

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EFFECTO DE LA APLICACION DE ENZIMAS PEROXIDASAS EXOGENAS SOBRE EL
CONTENIDO DE CAROTENOIDES Y CAPSAICINOIDES EN HARINA DE CHILE**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
JUANA SALINAS CRUZ



TUTOR: DRA. SANDRA NARANJO MODAD AÑO:2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (QUÍMICAS)

El trabajo experimental fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo del Grupo Industrial Resistol en Lerma, Estado de México, con la asesoría de la Dra. Sandra Naranjo Modad, Dr. Vicente Ridaura Sanz, M. en C. Santiago Capella Vizcaíno, Dr. Alfredo Vázquez Martínez.

Este proyecto recibió los siguientes apoyos:

Beca para estudios de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT)

Beca para estudios de maestría otorgada por la Asociación Nacional de la Industria Química, A. C.

AGRADECIMIENTOS.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Lerma Estado de México, por el apoyo recibido en la realización de la parte experimental de este trabajo de investigación.

A la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de cursar mis estudios de postgrado.

A la Dra. Sandra Naranjo Modad, Dr. Vicente Ridaura Sanz, M. en C. Santiago Capella Vizcaíno, Dr. Alfredo Vázquez Martínez, quienes me orientaron y me apoyaron en todo momento.

Dedico esta tesis a: Dr. R. Bernard, Profª. Rosa Ma. Cruz Martínez, Dr. A. Noyola, mis hermanos Rocío, Rubén, Norma, Eileen, Ana Lilia, mis amigos Alberto, Evodio, Héctor, Isela.

INDICE

ABREVIATURAS	viii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1. <i>Capsicum annuum</i>	5
2.1.1. Botánica de <i>Capsicum annuum</i>	5
2.1.2. Chile guajillo.	8
2.1.3. Usos del chile.	8
2.1.4. Limitaciones industriales del uso del chile como fuente de colorantes	9
2.2. Peroxidasas.	10
2.2.1. Reacciones catalizadas por peroxidasas	13
2.2.1.1. Reacciones de deshidrogenación oxidativa	13
2.2.1.2. Halogenación oxidativa	15
2.2.1.3. Desproporción de peróxido de hidrógeno	15
2.2.1.4. Reacciones de transferencia de oxígeno	15

2.2.2. Peroxidasas en <i>Capsicum annuum</i>	16
2.2.2.1. Actividad peroxidasa durante la maduración de <i>Capsicum annuum</i>	20
2.3. Pigmentos en <i>Capsicum annuum</i>	23
2.3.1. Distribución	26
2.3.2. Metabolismo	27
2.3.3. Aplicaciones de los carotenoides.	31
2.3.4. Factores que afectan a los Carotenoides de <i>Capsicum annuum</i>	31
2.4. Capsaicinoides en <i>Capsicum annuum</i>	35
2.4.1. Lugar de biosíntesis en frutos.	36
2.4.2. Metabolismo.	39
2.4.3. Algunos aspectos importantes de los Capsaicinoides.	44
3. MATERIALES Y METODOS	46
3.1. Material biológico	46
3.2. Reactivos	46
3.3. Equipo	46
3.4. Métodos	47
3.4.1. Determinación de la Concentración de Peróxido de Hidrógeno(University of Quebec, 2001).	47
3.4.2. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir de muestra seca utilizando acetona como disolvente	47
3.4.3. Determinación de capsaicina a partir de muestra seca mediante metodología propuesta por Collins <i>et al.</i> (1995)	49
3.4.4. Extracción de capsaicina y carotenoides empleando acetona y cloroformo con centrifugación de la muestra	50
3.5. Estudios de la reacción de oxidación de la capsaicina mediante peroxidasa de Nabo	52
3.5.1. Efecto de la adición de peróxido de hidrógeno sobre los carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina en ausencia de enzima	52
3.5.2. Determinación de la capsaicina soluble en la mezcla de reacción	53
3.5.3. Ensayos preliminares con peroxidasa de Nabo y Harina de chile	53

3.5.4. Ensayo con estándar de capsaicina utilizando H ₂ O ₂ 20 mM	54
3.5.5. Reacción enzimática con estándar de capsaicina, con mayor tiempo de duración ..	55
3.5.6. Reacción enzimática con estándar de capsaicina, ensayo para investigar saturación por exceso de capsaicina.....	56
3.6. Optimización de la reacción enzimática	56
3.6.1. Ensayo con estándar de capsaicina y enzima peroxidasa de Nabo, utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno	57
3.6.2. Reacción de oxidación de capsaicina con peroxidasa de Nabo en diferentes tiempos de reacción	57
3.6.3. Ensayo con harina de chile y estándar de capsaicina, empleando condiciones de reacción optimizadas	57
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	59
4.1. Determinación de la Concentración de Peróxido de Hidrógeno	59
4.2. Elección y optimización del método de extracción de carotenoides y capsaicina a partir de la suspensión acuosa donde se lleva a cabo la reacción	60
4.3. Estudios de la reacción de oxidación de la capsaicina mediante peroxidasa de Nabo	65
4.3.1. Efecto de la adición de peróxido de hidrógeno sobre los carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina en ausencia de enzima	66
4.3.2. Determinación de la capsaicina soluble en la mezcla de reacción	68
4.4. Ensayos preliminares con Harina de chile	70
4.4.1. Ensayo con estándar de capsaicina utilizando H ₂ O ₂ 20 mM	72
4.4.2. Reacción enzimática con harina de chile y de peróxido de hidrógeno 20 mM	75
4.4.3. Reacción enzimática con estándar de capsaicina, con mayor tiempo de duración	79
4.4.4. Reacción enzimática con estándar de capsaicina, ensayo para investigar saturación por exceso de capsaicina	81
4.5. Optimización de la reacción enzimática	84
4.5.1. Ensayo con estándar de capsaicina y enzima peroxidasa de Nabo, utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno	84
4.5.2. Reacción enzimática a diferentes tiempos de reacción	87

4.5.3. Resultados del ensayo con harina de chile y estándar de capsaicina, empleando condiciones de reacción optimizadas	90
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	94
6. REFERENCIAS CITADAS	96
7. ANEXOS	105

ABREVIATURAS

AMD	Degeneración macular de la retina
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTA	American Spice Trade Association
<i>C. annuum</i>	<i>Capsicum annuum</i>
CPO	<i>Caldariomyces fumago</i>
DDIF	Días después de iniciada la floración.
ER	Reticulo endoplásmico
GRA	Grado reactivo analítico
g/Kg	Gramos por Kilogramo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión.
IAA	Precusores de los capsaicinoides
mg	Miligramos
mM	Milimolar
pI	Punto isoeléctrico
POD	Peroxidasa
SHU	Unidades de picor Scoville
SD	Desviación estándar
t. r.	Tiempo de retención
uv	Ultravioleta
U	Unidad enzimática, micromoles de sustrato oxidados por miligramos de enzima por minuto.
U/mg	Unidades enzimáticas por miligramo de enzima.

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pagina
1	Hemo peroxidadas más comunes y sus funciones biológicas (van de Velde, <i>et al.</i> 2001).....	12
2	Distribución de la actividad peroxidasa por fraccionamiento subcelular en frutos de chile, Estrada <i>et al.</i> (2000).....	22
3	Evolución de compuestos fenólicos libres durante la maduración de frutos de chile (Estrada, <i>et al.</i> 2000)	43
4	Determinación de carotenoides totales y % de rojos y capsaicina en harina de chile	60
5	Efecto del H ₂ O ₂ 0.1 mM sobre el contenido de capsaicina y carotenoides totales en suspensiones acuosas de <i>C. annuum</i>	67
6	Determinación de capsaicina soluble proveniente de una suspensión de harina de chile en buffer de tris acetato, pH = 6.00.	69
7	Resultados de la determinación de capsaicina en extractos de mezcla sometida a reacción enzimática, H ₂ O ₂ 0.10 mM, 100 unidades enzimáticas, 25 °C y 14 horas de reacción.	71
8	Determinación de capsaicina en de mezcla sometida a reacción enzimática con estándar de capsaicina, con H ₂ O ₂ 20 mM, 100 unidades enzimáticas, 25 °C y 5 minutos de reacción.	73
9	Efecto del uso de peroxidasa de Nabo con [H ₂ O ₂] = 20 mM sobre la capsaicina y los carotenoides totales en harina de chile, 25 °C, 1 mL de solución enzimática (100 unidades) y 14 horas de reacción.....	76

10	Determinación de capsaicina y dehidrocapsaicina en estándares sometidos a reacción enzimática con peroxidasa de Nabo, $[H_2O_2] = 20 \text{ mM}$, 1 mL de solución enzimáticas (100 unidades), 25 °C, 14 horas de reacción.	79
11	Efecto de la concentración de capsaicina sobre la reacción enzimática, $[H_2O_2] = 20 \text{ mM}$, 1 mL de solución enzimática (100 unidades), 25 °C y 14 horas de reacción	82
12	Resultados de la determinación de capsaicina a partir de los extractos de la mezcla con estándar de capsaicina, sometida a condiciones de reacción enzimática, diferentes concentraciones de H_2O_2 , 1 mL de solución enzimática (100 unidades), 25 °C, 14 horas de reacción.	85
13	Resultados de la determinación de capsaicina a partir de los extractos de la mezcla con estándar, sometida a reacción enzimática, a diferentes tiempos de reacción (H_2O_2 1.0 mM, 100 unidades de enzima, 25 °C)	88
14	Determinación de capsaicina, carotenoides totales y porcentajes de rojos a partir del extracto de la mezcla con harina de chile y estándar de capsaicina, donde se llevo a cabo la reacción enzimática. (H_2O_2 1.0 mM, 100 unidades enzimáticas, 25 °C, 300 minutos de reacción)	90
15	Determinación de capsaicina, carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir del extracto de la mezcla con harina de chile, sometidos a reacción enzimática, ($[H_2O_2] = 1.0 \text{ mM}$, 100 unidades enzimáticas, 25 °C, 300 minutos de reacción)	91

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pagina
1	Esquema de la metodología seguida durante el desarrollo del presente trabajo experimental..... 2
2	Corte transversal de chile, en donde se pueden distinguir sus componentes (Chile pepper institute, 2003) 7
3	Ciclo de reacción de las peroxidasas (van Daurzen, <i>et al.</i> 1997) 14
4	Estructura de 5.5'-Dicapsaicina y el éter 4'-o-5-Dicapsaicina. Productos del acoplamiento oxidativo de capsaicina por peroxidasa de chile picante (Bernal, <i>et al.</i> 1996) 18
5	Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 5,5'-Capsaicina (4a) y éter 4'-o-5-Dicapsaicina (4b), a través de la reacción de acoplamiento radical-radical durante la oxidación de capsaicina por peroxidasa de chile (Bernal, <i>et al.</i> 1996b) 19
6	Actividad peroxidasa en frutos de pimiento durante los diferentes estados de desarrollo. Las barras muestran SD (Estrada, <i>et al.</i> (2000) 21
7	Cuantificación densitométrica de isoenzimas peroxidasas ácidas y básicas de fruto de pimiento Padrón en diferentes estados de desarrollo (expresados en porcentaje) (Estrada <i>et al.</i> 2000) 21
8	Estructuras de los carotenoides responsables del color en el fruto maduro de <i>Capsicum annuum</i> (Hornero, <i>et al.</i> 2000) 24
9	Ruta biosintética de carotenoides en <i>Capsicum annuum</i> . Las líneas

	punteadas incluyen la ramificación de la ruta para frutos rojos y la línea continua incluye la ruta para frutos verdes (Minguez-Mosquera, <i>et al.</i> 1999)	30
10	Diferentes estructuras de capsaicinoides (Contreras & Yahia, 1998)	35
11	Ruta de biosíntesis de la capsaicina en <i>Capsicum annuum</i> , mostrando los principales compuestos fenólicos, y la probable desviación de estos compuestos para formar compuestos similares a la lignina (Bernal <i>et al.</i> 1995).....	40
12	Cambios en el contenido de capsaicinoides, lignina y compuestos fenólicos libres durante la maduración de frutos de pimiento. Las barras muestran SD (Estrada, <i>et al.</i> 2000)	42
13	Cromatograma de la muestra de extracto de chile, obtenida mediante la extracción con acetona-cloroformo con centrifugación de la muestra a partir de una muestra en fase acuosa, 2: capsaicina (t.r. = 4.437), 1,3,4, no fueron identificados	62
14	Cromatograma del extracto de la oxidación de estándar de capsaicina con peroxidasa de Nabo; después de 14 horas de reacción a 25°C, H ₂ O ₂ 20 mM, 100 unidades enzimáticas, 25°C y 14 horas de reacción. Pico 4: capsaicina (t. r. = 4.406 minutos); pico 6: dehidrocapsaicina (t. r. = 6.19 minutos); picos: 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9 y 10, no han sido identificados	80
15	mM de capsaicina remanente y porcentaje de consumo a diferentes tiempos de reacción enzimática con peroxidasa de Nabo ([H ₂ O ₂] = 1.0 mM, 1 mL de solución enzimática (100 unidades), 25 °C)	89

INDICE DE ANEXOS

Anexo	Pagina
7.1. Desarrollo de la metodología de extracción de carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina a partir de harina de chile en suspensión acuosa	105
7.1.1. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir de muestra seca utilizando cloroformo como disolvente	106
7.1.2. Extracción y determinación de carotenoides y capsaicina a partir de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción, utilizando cloroformo como disolvente	106
7.1.3. Extracción y determinación de carotenoides y capsaicina a partir de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción, utilizando cloroformo como disolvente	108
7.1.4. Extracción de capsaicina y carotenoides empleando acetona y cloroformo con centrifugación de la muestra	109
7.2. Espectros obtenidos a partir de la determinación de carotenoides totales y % de rojos extraídos por el método de extracción 3.4.4.4.	111

RESUMEN.

Para obtener oleorresinas de chile libres de capsaicinoides, se estudiaron los efectos de la adición de enzima peroxidasa de Nabo sobre el contenido de capsaicinoides, carotenoides totales y % de rojos en harina de chile Guajillo.

Se desarrolló una metodología para la extracción y cuantificación de capsaicina, carotenoides totales y % de rojos, mediante centrifugación de la suspensión acuosa de harina de chile, se utilizó acetona y cloroformo para la extracción, espectrofotometría uv-visible y HPLC, para la cuantificación. La metodología resultó reproducible y confiable.

Se estudiaron los efectos de los reactivos que integraban la mezcla donde se llevaría a cabo la reacción enzimática en ausencia de enzima. A una concentración de H_2O_2 20 mM los carotenoides totales se degradan un 18.8 %; no existen efectos aparentes al utilizar H_2O_2 0.1 mM y 1.0 mM, a 25°C en 14 horas de reacción. No se presentó saturación de la reacción enzimática por exceso de capsaicina.

Al no observarse ningún cambio al utilizar las condiciones de reacción propuestas inicialmente se realizaron ensayos con estándar de capsaicina, H_2O_2 20 mM, en 5 minutos de reacción, obteniéndose una completa oxidación de la capsaicina disuelta en el medio de reacción. Dado que no toda la capsaicina adicionada se solubilizaba y no se oxidaba en 5 minutos, se incrementó el tiempo de reacción hasta 14 horas.

Tras lograr la completa oxidación de la capsaicina en la harina de chile, pero degradación del 18.8 % de carotenoides totales, utilizando H_2O_2 20 mM, se realizó la optimización de la reacción enzimática. Primero se realizaron ensayos con estándar de capsaicina y 100 unidades de enzima peroxidasa de Nabo, variando concentración de H_2O_2 y tiempo, encontrándose que a una concentración de peróxido de hidrógeno 1 mM y 5 horas de reacción, se logra la completa oxidación del estándar de capsaicina.

Finalmente se realizaron experimentos con harina de chile, empleando las condiciones de reacción optimizadas. La capsaicina ya no fue detectada en la harina, aparentemente no hubo degradación de los pigmentos presentes en la mezcla de reacción y se observó un ligero incremento de % de rojos, sin que se determinaran los productos de reacción, ni el perfil de carotenoides.

ABSTRACT

The effects of the addition of Horseradish peroxidase on capsaicinoids, total carotenoids and % reds, were studied, in order to obtain chili oleoresins free of capsaicinoids.

A methodology was development for the extraction and quantification of capsaicin, total carotenoids, and % reds, sample centrifugation was used, with acetone and chloroform solvents for extraction, uv-visible spectrophotometric and HPLC methods for quantification, this methodology was approach and reproducible.

Effects of reactives in mixture where the reaction will take place, were studied. With hydrogen peroxide 20 mM, total carotenoid were disappeared at 18.8 %, no effects were observed with hydrogen peroxide 0.1 mM and 1.0 mM. There wasn't saturation because excess of capsaicin, even with 5.25 mM.

Since no changes were obtained when the enzymatic reaction was performed using the reaction conditions proposed at the beginning of this research, several assays were performed using capsaicin standard, and H₂O₂ 20 mM, 5 minutes of reaction. A complete capsaicin oxidation was observed; since not all capsaicin in the mixture reaction was water soluble, and not all was oxidized, time reaction was prolonged to 14 hours.

A complete capsaicin oxidation in chili flour was obtain with H₂O₂ 20 mM, but carotenoids were degradated for about 18.8 %, we looked for better reaction conditions. First of all several assays were performed using capsaicin standard, and 100 enzymatic units of Horseradish peroxidase, using several H₂O₂ concentrations and time of reaction.

Finally, several assays were performed with chili flour, applying new optimized conditions. No capsaicin was detected, and no effects were observed on total carotenoids and % reds, but reaction products and carotenoides profile weren't determinated.

1. INTRODUCCIÓN.

En el presente trabajo de investigación se propone el uso de enzimas peroxidasas exógenas de Nabo, para inactivar el efecto pungente de los capsaicinoides, sin afectar la concentración de carotenoides totales y porcentaje de rojos en la harina de chile.

La demanda de colorantes de origen natural para su uso en alimentos, se ha incrementado en años recientes debido a que el consumidor exige la utilización de ingredientes no tóxicos. Aunado a esto es bien sabido que los carotenoides, además de proporcionar una amplia gama de colores que van del amarillo al rojo, presentan actividad de provitamina A y son auxiliares en la prevención de úlcera en el tracto digestivo, procesos degenerativos y cáncer. Es cada día más conocido su papel como antioxidantes. El chile es una de esas fuentes naturales de carotenoides, ya que proveen tanto colorantes lipo- como hidrosolubles. Sin embargo, el contenido de agentes pungentes, conocidos como capsaicinoides, limita su aplicación a alimentos condimentados o picantes y no es posible utilizarlos en productos no pungentes.

Los colorantes de chile generalmente se comercializan como un polvo seco llamado paprika o como oleorresinas extraídas con disolventes como hexano, metanol, etanol y acetona. Sin embargo la extracción de colorantes con disolventes no es selectiva y entonces las sustancias pungentes también son extraídas.

La primera etapa del proyecto se enfocó a la implementación y optimización de las metodologías para la extracción y cuantificación de capsaicina, carotenoides totales y porcentaje de rojos, ya que la muestra se encuentra en suspensión acuosa y los métodos de referencia con los que se contaba partían de muestra seca. Se utilizó centrifugación de la muestra y un sistema de disolventes acetona / cloroformo para la extracción y métodos espectrofotométricos y HPLC para la cuantificación de carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina respectivamente. La estrategia experimental se ilustra en la figura 1.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

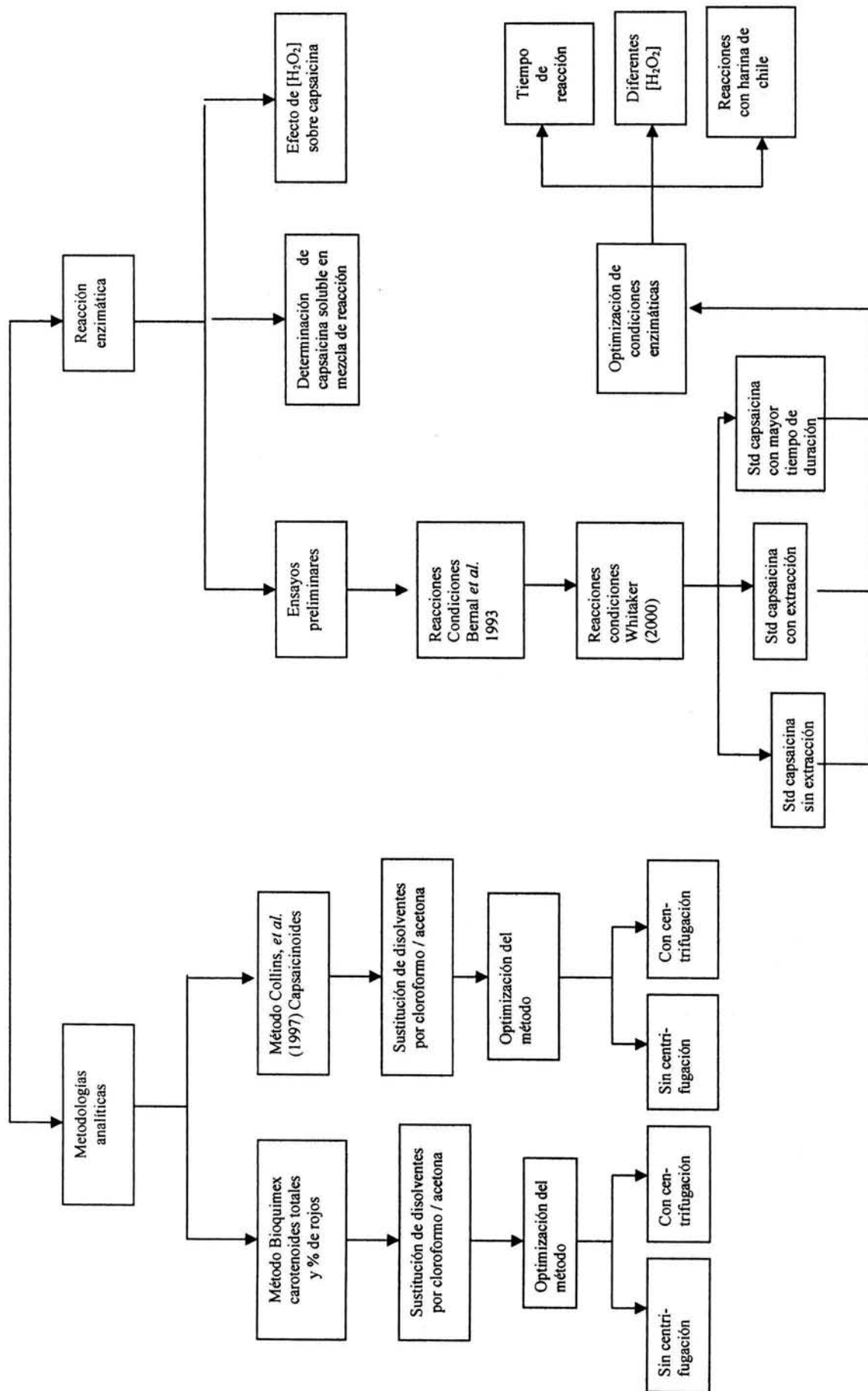


Figura 1. Esquema de la metodología seguida durante el desarrollo del presente trabajo experimental.

Inicialmente se propusieron condiciones de reacción tomadas de la referencia de Bernal *et al.* 1993 a y b (H_2O_2 0.1 mM, 25°C , 14 horas de reacción, buffer tris acetato pH = 6.00), pero no se logró oxidar la capsaicina presente. Se cambió la concentración de H_2O_2 a 20 mM, donde la capsaicina se oxidó completamente, pero los carotenoides totales disminuyeron en un 18.8 %, por lo que se realizaron experimentos variando las concentraciones de H_2O_2 . De esta manera se encontraron las condiciones optimizadas (H_2O_2 1.0 mM, tiempo de reacción de 300 minutos, 25°C , buffer tris-acetato pH = 6.00) con las cuales se degradó la capsaicina, minimizando la pérdida de colorantes, y se observó un ligero incremento en el porcentaje de rojos. Se piensa que es posible lograr la epoxidación de los carotenoides amarillos para obtener los rojos. De hecho se propone el uso de un cóctel enzimático el cual incluya enzima peroxidasa de Nabo y una enzima proveniente del fruto de *Capsicum annuum*, que lleve a cabo la epoxidación de los colorantes para incrementar el porcentaje de rojos, ya que el valor comercial de una oleoresina se basa en su contenido de colorantes rojos.

Finalmente la degradación de la capsaicina en la harina de chile mediante la aplicación de peroxidasa de Nabo, podría escalarse y aplicarse a nivel comercial, y así obtener oleoresinas de chile, con un valor adicional debido a la ausencia de capsaicinoides.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la adición de peroxidasas exógenas sobre el contenido de capsaicinoides, el contenido de carotenoides y porcentaje de rojos en harina de chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Desarrollar metodologías apropiadas para la extracción de capsaicinoides y carotenoides a partir de la mezcla en la cual se lleva a cabo la reacción enzimática.

Determinar los efectos de la adición de peroxidasa de Nabo sobre el contenido total de carotenoides en harina de chile.

Determinar las condiciones óptimas de acción de peroxidasa de Nabo para eliminar capsaicina de la harina de chile.

2. ANTECEDENTES.

2.1. *Capsicum annuum*.

2.1.2. Botánica de *Capsicum annuum*.

El chile pertenece a la familia Solanaceae, la cual tiene cerca de 90 géneros y 2000 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. El género *Capsicum* está relacionado a otros géneros de la misma familia, los cuales son económicamente importantes, tales como la papa (*Solanum tuberosum* L.), la berenjena (*S. melongem* L.), el tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.), y el tabaco (*Nicotiana tobacum* L.) (Govidarajan, 1985).

Todas las formas de pimiento, chile o ají utilizadas por el hombre pertenecen al género *Capsicum*. Según algunos autores, el nombre científico del género deriva del griego: *kapso* (picar) según otros de *kapsakes* (cápsula). La clasificación taxonómica precisa de estos vegetales se presenta a continuación (Nuez *et al.* 1996).

División: *Spermatophyta*

Línea XVI: *Angiospermae*

Clase A: *Dicotyledones*

Rama 2: Malvales-Tubiflorae

Orden XXI: *Solanales (Personatae)*

Familia: *Solanaceae*

Género: *Capsicum*

El género *Capsicum* lo conforman plantas anuales o perennes, de tallos bifurcados y hojas simples, con limbo entero, sinuoso, plano o redondo, pecioladas; las flores son consideradas como hermafroditas, solitarias y axilares; el cáliz es gama sépalo con 5 a 6 sépalos dentados; la corola es de color blanco o violeta con 5 ó 6 pétalos imbricados; el fruto es una baya oblonga, conoidal, con 2 ó 3 lóculos incompletos, que puede ser erecto o colgante; las semillas son subreniformes, con testa rugosa, embrión redondeado, con dos cotiledones (Robledo, 1991).

Este género tiene cerca de 25 especies silvestres, pero sólo existen 5 especies domesticadas: *Capsicum annuum*; *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. pubescens*. Todas las variedades cultivadas tienen su origen en Centroamérica y Sudamérica (Rylsky, 1986).

Se reconocen dos variedades de *C. annuum*: *C. annuum* var. *Glabriusculum/aviculare*, la cual comprende los chiles silvestres y *C. annuum* var. *annuum*, en donde se incluyen los domesticados (Govindarajan, 1985).

Capsicum annuum var. *annuum* es la variedad más importante económicamente. La variedad *annuum*, muestra mucha variabilidad, particularmente en los frutos. Es una planta herbácea o semiarbusciva, erecta y muy ramificada, hasta de un metro de alto, se comporta como anual y es glabra o pubescente. Tiene hojas simples, pecioladas, con tamaños muy variables y su lámina es lanceolada a ovalada. Sus flores generalmente se encuentran solas y son terminales; los pedicelos pueden ser erectos o pendientes. El cáliz puede ser campulado y dentado. La corola es blanco-sucio campulada con 5 ó 6 pétalos. El fruto es una baya indehiscente, pendulosa o erecta, es extremadamente variable en tamaño, forma, color y grado de pungencia; puede ser largo, cónico o globoso; cuando inmaduro, éste puede ser verde, amarillo o púrpura, y rojo, anaranjado, amarillo, café o púrpura en la madurez. Las semillas son aplanadas, amarillo pálido y de 3 a 5 mm en su diámetro más largo (Robledo, 1991).

