos de cadena larga les disminuye la polaridad.

El metanol y el etanol son ambos disolventes fuertemente aceptores o donadores de protones, y su grupo hidroxilo contiene un momento dipolo permanente de 1.7 debyes.

Finalmente, el grupo nitrilo del acetonitrilo, tiene un momento dipolo permanente de gran importancia en magnitud, esto es 3.5 debyes, el doble del valor del momento dipolo permanente de los alcoholes.

Después de analizar todas estas características, en el caso de la extracción de capsaicinoides, las fuerzas intermoleculares resultantes de la presencia de dipolos permanentes entre modificador y soluto tienen un mayor peso que las fuerzas generadas por los grupos capaces de aceptar o donar protones. Esto es, el acetonitrilo, al contener un grupo con un dipolo permanente de importancia, interactúa con los grupos funcionales con dipolos permanentes de la capsaicina de manera que la extracción resulta ser mejor que al utilizar los alcoholes, cuya interacción con la capsaicina se da principalmente gracias a los grupos capaces de donar y de aceptar protones presentes tanto en los cosolventes como en la capsaicina. Si bien es cierto que los alcoholes también tienen un dipolo permanente, todas las fuerzas intermoleculares en conjunto no logran generar una afinidad de la misma magnitud que la que se logra con el acetonitrilo. En ello influye el hecho de que el momento dipolo de este disolvente es, como ya se dijo, el doble del de los alcoholes.

En el caso de los colorantes, por otro lado, la diferencia en el aumento de la solubilidad al utilizar cada uno de los modificadores no es tan notoria. Aparentemente, la afinidad de los colorantes hacia el acetonitrilo, determinada por los momentos dipolo permanentes de sus grupos éster y $-C=O$, resulta similar a la que tienen hacia los alcoholes gracias a sus grupos éster que tienen la capacidad

de aceptar protones e interactuar con los alcoholes, los cuales funcionan, en este caso, como donadores de protones.

Debemos destacar el hecho de que la diferencia entre los valores de momento dipolo permanente en debyes entre los colorantes y la capsaicina no es en realidad notoria. El hecho de que la capsaicina sea más soluble en la mezcla con acetonitrilo que las moléculas de colorantes se puede deber a que los pigmentos tienen cadenas de ácidos grasos esterificadas, lo cual puede impedir el acercamiento de las moléculas de acetonitrilo y, por lo tanto, ser un impedimento para las interacciones a partir de momentos dipolo que de otra forma podrían llevarse a cabo con mayor facilidad.

Finalmente, la mayor capacidad del acetonitrilo para eliminar las limitaciones de la matriz, en comparación con las del metanol y etanol, resulta especialmente difícil de analizar debido a que en una matriz natural, las interacciones moleculares que pueden darse son muchas y de muy diferentes tipos. Podría sin embargo considerarse un efecto importante de hinchamiento de la matriz por parte del acetonitrilo en comparación con los alcoholes.

En la figura 30 se comparan, en forma gráfica, las extracciones con acetonitrilo y hexano con las extracciones supercríticas más exitosas en términos de la selectividad y la cantidad de los compuestos extraídos, esto es, la extracción con dióxido de carbono a 0.95 g/ml y la extracción con la mezcla dióxido de carbono-acetonitrilo 5.4% mol, la cual se manejó a una densidad de 0.5 g/ml, así como también la extracción con dióxido de carbono sin modificador.