La estructura de los frutos con semilla se muestra en la figura 2. En el fruto del chile se puede distinguir a efectos prácticos una región capsular externa, correspondiente al pericarpio, y un eje. El eje está formado por el pedúnculo rematado por el cáliz y su prolongación dentro del fruto, el corazón. Éste está formado por el tejido placentario y las semillas. En la región capsular externa se puede distinguir tres partes: base, cuerpo y ápice. La base del fruto es un conjunto con el extremo del pedúnculo y los tejidos desarrollados a partir del receptáculo floral, pudiendo ser cóncava, convexa o plana.

El cuerpo del fruto presenta una superficie suave, frecuentemente asurcada y con depresiones o rugosidad transversal. La sección transversal puede ser circular o poligonal. La sección longitudinal presenta una gran variedad de formas, desde rectangulares, triangulares o circulares a espirales e irregulares (Nuez *et al.* 1996).

El pedúnculo del fruto se desarrolla a partir del pedicelo floral. El cáliz se desarrolla a partir de los sépalos soldados de la flor. La parte final del pedúnculo continua directamente en el cáliz. Este puede presentar formas en umbela, discoidales, aplastadas y en copa.

La cavidad del fruto es la parte interior del pericarpio. La placenta con las semillas y las costillas o septos sobresalen dentro de ella formando el corazón. Los septos se desarrollan en la sutura de los carpelos, ordinariamente entre 2 y 4. El corazón está recubierto por el tejido placentario. Su forma está relacionada con la forma del fruto que es globosa en los frutos semiesféricos, alargada-cónica en los rectangulares y en forma de cono corto en los frutos prismáticos. Las semillas se encuentran en la superficie de la placenta (Nuez *et al.* 1996).

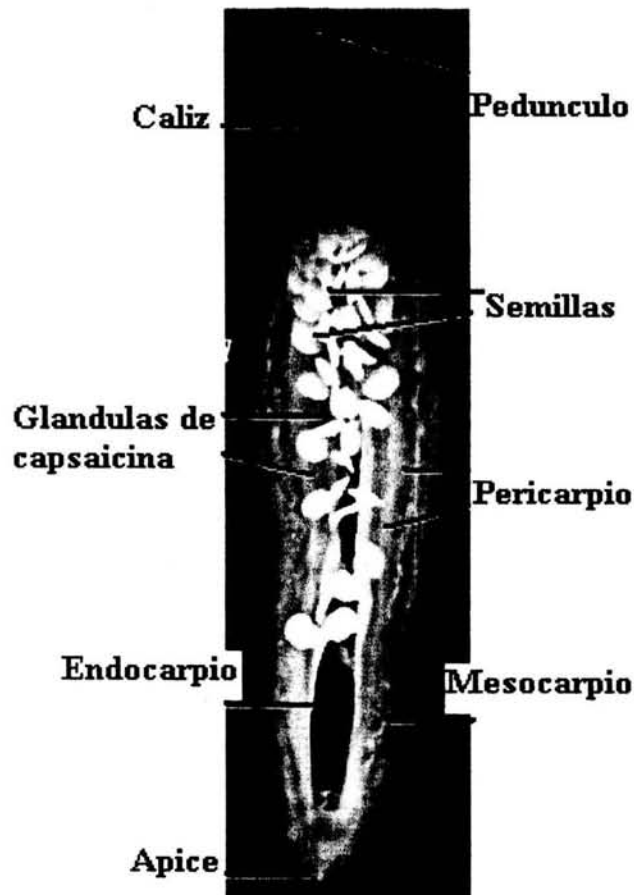


Figura 2. Corte transversal de chile, en donde se pueden distinguir sus componentes (Chile Pepper Institute, 2003).

Capsicum annuum var. *annuum* tiene gran número de cultivares. Entre los principales cultivados en México destacan el guajillo, ancho, mulato, pasilla, serrano, jalapeño, mirasol, árbol, güero, costeño, de agua, morita, cuaresmeño, poblano, etcétera (Robledo, 1991). El contenido nutricional del pimiento es alto en comparación con otras hortalizas de amplio consumo, como por ejemplo el tomate (Nuez, 1996).

2.1.2. Chile guajillo.

Existe mucha variación en cuanto a tipo de planta y la apariencia del fruto: por lo general estos chiles son largos, de 6 a 12 centímetros de longitud, delgados y con punta aguda, su cuerpo es cilíndrico, liso y con leves ondulaciones, tienen de dos a tres lóculos; su posición es colgante, aún cuando existen algunas variedades cuyos frutos son erectos. El color del fruto inmaduro es verde en sus diferentes tonalidades y cambia a rojo al madurar. Algunos cultivares que se conocen de esta variedad son: Loreto-74, La Blanca-74 y Real Mirasol, los cuales son selecciones resistentes a la marchitez por el hongo *Phytophthora capsici* (Trejo, 2000).

Santamaría *et al.* (2000) señalan que la variedad guajillo es la más frecuentemente utilizada en la industria de colorantes en México debido a su bajo contenido en capsaicina, además de que la oleorresina obtenida por extracción con disolventes como agua/etanol es rica en colorantes, pero aún es pungente.

2.1.3. Usos del Chile.

El chile es un aditivo alimentario, que por sus atributos sensoriales de color, pungencia y aroma es valioso en muchas partes del mundo. En México, el chile picante representa una identidad cultural y comercial ya que se utiliza como principal ingrediente en gran parte de la comida mexicana. El fruto es muy importante económicamente debido a la vasta cantidad y diversas variedades utilizadas (Robledo, 1991).

El fruto de *Capsicum* puede ser consumido fresco, en salsas o relleno con otros productos, pero también se industrializa en forma de enlatados, chile en polvo y oleorresinas. Además de

estos usos, del chile se pueden extraer la capsaicina y sus análogos, los capsaicinoides, compuestos que le confieren el sabor picante y que han adquirido gran importancia tanto por su uso industrial, como por sus propiedades farmacológicas. Además, *C. annuum* es una de las más importantes fuentes de carotenoides, grupo de colorantes naturales no tóxicos, que tienen alto valor nutricional por su actividad provitamina A, así como su capacidad antioxidante.

Los colorantes extraídos de *Capsicum annuum* se utilizan en dos formas para colorear alimentos:

- a) Polvo seco de pprika (vainas secas seleccionadas, molidas)
- b) Oleorresina de pprika, extracto oleoso de los componentes colorantes y saborizantes de los frutos.

La pprika en polvo es un producto oscuro insoluble en agua y se utiliza como condimento en productos como sopas, aderezos y algunas especialidades como salsas italianas para carne.

La oleorresina es un producto líquido soluble completamente en alimentos oleosos, sin partículas de tejido vegetal en el producto final. Una ventaja de la oleorresina es la posibilidad de estandarizar el color del extracto, dado que el color puede variar dependiendo de factores tales como el clima, la variedad, condiciones de cosecha, temperaturas de secado, contenido de humedad, y condiciones de almacenamiento (Bauernfeind, 1981).

La demanda de chile se ha incrementado en el ámbito internacional debido al gusto por consumir alimentos con chile, fuertemente coloreados y picantes.

2.1.4. Limitaciones industriales del uso del chile como fuente de colorantes.

El picor de diversas variedades de chile limita su aplicación a diversos productos. Es bien conocido que el principio pungente del chile hace que su principal uso sea sólo en la comida muy condimentada o en platillos tpicos de la cocina mexicana (Cichewick & Thorpe, 1996).

Estudios realizados han indicado que los capsaicinoides provocan diversos efectos farmacológicos y fisiológicos (Cichewick & Thorpe, 1996). El principal efecto farmacológico lo ejerce en la parte periférica del sistema nervioso sensor debido a su potencial para actuar como una toxina. Esto se refleja en la supresión de la sensibilidad para percibir posteriormente

otro tipo de sabores en los alimentos (Caterina *et al.* 1997). Otros estudios han reflejado que el consumo de chile es una de las principales causas de gastritis en México (Smith & Stopford, 2002).

Debido a sus efectos selectivos en las funciones de una subpoblación de neuronas sensoras, la capsaicina frecuentemente se utiliza como agente anésteziante del dolor (Rouhi, 1998).

En el presente estudio se pretende eliminar la capsaicina de la variedad chile guajillo y de esta manera aprovechar mejor los colorantes extraídos. Se hace pertinente el estudio del efecto del uso de peroxidasas exógenas sobre el contenido de carotenoides y capsaicinoides como se describirá más adelante.

A continuación, se presentan los antecedentes bibliográficos sobre los componentes de interés por separado, pues no se ha encontrado algún estudio en donde se involucren ambos tipos de compuestos (tanto capsaicina como carotenoides); sin embargo resultan importantes los estudios realizados por separado en cada uno de estos compuestos, ya que de esta manera será posible predecir el comportamiento de los compuestos durante la reacción enzimática.

2.2. Peroxidasas.

Las enzimas son proteínas especializadas en la catálisis de las reacciones biológicas. Tienen extraordinaria especificidad y poder catalítico (Lehninger, 1990).

Las peroxidasas (PODs, E.C. 1.11.1.7) son hemo proteínas, que contienen el grupo hemo (hierro (III), protoporfirina IX) como grupo prostético, pertenecen al grupo de las “oxido-reductasas”. Tienen la habilidad de catalizar la oxidación de un gran número de sustratos, a través de la reacción con peróxido de hidrógeno. Las enzimas peroxidasas se encuentran ampliamente difundidas en la naturaleza (Estrada *et al.* 2000).

La mayoría de las peroxidasas son enzimas extracelulares, relativamente estables. Sus nombres son derivados a partir de la fuente de la que se extraen (por ejemplo: Nabo, soya,

cacahuete, hoja de té, lacto- y mielo-peroxidases) o a partir de sus sustratos (por ejemplo: Bromo-, cloro-, y lignina-peroxidasa o citocromo *c*- o manganeso-peroxidasa) Las peroxidases llevan a cabo una amplia gama de funciones biológicas, tales como la síntesis de biomoléculas y la detoxificación de H₂O₂. Pueden reaccionar con un gran número de sustratos en una amplia variedad de reacciones. La aplicación de peroxidases como biocatalizadores en oxidaciones selectivas ha sido ampliamente estudiada, en particular de las cloroperoxidasas y las haloperoxidasas (van de Velde *et al.* 2001).

Basándose en su centro activo específico, las peroxidases se pueden clasificar en tres grupos: hemo peroxidases, vanadio peroxidases, y peroxidases no-metálicas. Las mejor conocidas son las hemo peroxidases (tabla 1), las cuales contienen una molécula de protoporfirina IX hierro (III) en su sitio activo. Las vanadio peroxidases tienen un ión vanadato en su grupo prostético y se encuentran en ambientes marinos. Las haloperoxidasas bacterianas libres de metales son activas únicamente en medios con buffer de acetato o propionato y se ha propuesto que se forma ácido peracético (o perpropiónico) en el sitio activo vía acilación de un residuo de serina y la subsecuente reacción con H₂O₂. van de Velde *et al.* (2001) señalaron que la estructura cristalina de la enzima peroxidasa, analizada por rayos X, reveló la presencia de la tríada catalítica serina-histidina-ácido aspártico (Ser-His-Asp) en el sitio activo. Esto reafirmó la noción de que estas enzimas catalizan la formación *in situ* de ácidos percarboxilados seguido por una oxidación no enzimática del sustrato.

Tabla 1. Hemo peroxidasas más comunes y sus funciones biológicas (van de Velde *et al.* 2001).

Peroxidasas	E. C. No.*	Fuente	Función biológica
Cloro peroxidasa	1.11.10	Moho <i>Caldariomyces fumago</i>	Biosíntesis de caldariomicina
Citocromo <i>c</i> peroxidasa	1.11.15	Levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Reducción de H ₂ O ₂ y oxidación de citocromo <i>c</i>
Nabo peroxidasa	1.11.1.7	Raíces de <i>Armoracia rustica</i>	Biosíntesis de hormonas de la planta
Lactoperoxidasa	1.11.1.7	Leche bovina	Antimicrobiano
Lignin peroxidasa		Moho <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de la lignina
Mieloperoxidasa	1.11.1.7	Leucocitos humanos	Antimicrobiano

* Nombre sistemático que identifica la reacción que cataliza. El número de clasificación, se emplea cuando se precisa la identificación inequívoca de la enzima.

Durante la catálisis las hemo peroxidasas son oxidadas por un peróxido a una especie oxo fierro (V) (formalmente) el cual se presenta predominantemente en muchas peroxidasas como un radical catiónico de oxo porfirina fierro (IV) el cual se llama compuesto I y es comparable con el intermediario oxo fierro (IV) en el ciclo catalítico de la mono-oxigenasa. En vez de oxígeno molecular y un cosustrato el cual transfiere dos átomos de hidrógeno, las peroxidasas pueden formar directamente las especies oxo fierro (V) a partir de la enzima nativa y peróxido de hidrógeno. El compuesto I puede reducirse a la enzima nativa por varios mecanismos dependiendo del tipo de reacción (van Daurzen *et al.* 1997).

2.2.1. Reacciones catalizadas por peroxidadas.

Las reacciones catalizadas por las peroxidadas se pueden dividir en las siguientes cuatro categorías:

- a) Deshidrogenación oxidativa (reacción típica de las peroxidadas)



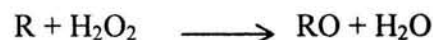
- b) Halogenación oxidativa.



- c) Desproporción del peróxido de hidrógeno (reacción de la catalasa)

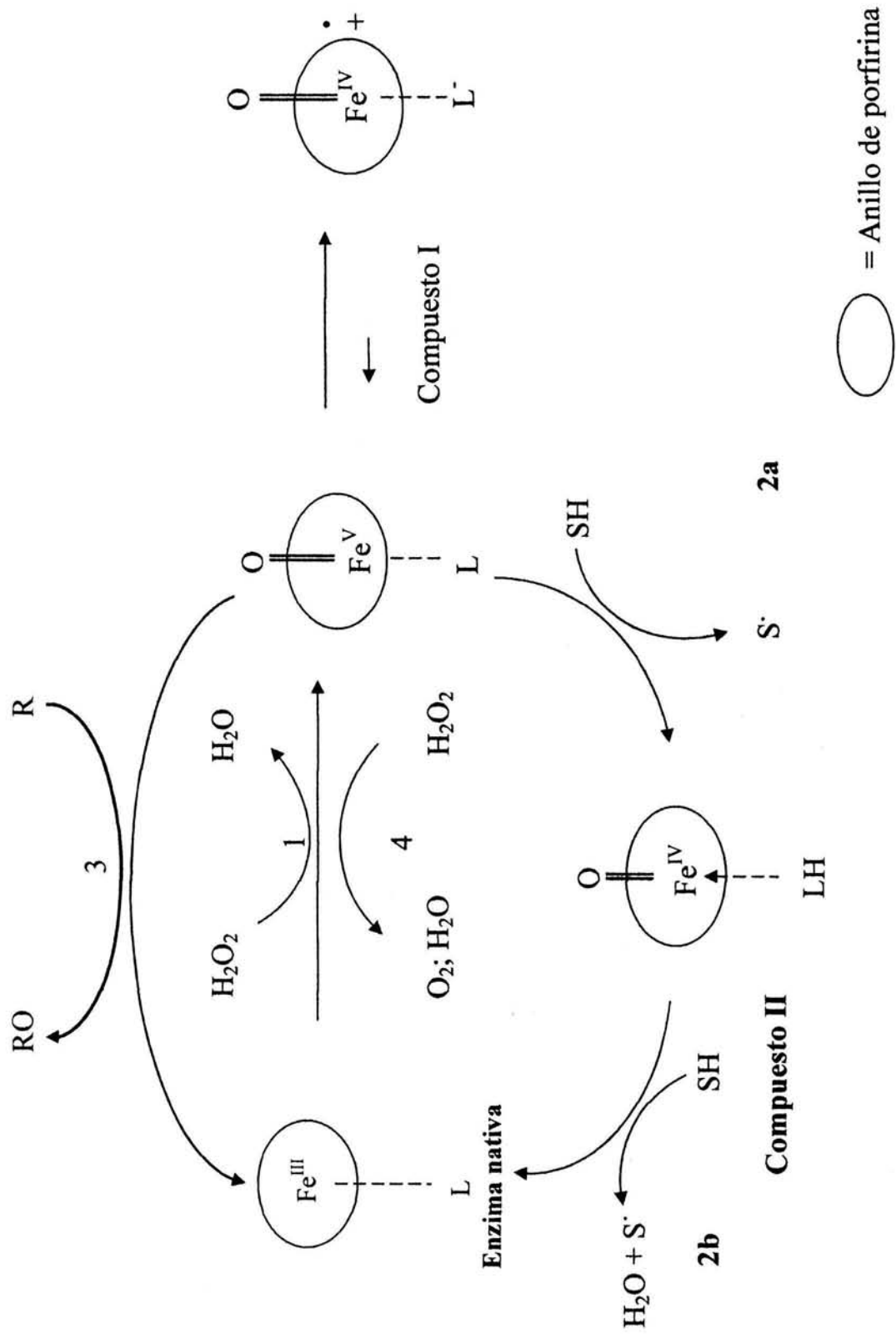


- d) Reacciones de transferencia de oxígeno



2.2.1.1. Reacciones de deshidrogenación oxidativa.

Estas reacciones están principalmente restringidas a las hemo peroxidadas. Este tipo de reacción involucra procesos de transferencia de un electrón con radicales y radicales catiónicos como intermediarios (Figura 3, vías 2a y 2b). Las especies oxo hierro (V) son reducidas a la enzima nativa por la vía de dos transferencias de un electrón. Las especies intermedias oxo hierro (IV), son llamadas compuesto II, las cuales se forman por una oxidación equivalente a un nivel superior de la enzima nativa. Este tipo de peroxidadas catalizan una amplia variedad de oxidaciones de un solo electrón en compuestos aromáticos ricos en electrones, resultando productos de acoplamiento de radicales de tipo inter- ó intra-moleculares. Una reacción clásica de este tipo de peroxidadas es aquella que cataliza la polimerización de fenoles y anilinas bajo condiciones favorables (van Daurzen *et al.* 1997).



L = Ligando

Figura 4. Ciclo de reacciones de Peroxidasas (van Deurzen *et al.* 1997)

2.2.1.2. Halogenación oxidativa.

Las llamadas haloperoxidasas median la halogenación de sustratos orgánicos. Hasta hace poco se pensaba que era una reacción rara, y durante 40 años sólo se conocieron tres ejemplos de esta reacción. Actualmente se sabe que las haloperoxidasas están ampliamente difundidas en la naturaleza. La halogenación oxidativa no se limita a las hemo peroxidadas, también la llevan a cabo las vanadio peroxidadas y otras haloperoxidasas que no son hemo haloperoxidasas. Se cree que la halogenación oxidativa procede por la vía de una especie haluro activa. En el caso de las vanadio y hemo peroxidadas (ruta 3 en la figura 3, donde R = haluro) esta especie es probablemente un hipohalito. La oxidación generalmente no es selectiva y se cree que tiene lugar fuera del sitio activo. Sin embargo, existe un claro ejemplo de regioselectividad: la cloroperoxidasa libre de metales proveniente de *Pseudomonas pyrrocinia*, la cual convierte selectivamente el indol a 7-cloro-indol (van Daurzen *et al.* 1997).

2.2.1.3. Desproporción de peróxido de hidrógeno.

La descomposición de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno es catalizada por enzimas peroxidasa directamente, o bien por la producción de ácido hiposaloso el cual reacciona con el peróxido de hidrógeno para producir oxígeno singulete. Especialmente *Caldariomyces fumago* (CPO) exhibe actividad catalasa cuando el peróxido de hidrógeno es el único agente reductor presente en la mezcla de reacción (van Daurzen *et al.* 1997).

2.2.1.4. Reacciones de transferencia de oxígeno.

El cuarto tipo de reacción catalizada por peroxidadas es la transferencia selectiva de oxígeno, la cual es catalizada por peroxidadas (ruta3, en la figura 3, R = sustrato orgánico). Desde el punto de vista sintético son las reacciones más importantes catalizadas por las peroxidadas. Las transformaciones son comparables con las catalizadas por las mono-oxigenasas. Las reacciones catalizadas por peroxidadas tipo oxigenasas se pueden dividir en las siguientes categorías:

- a. Oxidación de un hetero-átomo, por ejemplo S-oxidación, N-oxidación;
- b. Epoxidación;
- c. Oxidación del enlace C-H: oxidación bencílica; oxidación alílica; oxidación del indol.

Las peroxidasas participan en numerosos procesos fisiológicos, principalmente en el control del crecimiento y diferenciación celular debido a su participación en el catabolismo de auxinas, la polimerización de alcohol cinamofílico a lignina y las reacciones de detoxificación – H₂O₂ (Gaspar *et al.*1985).

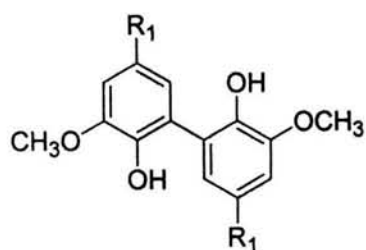
2.2.2. Peroxidasas en *Capsicum annuum*.

De acuerdo con Ros Barceló *et al.* (1998) las peroxidasas (E.C.1.11.1.7) presentes en los frutos de chile son glucoproteínas que pueden ser clasificadas en ácidas y básicas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) que va de 3.5 a 9.5. Bernal *et al.* (1993a y b) señalan que se pueden relacionar directamente al metabolismo de los capsaicinoides y además han reportado que la unión del grupo vanilloil de los capsaicinoides es fácilmente oxidada por esta enzima. Bernal *et al.* (1996a y b) también han reportado la localización histoquímica de las peroxidasas en frutos de *Capsicum*, principalmente en las vacuolas de las células de la placenta y células epidérmicas externas. Un determinado fruto puede presentar varias isoenzimas con muy diferentes puntos isoeléctricos. El papel específico de las isoformas de la peroxidasa permanece sin esclarecerse, sobre todo su localización y la disponibilidad de los sustratos específicos *in vivo* Pomar *et al.* (1997) señalan que las peroxidasas básicas son efectivas en el catabolismo de los precursores de los capsaicinoides (IAA) y las ácidas se asocian a las reacciones de lignificación. Los cambios en los niveles y distribución de las isoformas se asocian con los procesos metabólicos de las plantas superiores, si bien son pocos los casos en los cuales las isoformas involucradas han sido purificadas y caracterizadas, las peroxidasas están implicadas en un gran número de procesos tales como la senescencia de frutos y vegetales. Es importante remarcar que los cambios temporales en la actividad de las isoenzimas de peroxidasa durante la maduración del fruto, son debidas a las dos formas que se presentan (la básica y la ácida) y su expresión depende de factores genéticos y ambientales.

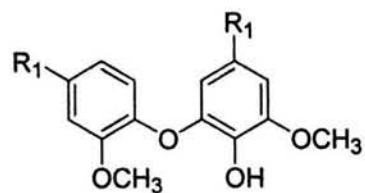
Recientemente se ha sugerido que las peroxidasas pueden participar en el metabolismo del fruto *Capsicum*. Las peroxidasas básicas con un punto isoeléctrico alto se pueden relacionar directamente con el metabolismo de los capsaicinoides porque tanto la capsaicina como la dehidrocapsaicina y sus precursores fenólicos son fácilmente oxidados por estas enzimas (Bernal *et al.* 1993a y b, 1995, 1996a y b, Pomar *et al.* 1997). Además tanto las peroxidasas básicas como la capsaicina se localizan en las vacuolas del tejido placentar de los frutos del pimiento (Bernal *et al.* 1993a y b, Suzuki *et al.* 1980). Por otro lado, el decremento observado en la peroxidasa básica podría relacionarse al incremento en el nivel de capsaicinoides durante la maduración.

Bernal *et al.* 1996a y b, realizaron estudios sobre la oxidación de capsaicina por acción de peroxidasas extraídas de pimiento (*Capsicum annuum* var. *annuum*) en un medio compuesto por buffer de tris acetato pH = 6.0, H₂O₂ a una concentración de 0.1 mM, capsaicina 0.1 M y enzima peroxidasa: Después de un periodo de incubación de 24 horas a 25°C encontraron que la peroxidasa oxida a la capsaicina para dar 5,5'-dicapsaicina (figura 4a) y el éter 4'-O-5-dicapsaicina (figura 4b) al igual que una mezcla de productos de deshidrogenación polimerizados, los cuales tienen estructuras muy parecidas a las de la lignina en el chile. La reacción también se llevó a cabo con competitividad oxidativa ya que naturalmente existen intermediarios fenilpropanoides provenientes de la biosíntesis de la capsaicina, los cuales compiten con la capsaicina misma para producir sustancias con estructura similar a la lignina, que se acumulan en la pared celular de *Capsicum annuum*. L. Var. *Annuum*, sin embargo no existen argumentos para establecer los efectos que la reacción tendría sobre los carotenoides existentes en el fruto.

Las pruebas a favor de la participación de la peroxidasa en este proceso metabólico se basan también en la localización de las peroxidasas dentro de las células epidérmicas placentales de los frutos de chile (Bernal *et al.* 1994) y la localización de peroxidasas y capsaicina en vacuolas y pared celular (Bernal *et al.* 1993b). Esta evidencia sustenta la gran actividad oxidativa de las peroxidasas sobre la capsaicina de chile, mecanismo de oxidación que ha sido propuesto por Bernal *et al.* (1996b).



5,5'-dicapsaicina



Éter 4'-o-5-dicapsaicina

Figura 4. Estructura de 5,5'-dicapsaicina y el éter 4'-o-5-dicapsaicina. Productos del acoplamiento oxidativo de capsaicina por peroxidasa de chile picante (Bernal *et al.* 1996b).

Estos autores propusieron la formación de 5,5'-dicapsaicina y éter 4'-o-5-dicapsaicina, el mecanismo de reacción se presenta en la figura 5. Este representa un mecanismo de acoplamiento de radicales fenólicos. El primer paso es la oxidación inicial de un solo electrón en la capsaicina por la peroxidasa para formar el radical libre 4-*o*-fenoxil (figura 5) el cual produce una serie de radicales mesoméricos, siendo el más estable (en el caso de la capsaicina) aquél en la cual el electrón desapareado se localiza en el carbono 5, (radical C5). Estos radicales se dimerizan espontáneamente para formar diferentes estructuras posibles. El acoplamiento de los radicales fenólicos C5 produce 5,5'-dicapsaicina (reacción i, en la figura 5) mientras que el acoplamiento de un radical C5 con un radical libre 4-*o*-fenoxil, produce el éter 4'-o-5 dicapsaicina (reacción j en la figura 5). Estas estructuras pueden en un momento dado actuar como núcleos, en los cuales se pueden formar productos de deshidrogenación altamente polimerizados, también formados por la acción de las peroxidases de *Capsicum annum*.