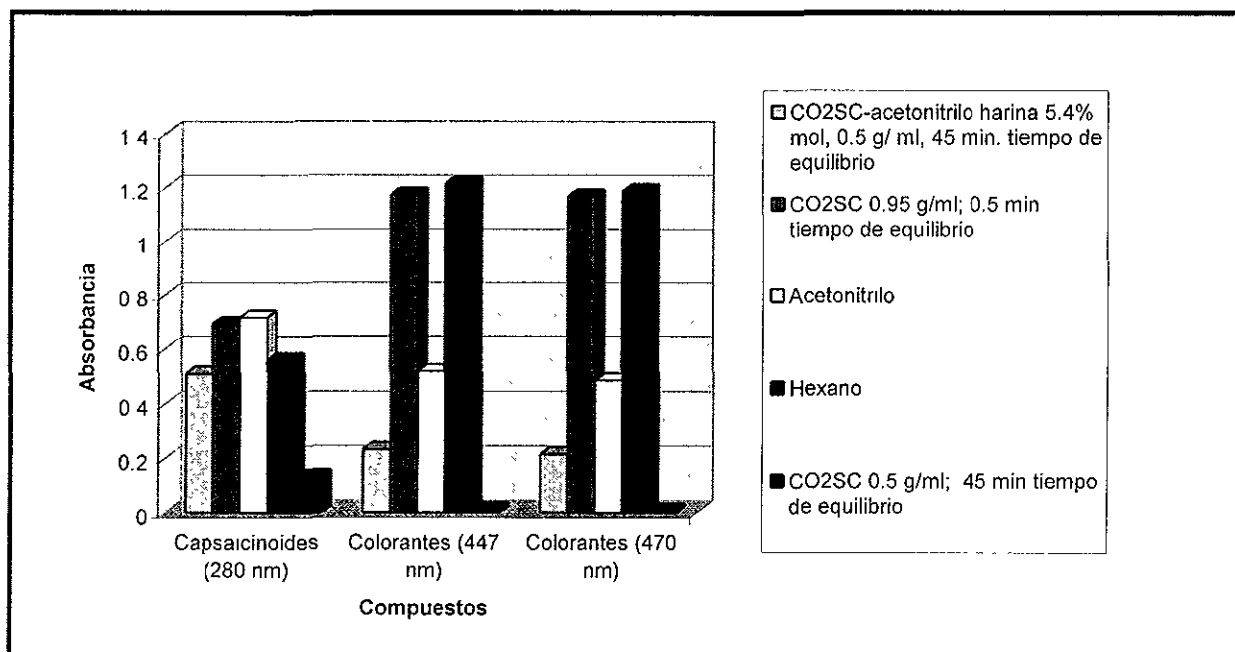


Fig 30. Gráfica de comparación entre las extracciones con disolventes, la extracción con dióxido de carbono supercrítico a 0.95 g/ml y la extracción con dióxido de carbono-acetonitrilo 5.4% mol, 0.5 g/ml, después de 15 minutos de tiempo de equilibrio.

En la gráfica anterior, se reporta el valor de absorbancia generado a partir de la mezcla dióxido de carbono - acetonitrilo 5.4% mol a partir de la harina a un tiempo de contacto de 45 minutos, así como los resultados obtenidos de las extracciones más representativas con dióxido de carbono sin modificador y aquellos obtenidos de la extracción con disolventes orgánicos.

Resulta evidente que la extracción de los colorantes con dióxido de carbono supercrítico a 0.95 g/ml es prácticamente tan eficiente como la extracción de los mismos con hexano, ya que en la extracción supercrítica se extrajeron aproximadamente el 95% de lo que se extrajo con el disolvente. Por otro lado, en la extracción de los colorantes con dióxido de carbono supercrítico a 0.5 g/ml sin modificador se extrajeron únicamente el 1.06% de los colorantes en relación con hexano y el 1.1% de los colorantes extraídos a una densidad de 0.95 g/ml, demostrando que el dióxido de carbono supercrítico a 0.5 g/ml no tiene el suficiente poder solvente para extraer eficientemente los colorantes y superar las interacciones probables de los mismos con la matriz.

De la extracción de capsaicinoides con dióxido de carbono supercrítico a 0.95 g/ml se extrajo el 96.7% de lo extraído con acetonitrilo, por lo que podemos decir que las eficiencias de extracción en ambos casos son muy similares. En la extracción con dióxido de carbono supercrítico a 0.5 g/ml, sin modificador, se logró extraer solo el 18.7% de lo que se logró extraer al utilizar acetonitrilo, y el 19.3% de lo extraído con dióxido de carbono a densidad de 0.95 g/ml.

Por otro lado, al utilizar la mezcla dióxido de carbono-acetonitrilo 5.4% mol a una densidad más baja (0.5 g/ml), a partir de harina, la extracción de los capsaicinoides resultó ser menos eficiente ya que se extrajo el 71.3% de lo que se logró extraer con acetonitrilo, incluso un valor menor al registrado en la extracción con hexano. Sin embargo, ésta resultó ser la extracción con dióxido de carbono más exitosa en el sentido que generó una mayor extracción de capsaicinoides a densidades bajas a partir de la harina de chile. También, por otro lado, fue la más exitosa en términos de selectividad en comparación con las demás extracciones esquematizadas en la gráfica anterior, ya que se logró extraer el 71.3% de capsaicinoides respecto a la extracción con acetonitrilo, pero se extrajo sólo el 19.2% de los colorantes que se extrajeron con hexano.

Los valores tomados en cuenta anteriormente en cuanto a las extracciones dióxido de carbono-acetonitrilo, han sido los generados de las extracciones a partir de la harina para poder hacer una comparación válida entre dichas extracciones y aquellas en las que se trabajó con dióxido de carbono a densidades altas y solventes orgánicos.

Con estos resultados como antecedentes, pueden tomarse decisiones importantes respecto a la extracción de colorantes y capsaicinoides de los frutos de *Capsicum annuum*; si lo que se busca es obtener un extracto con altos rendimientos de los compuestos de interés, sin importar la selectividad, se recomienda entonces realizar una extracción supercrítica a densidades altas, con las ventajas ecológicas, toxicológicas y operativas ya discutidas previamente. Si lo que se busca es una extracción selectiva que genere extractos con un contenido predominante de algunos de los compuestos, muy difícil de conseguir con un solo disolvente orgánico (como generalmente se trabaja en las plantas industriales),

entonces se recomienda realizar una extracción supercrítica a densidades bajas utilizando acetonitrilo como modificador; ello implica la obtención de un extracto con alto contenido de capsaicinoides. Si lo que se busca es la obtención de los colorantes con la menor cantidad posible de compuestos pungentes, también la extracción descrita anteriormente es recomendable como primer paso de extracción, ya que elimina una considerable parte de los capsaicinoides en la muestra y ésta puede ser seguidamente extraída con dióxido de carbono a densidades altas, extracción que tal y como aquí se comprobó, es eficiente para el caso de los colorantes

8. CONCLUSIONES

- ◆ Las xantofilas se encuentran efectivamente esterificadas con ácidos grasos según se desprende de las capas finas realizadas, así como de su gran solubilidad en hexano.
- ◆ Los disolventes estudiados (acetonitrilo y hexano) presentan diferentes selectividades hacia los analitos de interés; el acetonitrilo mostró una preferencia notoria hacia los capsaicinoides, mientras que el hexano la tiene hacia los colorantes.
- ◆ El poder solvente del dióxido de carbono supercrítico varía según su densidad. A densidades altas, tiene la capacidad de imitar a un mayor número de disolventes que a densidades bajas y disolver, por lo tanto, una mayor cantidad de solutos; a densidades bajas es más selectivo.
- ◆ El dióxido de carbono, a densidades altas, de alrededor de 0.95 g/ml, tiene la capacidad de extraer eficientemente tanto los colorantes como los capsaicinoides de la harina de los frutos de *Capsicum annuum* con la que se trabajó. Los resultados obtenidos de esta extracción son comparables a los rendimientos obtenidos a partir de las extracciones realizadas con disolventes orgánicos.
- ◆ A densidades bajas, el dióxido de carbono muestra cierta selectividad hacia la extracción de capsaicinoides sobre la extracción de los pigmentos.
- ◆ Los resultados obtenidos de las extracciones con dióxido de carbono supercrítico y con mezclas dióxido de carbono-modificador, a partir de harina y perlas recubiertas con oleoresina, hacen pensar que existen ciertas

interacciones de la matriz que limitan la extracción de los pigmentos y capsaicinoides.