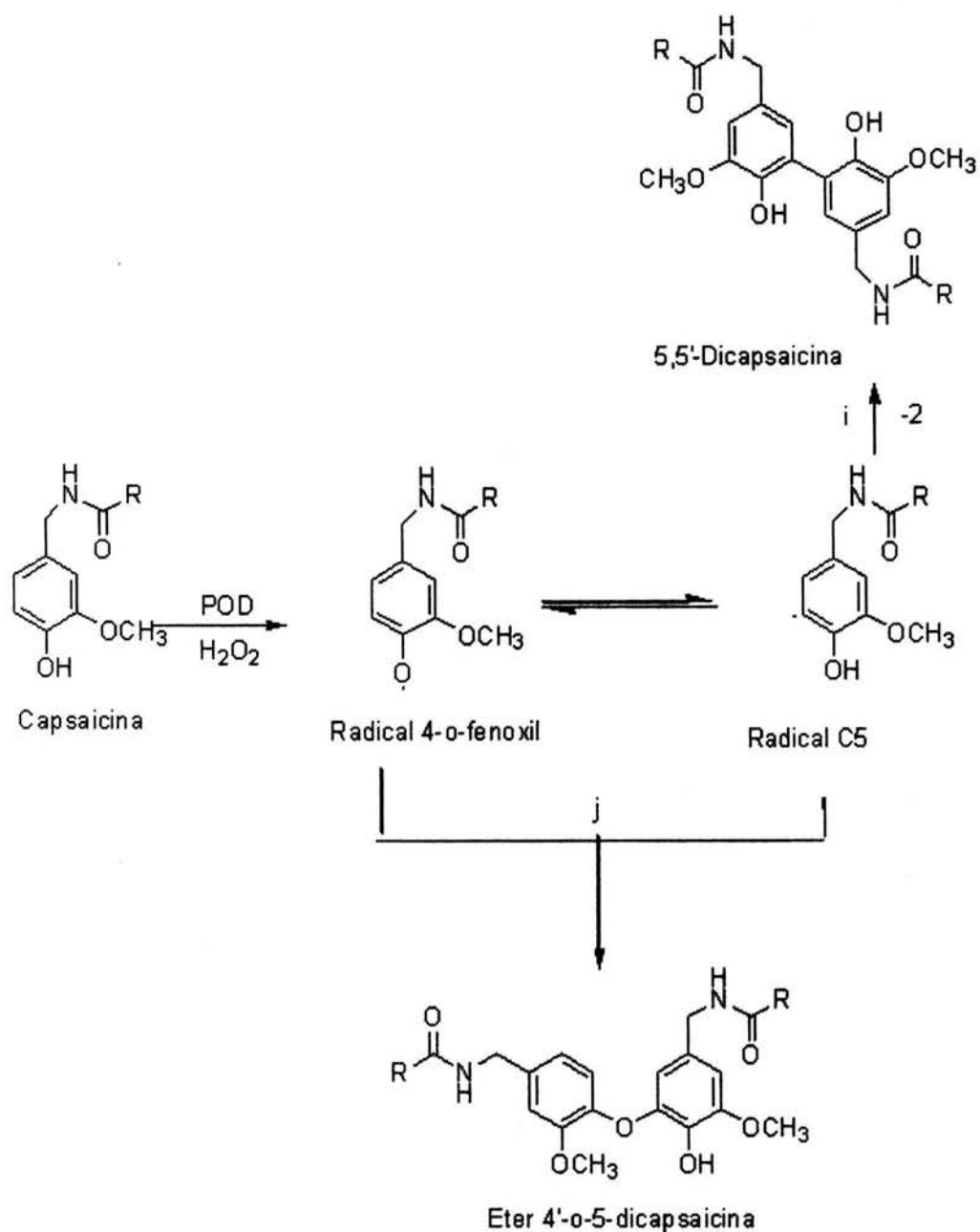


Figura 5. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de 5,5'-Dicapsaicina y éter 4'-o-5-Dicapsaicina, a través de la reacción de acoplamiento radical-radical durante la oxidación de capsaicina por peroxidasa de chile (Bernal *et al.* 1996b).

2.2.2.1. Actividad peroxidasa durante la maduración de *Capsicum annum*.

Contreras & Yahia (1998) estudiaron los cambios en la concentración de capsaicinoides durante el desarrollo, maduración y senescencia en diferentes variedades de chiles: habanero (*Capsicum chinense*, jacq.) piquin (*C. annum* var. *aviculare*) y chile de árbol (*C. annum* var. *annuum*) y su relación con la actividad de peroxidasas en el fruto. En las variedades estudiadas encontraron un patrón similar en el cual la actividad peroxidasa decrece días después del inicio de la floración (DDIF) y posteriormente aumenta gradualmente. En el caso del chile habanero, la actividad peroxidasa finalmente disminuye, si bien se trata de una especie diferente a las otras dos estudiadas. Este incremento coincide con la disminución inicial de los capsaicinoides que presentaron las variedades en estudio. En este caso se observa que la degradación de capsaicinoides en el chile es debida principalmente al metabolismo de las peroxidasas.

Por otro lado Estrada *et al.* (2000) describieron el cambio en la actividad peroxidasa en *C. annum*, variedad Padrón. Señalando que al inicio del desarrollo del fruto, catorce días DDIF, la actividad de peroxidasas solubles e iónicamente ligadas a la pared celular muestra altos niveles, disminuyendo a los 21 días de iniciada la maduración y permaneciendo constante durante los siguientes siete días (figura 6) para disminuir continuamente durante el proceso de maduración. El decremento en la actividad peroxidasa se correlaciona con otros parámetros fisiológicos como son los cambios en el contenido de clorofila y el pH, principalmente, los cuales definen la madurez de la variedad (Contreras & Yahia, 1998).

En ambos estudios se observó un comportamiento similar tanto en chiles como en pimientos donde la actividad peroxidasa se incremento conforme madura el fruto y la concentración de capsaicina disminuyo conforme la actividad de enzima peroxidasa se incrementa; comprobando así que la enzima peroxidasa es la sustancia que degrada a la capsaicina. Sin embargo, en las etapas finales de la maduración la degradación de capsaicina disminuye al disminuir la actividad peroxidasa. Por lo tanto, es posible oxidar la capsaicina del chile mediante la adición de enzimas peroxidasas exógenas.

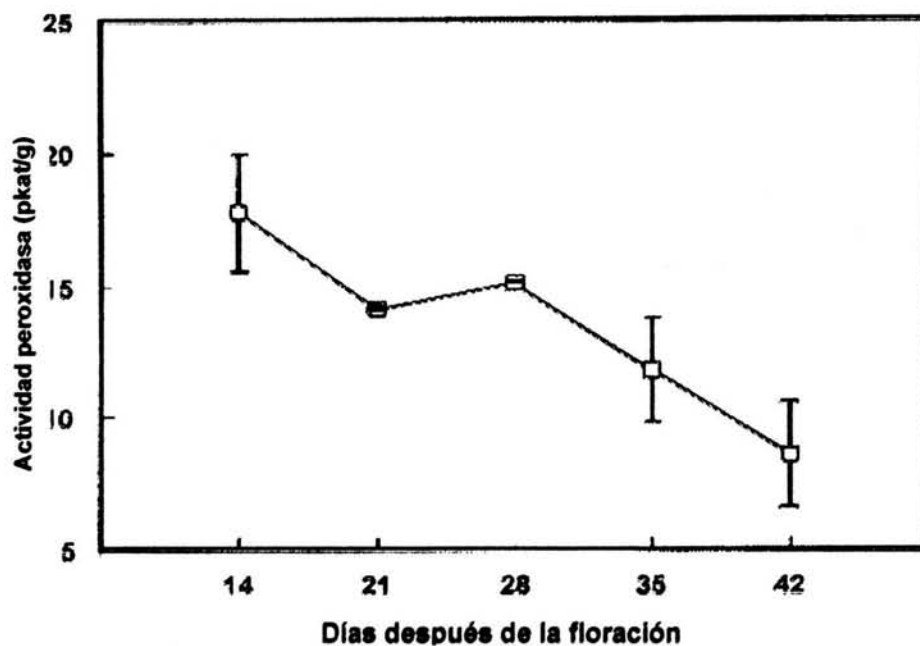


Figura 6. Actividad peroxidasa en frutos de pimiento durante los diferentes estados de desarrollo. Las barras muestran SD (Estrada *et al.* 2000).

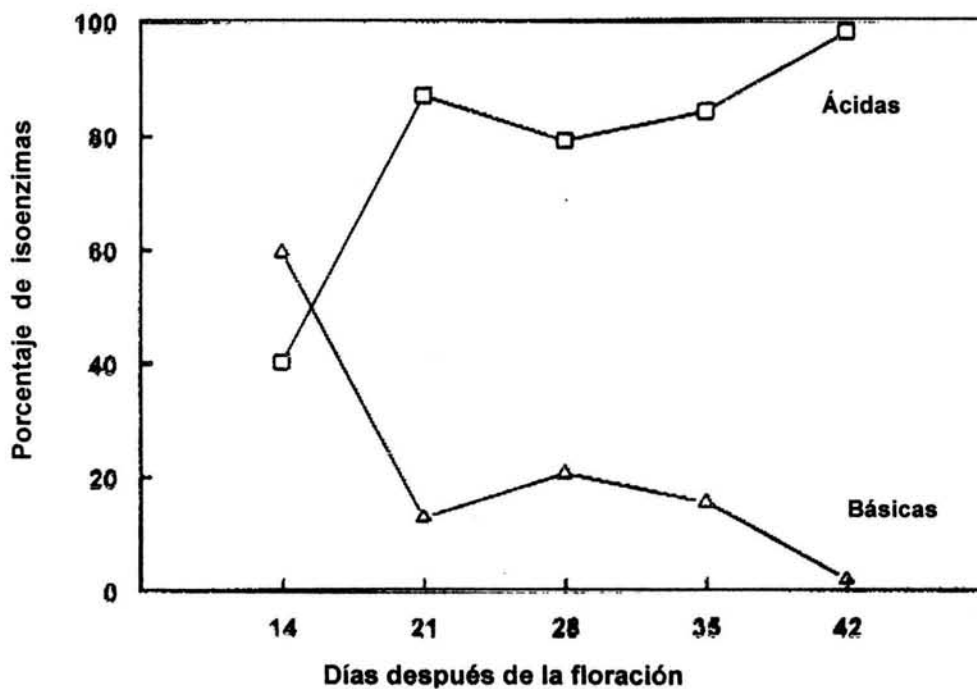


Figura 7. Cuantificación densitométrica de isoenzimas peroxidosas ácidas y básicas de fruto de pimiento Padrón en diferentes estados de desarrollo (expresados en porcentaje) (Estrada *et al.* 2000).

Al mismo tiempo Estrada *et al.* (2000), encontraron que la actividad peroxidasa se presenta principalmente en las células placentales y epidérmicas más externas. También se percataron que la actividad enzimática se concentra principalmente alrededor de las semillas hasta los 28 días de crecimiento, y en los estados finales la actividad se concentra principalmente en las células placentales y epidérmicas del fruto.

Los mismos autores se percataron que la actividad peroxidasa se localiza en la fracción soluble de las peroxidases. La actividad remanente se asocia iónicamente con la pared y la membrana celular. La peroxidasa covalentemente ligada a la pared celular hace solo una pequeña contribución (Tabla 2). Esta actividad varía en todas las fracciones en el curso del desarrollo del fruto, incrementándose en la fracción soluble y decreciendo en todas las demás fracciones.

Tabla 2. Distribución de la actividad peroxidasa por fraccionamiento subcelular en frutos de chile, Estrada *et al.* (2000).

Día^a	Soluble^b	Iónicamente ligada a la membrana^b	Iónicamente ligada a la pared celular^b	Covalentemente ligada a la pared celular^b
14	77.14	18.84	1.88	2.12
21	80.52	16.91	2.17	0.38
28	90.27	8.26	0.84	0.61
35	92.13	6.36	0.81	0.68
42	95.63	2.80	0.71	0.84

^a Días después de la floración. ^b Las actividades enzimáticas se reportan en porcentajes.

Estos cambios en la actividad peroxidasa también se acompañan por las variaciones en las diferentes isoenzimas que se presentan a lo largo del proceso de maduración del fruto. Así, las peroxidasas acidófilas se incrementan durante este proceso mientras que las isoenzimas básicas, quienes presentan su máxima actividad durante el primer estado de maduración, continúan decreciendo hasta casi desaparecer en las últimas etapas. Un análisis densitométrico reveló que es posible cuantificar la variación en diferentes isoenzimas: ácidas y básicas. Esta variación se presenta en la figura 7, en la cual se observa que durante el proceso de maduración del fruto tiene lugar diferentes tipos de isoenzimas de peroxidasas.

2.3. Pigmentos en *Capsicum annuum*.

Los carotenoides son un grupo de pigmentos con colores que varían desde rojo hasta amarillo que están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Minguez-Mosquera *et al.* 1993). En los vegetales se encuentran predominantemente esterificados con ácidos grasos (Oliver *et al.* 1998). Los carotenoides son compuestos isoprenoides, biosintetizados por la unión cola-cola de moléculas de geranylgeranyl difosfato C_{20} . Esto forma el esqueleto C_{40} , a partir del cual se forman cada una de las diferentes moléculas. Los carotenoides que contienen más de un átomo de oxígeno son conocidos como xantofilas, (Oliver *et al.* 1998) y su estructura básica refleja su modo de biosíntesis, que consiste en ocho unidades de isoprenoides, unidos de tal manera que los dos grupos metilo cercanos al centro de la molécula están en la posición relativa 1, 6, mientras que los otros grupos están en la posición relativa 1,5. Una serie de dobles enlaces constituyen el cromóforo característico (Davies, 1976). Este esqueleto puede ser modificado por ciclización del extremo final de la molécula para dar diferentes grupos finales, por cambios en los niveles de hidrogenación; y por adición de oxígeno en diferentes grupos funcionales (Haila, 1999).

La adición de posteriores unidades isoprenoides resulta en modificaciones que llevan a carotenoides de C_{45} y C_{50} . Además, existen carotenoides C_{30} simétricos, los cuales son característicos en bacterias (Davies, 1976).

La cadena carbonada se distingue por un largo sistema de enlaces dobles y sencillos alternantes que se encuentran en la parte central de la molécula (figura 8). Éste constituye un sistema conjugado en el cual los electrones π están completamente deslocalizados a lo largo de la cadena del polieno. Esta distribución de los enlaces π es responsable de la forma y la reactividad de la cadena, de las propiedades de absorción de la luz, y por lo tanto del color de los carotenoides (Haila, 1999).

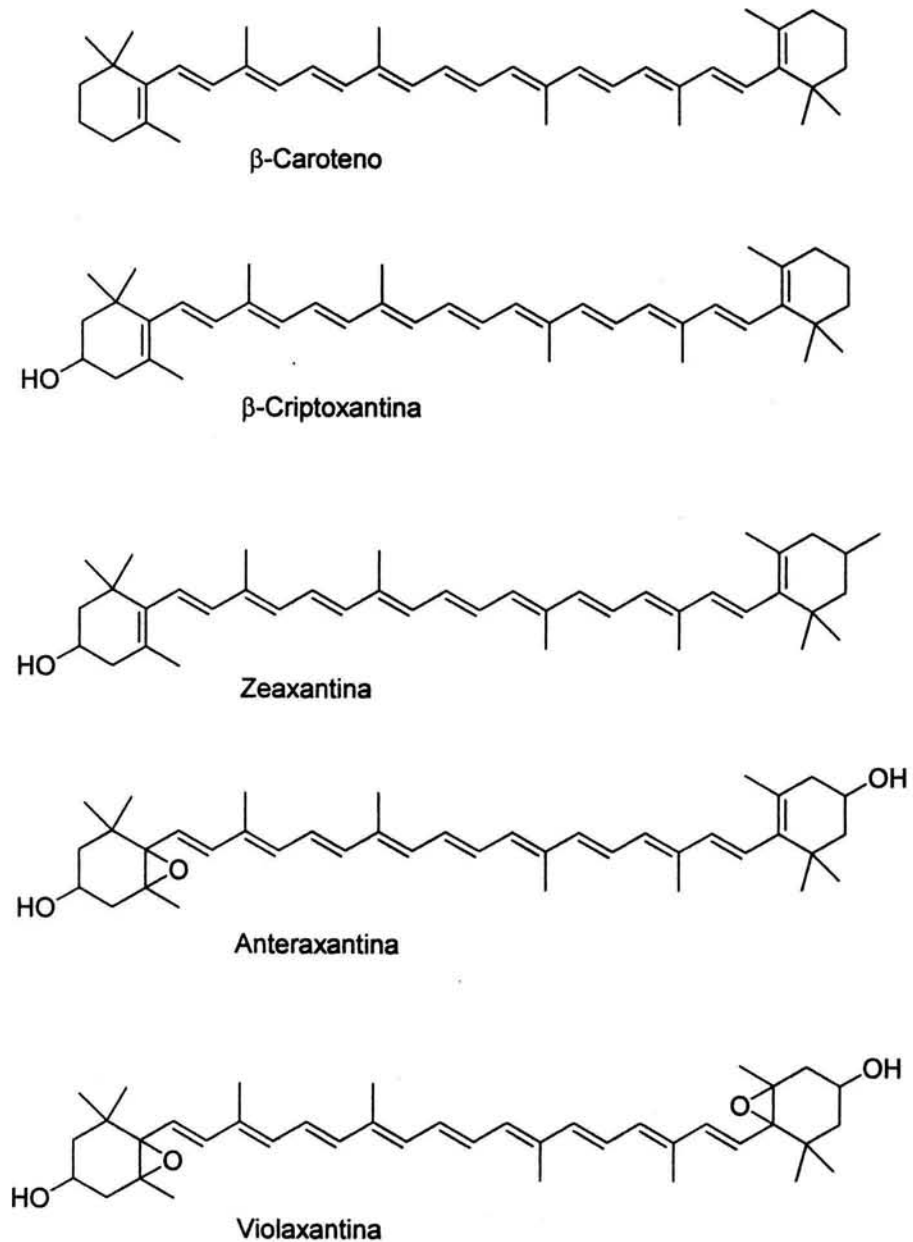


Figura 8. Estructuras de los carotenoides responsables del color en el fruto maduro de *Capsicum annuum* (Hornero *et al.* 2000), continua...

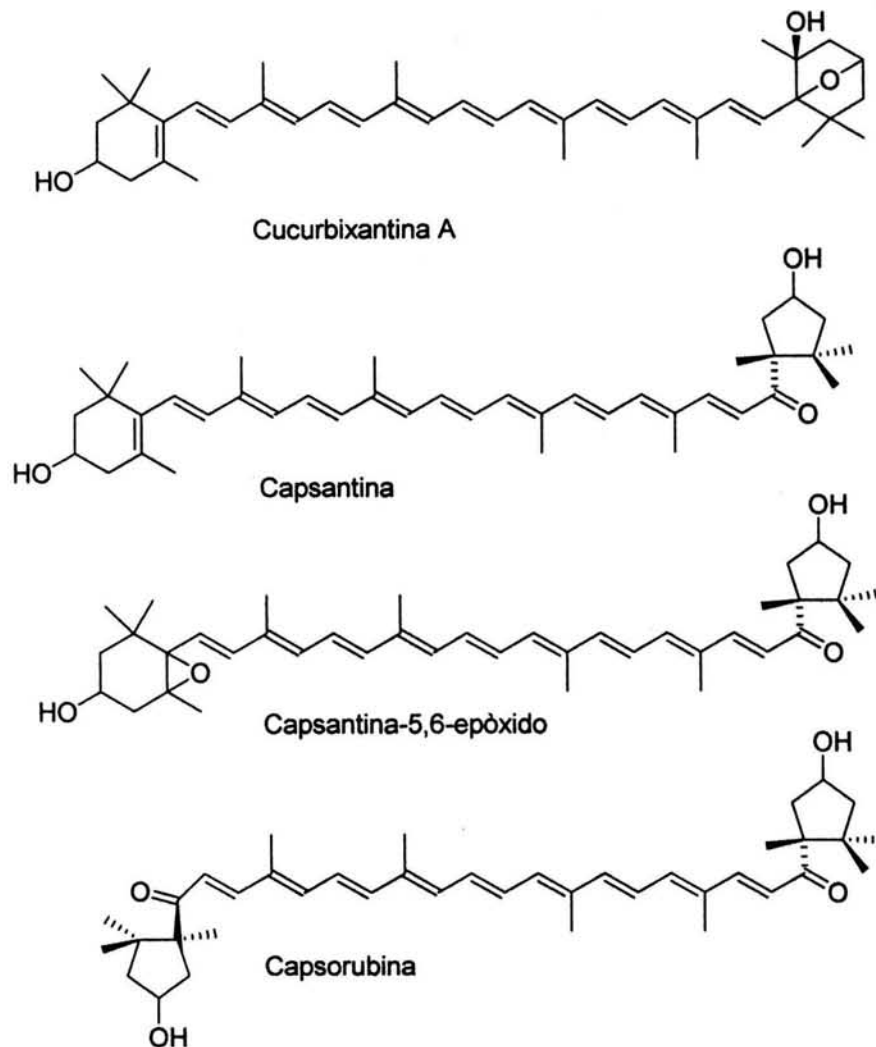


Figura 8. Estructuras de los carotenoides responsables del color en el fruto maduro de *Capsicum annuum* (Hornero *et al.* 2000).

El sistema de nomenclatura de los carotenoides está basado en el nombre base de “caroteno”, con designaciones específicas para el grupo terminal del caroteno (β , ϵ , κ , ϕ , ψ , χ), junto con el sistema de numeración para todos los átomos de carbono (Davies, 1976). Por ejemplo el β -caroteno es conocido como β,β -caroteno (Haila, 1999).

Cada doble enlace en la cadena poliénica de un carotenoide puede existir en dos configuraciones, los isómeros geométricos *trans* o *cis*. La presencia de un doble enlace *cis* crea mayor tensión entre los átomos de hidrógeno cercanos a los grupos metilo, así que los isómeros *cis* son menos estables que los correspondientes *trans*, termodinámicamente

hablando. La mayoría de los carotenoides ocurren en la naturaleza predominantemente o enteramente en forma *trans* (Haila, 1999).

Los carotenoides puros y en soluciones orgánicas son inestables en presencia de oxígeno (Thomas, 1998) mientras que los carotenoides *in vivo* son más estables, comúnmente están localizados en membranas donde constituyen una parte integral de su compleja estructura. Sin embargo, las propiedades físicas y químicas son influenciadas por otras moléculas como los lípidos y las proteínas de las membranas. El papel de las proteínas es particularmente importante con relación a la funcionalidad de los carotenoides, en cuanto a mantener la posición correcta de los carotenoides con respecto a otras moléculas (Haila, 1999).

2.3.1. Distribución.

La apariencia externa de frutos, particularmente su color, es de primordial importancia cuando se consideran los diferentes atributos que definen su calidad, y en el caso de los frutos destinados al consumo en fresco, una impresión visual que no coincida con los estándares establecidos, inmediatamente llevará al rechazo. En el caso de los frutos del género *Capsicum*, destinados al procesamiento de pprikas y oleorresinas, dos de los productos con pigmentos naturales más utilizados en la industria de los alimentos, resulta de gran importancia la obtención de variedades ricas en carotenoides rojos, ya que su calidad se encuentra estrechamente relacionada con su poder colorante (Gómez *et al.* 1996).

Muchos frutos de *Capsicum* presentan colores que van de un color rojo intenso a un rojo anaranjado cuando alcanzan la completa madurez, excepto en de muy pocas variedades de como el tipo "bell", que permanece verde. En la figura 8 se muestran algunos de los carotenoides responsables del color en los frutos *Capsicum*. Algunas mutantes naturales o manipulados por el hombre, se caracterizan por su color amarillo y anaranjado y muy pocos muestran un color blanco cremoso cuando maduran. El contenido de pigmentos es de 0.69 mg/Kg en variedades blancas, 10 mg/Kg en variedades verdes, y 127 a 1600 mg/Kg en frutos rojos. La proporción de los carotenoides en las diferentes variedades coloreadas es distinta entre cada una de ellas (Govidarajan, 1985).

Los carotenoides se encuentran en los cromoplastos de las células del chile. Durante la maduración del fruto, ocurren transformaciones dramáticas, entre las que se encuentra la transformación de los cromoplastos. En este proceso la clorofila desaparece y se presenta la biosíntesis de *novo* carotenoides que no estaban presentes en el fruto verde, los cuales son en algunos casos exclusivos del género *Capsicum* principalmente capsantina y capsorubina (Hornero *et al.* 2000).

2.3.2. Metabolismo.

En un estudio realizado por Hornero *et al.* (2000) para observar el cambio de la composición de los pigmentos durante la maduración de diversos cultivos del género *Capsicum*, encontraron que en las variedades estudiadas la proporción de pigmentos rojos/amarillo tiende a incrementarse con el transcurso de la maduración del fruto

Rylsky (1986) señala que en los estadios tempranos de maduración los cloroplastos se caracterizan por su estructura grana-inter-granal típica, y un gran desarrollo del retículo periférico. En un estadio tardío el sistema tilacoide se desintegra y es reemplazado por tilacoides no clorofilos sencillos, derivados en parte, de la membrana interior envolvente. En los plastidios, los carotenoides siempre están asociados con moléculas de lípidos, ya sea dentro de membranas o de inclusiones en plastoglóbulos.

Durante la maduración del fruto, conforme la clorofila desaparece, se incrementa la cantidad total de carotenoides. Rylsky (1986) señala que se han encontrado diferencias significativas tanto cualitativa como cuantitativamente en diferentes cultivares de *C. annuum*. El contenido de carotenoides es controlado por varios factores, dependiendo del genoma y de las condiciones ambientales. Hornero *et al.* (2000) notaron que en algunos cultivos de *Capsicum* la biosíntesis de pigmentos carotenoides rojos (capsantina, capsorubina, etcétera) alcanza una producción máxima límite, resultando en una acumulación de pigmentos amarillos (como viola-xantina, anteraxantina, zeaxantina, etcétera) que son precursores de los primeros. La extensión de tal acumulación depende de la especie que se trate.

La rápida desaparición de la clorofila conforme avanza la madurez del fruto coincide con la transformación de los cloroplastos a cromoplastos y por consiguiente la aparición de color rojo, amarillo o anaranjado (Minguez-Mosquera & Hornero, 1994). Los cromoplastos sintetizan y acumulan grandes cantidades de carotenoides, los cuales son responsables del color amarillo, naranja, o rojo del fruto. En un fruto maduro, la proporción de los distintos carotenoides varía ampliamente de una variedad amarilla a una roja. El espectro de absorción de extractos de frutos inmaduros de variedades rojas, amarillas, y anaranjadas, muestra un perfil semejante, a diferencia de los extractos de frutos completamente maduros, los cuales muestran el mismo perfil cualitativamente hablando, pero diferente perfil cuantitativo. Los carotenoides de los frutos anaranjados son similares a los de frutos rojos, a excepción del contenido de carotenoides oxigenados (xantofilas). La principal diferencia cualitativa entre frutos amarillos y rojos completamente maduros, es que los frutos amarillos contienen luteína y violaxantina como los pigmentos principales, mientras que los rojos no contienen luteína, y los principales carotenoides son capsantina y capsorubina, las cetonas características de la paprika en el fruto rojo maduro (Rylsky,1986).

En un fruto típico los pigmentos característicos de los cloroplastos, tales como luteína y neoxantina van desapareciendo gradualmente desde el inicio de la maduración y son reemplazados por los pigmentos propios de los cromoplastos, como por ejemplo la zeaxantina y la β -criptoxantina. La luteína y zeaxantina son sintetizadas en el mismo nivel por acción de las enzimas ciclasas (β - y ϵ - ciclasas) las cuales producen la formación de un anillo ϵ - y un anillo β - final para el caso de la luteína, y dos anillos β en el caso de la zeaxantina (figura 8). Una vez iniciada la maduración, sólo se sintetizan los carotenoides que tienen dos anillos β y desaparecen los compuestos con anillos ϵ . Así se hace evidente que la actividad de la ciclasa se restringe a aquellos compuestos con anillos β (β -caroteno, anteraxantina, β - criptoxantina, capsantina, capsorubina, capsantina-5,6-epóxido y cucurbixantina A). La biosíntesis de la neoxantina tiene lugar a otro nivel (figura 9). Este compuesto desaparece durante la maduración. La neoxantina se forma a partir de su precursor, la violaxantina, la cual es biosintetizada en grandes cantidades durante la formación de pigmentos rojos, y más tarde se convierte en capsorubina y capsantina 5,6-epóxido así que el paso de violaxantina a neoxantina no es posible conforme transcurre la maduración.