- ◆ Con los modificadores analizados se logró un aumento en los rendimientos de extracción de capsaicinoides y colorantes a partir de la harina de chile.
- ◆ El modificador más exitoso, en términos del aumento en los rendimientos y selectividad en la extracción, resultó ser el acetonitrilo, seguido por el etanol y, finalmente, por el metanol.
- ◆ El aumento de la solubilidad de los solutos en la mezcla dióxido de carbono-modificador (así como su selectividad en cualquier solvente), depende de las características únicas que asume la mezcla; sin embargo, puede entenderse a partir de las fuerzas intermoleculares que se establecen entre el modificador y los solutos.
- ◆ Dado que el acetonitrilo resultó ser el mejor modificador para lograr el aumento en la extracción de capsaicinoides, puede pensarse que las fuerzas que se establecen entre ellos a partir de los momentos dipolo permanentes, tienen una mayor importancia en la extracción de estos analitos que las fuerzas ocasionadas por los grupos aceptores y donadores de protones.
- ◆ La extracción de los colorantes a densidades bajas resultó ser deficiente con dióxido de carbono supercrítico sin modificador debido a que tienen pesos moleculares altos y a probables interacciones de dichos pigmentos con la matriz, que no logran superarse dado el bajo poder solvente del dióxido de carbono en estas condiciones.
- ◆ No se registró un aumento relevante en la eficiencia de la extracción de los colorantes a densidades bajas aún con la utilización de modificadores, debido

a que los cosolventes utilizados, siendo más polares que los pigmentos, no presentan la afinidad necesaria para lograr dicho aumento.

- ◆ Los resultados obtenidos al analizar la extracción con perlas y harina, con y sin modificadores, sugieren que estos últimos no sólo influyen en la solubilidad de los analitos en la mezcla en comparación con el dióxido de carbono supercrítico sin modificador sino que, además, influyen en la distribución de la matriz de modo que logran después de cierto tiempo de contacto variable según el modificador, eliminar en alto grado los impedimentos de la matriz; en cuanto a esto último, el acetonitrilo también resultó ser el modificador más exitoso.

- ◆ Se puede lograr una selectividad de importancia en la extracción supercrítica de capsaicinoides y colorantes a densidades bajas al utilizar modificadores, especialmente acetonitrilo.

- ◆ La extracción de colorantes y capsaicinoides con dióxido de carbono supercrítico, se presenta como una alternativa importante sobre la extracción de los mismos con disolventes orgánicos ya que, si bien los rendimientos de extracción, aunque similares, no son mayores en el caso de la extracción supercrítica; esta última representa ventajas ecológicas y operativas ya discutidas en el presente trabajo.

- ◆ Es probable que pueda lograrse la extracción selectiva de los colorantes y capsaicinoides contenidos en los frutos de *Capsicum annuum* a partir de un primer paso de extracción con una mezcla dióxido de carbono-acetonitrilo a densidades bajas, seguido de un segundo paso de extracción con dióxido de carbono a densidades del orden de 0.95 g/ml.

9. PERSPECTIVAS.

La presente investigación, así como las conclusiones que de ella se han derivado, pueden servir como precedente de nuevas indagaciones orientadas a una exploración más profunda del tema que nos concierne. De entre ellas, podemos mencionar las siguientes:

- ◆ Análisis cromatográfico por HPLC de los extractos obtenidos con dióxido de carbono supercrítico, mezclas de dióxido de carbono-modificadores y disolventes orgánicos, con el objetivo de lograr una comparación más detallada en cuanto a las características de los componentes extraídos, incluyendo la pureza de los extractos y la selectividad generada de las diferentes extracciones.
- ◆ Estudio de solubilidad de los colorantes y los capsaicinoides puros en dióxido de carbono supercrítico y con mezclas del mismo con modificadores, con el propósito de esclarecer más finamente, las posibles interacciones que pudieran darse entre los solutos y el solvente de extracción.
- ◆ Estudio de la extracción de colorantes y capsaicinoides con mezclas de dióxido de carbono y modificadores polares diferentes a los manejados en la presente investigación.
- ◆ Análisis de la optimización de la extracción de los pigmentos por medio de mezclas de dióxido de carbono y modificadores no polares a diferentes densidades.
- ◆ Estudio de la extracción supercrítica de la capsantina y la capsorubina no esterificados.

- ◆ Análisis de la extracción supercrítica con y sin modificadores de los capsaicinoides y colorantes de otras especies de frutos *Capsicum annum*.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y HEMEROGRÁFICAS.

- Albaladejo, F.; García, J., 1993, "Proceso industrial de la oleorresina del pimentón". En *La oleorresina del pimentón*. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Murcia. p. 27-35.
- Almela, L.; López-Roca, J.M.; Candela, M.E.; Alcázar, M.D., 1990, "Separation and Determination of Individual Carotenoids in a *Capsicum* Cultivar by Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatography*, 562: 95-106.
- A.O.A.C. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemistry, 6th Edition, 1990, 45.1.04.
- A.O.A.C. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemistry, 15th Edition, Ed. Kenneth Helrich, USA, 1990, 941.11, 941.12, 920.169, 920.172.
- Atkinson, B.; Maviturna, F.(eds)., 1991, "Solvent Extraction (Carbon Dioxide)". En *Upstream Processing in Biochemical Engineering & Biotechnology Handbook*. Chapter 15. 2nd edition. Stockton Press. p. 854-858.
- Barth, M.; Zhou, C.; Kute, K.; Rosenthal, G., 1995, "Determination of Optimum Conditions for Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids from Carrot (*Daucus Carota* L.) Tissue", *J. Agric. Food. Chem*, 43(11): 2877-2879.
- Basil, C.L. Moss, G., "Structure and Nomenclature", 1995, En Britton, G.; Liaaen, J.; Pfander, H. (eds). *Carotenoids. vol IA: Isolation and Analysis*. Birkhauser Verlag. Berlín, p. 27-44.
- Bernal, M.A.; Barceló, A.R., 1996, "5-5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-Dicapsaicin Ether, and Dehydrogenation Polymers With High Molecular Weights are the Main Products of the Oxidation of Capsaicin by Peroxidase from Hot Pepper", *J. Agric. Food Chem*, 44: 3085-3089.
- Bernal, M.A.; Calderón, A.; Pedreño, M.A.; Muñoz, R.; Barceló, A.R.; de Cáceres, M., 1993, "Dihydrocapsaicin Oxidation by *Capsicum annum* (var. annum) Peroxidase", *J. Food Sci*, 58(3): 611-613.