La anteraxantina, precursor de violaxantina, es utilizada en la síntesis de capsantina (el principal pigmento en el fruto maduro). Esto también podría ser un efecto negativo para reconvertir neoxantina en el inicio de la maduración. La zeaxantina es el principal pigmento de la fracción amarilla a lo largo de todo el proceso de maduración, lo cual denota el papel central de éste pigmento para obstruir la formación de otros intermediarios biosintéticos. La zeaxantina sufre una epoxidación para dar anteraxantina, la cual a su vez sufre una epoxidación y da violaxantina. Ambos pigmentos son importantes en la síntesis de pigmentos intrínsecos en el pimiento rojo (capsantina y capsorubina) vía reorganización picolinato del grupo 3-hidroxi-5,6-epoxi a acilciclopentano o anillo κ , por vía enzimática catalizada por capsantina-capsorubina-sintetasa. Similarmente, pero en menor grado el grupo 3-hidroxi-5,6-epoxi puede sufrir una transformación a 5-hidroxi-3,6-oxabicyclopentano, de tal manera que la cucurbitaxantina A se forma a partir de anteraxantina (Minguez-Mosquera *et al.* 1999).

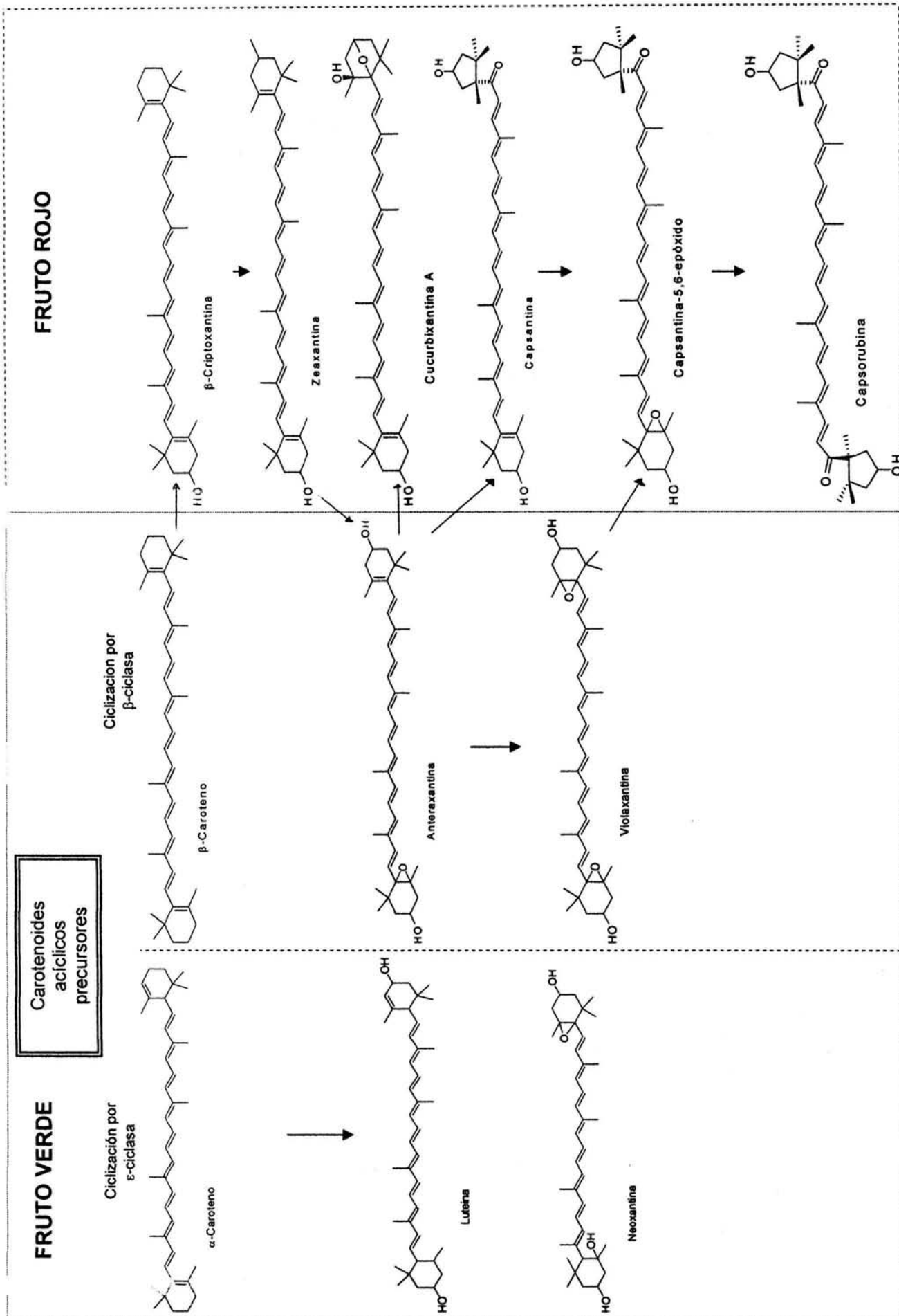


Figura 9. Ruta biosintética de carotenoides en *Capsicum annuum*. Las líneas punteadas incluyen la ramificación de la ruta para frutos rojos y la línea continua incluye la ruta para frutos verdes (Hornero, et al. 1999)

2.3.3. Aplicaciones de los carotenoides.

La función mejor documentada y establecida de algunos carotenoides es su actividad como provitamina A, especialmente el β -caroteno, aunque el χ -caroteno y β -criptoxantina también presentan propiedades de provitamina A, pero en menor grado que el primero.

Los carotenoides han mostrado ser antioxidantes efectivos *in vitro*, pero la situación *in vivo* aún no es muy clara. También se ha reportado que los carotenoides tienen efectos inmunomodulatorios, tales como la reducción en la inmunodepresión uv-inducida después de un suplemento alimenticio con β -caroteno. Otra función fisiológica importante es la comunicación entre células vía puentes, que juega un importante papel en la morfogénesis y diferenciación celular. Se han presentado evidencias de que los individuos con bajos consumos de carotenoides o bajos niveles de carotenoides en la sangre corren el riesgo de sufrir enfermedades degenerativas, daños por radicales libres. Los carotenoides reducen el riesgo de sufrir cáncer, enfermedades cardiovasculares y también han demostrado una asociación inversa con la degeneración macular de la retina (AMD) (H van den Berg *et al.* 2000).

El uso de carotenoides como colorantes alimenticios se ha incrementado. Este grupo de compuestos llena ciertas propiedades deseables tales como su origen natural, nula toxicidad y alta versatilidad; provee colorantes que pueden ser tanto lipo- como hidro-insolubles, con colores que van desde el amarillo hasta el rojo (Minguez-Mosquera & Hornero-Méndez, 1995).

2.3.4. Factores que afectan a los Carotenoides de *Capsicum annuum*.

De acuerdo con Minguez-Mosquera *et al.* (1999) la calidad comercial de una oleorresina de paprika depende básicamente de tres características: una alta concentración de pigmentos; la correcta proporción de esos pigmentos y la suficiente estabilidad para garantizar que las características cromáticas iniciales permanezcan durante su vida útil.

En su ambiente natural los pigmentos carotenoides son muy estables, pero cuando la estructura del fruto es triturada ó calentada o cuando los carotenoides son extraídos con aceites ó disolventes orgánicos, estos se vuelven mucho más lábiles. Si bien, mientras que el calentamiento en general incrementa la tasa de todas las reacciones, las de tipo termo-oxidativa son altamente afectadas por la temperatura.

Minguez-Mosquera *et al.* (1994) encontraron que los factores tecnológicos que más afectan la calidad de la pprika pueden incluir la sobremaduración, secado (dependiendo del tiempo y temperatura) molido (dependiendo del tipo, temperatura y finura del polvo) y condiciones de almacenamiento. Dado que la sobremaduración es indispensable para la completa carotenogénesis y la estabilización de los pigmentos vía esterificación con ácidos grasos del pimiento rojo, éste podría ser sobremadurado por unas cuantas semanas, ya sea en la planta o en almacenes después de la cosecha, para alcanzar la madurez tecnológica (Minguez-Mosquera *et al.* 1993a y b, Minguez-Mosquera & Hornero-Méndez 1994, 1999).

Por otra parte Marks *et al.*(1999) estudiaron los efectos de algunos factores tecnológicos y varietales sobre el contenido y composición de los pigmentos y otros materiales bioactivos vitales. Entre los factores que estudiaron se encuentran:

- a) Dinámica de la maduración.
- b) Efecto de la sobremaduración.
- c) Efecto de la centrifugación y caramelización de los azúcares.
- d) Efecto de la adición de semillas.

Es bien sabido que las operaciones industriales causan una marcada pérdida en la calidad de los componentes del color. La estabilidad de los principales carotenoides depende particularmente de las condiciones de secado. Durante el almacenamiento de la pprika en polvo, se puede llevar a cabo la degradación de color, lo cual depende de la temperatura, el contenido de humedad residual y el incremento del área superficial, particularmente en presencia de lípidos insaturados

Los efectos del procesamiento sobre el contenido de carotenoides deben considerarse dentro de tres perspectivas: la retención de carotenoides, los cambios químicos (isomerización, destrucción / formación de epóxidos) y sus efectos en el valor nutricional como recurso de provitamina A y en términos de otras acciones biológicas que tienen en los humanos (H van den Berg *et al.* 2000).

La susceptibilidad de las moléculas de carotenoides es inherente a la naturaleza del cromóforo. El suministro de energía puede romper la secuencia de conjugación, posiblemente por promoción de electrones a los orbitales de anti-enlace, y así se da la pérdida de sus propiedades cromóforas. Por otro lado, se requieren de cantidades pequeñas de energía para que los carotenoides tengan efecto antioxidante, si bien al actuar como antioxidantes, estos pierden sus propiedades colorantes y así como sus propiedades terapéuticas. Mínguez-Mosquera & Jaren-Galán (1995) publicaron un modelo cinético para describir los efectos del incremento de temperatura, la naturaleza del medio de reacción y los efectos de la presencia de luz en la degradación, utilizando β -caroteno, capsantina y capsantina diesterificada, encontrando que la reacción en medio anhidro (ciclohexano ó etanol absoluto) siguió una cinética de orden cero, mientras que en medio acuoso la degradación de carotenoides presenta una reacción de primer orden. Encontraron también que la luz y el calor aceleraban la reacción sin variación en el orden de las reacciones. Isidoro *et al.* (1995) estudiaron la retención de color en dos variedades de chile rojo medianamente picantes (Nuevo México 6-4 y Mumex R naky), tanto en vainas enteras como en polvo, encontrando que la pérdida de color en vainas mostró tendencias lineales y cuadráticas, después de un tratamiento de congelación y descongelación, mientras que la pérdida de color en el chile en polvo se retardaba y permanecía constante por más tiempo que en las vainas. En 1999 Mínguez-Mosquera y Jaren-Galán, evaluaron los cambios en oleorresinas de paprika asociados a los tratamientos térmicos a diferentes temperaturas de almacenamiento. Específicamente evaluaron los cambios cuantitativos en los pigmentos rojos y amarillos. Se presentó una completa pérdida de la pigmentación la cual fue muy marcada a altas temperaturas. A temperaturas por debajo de los 60C, la tasa de destrucción de los pigmentos amarillos fue mayor que la de los rojos. Arriba de 60C el orden de labilidad de las dos fracciones se invirtió y así la fracción roja se convirtió en la más susceptible.

Los procedimientos y precauciones que se deben de considerar para la manipulación de carotenoides, debido a su inestabilidad inherente, ya que son especialmente sensibles a la luz, calor, oxígeno, ácidos y en algunos casos a los álcalis (por ejemplo: astaxantina, ficoxantina peridina, etc.) son:

- a) Exposición a la luz. Protegerlos especialmente de la luz solar directa o de la luz ultravioleta las cuales inducen a la fotoisomerización *cis-trans* y lleva a la fotodestrucción de los carotenoides.
- b) Protección del calor. Debido a la termolabilidad de muchos carotenoides, especialmente las xantofilas, el calentamiento debería aplicarse únicamente cuando es estrictamente necesario. Debido a que los carotenoides se extraen con disolventes, se debe de elegir solo aquellos que tengan bajo punto de ebullición, para que sea fácil eliminarlos.
- c) Protección del oxígeno. Los carotenoides pueden ser oxidados por el oxígeno o por peróxidos. Ellos son particularmente propensos a la oxidación por el aire cuando son expuestos a él.
- d) Protección de los ácidos. Debido a la exposición de los carotenoides a ciertos ácidos algunos carotenoides sufren de descomposición oxidativa, isomerizaciones *cis-trans* e isomerización de 5,6-epóxidos a furanoides 5,8-epóxidos.

Las muestras de carotenoides siempre deberán ser almacenadas en la oscuridad, bajo atmósfera de nitrógeno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. En el caso de muestras sólidas, se deben envasar al vacío (Davies, 1976).

2.4. Capsaicinoides en *Capsicum annuum*.

La capsaicina es el principio picante del pimiento, encontrándose ausente de las variedades “dulces”. Es una sustancia de naturaleza alcaloide, específicamente se trata de un protoalcaloide, cuya formula empírica es $C_{18}H_{27}O_3N$, siendo un producto de condensación del ácido decilénico y de la 3-hidroxi-4-metoxi bencilamina. En la actualidad se sabe que la capsaicina no es sólo un compuesto, sino que se trata de una mezcla de amidas, que son comúnmente conocidas con el nombre de capsaicinoides, siendo la capsaicina el más importante entre ellas (Nuez, 1996). En efecto el principio pungente de los chiles picantes es un grupo de compuestos constituido por los análogos de capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida): dehidrocapsaicina (8-metil-n-vanillil-nonanamida), nordehidrocapsaicina, homocapsaicina I, homocapsaicina II, homodehidrocapsaicina I, homodehidrocapsaicina II, N-vallinil octanamida, N-vanillil nonanamida, N-vanillil decanamida, en la figura 10 se presentan las estructuras de dichos capsaicinoides. Estos compuestos están formados por aminas de la vanillilamina y ácidos grasos de cadena ramificada de 9 a 11 átomos carbonos (Suzuki e Iwai, 1984).

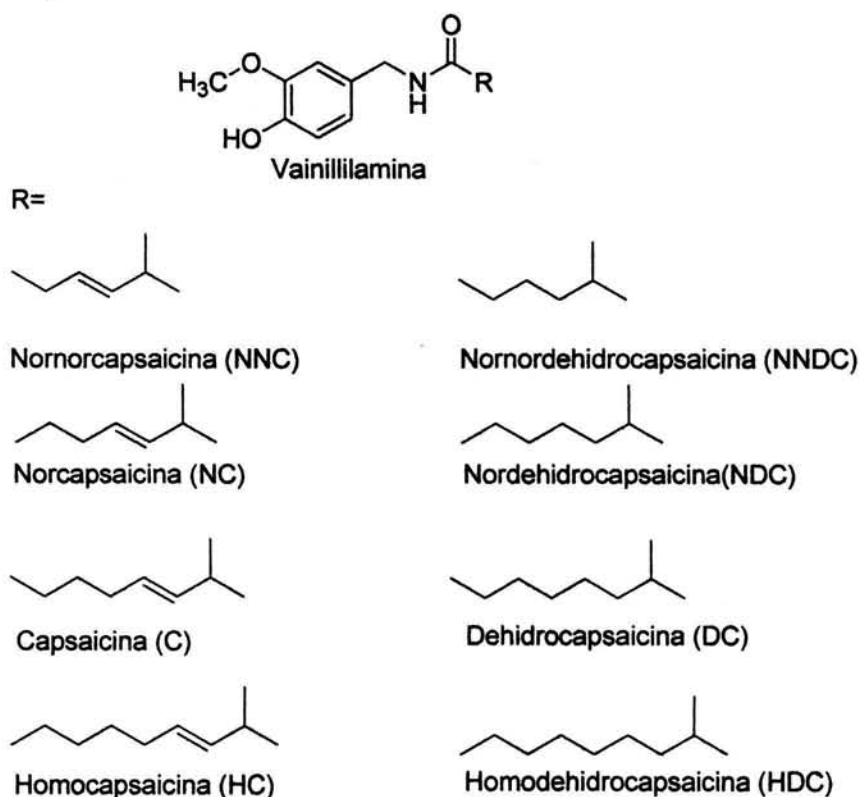


Figura 10. Diferentes estructuras de capsaicinoides (Contreras & Yahia, 1998).

2.4.1. Lugar de biosíntesis en frutos.

Los capsaicinoides se distribuyen en la naturaleza principalmente en los frutos del género *Capsicum annuum*. En la naturaleza la capsaicina y dehidrocapsaicina son los capsaicinoides principales y la homocapsaicina y homodehidrocapsaicina son los análogos menores (Suzuki & Iwai, 1984).

La capsaicina tiene un peso molecular de 305 g/mol, sus cristales son blancos inodoros, muy picante; su punto de fusión es de 64.5°C y el de ebullición de 210 a 220°C. Su absorbancia máxima en ultravioleta visible (UV) es de 227-281 nm. Es soluble en etil éter, alcohol etílico, acetona, alcohol metílico, cloroformo, álcali caliente, acetonitrilo y es poco soluble en agua. La dehidrocapsaicina tiene un peso molecular de 307.21 g/mol, es un cristal blanco opaco sin olor, muy pungente; tiene un punto de fusión de 65.6 a 65.8 °C y su absorbancia máxima está por debajo de los 230 nm. Es soluble en los mismos disolventes que la capsaicina. La nordehidrocapsaicina pesa 293.19 g/mol; es un cristal blanco muy picante, se funde a 65.6 °C, y absorbe a 280.5 nm. Los detalles de los otros análogos aún no se han establecido (Robledo, 2000).

Se han identificado doce compuestos diferentes de capsaicinoides, pero la capsaicina y dehidrocapsaicina son las principales responsables de aproximadamente el 90 % del picor.

Los capsaicinoides son derivados de compuestos fenilopropanoides y se caracterizan por su alta actividad biológica y su efectividad farmacológica, neurológica y dietética (Contreras & Yahia, 1998).

Govidarajan (1985) ha señalado que el contenido de capsaicina en frutos de *C. annuum* como en pimientos rojos va de 0.001 - 0.005 %, mientras que la concentración de capsaicinoides en chile varía de 0.003 - 0.1 % para los ligeramente picantes; para las variedades de chile medianamente picantes de 0.3 - 0.5 % y chiles muy picantes se caracterizan por contener de 0.3 - 1 %.

Se han realizado diversas investigaciones para elucidar el lugar de biosíntesis en frutos. En el artículo de Suzuki & Iwai (1984) se describe una breve historia de dichas investigaciones y se mencionan los trabajos realizados por Faruya & Hashimoto (1954) quienes fueron los primeros en describir la distribución de órganos secretores de capsaicinoides en plantas de *Capsicum* a nivel microscópico. Ellos especularon que la capsaicina se secretaba en receptáculos de las células epidérmicas de los septos interloculares como complejos capsaicina-lípidos. También mencionan a Otha quien en 1962, a partir de sus observaciones histológicas e histoquímicas, concluyó que los órganos secretores de capsaicinoides se localizaban en la placenta y los septos interloculares de los frutos de *Capsicum*. Además comparó el contenido de capsaicinoides en pericarpio, semillas y placenta con septos interloculares, y encontró que eran estas últimas partes las que contenían más capsaicinoides que cualquier otra. Otros investigadores que se citan son Iwai *et al.*, quienes en 1979 compararon la incorporación de la DL-fenil-[3-¹⁴C] alanina y L-valina [U-¹⁴C] en las moléculas de capsaicinoides en raíz, tallo y fruto (pericarpio y placenta) de *C. annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa. Ellos encontraron que la presencia de fenilalanina fue mayor en la placenta (50933 cpm/g de tejido fresco) que en el pericarpio (81084 cpm/g de tejido fresco) la raíz (4000 cpm/g) y el tallo (1000 cpm/g). Lo mismo observaron para la valina donde hubo 13182 cpm/g de peso fresco en placenta y 342 cpm/g de peso en pericarpio. Fujiwake *et al.* (1980) realizaron estudios sobre la ubicación del principio pungente en el chile, mediante microscopía ultravioleta, encontrando que los capsaicinoides se encuentran ubicados dentro de diminutos gránulos oscuros en algunos organelos subcelulares. Posteriormente, al realizar detallados experimentos de la estructura intracelular de la placenta utilizando microscopía electrónica demostraron la ocurrencia de gránulos en las vacuolas grandes y vesículas pequeñas especialmente en las células epidérmicas elongadas. Los estudios realizados con protoplastos de esta misma variedad de chile, cosechados 20 días después de la floración, mostraron la localización de los capsaicinoides en las vacuolas de los protoplastos y la presencia de gránulos denso-electrónicos incluidos en estructuras que se consideraron como vacuolas subdesarrolladas (Fujiwake *et al.* 1980). Las observaciones realizadas empleando técnicas de microscopía para investigar la localización intracelular de los capsaicinoides en frutos de *Capsicum*, revelaron algunos cambios morfológicos, principalmente en el tejido epidérmico de las placentas durante la maduración. Fue posible observar el alargamiento de

estas células y la presencia de gránulos osmofílicos en las cuales los capsaicinoides se formaron y se acumularon activamente. Asimismo, se notó la presencia de muchos gránulos denso-electrónicos que parecían ser capsaicinoides tanto en vesículas pequeñas como en las vacuolas de las células epidérmicas de la placenta. En la placenta de los frutos de 30 días después de la floración se reconoció el desarrollo de un espacio hinchado entre la cutícula y las células epidérmicas (receptáculo de capsaicina) en el cual se pudo confirmar la presencia de capsaicinoides, mediante tinción. Los receptáculos de capsaicina se reconocieron principalmente en la región media de la placenta y no se observaron en la parte superior o inferior, ni en las zonas cercanas al pericarpio y las semillas. Los datos obtenidos sugieren que los capsaicinoides deben estar localizados en organelos subcelulares tales como vesículas y vacuolas antes de secretarse en los receptáculos de capsaicina (Suzuki *et al.* 1980). Zamsky & Shoham (1987) también analizaron la ultraestructura de células secretoras de capsaicinoides en pimientos picantes y no picantes, emplearon microscopía de transmisión electrónica y microscopía de absorción electrónica. En este caso establecieron que el sitio donde se sintetizan los capsaicinoides es el compartimiento interno del retículo endoplasmico (ER). Sugirieron que las vesículas que contienen los capsaicinoides tienen un tamaño entre 0.15-1.0 μm las cuales se derivan de fragmentos del ER agotado. Emigran a través del citoplasma y se fusionan con el plasmalema. También se han encontrado capsaicinoides en el tejido de la placenta donde las cantidades son mayores a las encontradas en semillas, pericarpio y en el tallo final del fruto. La fertilización y formación de semillas no son necesarios para la síntesis de capsaicina. En frutos partenocárpico encontró que la concentración de capsaicina era casi la misma que en aquellos frutos de los cuales se habían removido las semillas (Fujiwake *et al.* 1980; Rylsky, 1986).

Al conocer dónde se localiza la capsaicina en el chile se puede determinar la manera más fácil de extraer este compuesto y de esta manera se encuentre disponible en el medio acuoso para ser oxidada por la enzima peroxidasa de Nabo, dada esta observación, resulta práctico moler el chile y entonces la capsaicina se solubiliza en agua, donde se propone llevar a cabo la reacción enzimática bajo las condiciones que más adelante se mencionan en este trabajo.

2.4.2. Metabolismo.

Las investigaciones realizadas acerca de la vía biosintética de la capsaicina y sus análogos, comenzaron a fines de la década de 1960, cuando Bennet & Kirby, en 1968 (citados por Robledo, 1991) emplearon técnicas radio isotópicas en frutos de *Capsicum annuum*. Encontraron que la fenilalanina, los ácidos p-cumárico, ferúlico y cafeico y la vanillilamina se incorporaban al residuo bencil de la capsaicina durante un periodo de siete días de incubación del fruto con estos compuestos. Por otro lado, Leete & Louden (1968) (citados por Robledo, 1991) expusieron frutos de *C. frutescens* a la presencia de DL-[3-¹⁴C] fenilalanina, DL-[3-¹⁴C] tirosina y L-[metil-¹⁴C] metionina, durante dos semanas. Los resultados indicaron que sólo la DL-[3-¹⁴C] fenilalanina marcó el grupo metileno de la vanillilamina.

Posteriormente, Yeoman *et al.* (1980) (citado por Robledo, 1991) recopilaron la información previa existente al respecto y propusieron una vía para la síntesis de capsaicina en donde la fenilalanina es el precursor de la vanillilamina vía ácido cinámico como sucede para la síntesis de la lignina después de la formación de ácido cafeico o alternativamente a la del ácido ferúlico. De la misma manera estos autores sugieren que la valina es el precursor del ácido 8-metilnonenoico que se une a la vanillilamina para formar capsaicina. Indican también que los aminoácidos precursores pueden ser dirigidos a la síntesis de capsaicina y no a la de proteínas, retardando así la síntesis de estas últimas y disminuyendo la velocidad de crecimiento. Por otro lado Suzuki *et al.* (1980) encontraron que además de la L-[U-¹⁴-C] valina, la L-[U-¹⁴-C] leucina también se incorporaba a los capsaicinoides y que la valina lo hacía a los ácidos grasos de la capsaicina e hidrocapsaicina, mientras que la leucina se incorporaba a los de la nordeihidrocapsaicina y homodehidrocapsaicina.

Fujiwake *et al.* (1980) estudiaron la formación de capsaicinoides en protoplastos de placenta en frutos de *C. annuum* var. *annuum* var. Karayatsubusa, propusieron la vía de biosíntesis de estos compuestos. En esta ruta la L-fenilalanina es precursor de la vanillilamina, mientras que la L-valina y L-leucina se utilizan en la síntesis de las cadenas de ácidos grasos de número par e impar. Ellos también lograron detectar la actividad de las enzimas que intervienen en esta ruta biosintética. En la figura 11 se muestra la propuesta por Bernal *et al.* (1995).

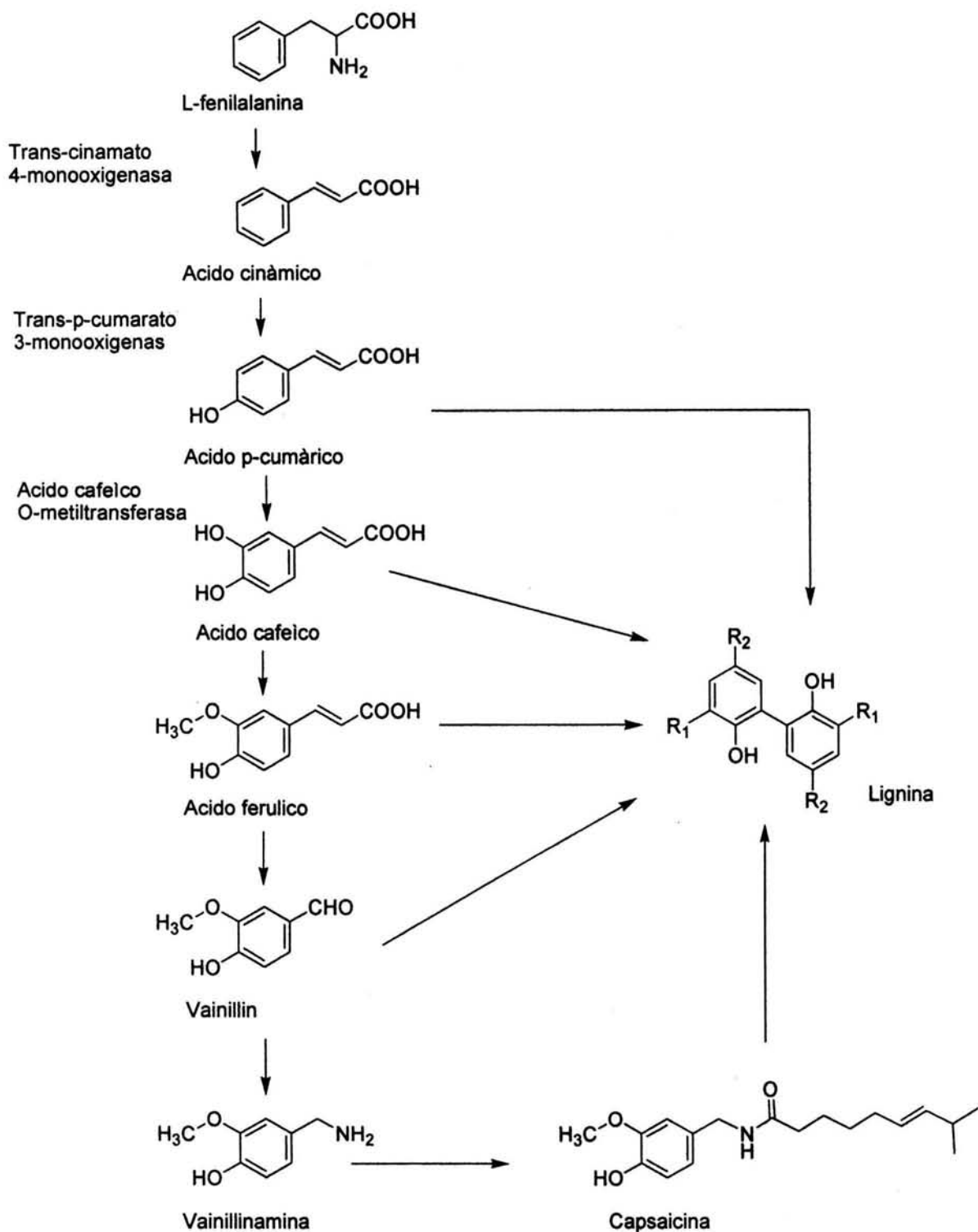


Figura 11. Ruta de biosíntesis de la capsaicina en *Capsicum annuum*, mostrando los principales compuestos fenólicos, y la probable desviación de estos compuestos para formar compuestos similares a la lignina (Bernal *et al.* 1995).