- Bernal, M.A.; Calderón, A.; Ferrer, M.A.; de Cáceres, F.; Barceló, R., 1995, "Oxidation of Capsaicin and Capsaicin Phenolic Precursors by the Basic Peroxidase Isoenzyme B₆ from Hot Pepper", *J. Agric. Food Chem.*, 43: 352-355.
- Betts, T., 1999, "Pungency Quantitation of Hot Pepper Sauces Using HPLC", *J. of Chemical Education*, 76(2): 240-244.
- Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H., 1995, "Carotenoids Today and Challenges for the Future". En Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (eds). *Carotenoids. vol IA: Isolation and Analysis*. Birkhauser Verlag. Berlín, p.13-26.
- Brown; Lemay; Burstein., 1993, *Química. La ciencia central*. Quinta edición. Ed. Prentice Hall. México, p. 413-416.
- Calvey, E.M.; Matusik, J.E.; White, K.D.; Betz, J.M.; Block, E., 1994, "Off-Line Supercritical Fluid Extraction of Thiosulfanates from Garlic and Onion", *J. Agric. Food. Chem.*, 42: 1335-1341.
- Camara, B.; Monéger, R., 1978, "Free and Esterified Carotenoids in Green and Red Fruits of *CAPSICUM ANNUUM*", *Phytochemistry*, 17: 91-93.
- Chang, R., 1992, *Química*. Cuarta edición. Ed. Mc Graw Hill. México. p. 442-449.
- Chávez, M.M. de; Chávez, V.A.; Roldán, A.J.; Ledesma, S.J.; Mendoza, M.E.; Pérez-Gil, R.F., 1996, "Tablas de uso práctico del valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México. Edición Internacional", Comisión Nacional de Alimentación. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Subiran. México, p. 6 A.
- Chiou, R.; Yu, Z.; Wu, P.; Chen, W.; Weng, Y., 1996, "Partial Defatting of Roasted Peanut Meals and Kernels by Supercritical CO₂ Using Semicontinuous and Intermittently Depressurized Processes", *J. Agric. Food. Chem.*, 44: 574-578.
- Chrastil, J., 1982, "Solubility of Solids and Liquids in Supercritical Gases", *J. Phys. Chem.*, 86: 3016-3021.

- Christianson, D.; Friedrich, J.; List, G.; Warner, K.; Bagley, E. Stringfellow, A.; Inglett, G., 1984, "Supercritical Fluid Extraction of Dry-Milled Corn Germ with Carbon Dioxide", *J. Food Science*, 49: 229-232.
- Clifford, A.A., 1996, "Supercritical Fluid Extraction and Chromatography". En *Downstream Processing of Natural Products*. Ed. John Wiley & Sons. Chichester, p. 241-257.
- Clifford, A.A.; Bartle, K.D., 1995, "Supercritical Fluid Extraction" En *Developments in the Isolation of Microbial Products*. p. 307-308.
- Contreras-Padilla, M.; Yahia, E.M., 1998, "Changes in Capsaicinoids During Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity", *J. Agric. Food Chem.*, 46: 2075-2079.
- Dobbs, J.M.; Wong, J.M.; Lahiere, R.J.; Johnston, K.P., 1987, "Modification of Supercritical Fluid Phase Behavior Using Polar Cosolvents", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 26: 56-65.
- Favati, F.; King, J.; Friedrich, J.; Eskins, K., 1988, "Supercritical CO₂ Extraction of Carotene and Lutein from Leaf Protein Concentrates", *J. Food Science*, 53(5): 1532-1536.
- Fedors, R.F., 1974, "A Method for Estimating Both the Solubility Parameters and Molar Volumes of Liquids", *Polymer Engineering and Science*, 14(2): 147-154.
- Fennema, O. 1993, *Química de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, p. 645.
- Fisher, C.; Focis, J., 1987, "Separation of Paprika Pigments by HPLC", *J. Agric. Food Chem.*, 35: 55-57.
- Garrido-Fernández, J.; Mínguez-Mosquera, M.I., 1983, "Pigmentos carotenoides", *Grasas y aceites*, 5: 339-343.
- Govindarajan, V.S., 1985, "Capsicum Production, Technology, Chemistry, and Quality. Part I: History, Botany, Cultivation, and Primary Processing", *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 22(2): 109-176.
- Govindarajan, V.S., 1986, "Capsicum Production, Technology, Chemistry, and Quality. Part II: Processed Products, Standars, Worl Production and Trade", *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 23(3): 207-288.