Romeyer *et al.* (1983) observaron que existen variaciones en el contenido de compuestos fenólicos en frutos durante los diferentes estados de desarrollo y maduración, e incluso de una variedad a otra, por ejemplo en el fruto de la variedad Padrón el decremento en la concentración de los compuestos fenólicos puede estar asociado a la síntesis de capsaicinoides. En contraste Sakrasno & Yeoman (1993) quienes estudiaron *Capsicum frutescens*, observaron la presencia de compuestos fenólicos glicosilados en cantidades considerables sólo antes de la acumulación máxima de capsaicinoides, debido a los intermediarios para la síntesis de los mismos. Por otro lado, Sakamoto *et al.* (1994) (Citado por Robledo, 1991) detectaron compuestos fenólicos libres en dos cultivos de *C. annum*. Ellos reportaron un incremento en los compuestos fenólicos libres durante el desarrollo, pero éste no se correlacionó con la producción de capsaicinoides en ninguno de los cultivos estudiados. Recientemente, Estrada *et al.* (2000) realizaron estudios para describir el cambio en la concentración de compuestos fenólicos libres, capsaicinoides y lignina durante la maduración de *C. annum*, demostraron que la capsaicina es una amina derivada de vanillilamina y ácido 8-metilnontrans-6-enoico. La vanillilamina se deriva a su vez de L-fenilalanina, mientras que el ácido graso se deriva de la valina. Estos experimentos realizados para estudiar la biosíntesis de la capsaicina en el chile picante sugirieron que existe una competencia con la acumulación de los compuestos de la lignina, los cuales derivan del compuesto fenil-propanoide, el cual proviene de la capsaicina misma.

En la figura 12 se muestran los cambios en capsaicinoides, compuestos fenólicos libres y lignina durante la maduración del fruto. Los capsaicinoides se detectan a 14 días después de la floración en el primer estado de desarrollo. Los niveles permanecen bajos por 21 días, pero 28 días después de la floración los capsaicinoides se incrementan moderadamente, y finalmente, en la última etapa de maduración se presenta un incremento dramático en los niveles de capsaicinoides, encontrándose los máximos valores a los 42 días después de la floración.

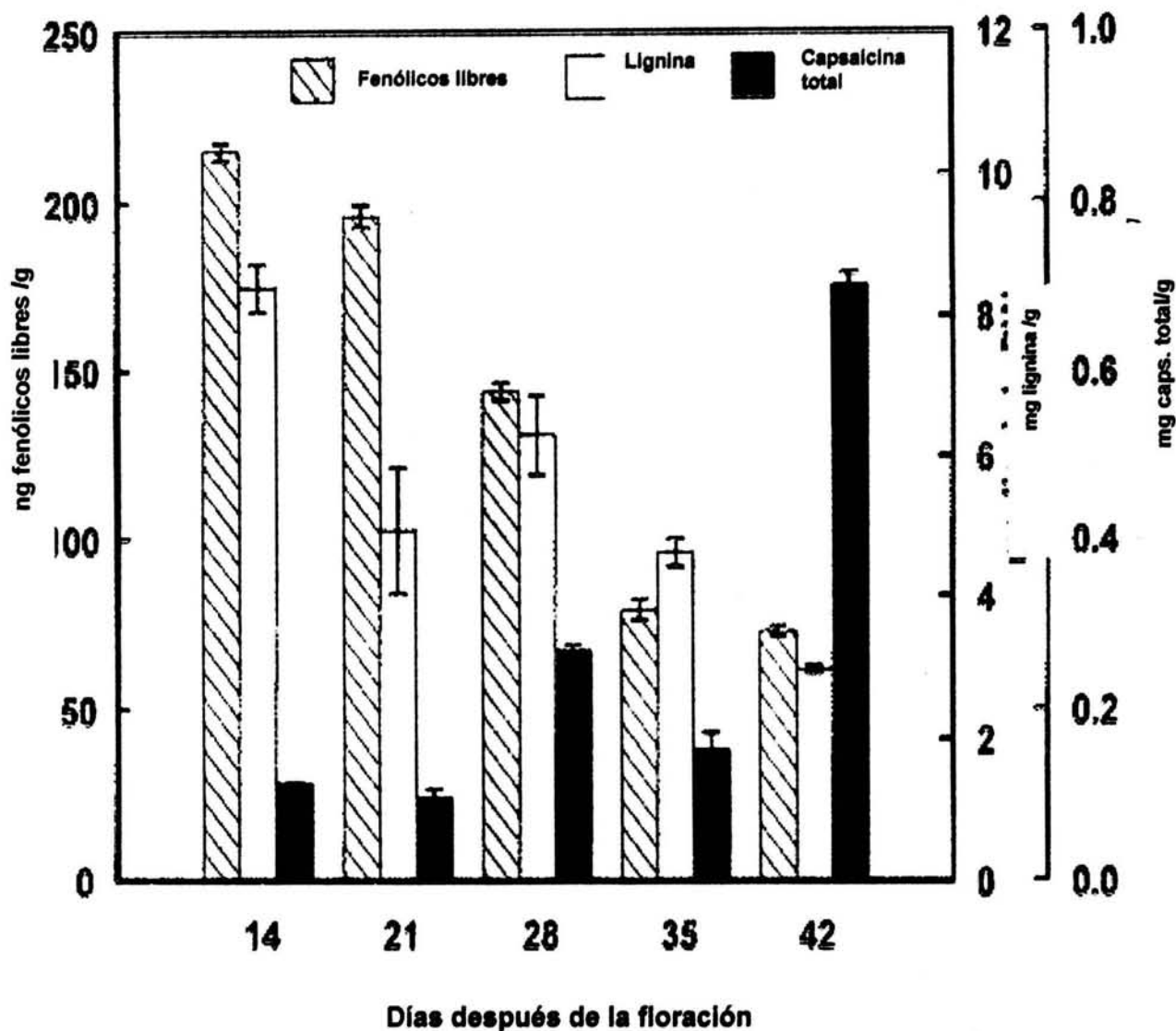


Figura 12 Cambios en el contenido de capsaicinoides, lignina y compuestos fenólicos libres durante la maduración de frutos de pimiento. Las barras muestran SD. (Estrada *et al.* 2000).

Durante el desarrollo y maduración del fruto se han identificado cuatro tipos de compuestos fenólicos libres: ácido protocatequinoico, ácido cumárico, ácido clorogénico y ácido ferúlico. En la tabla 3 se muestran las concentraciones totales de estos cuatro compuestos durante el proceso de maduración del fruto. Todos ellos exhiben un decremento en el contenido con el desarrollo excepto para el ácido ferúlico, precursor de los capsaicinoides que aparece en el último estado de maduración.

Tabla 3. Evolución de compuestos fenólicos libres durante la maduración de frutos de Chile. (Estrada *et al.* 2000).

Compuestos fenólicos libres^b				
Día^a	Ácido protocatequinoico	Ácido clorogénico	Ácido cumárico	Ácido ferúlico
14	130 ± 4	66 ± 2	19 ± 2	ND
21	134 ± 5	48 ± 3	14 ± 2	ND
28	113 ± 3	31 ± 2	ND	ND
35	79 ± 3	ND	ND	ND
42	63 ± 2	ND	ND	10 ± 1

^a: Número de días después de la floración. ^b: Niveles de compuestos fenólicos libres reportados como ng/g ± SD, en peso seco. ND: no detectado.

Se ha propuesto que la síntesis de capsaicinoides *in vivo* coincide con la pérdida de textura del fruto, la cual a su vez puede deberse a la alta tasa de suministro de sustratos para la síntesis de capsaicinoides. Holden *et al.* 1987 (citado por Robledo 1991); Estrada *et al.* (2000) reportaron que la disminución de los compuestos fenólicos ligados a la pared celular puede deberse a que de esta manera se proveen sustratos para la ruta biosintética de capsaicina. También Sakrasno & Yeoman, 1993, sugieren que la biosíntesis de capsaicina en frutos de pimiento compite con la acumulación de sustancias derivadas de la lignina en la pared celular, las cuales provienen probablemente de precursores como fenilpropanoides y de la capsaicina misma, un proceso que ocurre cuando la acumulación de capsaicina llega al máximo.

La acumulación de capsaicinoides en frutos de *Capsicum* por lo tanto se encuentra estrechamente relacionada con la edad del fruto, tamaño y estado de desarrollo. Los capsaicinoides se empiezan a acumular en los primeros estados de desarrollo del fruto y su acumulación alcanza un máximo cuando el fruto se acerca al final de su fase de crecimiento. La acumulación continúa hasta que el fruto alcanza su máxima longitud. Sin embargo la concentración de capsaicinoides varía dependiendo de los diferentes cultivos analizados. Los factores que influyen en la acumulación de capsaicinoides son de dos tipos: genético y la interacción con el medio ambiente (temperatura, luz, fertilización, agua). Incluso al proporcionarle minerales a los cultivos de chile se ha observado que varía el contenido de capsaicina en el chile jalapeño, así como la carencia de agua, la cual tiene un alto impacto en el metabolismo del chile, ya que aumenta la síntesis de metabolitos secundarios tales como los compuestos precursores de la lignina, lo cual a su vez afecta a la biosíntesis de capsaicina debido a la competencia oxidativa que representan estos compuestos (Estrada *et al.*, 2000).

2.4.3. Algunos aspectos importantes de los capsaicinoides.

Los capsaicinoides han mostrado actividades farmacológicas potenciales, (Surh & Lee, (1995); Cichewick & Thorpe, (1996). Se ha encontrado que la capsaicina reduce la absorción de grasas por las células del epitelio, además de que disminuye los niveles de colesterol en la sangre (en ratas y hámsteres). En ratas, los capsaicinoides en bajas concentraciones aumentan los mecanismos de defensa del estómago. También se ha mostrado que tienen efectos laxantes sobre el colon, (Suzuki e Iwai, 1984).

Se ha podido observar la actividad fungicida de la capsaicina contra especies como *Zygosacharomyces sp.* y *Micoplasma aglactiae*. También se ha mostrado la actividad bactericida sobre *Bacillus cereus* y *B. subtilis*.

El efecto más profundo de los capsaicinoides en el tracto gastrointestinal es la estimulación de la secreción del jugo gástrico, lo cual puede ocasionar úlcera. También causan fuerte inflamación e irritación en la piel, membrana mucosa y ojos, y son tóxicos cuando se suministran en altas concentraciones. Se ha demostrado que estimulan la respiración y la vaso

constricción, la presión aórtica y el bombeo cardíaco. También disminuyen la sensibilidad en la piel humana, razón por la cual se ha usado para aliviar el dolor muscular (Suzuki & Iwai, 1984).

Los capsaicinoides también son importantes en la industria. Las oleorresinas que pueden ser consideradas como una solución de capsaicina en aceite fijo (fabricada de chiles picantes deshidratados) se usan como condimento en la preparación de ciertas carnes frías como chorizos, salchichas y mortadelas. También complementan la salsa “catsup” y otras. La oleorresina se combina con el tabaco para darle un sabor especial a los cigarros. La oleorresina de chiles también se puede agregar al ron y al ginger ale (Robledo 1991).

Sin embargo la aplicación limitada de las oleorresinas extraídas de frutos picantes, así como la creciente demanda de colorantes de origen natural no tóxicos hacen necesaria la extracción y/o degradación de capsaicinoides en estos productos.

En el presente trabajo de investigación se plantea eliminar los capsaicinoides de la harina. Como primer paso se procedió a caracterizar la harina de chile y tener métodos de extracción de los compuestos de interés, los cuales son los carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina; posteriormente se procedió a identificar los efectos que tienen cada uno de los reactivos que se adicionan al reactor, sin que se llevara a cabo la reacción enzimática. Finalmente se realizaron los ensayos con estándar de capsaicina y peroxidasa de Nabo, o bien con harina de chile y peroxidasa de Nabo, evaluando los cambios producidos en los componentes de interés.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Material biológico.

En la presente investigación se utilizó chile guajillo (*Capsicum annuum*) seco en hojuelas, las cuales fueron proporcionadas por la compañía Bioquimex Natural (Querétaro, Qro., México). Estas hojuelas se molieron en un molino analítico para obtener un polvo fino y con este material llevar a cabo la investigación.

Enzima peroxidasa de Nabo (E.C. 1.11.1.7); 588 U/mg, pH=6.00, temperatura de operación a 25°C, Fluka-Aldrich.

3.2. Reactivos.

Peróxido de Hidrógeno al 31.50 %, marca Sigma Aldrich.

Patrón compuesto de 65.00 % de capsaicina y 35.00 % de dehidrocapsaicina, de la marca Sigma-Aldrich.

Cloroformo y acetona (GRA) para llevar a cabo las extracciones, marca Tecsiquim.

Acetonitrilo HPLC, marca JT Baker para la extracción de capsaicina de acuerdo a Collins *et al.* (1995).

Acetonitrilo y agua grado HPLC para las determinaciones analíticas, marca JT Baker. Previo al uso, éstos se filtraron al vacío a través de filtros de membrana Millipore poro de 0.45 µm y se desgasificaron con helio (Praxair, grado ultra alta pureza). Las muestras analizadas por HPLC se filtraron antes del análisis a través de una membrana Millipore poro de 0.25 µm.

3.3. Equipo.

Molino analítico Junkle IKA Labortechnik modelo A10 20000 rpm.

Rotavapor IKA-Werk, tipo RV 0551 Junkle & Kunnkel.

Agitador múltiple de 5 espacios, IKAmacro con 10 velocidades.

Cabeza IKA EH 4-basic, para controlar la temperatura del baño de acrílico.

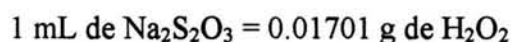
Espectrofotómetro uv-visible Hawlett Packard modelo HP8453.

Cromatógrafo Waters, integrado por los siguientes módulos: bomba cuaternaria Waters Associates modelo 600E y detector uv-visible de rearreglo de diodos Waters Associates modelo 996. La columna empleada fue una C18 de fase reversa Novapack Waters Associates de 3.9 mm D.I. x 150 mm, tamaño de partícula 3.9 µm. El software utilizado fue Millennium 32.

3.4. Métodos.

3.4.1. Determinación de la Concentración de Peróxido de Hidrógeno (University of Québec, 2001).

1. Tomar 25 mL de la solución preparada de peróxido de hidrógeno, y adicionarla gradualmente a una solución agitada de 1g de yoduro de potasio grado reactivo analítico en 20 mL de ácido sulfúrico 2N, contenidos en un matraz para titulaciones yodométricas. Reposar la solución por 15 minutos.
2. Titular el yodo liberado con solución estándar de tiosulfato de potasio 0.1 N, adicionando 2 mL de solución de almidón al 1%, cuando el color del yoduro casi desaparezca.
3. Correr un blanco al mismo tiempo.
4. Calcular la concentración de peróxido de hidrógeno utilizando la siguiente regla:



Al volumen gastado para la titulación de la muestra restar el volumen gastado en el blanco.

3.4.2. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir de muestra seca utilizando acetona como disolvente.

Método de referencia que se basa en la metodología sugerida por el Dr. Vicente Ridaura Sanz y Dra. Sandra Naranja mediante comunicación oral, para determinar carotenoides totales y porcentaje de rojos en harina de chile seca. Este método es una adaptación del método 971.26 descrito en el manual de la AOAC (1990).

1. Moler y homogenizar la muestra en el molino analítico.
2. Pesar 0.1 g de muestra, transfiriéndola a un matraz volumétrico de 100 mL.
3. Agregar 50 mL de acetona grado industrial (NF) y someter la muestra a calentamiento por 10 minutos a 56° C +/- 1° C.
4. Enfriar los matraces a temperatura ambiente.
5. Aforar a 100 mL con acetona (NF). Tapar y agitar durante 1 ó 2 minutos, reposar por 15 minutos.
6. Si la concentración de carotenoides es muy elevada a simple vista, transferir 10-20 mL a un matraz volumétrico de 50 mL y aforar con acetona (NF).
7. Leer en el espectrofotómetro UV-vis en celdas de cuarzo, utilizando acetona como blanco.
8. Realizar las lecturas a 422, 460, 495 nm. Si la absorbancia se encuentra entre 0.3 y 0.7 tomarla como correcta, pero si es mayor a 0.7 realizar una dilución tomando 10 mL de la solución problema y aforar a 25 mL con acetona.
9. Si la absorbancia resulta menor a 0.3 pesar una mayor cantidad de muestra (0.5 g) y repetir el análisis. Cada análisis se deberá realizar por duplicado.

Para realizar el cálculo de la concentración de carotenoides totales (CarT) se emplea la siguiente formula, la cual se obtiene a partir de la curva estándar obtenida de diferentes diluciones de rodofila (comunicación oral Dr. Vicente Ridaura Sanz y Dra. Sandra Naranjo Modad):

$$\text{Car T (g/Kg)} = \frac{A_{460} * 0.164 * \text{F.D.}}{P * 40}$$

Donde:

A_{460} = Absorbancia a 460 nm

P = Peso de la muestra en gramos

F. D. =Factor de dilución 100 ó 100*50/10-20 ó 100*25/10

0.164 = Factor de conversión para unidades de color ASTA

40 = Factor de conversión ASTA a g/Kg

El uso de diferentes longitudes de onda permite estimar el porcentaje de rojos en la muestra mediante la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Rojos} = (A_{495}/A_{422} * 72.5) - 24.5$$

72.5 y 24.5 son constantes y corresponden a la pendiente y la ordenada al origen respectivamente, de la curva de calibración.

3.4.3. Determinación de capsaicina a partir de muestra seca mediante metodología propuesta por Collins *et al.* (1995).

Método de referencia para caracterizar la harina de chile partiendo de muestra seca, fue tomado a partir de las referencias: Collins *et al.* (1995), Contreras & Yahia, (1998); Bernal *et al.* (1993 a y b). A diferencia de los métodos descritos en otros manuales como el de la AOAC (1995) y ASTA (1995), resultó ser el más práctico de aplicar utilizando muestra seca.

1. Pesar un gramo de muestra molida seca.
2. Colocarla en una botella de vidrio Pyrex de 125 mL, agregar 10 mL de acetonitrilo grado HPLC y taparla herméticamente.
3. Someterla a calentamiento en baño de agua a 80°C por cuatro horas, agitando manualmente cada hora.
4. Retirar la muestra del baño y enfriar a temperatura ambiente.
5. Extraer 3 mL del sobrenadante y filtrar en una jeringa de 5 mL a través de un filtro de 0.25 µm de poro, colocar la muestra en un vial de 1 mL para su análisis.
6. Las condiciones HPLC para determinar el contenido de capsaicina son: temperatura ambiente, flujo de 1 mL/ min, 25 minutos de corrida, fase móvil isocrática, con 50% acetonitrilo y 50% agua acidificada con ácido acético a pH 3.0, en una columna C18 de fase reversa Novapack Waters Associates de 3.9 mm D.I. x 150 mm, tamaño de partícula 3.9 µm y un volumen de inyección 20 µL y detección a 280 nm.

Durante el período en el cual se llevo a cabo la caracterización de la harina de chile, así como la elección y optimización del método de extracción de carotenoides y capsaicina a partir de la suspensión acuosa donde se llevaría a cabo la reacción (ver anexo 1), cada determinación se llevó a cabo con al menos 25 repeticiones, tratando de que todos se llevaran a cabo bajo las mismas condiciones para asegurar así la reproducibilidad y exactitud del método.

El método de extracción y cuantificación de capsaicina, carotenoides totales y % de rojos a partir de muestra en suspensión acuosa que se utilizó fue el método que a continuación se describe y cuyo desarrollo se llevo a cabo bajo la metodología descrita en el anexo 1.

3.4.4. Extracción de capsaicina y carotenoides empleando acetona y cloroformo con centrifugación de la muestra.

Esta metodología fue desarrollada durante esta investigación para adaptar los métodos a las necesidades de la muestra con la que se trabajo.

La metodología que finalmente se utilizo durante el desarrollo experimental de este proyecto fue la que a continuación se describe:

- a. Preparación de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción.
 1. Preparar la siguiente mezcla:
 - 3g de harina de chile guajillo
 - 30 mL de buffer pH 6.00
 - 3 mL de peróxido de hidrogeno 1.0 mM
 2. Someter la mezcla descrita a las condiciones de reacción, según sea el caso.

- b. Extracción de capsaicina y carotenoides.
 1. Transferir la mezcla a tubos de centrifuga y centrifugar a 1000 rpm durante 30 minutos.
 2. Transferir el sobrenadante a un embudo de separación.

3. Agregar 10 mL de cloroformo.
4. Agitar vigorosamente y dejar reposar el matraz hasta que se separen las fases.
5. Vaciar cloroformo en un matraz bola.
6. Repetir los pasos 3 - 5 hasta que ya no se extraiga mas color con el cloroformo.
7. En cuanto a la parte sedimentada, transferirla a un embudo con el papel filtro whatman número 41.
8. Extraer los pigmentos de la torta con enjuagues de acetona, recibir estos enjuagues en embudo de separación.
9. Agregar 10 mL de cloroformo al embudo de separación y agitar vigorosamente.
10. Reposar hasta que se separen las fases.
11. Repetir los pasos 8 – 10 hasta que la fase rica en cloroformo aparezca sin color.
12. Vaciar la fase inferior del embudo a un matraz junto con el extracto obtenido a partir del sobrenadante y evaporar a sequedad.
13. Disolver con pequeños volúmenes de acetona y transferir el extracto a un matraz de 10 mL, aforar con acetona.

c. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos.

1. Tomar la alícuota de 1 mL para determinar carotenoides, transferirlo a un matraz aforado de 100 mL y aforar con acetona.
2. Para determinar carotenoides totales utilizar acetona como disolvente y leer en el espectrofotómetro UV-visible a 422, 460 y 495nm. Para los cálculos utilizar las formulas descritas en el método 3.4.2.

d. Determinación de Capsaicina.

1. En el caso de la capsaicina tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y evaporar en atmósfera inerte de nitrógeno hasta sequedad, aforar con la mezcla compuesta por 50% agua acidificada con ácido acético a pH 3.0 y 50% acetonitrilo, ambos reactivos grado HPLC.

2. Mezclar perfectamente la muestra en un agitador automático durante 30 minutos, filtrar a través de un filtro de nylon millipore de 4.5 μm .
3. Utilizar las siguientes condiciones de HPLC para determinar el contenido de capsaicina: Temperatura ambiente, flujo de 1 mL/min, 60 minutos de corrida. Fase móvil isocrática con 50% de acetonitrilo y 50% de agua acidificada con ácido acético a pH 3.0, volumen de inyección de 20 μL , columna C18 de fase reversa Novapack Waters Associates de 3.9 mm D. I. x 150 mm, tamaño de partícula 3.9 μm y detección a 280 nm en el detector de rearreglo de diodos.

3.5. Estudios de la reacción de oxidación de la capsaicina mediante peroxidasa de Nabo.

Como paso preliminar a los experimentos con enzima peroxidasa se procedió a estimar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre los carotenoides totales y porcentaje de rojos, y el efecto de la concentración de capsaicina sobre la actividad enzimática. Adicionalmente se estudió el efecto del tiempo de reacción.

3.5.1. Efecto de la adición de peróxido de hidrógeno sobre los carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina en ausencia de enzima.

Las condiciones que se utilizaron para evaluar dicho efecto fueron las siguientes:

- a. Preparar la siguiente mezcla:

3 g de harina de chile

Agregar 30 mL de buffer de tris acetato pH 6.00

Agregar 3.3 mL de peróxido de hidrógeno 1.0 mM, (concentración final del peróxido de hidrógeno en la muestra 0.1 mM.)

- b. Agitar durante 14 horas a 25° C.

- c. Extracción y cuantificación de carotenoides y capsaicina de la mezcla de reacción, como se señala en el método 3.4.4.

Se evaluaron los efectos del peróxido de hidrógeno sobre los compuestos de interés, como por ejemplo efecto degradativo, efecto oxidativo, etc.

3.5.2. Determinación de la capsaicina soluble en la mezcla de reacción.

- a. Preparación de la mezcla de reacción como se describió anteriormente, en el método 3.5.1.
- b. Centrifugación de la muestra.
 - 1. Centrifugar la muestra bajo las condiciones previamente descritas en la sección 3.4.4.
 - 2. Filtrar el sobrenadante a través de papel filtro whatman no. 41
- c. Preparación de la muestra para determinar capsaicina.
 - 1. Tomar con pipeta volumétrica, 1 mL del filtrado y colocarlo en un vial, agregar 1 mL de acetonitrilo.
 - 2. Inyectar en el HPLC, bajo las condiciones de operación ya descritas en la sección 3.4.4.

3.5.3. Ensayos preliminares con Peroxidasa de Nabo y Harina de Chile.

Se utilizó para determinar si las condiciones reportadas en la publicación de Bernal *et al.* (1993 a y b) eran reproducibles y adaptables a las condiciones que se trabajaron.

Las condiciones bajo las cuales se trabajó fueron prácticamente las mismas que en dicha publicación, salvo que se utilizó harina de chile y el tiempo de reacción fue de 14 horas en vez de 24 horas, como lo hicieron dichos autores.

- 1. Preparar la siguiente mezcla:
 - 3 g de harina de chile guajillo
 - 30 mL de buffer tris acetato pH 6.00

3.3 mL de peróxido de hidrógeno 1.0 mM

1 mL de solución enzimática con 100 unidades de peroxidasa de Nabo

2. Someter la mezcla bajo las condiciones de reacción: 25°C, durante 14 horas, con agitación.
3. Extraer carotenoides y capsaicina utilizando el método que se describe en la sección 3.4.4.

El experimento se repitió utilizando estándar de capsaicina 2.60 mM.

3.5.4. Ensayo con estándar de capsaicina utilizando H₂O₂ 20 mM.

Como ensayo preliminar se procedió a realizar el experimento como lo describe Whitaker (1999), básicamente como a continuación se describe:

1. Preparar una solución de capsaicina a una concentración de 7.90 mM en amortiguador tris-acetato 0.1 M pH = 6.0. Preparar una solución de peróxido de hidrógeno 80 mM en amortiguador de tris-acetato 0.1 M pH = 6.0, mezclar volúmenes iguales de las dos soluciones justo antes de utilizarlas. La concentración final de capsaicina y peróxido de hidrógeno en la mezcla que sería sometida a la reacción enzimática fue de 2.00 mM y 20 mM respectivamente.
2. Preparar una solución con 100 unidades/mL de enzima peroxidasa de Nabo, en buffer de tris acetato pH = 6.0
3. Para la determinación de actividad, añadir a cuatro tubos de ensayo cada uno de los siguientes reactivos, y equilibrar a 25 °C.

Tubo 1: Añadir 15 mL de la solución combinada de sustrato y peróxido de hidrógeno (50 % solución de capsaicina 7.90 mM y 50% solución de peróxido de hidrógeno 80 mM), agregar 15 mL de agua destilada (este es el control).

Tubo 2: Añadir 15 mL de la solución combinada de sustrato y peróxido de hidrógeno (50 % solución de capsaicina 7.90 mM y 50% solución de peróxido de hidrógeno 80 mM), agregar 10 mL de agua destilada, 1 mL de solución enzimática, equivalente a 100 unidades de enzima en toda la mezcla.

Tubo 3: Añadir 15 mL de la solución combinada de sustrato y peróxido de hidrógeno (50 % solución de capsaicina 7.90 mM y 50% solución de peróxido de hidrógeno 80 mM), agregar 10 mL de agua más 5 mL de solución enzimática, equivalente a 500 unidades de enzima en toda la mezcla.

Tubo 4: Añadir 15 mL de la solución combinada de sustrato y peróxido de hidrógeno (50 % solución de capsaicina 7.90 mM y 50% solución de peróxido de hidrógeno 80 mM), agregar 5.0 mL de agua mas 10.0 mL de solución enzimática, equivalente a 1000 unidades de enzima en toda la mezcla.

4. Determinar los cambios en absorbancia a 280 nm a intervalos de 30 segundos, hasta llegar a 5 minutos en todos los tubos de ensayo.
5. A partir de los resultados escoger el mejor volumen de solución enzimática a utilizar.

Después del ensayo preliminar, el cual fue monitoreado a 280 nm, se procedió a determinar la cantidad residual de capsaicina mediante la metodología de extracción y determinación de capsaicina por HPLC que se describe en la sección número 3.4.4., en este caso también se utilizó estándar de capsaicina.

3.5.5. Reacción enzimática con estándar de capsaicina y con harina de chile, con mayor tiempo de duración.

En este caso el tiempo de reacción se extendió a 14 horas, bajo las condiciones que se describen a continuación y que se tomaron en base a las condiciones dadas en la sección 3.5.4.

1. Preparar una solución de capsaicina a una concentración de 7.90 mM en amortiguador tris-acetato 0.1 M pH = 6.0. Preparar una solución de peróxido de hidrógeno 80 mM en amortiguador de tris-acetato 0.1 M pH = 6.0, mezclar las dos soluciones justo antes de utilizarlas. La concentración final de capsaicina y peróxido de hidrógeno en la mezcla que sería sometida a la reacción enzimática fue de 2.00 mM y 20 mM respectivamente.
2. Preparar una solución con 100 unidades/mL de enzima peroxidasa de Nabo, en buffer de tris acetato pH = 6.0

3. Preparar la mezcla donde se llevará a cabo la reacción.
 - 7.5 mL de estándar de capsaicina 7.90 mM
 - 15 mL de buffer pH 6.00
 - 7.5 mL de peróxido de hidrogeno 80 mM
 - 1 mL de solución enzimática
4. Someter la mezcla descrita a las siguientes condiciones: baño de agua a una temperatura de 25°C, 14 horas con agitación.
5. Determinar capsaicina residual, mediante el método de extracción y cuantificación descrito en la sección 3.4.4.

El mismo experimento se repitió utilizando harina de chile, preparando la mezcla como ya se ha descrito en experimentos anteriores.

3.5.6. Reacción enzimática con estándar de capsaicina, ensayo para investigar saturación por exceso de capsaicina.

Se consideraron cuatro concentraciones de capsaicina: 1.30, 2.62, 3.93 y 5.25 mM y un control, aplicando las condiciones de reacción que se utilizaron en el experimento 3.5.5.

3.6. Optimización de la reacción enzimática.

Este grupo de experimentos sirvió para encontrar la concentración de peróxido de hidrógeno y el tiempo de reacción más adecuados para oxidar la capsaicina sin que los valores de concentración de peróxido de hidrógeno sean extremos, como los hasta ahora manejados. En este estudio no se hicieron cambios en cuanto a la concentración de enzima. En cuanto al peróxido de hidrógeno se habían manejado condiciones de 0.1 mM y 20 mM y con el tiempo de reacción ocurría lo mismo ya que se utilizaban tiempos de 5 minutos y 14 horas.

No se realizaron experimentos variando la concentración de enzima, por lo que se siguió trabajando con concentraciones de 100 unidades enzimáticas.

3.6.1. Ensayo con estándar de capsaicina y enzima peroxidasa de Nabo, utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

1. Preparar diferentes mezclas para llevar a cabo la reacción enzimática, variando la concentración de solución de peróxido de hidrógeno. Los ingredientes de la mezcla, para cada reactor, son los que a continuación se enlistan:
2 mL de solución stock de capsaicina de 13.12 mM (concentración final en el reactor 0.80 mM)
15 mL de buffer tris acetato pH 6.00
15 mL de solución de peróxido de hidrógeno 0.02, 0.2, 2.0, 20.0 y 40.0 mM (en total 5 reactores, cada uno con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno).
100 unidades de enzima peroxidasa de Nabo.
2. Someter la mezcla a las siguientes condiciones de reacción: 25°C, durante 5 minutos, con agitación.
3. Extraer y determinar capsaicina como se describe en la sección 3.4.4.

3.6.2 Reacción de oxidación de capsaicina con peroxidasa de Nabo, en diferentes tiempos de reacción.

El experimento se llevó a cabo como se describió en la sección 3.6.1., utilizando estándar de capsaicina, a una concentración de peróxido de hidrógeno de 1.00 mM y con tiempos de reacción de 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos, con agitación. La extracción y determinación de capsaicina se realizó como se describió en la sección 3.4.4.

3.6.3. Ensayo con harina de chile y estándar de capsaicina, empleando condiciones de reacción optimizadas.

Tomando como base los ensayos anteriores se procedió a realizar reacciones utilizando harina de chile utilizando las siguientes condiciones: concentración de peróxido de hidrógeno a la cual se lleva la reacción sin que se degrade capsaicina por la acción misma del peróxido (1.0 mM) y tiempo de reacción de 300 minutos.

Los experimentos se llevaron a cabo con mezclas de harina de chile y estándar de capsaicina. Posteriormente se efectuaron reacciones únicamente con harina de chile.

La metodología utilizada se describe a continuación:

1. Preparar la siguiente mezcla:
 - 3 g de harina de chile guajillo
 - 2 mL de solución estándar de capsaicina de 13.12 mM
 - 13 mL de buffer tris acetato pH 6.00
 - 15 mL de peróxido de hidrógeno 2 mM
 - 100 unidades de enzima peroxidasa de Nabo
2. Someter la mezcla bajo las condiciones de reacción 25°C, durante 5 horas, con agitación.
3. Extraer y determinar carotenoides y capsaicina como se describe en la sección 3.4.4.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

4.1. Determinación de la Concentración de Peróxido de Hidrógeno.

El objetivo de esta metodología fue determinar la concentración de peróxido de hidrógeno que se agregaba a la mezcla donde se llevaría a cabo la reacción enzimática, y así se podría tener un control de la reacción. El método que se eligió fue el método volumétrico por titulación con tiosulfato de sodio (University of Quebec, 2001). El principio de este método es que el peróxido de hidrógeno reaccione con el ion yoduro en solución ácida de acuerdo con la siguiente ecuación:



Este método se seleccionó en lugar del método permanganométrico debido a que tiene la ventaja de que los reactivos son menos afectados por los estabilizantes que se adicionan a las soluciones de peróxido de hidrógeno Ayres (1968). Estos aditivos frecuentemente son ácido bórico, ácido salicílico y glicerol, los que ocasionan que el método del permanganato rinda resultados menos exactos.

En cada caso se determinaba la concentración de peróxido de hidrógeno y se ajustaba en caso de presentarse desviaciones en la concentración de la solución de peróxido de hidrógeno. Debido a que efectivamente se observaron variaciones en la concentración con el paso del tiempo, se optó por preparar la solución de peróxido con que se trabajaba en cada experimento justo el día que sería utilizada.

Dado que las soluciones de peróxido de hidrógeno se preparaban para obtener diferentes concentraciones de acuerdo a las condiciones de cada experimento las concentraciones que se determinaron son las que se reportan en cada sección y debido a que las condiciones varían entre cada uno los experimentos en cuanto a la concentración de peróxido de hidrógeno las soluciones tuvieron concentraciones de 1.00, 2.00, 20.00, 30.00, 40.00 y 80.00 mM, cada valor de concentración se indicó en los casos donde se utilizó peróxido de hidrógeno y cual fue la concentración a la que se encontraba al momento de realizar el experimento.

4.2. Elección y optimización del método de extracción de carotenoides y capsaicina a partir de la suspensión acuosa donde se lleva a cabo la reacción.

En la tabla número 4 se muestran los resultados obtenidos al aplicar los métodos de referencia que se mencionaron en el capítulo 3. Materiales y Métodos para caracterizar la harina de chile, en dicha tabla también se muestran los resultados obtenidos al desarrollar la metodología para la extracción de los compuestos de interés a partir de la suspensión acuosa que se detalla en el anexo número 1.

Tabla 4. Determinación de carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina en harina de chile.

Método	Carotenoides totales ^a (g/Kg)	Porcentaje de Rojos ^a	Capsaicina ^a mM
3.4.2. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir de muestra seca (AOAC modificado).	1.24 ± 0.06	51.32 ± 4.66	-
3.4.3. Determinación de capsaicina a partir de muestra seca, Collins <i>et al.</i> 1995.	-	-	5.07 ± 0.21
Extracción y determinación de carotenoides y capsaicina a partir de suspensión acuosa utilizando cloroformo como disolvente.	0.92 ± 0.07	42.78 ± 1.16	0.72 ± 0.005
Extracción de carotenoides y capsaicina a partir de suspensión acuosa utilizando cloroformo y acetona como disolventes, sin centrifugación de la muestra.	0.99 ± 0.06	42.62 ± 1.15	1.70 ± 0.01
3.4.4. Extracción de capsaicina y carotenoides empleando acetona y cloroformo como disolventes con centrifugación de la muestra.	1.09 ± 0.03	46.34 ± 1.55	4.61 ± 0.25

^a. Valores promedio; n=25

Como primer paso se procedió a determinar capsaicina utilizando el método 3.4.3. propuesto por Collins *et al.* (1995) para tomar este dato como referencia y así compararlo con los demás métodos que se probaron, a partir de este dato se considera que el 100 % de capsaicina del chile guajillo es extraído mediante esta técnica.

En los estudios preliminares (ver anexo 7.1.) sólo se utilizó cloroformo como disolvente, pero se obtenían valores por debajo de lo esperado en cuanto al contenido de capsaicina (Tabla 4). Aún cuando se han reportado otros sistemas de extracción de capsaicinoides en chile guajillo seco, como por ejemplo: etanol, acetona, acetato de etilo y hexano (Santamaría *et al.* 2000) se eligió cloroformo porque la muestra estaría en suspensión acuosa y el cloroformo es inmisible en agua, propiedad que facilitaría en principio la separación de los pigmentos y capsaicinoides. Al emplear el procedimiento 3.4.4, en el cual se centrifugó la muestra y se llevó a cabo la extracción utilizando acetona y cloroformo, se obtuvieron los mejores resultados aún cuando estuvieron por debajo de los obtenidos utilizando los métodos de referencia, al comparar éstos resultados con los obtenidos mediante el método de Collins *et al.* 1995, la diferencia es de ± 5.3 %. Se consideró entonces que los resultados permitirían hacer una estimación aproximada si la diferencia entre ambos métodos permanecía constante y cuando se realizó el análisis de varianza para ambos métodos se encontró que no había diferencia significativa a un $\alpha = 0.05$, como se hicieron 25 repeticiones y se observó una variación constante, el método propuesto se considera útil para el propósito de comparación entre tratamientos enzimáticos. Adicionalmente, la reproducibilidad del método 3.4.4. es aceptable ya que presenta una variación de ± 0.25 mM, ligeramente superior a la variación obtenida mediante el método de referencia. Como referencia del contenido de capsaicinoides en chile guajillo, se tomaron los datos reportados por Berkley (1995) de 3.28–5.47 mM, y por Santamaría *et al.* (2000) de 9.51 mM. El principal capsaicinoide en la muestra es la capsaicina, que corresponde al 73 % en esta variedad (Govidarajan, 1998). Se hubiera entonces esperado detectar aproximadamente 2.55 mM de los otros capsaicinoides. Sin embargo, como se observa en la figura 13 sólo se obtuvo señal para la capsaicina (tiempo de retención: 4.437 minutos) con un máximo de absorbancia de 280 nm. Los demás capsaicinoides que no se detectaron, debido probablemente a que existen en tan poca proporción en la muestra tomada para la inyección en el cromatógrafo (20 μ l) que no es posible determinarlos. Esta observación

también podría deberse, en parte, al tipo de muestra y las condiciones climáticas, de cosecha y almacenamiento del fruto a partir del cual se obtuvo la muestra analizada (Pomar *et al.* 1997).

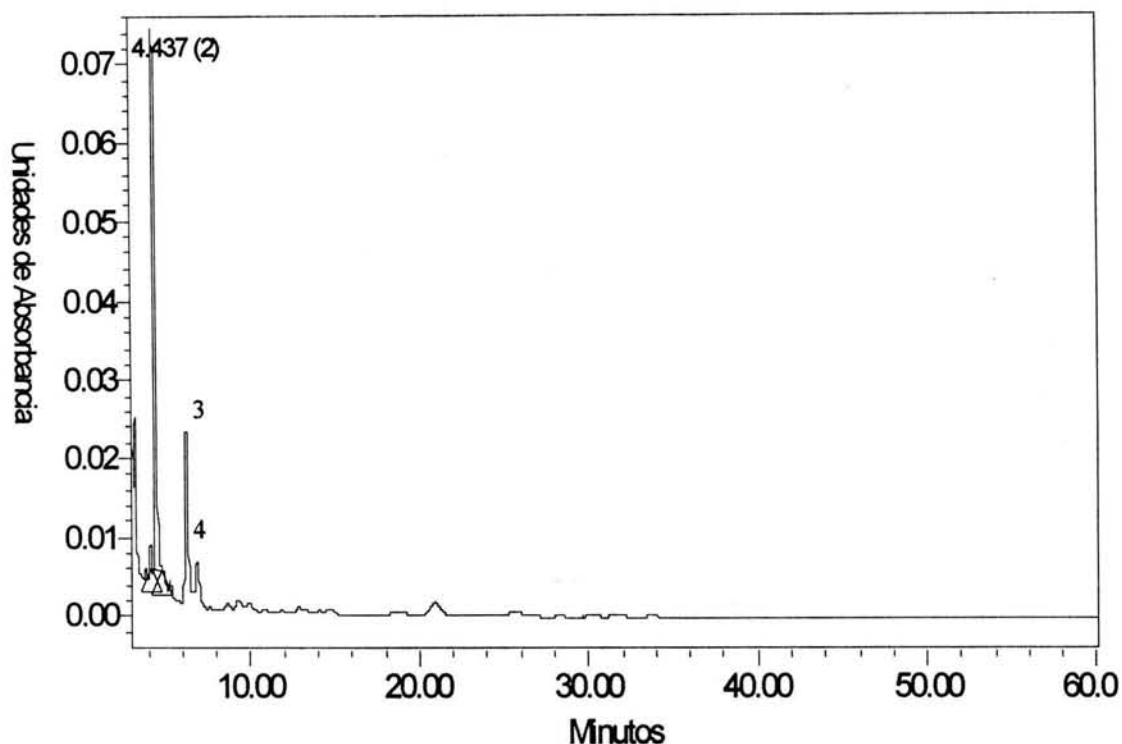


Figura 13. Cromatograma de la muestra de extracto de chile, obtenida mediante la extracción con acetona-cloroformo con centrifugación de la muestra a partir de una muestra en fase acuosa. 2: capsaicina (t. r. = 4.437), 1,3,4, no fueron identificados.

Con el método propuesto para la extracción de capsaicinoides también se extraen pigmentos y otros compuestos que interfieren en la determinación de la capsaicina por medio de la cromatografía HPLC. En un momento dado esto puede provocar la disminución de la vida útil de la columna C18, pero se encontró la forma de limpiar de impurezas la muestra a ser inyectada, esto se logra evaporando primeramente la acetona bajo atmósfera inerte de nitrógeno y posteriormente se redisolvió la muestra en la fase móvil (50% agua acidificada con ácido acético hasta pH =3.00 y 50 % de acetonitrilo). Esta operación permitió que la capsaicina se disolviera con ayuda del acetonitrilo, pero que los carotenoides no se disolvieran porque no son solubles en agua, y su solubilidad en acetonitrilo es limitada (Attuquayefio,

1987). Finalmente, para contribuir a la protección de la columna y limpiar aún más la muestra, ésta fue filtrada a través de filtro de nylon Millipore 0.45 μm de tamaño de poro y se utilizó una precolumna Waters C18, tamaño de partícula 3.9 μm .

En cuanto a la determinación de carotenoides, los resultados obtenidos también se muestran en la tabla número 4, además de que en el anexo 7.2. se muestra un espectro de los que se obtenían cada que se determinaron carotenoides totales y porcentaje de rojos. En este caso, se observa que al utilizar cloroformo en vez de acetona en la muestra seca (ver anexo 7.2.) se obtienen prácticamente los mismos resultados que cuando se aplica el método de referencia 3.4.2. Sin embargo no ocurre lo mismo con el porcentaje de rojos, el cual es menor en el caso de utilizar sólo cloroformo, la diferencia en la estructura del disolvente podría ser la explicación en la diferencia en la absorbancia de los compuestos extraídos y por lo tanto la diferencia en las concentraciones determinadas para el porcentaje de rojos.

El uso de acetona para extraer carotenoides y capsaicina en la muestra en suspensión acuosa no era útil debido a que la acetona es soluble en agua y por lo tanto no era posible separar ambos disolventes, haciéndose necesario utilizar otro disolvente que no fuera miscible en agua y que además permitiera la extracción de las sustancias de interés. En un principio se propuso utilizar únicamente cloroformo para la extracción en las muestras en suspensión, una vez determinado que el método de extracción con cloroformo era útil para determinar carotenoides en seco. Al utilizar cloroformo se observó que la extracción era lenta ya que en ocasiones la mezcla se emulsificaba y por lo tanto el tiempo de separación de las fases era mayor. Lo que es más importante, se observó una extracción incompleta y no reproducible. Como se podía deducir el agua formaba una capa que impedía que el cloroformo entre en contacto directo con los pigmentos y la capsaicina. Por ello se decidió utilizar la acetona para hacer más eficiente la extracción, considerándose dos casos: centrifugando la muestra y sin centrifugar la muestra. El uso de acetona en la extracción debía facilitar la solubilización de carotenoides ya que éstos son muy solubles en este disolvente (Minguez-Mosquera *et al.* 1993) adicionalmente la acetona debería de evitar que se formara una interfase entre el agua y el cloroformo que impidiera la extracción de los carotenoides, ya que los compuestos de interés se encuentran repartidos entre las partículas de chile y la fase acuosa circundante. En el primer ensayo

utilizando ambos disolventes, se trató toda la muestra en el embudo de separación pero se emulsificaba y era difícil de romper dicha emulsión a menos que se adicionara exceso de cloroformo, pero representaba gasto excesivo de dicho reactivo.

En el método propuesto se extrajo en primer término con acetona y posteriormente se agregó cloroformo para separar fases y tener a los carotenoides y capsaicinoides en la fase rica en cloroformo, posteriormente se obtuvieron los compuestos de interés en forma de oleoresina mediante evaporación de la mezcla de disolventes. Posteriormente se optimizó la extracción de los compuestos de interés mediante ligeras modificaciones que se describen en el anexo 1.

Al emplear la centrifugación y ambos disolventes, se observó una mejora considerable. El hecho de que las partículas de Chile se vieran expuestas a un disolvente que penetrara por los poros de las partículas y permitiera la extracción de los pigmentos atrapados en las células, además de deshidratar la muestra, es la explicación de dicha mejora. Como se observa en la tabla 4, la cantidad estimada de carotenoides totales y porcentaje de rojos es muy cercana a la obtenida utilizando el método de referencia de la AOAC modificado (1990) (sección 3.4.2.)

A partir de los resultados expuestos, se consideró que el mejor método de extracción de carotenoides y capsaicina en la mezcla de reacción es el que involucra la centrifugación de la muestra y la extracción con acetona y cloroformo.

Con la finalidad de mejorar la confiabilidad de la cuantificación por HPLC, se decidió agregar una concentración conocida de capsaicina a la mezcla de reacción sin llevar a cabo la reacción enzimática, (datos no mostrados). Corriendo paralelamente esta muestra y la muestra sin estándar, sería posible tener una cantidad conocida de capsaicina en las muestras. Así se podría corroborar en cada inyección que el método HPLC funcionaba correctamente y además permitiría medir concentraciones bajas del compuesto con mayor precisión y confiabilidad. Los resultados obtenidos en este experimento no se muestran, pero éstos demostraron que la extracción es completa y reproducible.

Como ultimo paso se realizó la modificación de la técnica de preparación de la muestra para ser inyectada al HPLC. Hasta que este experimento se propuso, la preparación de las muestras para la determinación de capsaicina se había llevado a cabo utilizando la metodología descrita en el experimento número 3.4.3. El método fue modificado debido a que se obtenían cromatogramas “coleados” y que no tocaban línea base. En la figura 13, se muestra un cromatograma obtenido utilizando esta modificación. Se eliminó el coleo de picos y se obtuvieron picos más bien simétricos. En la figura 13, que corresponde a la determinación de capsaicina en harina de chile se observa que aparecen cuatro picos y además la separación de los compuestos es mucho mejor, en cuanto a la determinación de capsaicina en el chile guajillo se pudo observar que el pico correspondiente al compuesto de interés esta mejor definido que en determinaciones anteriores a la modificación realizada a la metodología. Si bien otra manera de obtener muestras libres de impurezas sería utilizar cartuchos de extracción (Hoffman, 1983; Cooper, 1991; Lacker, 1999; Perucka, 2000) los cuales permiten obtener muestras prácticamente puras, pero debido a su alto costo se decidió no utilizarlos.

Otro aspecto interesante que se detectó durante el desarrollo del método de extracción fue el hecho de que las muestras debían de ser analizadas inmediatamente ya que las dobles ligaduras de los carotenoides los hacen susceptibles a la degradación por acción de la luz, oxígeno y calor, así como condiciones alcalinas o ácidas del medio (Oliver *et al.* 1998). En general los cuidados que se siguieron para evitar al máximo la degradación de los carotenoides y evitar tener resultados erróneos, basándose en las recomendaciones de Davies (1976) fueron: evaporar el disolvente empleando vacío, o bajo atmósfera inerte de nitrógeno, y en caso de no ser posible el análisis inmediato, el almacenamiento de las muestras secas en la oscuridad, bajo atmósfera de nitrógeno a -20° C.

4.3. Estudios de la reacción de oxidación de la capsaicina mediante peroxidasa de Nabo.

Inicialmente se realizaron los experimentos necesarios para determinar el efecto de cada uno de los reactivos que se adicionan a la mezcla donde se lleva a cabo la reacción enzimática. Si bien en un principio se habían propuesto las condiciones que aparecen en el artículo de Bernal *et al.* (1993 a y b) en cuanto a concentración de peróxido de hidrógeno (0.1 mM) y

concentración de capsaicina (1mM) así como la temperatura de 25 °C, pero no así el tiempo de reacción el cual era de 24 horas en el caso de dichos autores, en este caso se utilizó un tiempo de reacción de 14 horas, la descripción del experimento se presento en el capítulo 3, posteriormente se realizaron ajustes para adecuar dichas condiciones a los requerimientos propios del fruto con el que se trabajo, ya que en dicha referencia se utilizó estándar de capsaicina o dehidrocapsaicina o bien pimiento el cual contenía muy pocos capsaicinoides a diferencia del chile guajillo, además de que las reacciones generalmente se llevaron a cabo en tiempos mas prolongados como ya se menciona, a diferencia de dichos autores se trabajo con chile guajillo el cual es un producto ligeramente picante cuyo contenido de capsaicina va de 3.28 a 5.47 mM (Berkley, 1995; Santamaría *et al.* 2000) además de que las reacciones generalmente duraron 14 horas, o bien se variaba dicho periodo de acuerdo a las nuevas condiciones que se encontraron a lo largo del desarrollo experimental, ya que como se pudo observar estas condiciones fueron variando conforme se lograba la completa oxidación de la capsaicina, sin degradar los carotenoides.

4.3.1. Efecto de la adición de peróxido de hidrógeno sobre los carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina en ausencia de enzima.

El objetivo de este ensayo fue determinar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre los carotenoides totales y la capsaicina, sin adicionar enzima. En este caso la concentración de peróxido de hidrógeno que se utilizó fue de 0.1 mM, si bien por razones que posteriormente se exponen, se decidió cambiar la concentración de esta sustancia por una que se ajustara a las nuevas condiciones experimentales ya que al llevar a cabo reacciones enzimáticas utilizando esta concentración de peroxido no se obtuvo la oxidación de la capsaicina, sin embargo se considero importante estimar los efectos de dicho reactivo sobre los carotenoides principalmente, debido a que éstos compuestos son los que se debían de proteger, ya que son los compuestos valiosos que forman parte de las oleorresinas comerciales y sobre todo la proporción rojos / amarillos (Minguez-Mosquera, 1994 a y b) ya que al ser este reactivo un agente oxidante, se requería estimar el efecto del peróxido de hidrógeno, por sí solo sobre los carotenoides y capsaicina, y comparar este efecto con el observado cuando se añadía enzima. Cabe señalar que para las determinaciones se utilizó el método de extracción 3.4.4., en el cual

se extrae con cloroformo y acetona centrifugando la muestra. Otro aspecto importante que vale la pena señalar es que en la reacción de oxidación de la capsaicina se requiere de peróxido de hidrógeno para generar radicales libres que permitan la generación de dímeros y polímeros (Bernal *et al.* 1995) por lo que la concentración de peróxido de hidrógeno es un factor determinante en el desarrollo de la reacción enzimática.

Los resultados obtenidos en este experimento se presentan a continuación en la tabla 5. Las condiciones que se utilizaron para evaluar dicho efecto fueron las siguientes: concentración de peróxido de hidrógeno 0.10 mM, 25 °C, tiempo de reacción de 14 horas, en buffer de tris acetato pH = 6.00, y 3 g de harina de chile.

Tabla 5. Efecto del H₂O₂ 0.1 mM sobre el contenido de capsaicina y carotenoides totales en suspensiones acuosas de *C. annuum*, sometidas a 25 °C durante 14 horas, con agitación.

Parámetro	Valor ^a	Valor de Referencia ^b	% Cambio
mM Capsaicina	4.60±0.15	4.61 ± 0.25	0.43
Carotenoides totales (g/Kg)	1.06 ± 0.05	1.09 ± 0.03	2.75
Porcentaje Rojos	45.63 ± 0.93	46.34 ± 1.55	1.53

^a Valores promedio; n = 5; ^b. Con base en los valores obtenidos en la tabla 4, utilizando la metodología 3.4.4.

En el caso de los carotenoides, se observa que el resultado en la determinación es prácticamente igual al valor reportado en la tabla 4 (1.09 g/Kg) donde se utiliza el mismo método de extracción, ya que solo vario el 2.75 %. Al no haber gran cambio entre ambas determinaciones se puede afirmar que no existe efecto del peróxido de hidrógeno 0.1 mM

sobre el contenido total de carotenoides en la muestra y tampoco en el porcentaje de rojos. En cuanto a la capsaicina se observa que el resultado promedio obtenido es prácticamente igual al reportado en la tabla 4 (4.61 ± 0.25 mM) si se considera la desviación estándar de ambas determinaciones. Por lo anterior se comprueba que el peróxido de hidrógeno 0.1 mM no afecta la concentración de capsaicina en la mezcla de reacción sin adición de peroxidasa. Esta podría ser la razón por la cual Bernal *et al.* 1993a y 1993b eligieron esta concentración de peróxido, si bien ellos trabajaron con un sistema modelo utilizando reactivos de capsaicina y dehidrocapsaicina proveniente de Sigma Aldrich y enzima peroxidasa extraída de *Capsicum annuum* y en algunos casos trabajaron con pimiento sí bien en dichos estudios no se consideraron los efectos sobre carotenoides ya que los objetivos de dicha investigación eran diferentes a los que en la presente se han planteado. En otras referencias consultadas tampoco se evaluó la degradación de carotenoides debido a este reactivo, pero en general se encontró que los carotenoides son sensibles a degradación por acción de agentes oxidantes (Davis, 1976).