- Govindarajan, V.S., 1986, "Capsicum Production, Technology, Chemistry, and Quality. Part III. Chemistry of the Color, Aroma, and Pungency Stimuli", *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 24(3): 245-357.
- Gurdial, G.S.; Foster, N.R.; Jimmy Yun, S.L.; Tilly, K.D., 1993, "Phase Behavior of Supercritical Fluid-Entrainer Systems". En Kiran, E.; Brennecke, J.F. eds. *Supercritical Fluid Engineering Science*. 1993, ACS Symposium Series 514. Washington D.C., p.1-8.
- Hawthorne, S.B.; Galy, A.B.; Schmitt, V.O.; Miller, D.J., 1995, "Effect of SFE Flow Rate on Extraction Rates: Classifying Sample Extraction Behavior", *Analytical Chemistry*, 67(5): 2723-2732.
- Henderson, D.E.; Henderson, S.K., 1992, "Thermal Descomposition of Capsaicin. 1. Interactions with Oleic Acid at High Temperatures", *J. Agric. Food Chem.*, 40: 2263-2268.
- Hoffman, P.G.; Lego, M.C.; Galetto, W.G., 1983, "Separation and Quantitation of Red Pepper Major Heat Principles by Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography", *J. Agric. Food Chem.*, 31: 1326-1330.
- Ittah, Y.; Kanner, J.; Granit, R., 1993, "Hydrolysis Study of Carotenoid Pigments of Paprika (*Capsicum annuum* L. variety Lehava) by HPLC/ Photodiode Array Detection", *J. Agric. Food Chem.*, 41: 899-901.
- Knez, Z.; Steiner, R., 1992, "Solubility of Capsaicin in Dense CO₂", *J. Supercrit. Fluids*, 5: 251-255.
- Knipe, C.; Miles, W.; Rowland, F.; Randall, L., 1993, "The Entwined Influence of Instrumentation and Sample upon an SFE Method". En *Designing a Sample Preparation Method that Employs Supercritical Fluid Extraction*. Chapter 2. Hewlett-Packard Company. U.S.A, p. 13-24.
- Krukonis, V.J., 1985, "Supercritical Fluid Extraction in Flavor Applications". En Bills, D.D. Mussinan.C.J. eds., *Characterization and Measurement of Flavor Compounds*. ACS, Symposium Series. American Chemical Society. Washington. D.C. p.155-175.
- Larson, K.A.; King, M.L., 1986, "Evaluation of Supercritical Fluid Extraction in the Pharmaceutical Industry", *Biotechnology Progress*, 2(2): 73-82.

- Liang, J.; Yeh, A., 1991, "Process Conditions for Separating Fatty Acid Esters by Supercritical CO₂", *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 68(9): 687-692.
- Lomelí, A., 1986, *El Chile y otros Picantes*. Ed. Prometeo Libre. México, p. 9-10, 56-58.
- Mínguez-Mosquera, M.I.; Hornero-Méndez, D., 1994, "Formation and Transformation of Pigments During the Fruit Ripening of *Capsicum annuum* Cv. Bola and Agridulce", *J. Agric. Food Chem.*, 42: 38-44.
- Montanari, L.; King, J.W.; List, G.R.; Rennik, K.A., 1994, "Selective Extraction and Fractionation of Natural Phospholipid Mixtures by Supercritical CO₂ and Cosolvent Mixtures". En *Proceeding of the International Symposium on Supercritical Fluids*, Strasbourg, t.2, p. 497-504.
- Norton, S.A., 1998, "Useful Plants of Dermatology. V. *Capsicum* and capsaicin", *J. of the American Academy of Dermatology*, 39(4): 626-628.
- Peplonski, R.; Kwiatkowski, J.; Jarosz, M. Lisicki, Z., 1994, "Extraction of Some Components for Flavoring, Colouring and Preservation of Food Using Supercritical Carbon Dioxide", *Proceeding of the International Symposium on Supercritical Fluid*. Strasbourg, 2: 435-440.
- Perrut, M., 1990, "Les Fluides Supercritiques: Applications en Abondance", *Informations Chimie*, 321: 166-176.
- Perry, R.H.; Chilton, C.L., 1987, *Biblioteca del ingeniero químico*. Vol. V. Quinta edición. Ed. Mc Graw Hill. México, p. 19-47-19-48.
- Phelps, C.L.; Smart, N.G.; Wai, C.M., 1996, "Past, Present and Possible Future Applications of Supercritical Fluid Extraction Technology", *J. of Chemical Education*, 73(12):1163-1168.
- Philip, T.; Nawar, W.; Francis, F., 1971, "The Nature of Fatty Acids and Capsanthin Esters in Paprika", *J. Food Science*, 36: 98-100.
- Randolph, T.W., 1990, "Supercritical Fluid Extractions in Biotechnology", *TIBTECH*, 8: 78-82.
- Rouhi, A.M., 1998, "Vanilloids: Hot Relief for Pain", *Chemical and Engineering News*, 76(4): 31-34.