4.3.2 Determinación de la capsaicina soluble en la mezcla de reacción.

Con este experimento se pretendió estimar cuanta capsaicina soluble existe en la fase acuosa donde se llevaría a cabo la reacción enzimática, sobre todo para determinar si la capsaicina estaría expuesta a la acción de la enzima peroxidasa de Nabo y de esta manera comprobar que la reacción era posible bajo las condiciones propuestas.

Los resultados que se obtuvieron en este experimento se presentan a continuación en la tabla 6. En este caso no se utilizó el método de extracción con disolventes. Sino que se utilizó la metodología descrita en la sección 3.5.2., en este caso solo se filtro la muestra y se adiciono fase móvil para evaluar la cantidad de capsaicina solubilizada en el medio acuoso y por lo tanto disponible para la reacción enzimática

Tabla 6. Determinación de capsaicina, soluble proveniente de una suspensión de harina de chile en buffer de tris acetato, pH = 6.00.

Parámetro	Valor ^a	Valor de Referencia ^b
Capsaicina mM	0.66 ± 0.03	4.61 ± 0.25
Dehidrocapsaicina mM	No se detectó	No se detectó

^a. Valores promedio; n = 5; ^b. El valor de referencia se toma de las determinaciones reportadas en la tabla 4 utilizando el método de extracción 3.4.4.

La capsaicina en solución que se extrae de las partículas de chile, si sólo se utiliza agua es muy poca, comparando los datos con los de la tabla 4. Se podría pensar que las cantidades detectadas se encuentran en el límite de lo que puede ser detectado por esta metodología. La baja concentración de capsaicina en la fase acuosa es congruente con la información proporcionada en la hoja técnica del reactivo (Sigma-Aldrich) y por Santamaría *et al.* (2000) quienes indican que la capsaicina grado reactivo es poco soluble en agua a una temperatura de 25°C, la cual es la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción. Por los datos obtenidos en este experimento, era posible que la enzima tuviera una limitada disponibilidad del sustrato en la mezcla de reacción y entonces esta no se llevaría a cabo. En ese momento se especuló que podría requerirse un método para que la capsaicina estuviera más disponible a la enzima, ya que la capsaicina al ser hidrofóbica presentaría limitada transferencia de masa en el sistema acuoso. A partir de la información disponible se encontró que recientemente se han probado sistemas acuosos con disolventes miscibles en agua (tetrahidrofurano, acetona, acetonitrilo, metanol, etilenglicol) donde se llevaron a cabo reacciones de oxidación con enzima peroxidasa de Nabo, tal como la han propuesto Torres *et al.* (1998) por lo que sería posible utilizar alguno de éstos medios. Sin embargo, se tenían referencias (Boersch *et al.* 1991; Bernal *et al.* 1993a; Bernal *et al.* 1993b; Bernal *et al.* 1995, Bernal *et al.* 1996a, Bernal *et al.* 1996b, Pomar *et al.* 1997) donde se ha demostrado que la reacción enzimática se llevaba a cabo en medio acuoso,

aún cuando se trata de sistemas modelo donde se utilizaba capsaicina grado reactivo, se considero que la reacción efectivamente se podría llevar a cabo en el sistema propuesto. Podría ocurrir entonces que la enzima oxidara en un principio la capsaicina que se encuentra disponible en el medio de reacción y que posteriormente más capsaicina migrara desde las partículas de chile hacia la fase acuosa para reaccionar. Esta afirmación se corroboraría al comparar los resultados obtenidos más adelante en la sección 4.4.4

4.4. Ensayos preliminares con Harina de Chile.

Una vez que ya se había establecido la metodología para la extracción y cuantificación de capsaicina y carotenoides totales, así como la determinación del efecto de los diferentes reactivos en la suspensión acuosa en donde se lleva a cabo la reacción enzimática, se procedió a realizar los ensayos con enzima peroxidasa de Nabo en harina de chile.

Como ya se menciona anteriormente en un principio se decidió realizar este experimento para determinar si las condiciones de reacción reportadas en la publicación de Bernal *et al.* (1993 a y b) eran reproducibles al utilizar harina de chile guajillo, dichas condiciones ser las adecuadas para nuestro estudio, aún cuando en dichos trabajos se utilizó pimiento y en vez de chile, sin embargo también se utilizaba estándar de capsaicina o dehidrocapsaicina y se observaba la degradación de ambos reactivos debido a la acción de la enzima peroxidasa de *Capsicum annuum* ó peroxidasa de Nabo.

Al llevar a cabo diferentes ensayos, empleando una concentración de peróxido de hidrógeno 0.1 mM, según la metodología propuesta, no se observaron cambios en la concentración de capsaicina contenida en el chile. Debido a esto, el experimento se repitió utilizando únicamente estándar de capsaicina; la metodología seguida fue la misma que para los ensayos con harina de chile.

Los resultados de las determinaciones de capsaicina después de someter la mezcla a las condiciones de reacción reportadas, se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la determinación de capsaicina en extractos de mezcla sometida a reacción enzimática, $[H_2O_2] = 0.10 \text{ mM}$, 100 unidades enzimáticas, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 14 horas de reacción.

	Reacción	Parámetro	mM^a
Harina de chile	Con Enzima	Capsaicina	4.64 ± 0.04
	Sin Enzima	Capsaicina	4.64 ± 0.06
Estándar de Capsaicina	Con Enzima	Capsaicina	2.63 ± 0.09
	Sin Enzima	Capsaicina	2.63 ± 0.06

^a Valores promedio; n = 5

Considerando los resultados presentados en la tabla 7, tenemos que en este ensayo no se observaron cambios en cuanto a la concentración de capsaicina. Se pensó entonces que la reacción no era propicia en medio acuoso debido a la poca solubilidad de la capsaicina en dicho medio como ya se había señalado previamente en 4.3.2. ó bien el tipo de enzima peroxidasa de Nabo que se había adquirido no presentaba acción sobre la capsaicina, la cual representa el segundo sustrato en la reacción y que dará paso a la formación del compuesto II (van Daurzen *et al.* 1997). Antes de considerar cambiar esta enzima, se tomó en cuenta que la cantidad de peróxido de hidrógeno adicionada es muy pequeña y se consideró incrementar esta concentración.

4.4.1. Ensayo con estándar de capsaicina utilizando H_2O_2 20 mM.

Dado que los resultados obtenidos utilizando las condiciones de Bernal *et al.* (1993 a y b) no mostraron disminución de la capsaicina al emplear harina de chile, y tampoco empleando estándar de capsaicina, se pensó que la reacción no era propicia en medio acuoso, especialmente tomando en cuenta la baja concentración de capsaicina soluble en la mezcla de reacción o la posibilidad de que no estuviera disponible a la enzima peroxidasa de Nabo. Antes de considerar cambiar alguna de las condiciones de la reacción de referencia, se tomó en cuenta que la cantidad de peróxido de hidrógeno adicionada es muy pequeña y se contempló aumentar esta concentración, por lo que se procedió a investigar cual sería la cantidad apropiada de peróxido en la mezcla. Para tratar de esclarecer lo que estaba ocurriendo, también se comenzó a determinar el peróxido de hidrógeno en la mezcla donde se lleva a cabo la reacción (sección 4.1.) ya que este reactivo actúa como primer sustrato y al no estar presente no se llevaba a cabo el primer paso de la reacción y la formación de los primeros radicales, compuesto I (van Daurzen, 1997).

Al consultar en bibliografía se encontraron condiciones de reacción que varían ampliamente, por lo cual se procedió a emplear la metodología reportada por Whitaker (1999) para investigar el efecto del incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno y adicionalmente el efecto de la concentración de enzima. Además de que el método se eligió por ser relativamente rápido de realizar.

Whitaker (1999) emplea este ensayo para determinar la actividad peroxidasa en vegetales, utilizando como sustrato guayacol y una concentración de peróxido de hidrógeno 20 mM. Se procedió a seguir esta metodología utilizando capsaicina en lugar del guayacol y empleando buffer tris acetato pH = 6.0. El tiempo de reacción era de cinco minutos, el cual es muy corto si lo comparamos con el tiempo que se utilizaba en un principio el cual era de 14 horas. Sin embargo esta diferencia se compensó con la concentración de peróxido de hidrogeno la cual era 200 veces mayor.

Como ensayo preliminar se procedió a realizar el experimento como lo describe dicho autor, utilizando estándar de capsaicina y dehidrocapsaicina; los resultados que se obtuvieron se presentan en la tabla 8, se siguió la metodología descrita en la sección 3.5.4.

Tabla 8. Determinación de capsaicina en extractos de mezcla sometida a reacción enzimática con estándar de capsaicina, con $[H_2O_2] = 20$ mM, 100 unidades enzimáticas/mL, 25 °C y 5 minutos de reacción.

Determinación de capsaicina	Tratamiento	Sustancia	mM ^a
Sin extracción	Con Enzima	Capsaicina	N. D.
		Dehidrocapsaicina	N.D.
	Sin Enzima ^a	Capsaicina	1.19 ± 0.03
		Dehidrocapsaicina	N. D.
Extracción con cloroformo y acetona	Con Enzima	Capsaicina	1.10 ± 0.35
		Dehidrocapsaicina	0.50 ± 0.07
	Sin Enzima ^a	Capsaicina	2.85 ± 0.06
		Dehidrocapsaicina	1.16 ± 0.16

^a Valores promedio; n = 5; N. D. = No detectado

En este caso se observó que hubo reacción ya que al determinar en el reactor con enzima la concentración residual de capsaicina disuelta (es decir sin extracción con disolventes) ésta no se detectó. Se podría pensar que el sustrato se agota eventualmente en la fase acuosa y que la enzima actúa sobre el sustrato sólo cuando éste se encuentra disponible en el medio acuoso y que al ir desapareciendo la capsaicina por acción de la enzima, la capsaicina no disponible que se encuentra dentro de las partículas de chile entra en solución en el agua y podría ser entonces atacada por la peroxidasa. En efecto, al incluir el procedimiento de extracción con cloroformo y acetona sí se encontró capsaicina, por lo que se verificó que la reacción se llevó a cabo, determinándose cuanta capsaicina no reaccionó en presencia de enzima peroxidasa después de cinco minutos de reacción. Esta hipótesis la pudimos comprobar sometiendo a reaccionar las sustancias por más tiempo ya que en los experimentos aquí descritos el tiempo de reacción fue de 5 minutos.

En los casos en que se detectó disminución o desaparición de capsaicina no se observaron nuevos picos en el cromatograma. Probablemente esto se deba a que las sustancias originadas no son detectadas a la concentración a la que existen después de cinco minutos de reacción, o bien ya que no se realizó extracción con cloroformo y acetona, es decir se tomó la muestra directamente de la mezcla donde se llevó a cabo la reacción, probablemente los compuestos formados no son solubles en agua. Cabe aclarar que no se inyectó algún estándar para verificar la degradación de la capsaicina a compuestos más simples como serían la vainillilamina 3-hidroxi-4 metoxi bencilamida y el ácido decilénico, los cuales podrían también ser productos de la reacción por rompimiento del enlace que existe entre ambas moléculas y por medio del cual forman la capsaicina, aun cuando en la literatura no se ha encontrado que éstos sean los compuestos que se formarían, se considera que no se debe eliminar la posibilidad de que se presente esta vía en la reacción enzimática.

Algo que se observó fue que en los reactores en los que hubo reacción, la concentración de capsaicina residual varió considerablemente entre sí y los valores van de 0.75 a 1.64 mM, (desviación estándar de 0.35 mM). Probablemente la variación se deba a que la reacción se llevó a cabo a diferentes velocidades en cada reactor, aun cuando los cinco reactores se sometieron a las mismas condiciones de reacción y de manera simultánea. A partir de los

experimentos descritos se concluyó que se debía de incrementar la concentración de peróxido de hidrógeno en la mezcla para llevar a cabo la reacción enzimática. Sin embargo, se observa que el peróxido de hidrógeno 20 mM, por si mismo, tiene efectos degradantes sobre la capsaicina, así que fue necesario optimizar su concentración.

A partir de este experimento se decidió utilizar 100 unidades enzimáticas en la mezcla donde se lleva a cabo la reacción ya que Whitaker (1999) señala que la concentración a elegir será aquella a la cual se da la reacción a partir de las concentraciones que recomienda (100, 500, 1000 unidades enzimáticas) en la metodología de referencia, además de que a esta concentración se dio adecuadamente la reacción, se puede observar que era la mas baja concentración recomendada por dicho autor y la cual coincidió con la concentración propuesta en el artículo de Bernal *et al.* (1993 a y b) sin embargo sería necesario ajustar esta concentración hasta encontrar la concentración de enzima a la cual se lleve a cabo la reacción adicionando una mínima cantidad y por lo tanto el gasto de enzima.

4.4.2. Reacción enzimática con harina de chile y peróxido de hidrógeno 20 mM.

El objetivo de esta reacción fue el de observar los efectos de la peroxidasa de Nabo sobre la capsaicina de la harina de chile guajillo y también sobre los carotenoides totales y porcentaje de rojos, utilizando peróxido de hidrógeno al 20 mM. Se utilizaron las metodologías descritas en las secciones 3.5.4. y el método de extracción 3.4.4.

Los resultados obtenidos en este experimento se presentan a continuación en la tabla 9 para capsaicina, carotenoides totales y porcentaje de rojos.

Tabla 9. Efecto del uso de peroxidasa de Nabo con $[H_2O_2] = 20 \text{ mM}$ sobre la capsaicina y los carotenoides totales en harina de chile, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 mL de solución enzimática (100 unidades) y 14 horas de reacción.

Reacción	Parámetro	Valor^a
Con Enzima	Capsaicina (mM)	0.84
	Carotenoides totales (g/Kg)	0.848
	Porcentaje Rojos	53.45
Sin Enzima ^a	Capsaicina (mM)	4.83
	Carotenoides totales (g/Kg)	1.044
	Porcentaje Rojos	54.78

^a Valores promedio; n = 5

Con respecto a los datos que se muestran en la tabla 9 se comprueba que efectivamente se tuvo una reacción y la disminución de capsaicina fue de 82.5 %. En cuanto al contenido de carotenoides totales se observa que éstos disminuyen en un 18.8 %, aunque el porcentaje de rojos prácticamente no se ve afectado, por lo que se considera que a pesar de que los carotenoides totales sufren deterioro debido a la reacción enzimática, la proporción roja permanece constante. De hecho se ha observado previamente que esta fracción de carotenoides es mucho más estable que los amarillos. Mínguez-Mosquera & Hornero-Méndez

(1994a) han demostrado que el pigmento que más rápidamente se deteriora es el β -caroteno, seguido por la β -criptoxantina y finalmente la zeaxantina. Otros autores han observado, que los pigmentos esterificados presentan una mayor estabilidad en comparación con las formas libres (Márkus, *et al.* 1999). Estas investigaciones concuerdan entre sí dado que el β -caroteno no puede ocurrir en forma esterificada, la β -criptoxantina puede ocurrir en forma libre o en monoesterificada, o aún en formas diesterificadas dentro de los pimientos rojos de *Capsicum annuum* var. *annuum*, mientras que los pigmentos rojos capsantina y capsorubina parecen ser los más estables y ocurren en formas libre, monoesterificadas y más frecuentemente diesterificadas (Minguez-Mosquera & Hornero-Mendez, 1994a).

Otro factor por el cual podrían presentarse diferencias en la estabilidad de las fracciones rojas y amarillas podrían ser las estructuras químicas de las dos familias de compuestos. La diferencia entre los pigmentos rojos y amarillos no es exclusivamente visual. Como todos los carotenoides, ambas familias comparten la estructura básica de C40 con 11 dobles ligaduras conjugadas, y ambos grupos contienen hidroxilos en su estructura. La sola diferencia es la presencia de grupos ceto en los pigmentos rojos. Todos los pigmentos de la fracción roja tienen grupos cetónicos en su estructura, mientras que los pigmentos amarillos no tienen este tipo de grupo funcional. La presencia de este grupo es probablemente la causa de la forma incrementada en la estabilidad con la temperatura en los pigmentos rojos (Minguez-Mosquera & Jaren-Galán, 1999).

Cada oleorresina tiene un valor inicial específico de rojos /amarillos (R/Y) dependiendo de la variedad del fruto y el sistema de extracción utilizado. Algún cambio posterior en R/Y podría deberse al tratamiento aplicado. Un incremento en el valor de este parámetro muestra que los pigmentos amarillos es degradada mas intensamente que los rojos. La disminución de los valores de R/Y muestran una perdida de pigmentos carotenoides rojos (Minguez-Mosquera & Jaren-Galán, 1999).

En la bibliografía consultada no se ha reportado hasta ahora cómo se afectan los carotenoides por la acción directa de peroxidasas, sin embargo es evidente que un sistema tan complejo como lo es un alimento, hay interacción entre los diferentes componentes de dicho sistema y

por lo tanto de u otra una manera los carotenoides se ven afectados por la presencia de compuestos generados durante la reacción. Si bien es evidente que el peróxido de hidrógeno a una concentración 20 mM afecta directamente a los carotenoides, seguramente éste es el reactivo que provoca disminución en los pigmentos (Davis, 1976) y tal vez oxida preferentemente a los amarillos por no estar esterificados o por su carencia de grupo cetónico el cual como ya se señaló, proporciona cierta estabilidad a la molécula de los carotenoides rojos además de su esterificación.

Otra observación que se tiene de esta tabla 9, es el hecho de que el porcentaje de rojos se ve ligeramente incrementado cuando el chile se somete a reacción enzimática, si bien este incremento es muy pequeño, podríamos especular que en cierto momento se presentó una epoxidación de los carotenoides amarillos y así se transformaron en moléculas de carotenoides rojos. Aunque no se han encontrado evidencias de que la enzima peroxidasa de Nabo nativa pueda realizar esta transformación, sí se ha encontrado que las peroxidasas de Nabo mutantes, producen epoxidación en moléculas con sistemas conjugados mediante un mecanismo concertado de transferencia de oxígeno. Esta reacción se ha llevado a cabo únicamente en buffer de acetato y propionato para producir un perácido que propicia la transformación (van Daurzen *et al.* 1997). En este caso sería necesario investigar en primer lugar si realmente sucede una transformación de pigmentos mediante el perfil de carotenoides, y posteriormente estudiar el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la reacción enzimática y a su vez favorecer ó no dicha transformación de amarillos a rojos, mediante la optimización de la reacción, en adición a esto se deberá comprobar que efectivamente la enzima que se utilizó sería capaz de realizar esta reacción de Epoxidación, una vez que se han optimizado las condiciones para degradar a la capsaicina. El hecho de incrementar el contenido de rojos en oleorresinas de *Capsicum annum* significa un incremento en el valor comercial de las mismas (Jaren-Galán & Minguez-Mosquera 1999).

En el presente estudio la decisión que se tomo fue tratar de minimizar la degradación de carotenoides totales ya que se perdía el 18.8 % de éstos y abatir por completo la presencia de capsaicinoides por lo que también se decidió aumentar el tiempo de reacción. En estudios posteriores se ensayaría la reacción de Epoxidación.

4.4.3 Reacción enzimática con estándar de capsaicina, con mayor tiempo de duración.

El objetivo de este experimento fue determinar si la reacción continua a lo largo del tiempo y cuanta capsaicina desaparece, ya que el tiempo de cinco minutos se estableció basándose en la metodología de Whitaker (1999) y sólo se utilizó este tiempo con la finalidad de observar si realmente se presentaba la reacción, pero no se obtenía la completa degradación de la capsaicina, ya que al realizar la extracción de los compuestos éstos eran detectados a 280 nm por el detector de arreglo de diodos del cromatógrafo de líquidos. Al aumentar el tiempo de la reacción de 5 minutos a 14 horas se observó que la capsaicina era oxidada por completo por la enzima.

En este caso el tiempo de reacción se extendió hasta 14 horas, manteniendo las demás condiciones de reacción constantes, la metodología seguida se describió en la sección 3.5.5. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla 10.

Tabla 10. Determinación de capsaicina y dehidrocapsaicina en estándares sometidos a reacción enzimática con peroxidasa de Nabo, $[H_2O_2] = 20$ mM, 1 mL de solución enzimática (100 unidades), 25 °C, 14 horas de reacción.

Reacción	Parámetro	Valor ^a (mM)
Con Enzima	Capsaicina	0.004
	Dehidrocapsaicina	No se detectó
Sin Enzima ^a	Capsaicina	2.77
	Dehidrocapsaicina	1.24

^a Valores promedio; n = 5

Como se puede observar los componentes prácticamente desaparecieron y además en los cromatogramas aparecieron nuevos picos los cuales no fueron identificados, pero se considero que éstos nuevos picos eran debidos a compuestos originados durante la reacción. En la figura 14 se observan los nuevos picos que se obtienen después de la reacción enzimática tras 14 horas de reacción. En dicho cromatograma se pueden distinguir los compuestos originales en el estándar de capsaicina y dehidrocapsaicina (picos 4 y 6 respectivamente) pero en mucha menor concentración que en la mezcla original, los cuales se identificaron al comparar con los tiempos de retención obtenidos para el estándar, sin reacción enzimática (el cromatograma del estándar sin enzima no se muestra) ver figura. Los picos restantes (1, 2, 3, 5, 7, y 8) son los nuevos compuestos que se formaron después del periodo de reacción enzimática, los cuales no fueron caracterizados.

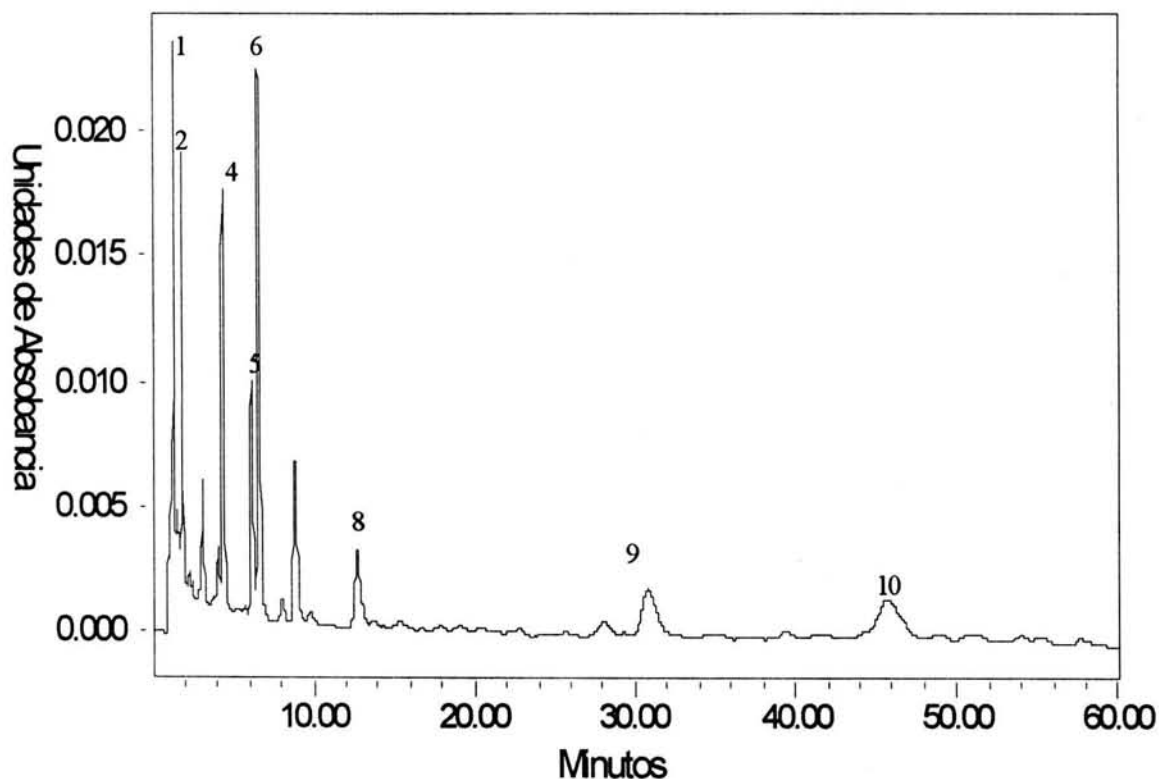


Figura 14. Cromatograma del extracto de la oxidación de estándar de capsaicina con peroxidasa de Nabo, H_2O_2 20 mM, 100 unidades enzimáticas, $25^\circ C$ y 14 horas de reacción. **Pico 4:** capsaicina (t. r. = 4.406 minutos); **pico 6:** dehidrocapsaicina (t. r. = 6.18 minutos); picos: 1,2,3,5,7,8,9 y 10, no han sido identificados.

Como ya se menciono, durante esta investigación no se realizó la caracterización de los nuevos compuestos formados después de someter a la capsaicina a reacción enzimática durante 14 horas y por lo tanto no se comprobó si éstos corresponden a los productos propuestos por Bernal *et al.* (1996a y 1996b) para el mecanismo presentado y el cual corresponde a la reacción enzimática de capsaicina y peroxidasa de Nabo. En ambas publicaciones se describe la formación de productos de acoplamiento de dos moléculas de capsaicina que corresponden a las estructuras del 5,5'-dicapsaicina y el éter 4'-o-5-dicapsaicina (cuyas estructuras se presentan en la figura 3). Así mismo, se describe la formación de productos de deshidrogenación polimerizados, los cuales tienen estructuras muy parecidas a las de la lignina en el chile. Se considero que los productos propuestos serían los que tienen mayor probabilidad de formarse en la reacción donde se utilizaba únicamente estándar ya que resultan ser los más estables químicamente hablando y porque la enzima peroxidasa de Nabo es un biocatalizador muy eficiente en la formación de compuestos biarilos (Schmitt *et al.* 1998). Sin embargo, dado que la reacción procede por radicales libres y debido a la compleja composición del chile, es muy probable que se formaran compuestos distintos a los propuestos en el caso de las reacciones en las cuales se utilizó chile, se propone que en investigaciones posteriores se realice la caracterización de los productos formados al llevar a cabo la reacción utilizando harina de chile y peroxidasa de Nabo.

4.4.4. Reacción enzimática con estándar de capsaicina, ensayo para investigar saturación por exceso de capsaicina.

Con este experimento se pretendió determinar a qué concentración del segundo sustrato la enzima se satura, es decir a cual concentración de capsaicina la enzima peroxidasa de nabo se satura y además determinar si la degradación de la capsaicina es constante a lo largo del tiempo de reacción. Se consideraron cuatro concentraciones y un control. Las condiciones de reacción que se utilizaron fueron: estándar de capsaicina (2.62 mM) y dehidrocapsaicina (1.40 mM) H₂O₂ 20 mM, 25° C, 14 horas con agitación, en buffer de tris acetato pH = 6.00. Cabe aclarar que en este caso se utilizó una concentración de peróxido de hidrógeno mucho mayor a la que originalmente se había propuesto la cual era de 0.1 mM, debido a los motivos que se exhibieron en la sección 4.4. y el principal motivo fue que al utilizar peróxido de hidrógeno a

una concentración tan pequeña de 0.1 mM no había reacción en el tiempo en el cual se efectuó el experimento.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 11, para este caso.