- Rylski, I., 1986, "Pepper (Capsicum)". En *CRC Handbook of Fruit Set and Development*. p. 341-354.
- Sasián, R., 1992, "Capsicum en México, situación actual", *Tecnol. Aliment.*, 27: 50-56.
- Sato, M.; Goto, M.; Hirose, T., 1995, "Fractional Extraction with Supercritical Carbon Dioxide for the Removal of Terpenes from Citrus Oil", *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34: 3941-3946.
- Schiedt, K.; Liaan-Jensen, S., 1995, "Isolation and analysis". En Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (eds). *Carotenoids. vol IA: Isolation and Analysis*. Birkhauser Verlag. Berlín, p. 81-107.
- Skerget, M.; Knez, Z., 1997, "Solubility of Binary Solid Mixture β -Carotene-Capsaicin in Dense CO_2 ", *J. Agric. Food Chemistry*, 45(6): 2066-2069.
- Smith, R.; Burford, M., 1992, "Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Volatile Constituents from a Model Plant Matrix", *J. Chromatography*, 600: 175-181.
- Spanos, G.A.; Chien, H.; Schwartz, S.J., 1993, "Supercritical CO_2 Extraction of β -Carotene from Sweet Potatoes", *J. Food Science*, 58(4): 817-820.
- Stahl, E.; Schütz, E.; Mangold, H., 1980, "Extraction of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide", *J. Agric. Food. Chem.*, 28: 1153-1157.
- Subra, P.; Castellani, S.; Garrabos, Y., 1994, "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carotenoids from Carrots". En *Proceeding of the International Symposium on Supercritical Fluids*. Strasbourg, t2, p. 447-452.
- Sunol, A.K.; Hagh, B.; Chen, S., 1985, "Entrainer Selection in Supercritical Extractions". En *Process Technology Proceedings. Supercritical Fluid Extraction*. Penminger, J.M.; Radosz, M.; Mc Hugh, M.A.; Krukonis, V.J. eds. Elsevier Science Publishers, N.Y. p. 451-464.
- Susuki, T.; Iwai, K., 1984, "Constituents of Red Pepper Species", *The Alkaloids*. Academic Press, 23: 227-299.
- Taniguchi, M.; Tsiji, T.; Shibata, M.; Kobayashi, T., 1985, "Extraction of Oils from Wheat Germ with Supercritical Carbon Dioxide", *Agric. Biol. Chem.*, 49(8): 2367-2372.

- Yamaguchi, K.; Murakami, M.; Nakano, H.; Konosu, S.; Kokura, T.; Yamamoto, H.; Kosaka, M.; Hata, K., 1986, "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Oils from Antarctic Krill", *J. Agric. Food. Chem.*, 34: 904-907.
- Yao, J.; Nair, M.G.; Chandra, A., 1994, "Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Scotch Bonnet (*Capsicum annuum*) and Quantification of Capsaicin and Dihydrocapsaicin", *J. Agric. Food Chem.*, 42: 1303-1305.
- Yuste, F.; Castro, V.; Walls, F., 1979, "Determinación de capsaicina en algunas variedades mexicanas del género *Capsicum*", *Rev. Soc. Quim. Mex.*, 24(4): 166-167.