Tabla 11. Efecto de la concentración de capsaicina sobre la reacción enzimática, $[H_2O_2] = 20$ mM, 1 mL de solución enzimática (100 unidades), 25 °C y 14 horas de reacción.

mM Capsaicina (Adicionadas)	mM Capsaicina (Oxidada) ^b	Porcentaje de Degradación	mM Dehidro-capsaicina (Adicionadas)	mM Dehidro-capsaicina (Oxidada) ^b	Porcentaje de Degradación
2.62 ^a	1.04	39.70	1.40	0.55	39.28
1.30	1.25	96.15	0.70	0.51	72.86
2.62	2.34	89.31	1.40	1.40	100.00
3.93	3.74	95.16	2.10	1.87	89.05
5.25	4.17	79.43	2.66	1.21	0.45

^a El control lleva todos los reactivos excepto enzima peroxidasa de Nabo. ^b Valores promedio; n = 5

De los resultados presentados en la tabla 11, se puede observar que la concentración de capsaicina disminuye en todos los reactores, en un rango de 89.20-99.98 %, aún cuando la desaparición no es uniforme ya que en los reactores con 1.30 mM y 3.93 mM la capsaicina prácticamente desapareció, en cambio en el caso de los reactores que contenían 2.62 mM y 5.25 mM la concentración de capsaicina no oxidada es mayor. Observamos nuevamente que la reacción no fue uniforme en los diferentes reactores, sin embargo se observa que la degradación es significativa aun en aquellos reactores en los cuales la degradación fue menor. La efectividad en la degradación de este tipo de compuestos es una característica típica de la enzima peroxidasa de Nabo, la cual resulta ser un biocatalizador efectivo en las reacciones donde se forman biarilos (Schmitt *et al.* 1998). También se observa que la enzima actúa tanto sobre la capsaicina como la dehidrocapsaicina, y lo hace en la misma proporción. Se podría buscar una forma de controlar esta reacción y tener las mismas tasas de consumo de capsaicina en todos los reactores; sin embargo la reacción involucra la formación de radicales libres lo cual hace difícil dicho control porque la formación de sustancias varía ampliamente dada la presencia de los demás componentes del chile, una forma de controlar la reacción que se encontró en el artículo de Bernal *et al.* (1995, 1996 a y b) quienes proponen adicionar un inhibidor competitivo como podrían ser el ácido cinámico o ácido ferúlico.

También se observó que en el reactor que se utilizó como control de la reacción, es decir al reactor al cual no se adicionó enzima peroxidasa, también disminuyó la concentración de capsaicina y dehidrocapsaicina. Con base en éstos resultados se consideró necesario encontrar una concentración mas baja de peróxido de hidrógeno a partir de la cual la degradación de la capsaicina fuera únicamente debida a la enzima peroxidasa.

También se observó que efectivamente la reacción depende de la concentración de peróxido de hidrógeno, como lo han reportado Bernal *et al.* (1993a y 1993b) ya que al consumirse la capsaicina, independientemente de la cantidad presente, parece indicar que, a las concentraciones utilizadas en este ensayo, la cantidad de la misma no fue un factor que influyó en la reacción enzimática. Por otra parte como se mencionó anteriormente la capsaicina muestra una limitada solubilidad en el medio acuoso y por tanto, no esta completamente disponible a la enzima peroxidasa, pero se sospecha que conforme se va degradando la

capsaicina solubilizada, es posible que la fracción insolubilizada se vaya incorporando a la solución. De esta manera se hace disponible para la enzima peroxidasa y fue posible que se degrade. Así se explica que en todos los reactores desapareciera la capsaicina, e inclusive en aquel en el que se tenían 5.25 mM, conforme aumenta la concentración inicial de capsaicina se observa que también aumenta la cantidad de capsaicina oxidada, alcanzando un máximo.

4.5. Optimización de la reacción enzimática.

Se decidió determinar a que concentración de peróxido de hidrógeno se lleva a cabo la reacción enzimática, sin que éste afecte por sí solo la capsaicina, ya que en los primeros ensayos se utilizó una concentración de 0.10 mM pero no se observaron cambios y se concluyó que no había reacción enzimática. Se decidió entonces utilizar una concentración de 20 mM, con la cual sí se lleva a cabo la reacción enzimática, pero también en el control se presentaron disminuciones de capsaicina. En el presente experimento se probaron diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno dejando constante el tiempo de reacción sugerido por Whitaker (1999) el cual es de 5 minutos.

4.5.1 Ensayo con estándar de capsaicina y enzima peroxidasa de Nabo, utilizando diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Este experimento se realizó para determinar a qué concentración de peróxido de hidrógeno se lleva a cabo la reacción enzimática, sin que este reactivo afecte por sí solo a la concentración de capsaicina o carotenoides. En los primeros experimentos con la enzima peroxidasa de Nabo se utilizó H_2O_2 a una concentración de 0.1 mM pero no se observaron cambios. Posteriormente, se siguió la recomendación de Whitaker (1999) y se eligió la concentración a 20 mM, con la cual sí se llevaba a cabo la reacción, pero también en el control exhibía disminución de capsaicina. La diferencia entre ambas concentraciones de H_2O_2 es muy grande y por lo tanto se hizo necesario buscar un valor intermedio.

Para el presente experimento se tomó como referencia el tiempo mínimo de 5 minutos de reacción sugerido por Whitaker (1999) y el cual se utilizó en experimentos previos

observándose que se tenía reacción. Los resultados de las determinaciones de capsaicina en este experimento se presentan a continuación en la tabla número 12.

Tabla 12. Resultados de la determinación de capsaicina a partir de los extractos de la mezcla con estándar de capsaicina, sometida a condiciones de reacción enzimática, diferentes concentraciones de H₂O₂, 1 mL de solución enzimática (100 unidades), 25 °C, 14 horas de reacción.

[H₂O₂] mM	mM Capsaicina (Sin enzima)	mM Capsaicina ^a (Con enzima)	mM Capsaicina (Oxidada)
0.01	2.60	2.44	0.17
0.10	2.61	2.32	0.29
1.00	2.60	2.24	0.35
10.0	2.43	2.22	2.10
20.0	2.33	0.77	1.56

^a Valores promedio; n = 5

En la tabla 12 se observa un aumento en la cantidad de capsaicina oxidada a partir de 10 mM de peróxido de hidrógeno. Esto es, antes de 10 mM de H₂O₂ la capsaicina oxidada se mantiene entre 0 y 0.33 mM aproximadamente, pero en 20 mM de H₂O₂ crece hasta 1.56 mM. Adicionalmente se observa que la concentración de capsaicina en el control (20 mM) no disminuye como se lo hace en el experimento con enzima, lo que hace atribuibles los cambios al efecto de la peroxidasa de Nabo. Podría parecer que la concentración de peróxido de

hidrógeno a la cual la capsaicina desaparece sin que él peróxido mismo afecte, está entre 10 y 20 mM. Incluso podría incrementarse aún más la oxidación a mayores concentraciones de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, es importante considerar el efecto aislado del peróxido de hidrógeno sobre la reacción enzimática, ya que a concentraciones mayores se ve disminuida la actividad peroxidasa debido a una desactivación por sustrato (H_2O_2) para formar el compuesto I que se obtiene en este tipo de reacciones, Bernal *et al.* (1993 a y b). También se debe de tomar en cuenta la capsaicina, que efectivamente se ve afectada a causa del peróxido de hidrógeno 20 mM, constatando lo reportado en la sección 4.4.2. Adicionalmente resulta importante evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre los pigmentos, cuya concentración se desea preservar lo más posible.

Como se ha constatado la reacción de oxidación de la capsaicina es dependiente de la concentración de peróxido de hidrógeno, Bernal *et al.* (1993a y 1993b). Además la dependencia entre la velocidad de oxidación de capsaicina y concentración de H_2O_2 muestra un comportamiento cinético de tipo Michaelis-Menten a bajas concentraciones de sustrato como la que se propuso al inicio de la investigación, y con desactivación a altas concentraciones de sustrato (H_2O_2). De hecho esta desactivación observada a altas concentraciones de sustrato y el hecho de que no pueden ser definidos los valores de K_M para oxidaciones catalizadas por peroxidasas, ya que estas reacciones no muestran señales de reversibilidad o formación de complejos enzima-sustrato, se optó por no calcular los valores de K_M , por lo tanto no se determinó la cinética de la reacción enzimática, pero si se determinó la concentración de H_2O_2 a la cual prácticamente desaparece la capsaicina, la cual fue de 1.0 mM y una concentración de aproximadamente 2.30 mM para la capsaicina cuando se utiliza un estándar, la cual resulta ser próxima al límite de solubilidad de la capsaicina en solución acuosa, cuando se utiliza dicho estándar de capsaicina (Boersch *et al.* 1991).

La reacción aquí mostrada fue de corta duración (5 minutos) y los resultados se podrían mejorar notablemente al incrementar el tiempo de reacción. En experimentos subsecuentes se estudió el progreso de la reacción con respecto al tiempo, utilizando diferentes periodos de reacción.

Con este experimento se logró determinar la concentración de peróxido de hidrógeno a la cual hay reacción enzimática, pero no se ve afectada la concentración de capsaicina por el peróxido. De esta manera se eligió la concentración de peróxido de hidrógeno a utilizar en los siguientes experimentos la cual será de 1.0 mM, ya que como se observa en la tabla 12, a esta concentración se ven mayores cambios en concentración de capsaicina en comparación con las concentraciones más bajas de 0.01mM y 0.1 mM, y al comparar con la concentración de 10 mM, vemos que los cambios son casi los mismos, no así con los presentados en la reacción con concentración de 20 mM, a cuya concentración se observa que prácticamente se degrada toda la capsaicina. Sin embargo también se ve afectada la concentración en el control donde no se agregó enzima, pero se adiciono la misma concentración de H₂O₂.

4.5.2 Reacción enzimática a diferentes tiempos de reacción.

Una vez fijada la concentración de peróxido de hidrógeno a utilizar se procedió a determinar el tiempo de reacción durante el cual la capsaicina es consumida casi por completo. El objetivo de este experimento fue observar los cambios en la concentración de capsaicina por acción de la enzima peroxidasa de Nabo a lo largo del tiempo, utilizando la concentración de peróxido de hidrógeno seleccionada en el experimento anterior, a diferentes tiempos de reacción de 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos, con agitación. La extracción y determinación de capsaicina se realizó como se describió en la sección 3.4.4.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran a continuación en la tabla 13 y en la figura 15.

Tabla 13. Resultados de la determinación de capsaicina a partir de los extractos de la mezcla con estándar, sometida a reacción enzimática, a diferentes tiempos de reacción (H_2O_2 1.0 mM, 100 unidades de enzima, 25 °C).

Tiempo de Reacción (minutos)	mM Capsaicina ^a (sin enzima)	mM Capsaicina ^a (con enzima)	% de consumo de capsaicina
5	2.60	2.24	13.39
15	2.63	2.10	20.26
30	2.60	1.70	34.80
60	2.63	1.37	50.77
120	2.63	1.15	56.78
180	2.63	0.66	64.08
240	2.65	0.37	73.58
300	2.65	0.08	96.99
360	2.60	0.05	97.97
420	2.32	No detectada	100.00
480	1.64	No detectada	100.00

^a Valores promedio; n = 5

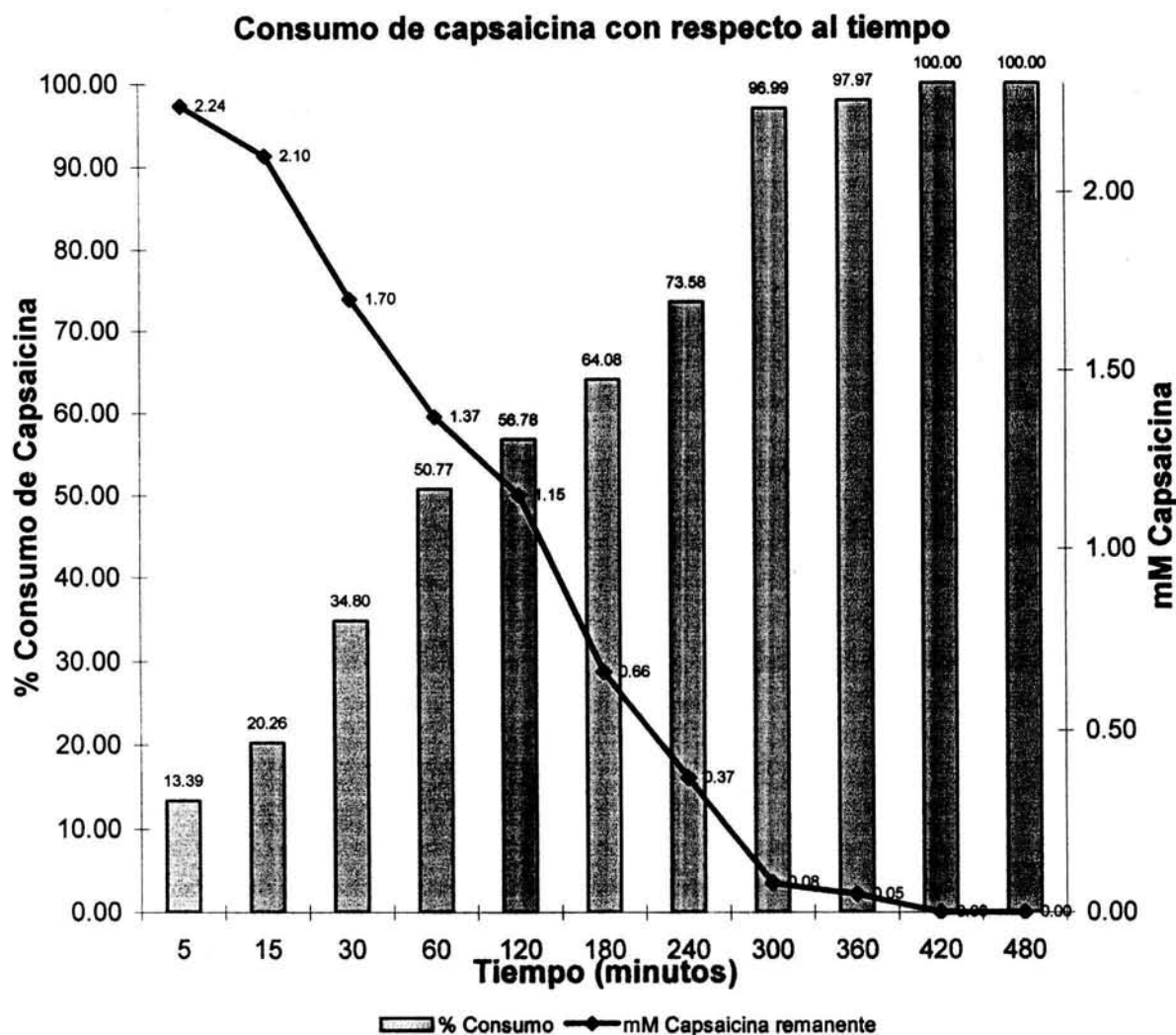


Figura 15. mM de capsaicina remanente y porcentaje de consumo a diferentes tiempos de reacción enzimática con peroxidasa de Nabo ($[H_2O_2] = 1.0 \text{ mM}$, 1 mL de solución enzimática (100 unidades), $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Como se puede observar en este experimento la capsaicina es degradada por la enzima peroxidasa y prácticamente desaparece después de 300 minutos de reacción (5 horas). A esta concentración de peróxido de hidrógeno la concentración de capsaicina en el control no se ve afectada sino hasta después de 420 minutos (7 horas) sin embargo al cabo de 300 minutos no se observó deterioro de la capsaicina en el reactor con el control, este periodo de tiempo correspondió al tiempo de reacción que se procedió a utilizar para llevar a cabo las reacciones enzimáticas utilizando ahora harina de Chile.

4.5.3 Resultados del ensayo con harina de chile y estándar de capsaicina, empleando condiciones de reacción optimizadas.

Tomando como base los ensayos anteriores se procedió a ejecutar reacciones utilizando harina de chile. Anteriormente se observó en las tablas 12 y 13 que la concentración de peróxido de hidrógeno a la cual se lleva la reacción sin que se degrade capsaicina por la acción misma del peróxido es de 1.0 mM y el tiempo de reacción en el cual prácticamente desaparece la capsaicina de 300 minutos.

Los resultados se muestran a continuación en la tabla no. 14.

Tabla 14. Determinación de capsaicina, carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir del extracto de la mezcla con harina de chile y estándar de capsaicina, donde se llevo a cabo la reacción enzimática. (H₂O₂ 1.0 mM, 100 unidades enzimáticas, 25 °C, 300 minutos de reacción)

Muestra	mM Capsaicina ^a	Carotenoides totales (g/Kg) ^a	Porcentaje Rojos ^a
Control	7.42	1.09	56.14
1	No se detectó	1.01	57.73
2	No se detectó	1.09	50.17
3	No se detectó	1.06	58.53
4	No se detectó	1.09	57.48

^a Valores promedio; n = 5

En este experimento se observa que efectivamente desaparece por completo la capsaicina; el valor de los carotenoides totales y porcentaje rojos casi no varían con respecto al control y se puede observar, además de que en dos reactores se observa un ligero incremento en el porcentaje de rojos, sin embargo este incremento no es significativo. Cabe señalar que no se determinó desviación estándar en los casos en los cuales sólo se contaban con cinco datos, debido a cuestiones de estadística, ya que el número de datos mínimo recomendado para este cálculo es de 25 datos (Comunicación oral con M. en C. Santiago Capella Vizcaíno, 2002).

En el experimento anterior se tenía la capsaicina de la harina de chile más la capsaicina añadida (2.30 mM). Posteriormente se realizó un experimento para comprobar que la desaparición de la capsaicina en la harina de chile bajo las condiciones de reacción elegidas era completa. En este caso no se adicionó estándar alguno, esto con la finalidad de evaluar si la enzima había actuado únicamente sobre la capsaicina presente en la harina de chile. Para este experimento los resultados se presentan en la tabla 15.

Tabla 15. Determinación de capsaicina, carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir del extracto de la mezcla con harina de chile, sometidos a reacción enzimática, ($[H_2O_2] = 1.0 \text{ mM}$, 100 unidades enzimáticas, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 300 minutos de reacción).

Muestra	mM Capsaicina	Carotenoides totales (g/Kg)	Porcentaje Rojos
Control	4.80	1.09	56.14
1	No se detectó	1.06	54.81
2	No se detectó	0.92	57.66
3	No se detectó	1.09	57.97
4	No se detectó	1.02	59.02
5	No se detectó	1.05	59.13

* Valores promedio; n = 5

Se observa que bajo las condiciones propuestas, se lleva a cabo la reacción enzimática y que la capsaicina desaparece, a niveles a los que ya no es posible que sea detectada por el aparato de HPLC. Sin embargo, sería interesante llevar a cabo un análisis sensorial para estudiar hasta que punto el sentido del gusto sería capaz de detectar la capsaicina en la muestra sometida a reacción enzimática, y con ello asegurar que al no ser detectada por el HPLC tampoco será detectada por el sentido del gusto. El método sensorial que se propone aplicar es el método 31.0 del ASTA (1995) donde se consideran diluciones de capsaicinoides de hasta 0.37 mM (5.5 Unidades Scoville de picor, SHU) en solución azucarada al 5 %. De hecho se sabe que el nivel al cual se percibe el típico gusto picante corresponde a una concentración de 0.6116 mM y umbral de detección de picor de se encuentra a 0.3795 mM. Sin embargo la intensidad del picor dependerá de los capsaicinoides presentes al final de la reacción, ya que cada capsaicinoide presenta diferentes tipos de pungencia a niveles de concentración muy bajos, como los que se consideraría que se alcanzarían al final de la reacción. Por ejemplo la capsaicina y la dehidrocapsaicina producen un picor agudo y ardiente localizado en la mitad de la boca y medio paladar así como en la garganta y atrás de la lengua, sensación que se desarrolla rápidamente y permanece por largo tiempo (Mike's pepper Garden, 2002) Así mismo, se deberá considerar la concentración final de la oleorresina en el alimento.

En el caso de que la capsaicina sea detectada a estos niveles de dilución, habrá que volver a optimizar la reacción enzimática, de modo que la capsaicina no sea detectada ya sea en la harina, en la oleorresina o en el producto final donde la oleorresina sería aplicada.

Al realizar ensayos bajo las condiciones de reacción optimizadas, es posible oxidar hasta 7.21 mM de capsaicina, concentración que podría corresponder a variedades más picantes que la muestra de chile guajillo empleada para este estudio. Sería interesante también estudiar hasta qué concentración de capsaicina es posible oxidar mediante las condiciones de reacción propuestas, lo que permitiría acotar su rango de aplicación.

También se observó que al contenido de carotenoides totales casi no se afectó el contenido y que el porcentaje de rojos se vio ligeramente incrementado como se ve en la tabla 15, probablemente este fue debido a que la ligera degradación presentada sea sólo debida a los

carotenoides amarillos y a que los rojos presentaron mayor estabilidad, aunque no se descarta la posibilidad de una reacción donde se transformen los carotenoides amarillos a rojos, ya que no se conoce el perfil de carotenoides. Como los pigmentos rojos son los compuestos responsables de la calidad final de la oleoresina (Minguez-Mosquera & Hornero-Mendez, 1994a) sería conveniente monitorearlos individualmente para ver cuál de ellos sufre degradación y en qué momento de la reacción enzimática, dado que se ve un ligero aumento de la proporción de rojos / amarillos. Sería también adecuado verificar la intensidad de degradación de los carotenoides amarillos. El monitoreo del perfil de carotenoides resultaría de gran utilidad para determinar si existen cambios de manera individual para cada tipo de carotenoide y así establecer la posibilidad de que se logre la epoxidación de los carotenoides amarillos. De no ser así ésta se podría lograr aplicando un cóctel de enzimas, que consista de enzima peroxidasa de Nabo que oxide a la capsaicina y otra enzima adecuada que lleve a cabo la epoxidación, la cual se podría obtener a partir de los mismos frutos de *Capsicum*, o bien aplicando alguna epoxidasa comercial que sea la más adecuada para los fines aquí expuestos.

5. CONCLUSIONES. Y RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se desarrollo el método para determinar el contenido de capsaicina, carotenoides totales, y porcentaje de rojos, a partir de la suspensión acuosa mediante la metodología propuesta para la extracción y cuantificación de los componentes de interés capsaicina, carotenoides totales y porcentaje de rojos) utilizando acetona y cloroformo para la extracción y métodos como espectrofotometría de uv-visible y HPLC, para determinar carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina respectivamente.
- No existen efectos aparentes al adicionar peróxido de hidrógeno en un rango de concentración de 0.10 mM hasta 1.00 mM, sobre los carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina en ausencia de enzima peroxidasa de nabo.
- No se presenta saturación por exceso de capsaicina en la reacción enzimática con peroxidasa de Nabo, en concentraciones de hasta 5.25 mM de capsaicina, empleando una concentración de peróxido de hidrógeno 20 mM.
- Aparentemente la transferencia de la capsaicina desde las hojuelas de chile hacia el medio acuoso (solución buffer de tris acetato pH = 6.00) es muy lenta, y solubilidad muy limitada en medio acuoso. Aún cuando no se comprobó experimentalmente en esta investigación.
- Es posible oxidar la capsaicina presente en la mezcla donde se lleva a cabo la reacción, hasta desaparecer casi por completo, utilizando las condiciones de reacción: 100 unidades de enzima peroxidasa de Nabo en buffer de tris-acetato pH = 6.00, 25 °C, 5 horas, concentración de peróxido de hidrógeno 1.0 mM, utilizando tanto estándar de capsaicina (2.30 mM) como harina de chile guajillo (4.61 mM).

- Se recomienda implementar la metodología de HPLC para determinar la concentración de cada uno de los carotenoides presentes en el extracto obtenido a partir de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción enzimática.
- Es conveniente además determinar si es percibido algún picor en el producto final (oleorresina o alimento donde se aplique) o al menos estimar su intensidad con respecto a la oleorresina no tratada con enzima.
- Sería conveniente investigar el mecanismo de reacción mediante el cual se lleva a cabo la reacción de oxidación de la capsaicina, ya que en el caso de estudio se tiene una matriz compleja en donde intervienen también los demás componentes químicos del chile, lo cual no fue realizado en el presente trabajo debido a que este se enfocó a obtener las condiciones a las cuales se eliminaba la capsaicina y no se perdían los carotenoides.
- Se propone realizar experimentos para investigar si es posible obtener la transformación de carotenoides amarillos a rojos, mediante las condiciones de reacción encontradas o mediante la aplicación de un cóctel enzimático, que contenga enzimas peroxidasa que oxiden a la capsaicina y epoxiden los carotenoides amarillos para obtener carotenoides rojos, los cuales resultan más valiosos comercialmente hablando.
- Otro aspecto que sería interesante investigar sería escalar el proceso a nivel planta piloto, una vez que se hayan establecido las condiciones optimizadas, hasta llegar aun nivel industrial, considerando rendimientos, ya que no hay que olvidar que se parte de una reacción en suspensión acuosa.

6. REFERENCIAS CITADAS.

1. AOAC, Official Method 995.03. (1995) "Capsaicinoids in Capsicums and their Extractives Liquid Chromatographic Method", 2:1001.
2. AOAC, Official Method 971.26. (1990) "Color (Extractable) in Spices, Spectrophotometric Method", 2:999.
3. ASTA (1995) "Official Analytical Methods of the American Spice Trade Association", 5th edition, American Spice Trade Association, Englewood cliffs, USA, pp. 45-50
4. Attuquayefio V. K. (1987) "Rapid Sample Preparation Method for HPLC Analysis of Capsaicinoids in *Capsicum* Fruits and Oleoresins", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35:777-779.
5. Ayres (1968) "Análisis Químico Cuantitativo", Oxford University press, pp. 430-441
6. Bauernfeind J. C. (1981) "Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors. Technological and Nutritional Applications", Food Science and Technology a Series of Monographs, pp. 8-71.
7. Berkley R. (1995) "Chiles, Ajíes y Pimientos", Editorial Voluntad S. A., Colombia, pp. 6.
8. Bernal M.A., Calderon A.A., Pedreño M.A., Muñoz R., Ros Barceló A., Merino de Cáceres F. (1993a) "Capsaicin Oxidation by Peroxidase from *Capsicum annuum* (var. *annuum*) fruits", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41(7):1041-1044.
9. Bernal M.A., A. A. Calderón, M. A. Pedreño, A. Muñoz Ros, Merino Cáceres (1993b) "Dehydrocapsaicin Oxidation by *Capsicum annuum* (var. *Annuum*) Peroxidase", Journal of Food Science, 53(3):611-613.

10. Bernal M. A., A. A. Calderón, M. A. Ferrer, F. Merino de Cáceres, Ros Barceló (1995) "Oxidation of Capsaicin and Capsaicin Phenolic Precursors by the Basic Peroxidase Isoenzyme B₆ From Hot Pepper", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2):352-355.
11. Bernal A., F. Merino, Ros Barceló (1996a) "A Role for the Basic Peroxidase Isoenzyme of High pI from Hot Pepper in Capsaicin Metabolism", *Plant Peroxidase Newsletter*, (8):4 p.
12. Bernal A., Ros Barceló (1996b) "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", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10):3085-3089.
13. Bioquimex Reka (1998) "Determinación de Carotenoides Totales y % de Rojos en Harina de Chile", 6 p.
14. Boersch A., B. A. Callingham, F. Lemberk, D. F. Sharman (1991) "Enzymatic Oxidation of Capsaicin", *Biochemical Pharmacology*, 41(12):1863-1869.
15. Caterina M.J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. Rosen, J. D. Levine, D. Julius (1997) "The Capsaicin Receptor ion Channel in the Pain Pathway", *Nature*, 389:816-824.
16. Cichewick R. H., P. A. Thorpe. (1996) "The Antimicrobial Properties of Chile Peppers (*Capsicum* species) and Their uses in Mayan Medicine", *Journal of Ethno Pharmacology*, 52:61-70.
17. Collins M. D., L. Mayer Wasmund, P.W. Bosland (1995) "Improved Method for Quantifying Capsaicinoides in *Capsicum* using High Performance Liquid Chromatography", *Hortscience*, 30(1):137-139

18. Contreras P. M., M. E Yahia (1998) "Changes in Capsaicinoids During Development, Maturation, and Senescence of Chile Peppers and Relation with Peroxidase Activity", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6):2075-2079.
19. Cooper T. H. (1991) "Improved High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Major Capsaicinoids in *Capsicum* Oleoresins", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:2253-2256.
20. Davies B. H. (1976) "Carotenoids", in "Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments", Goodwin T.W., Ed., Academic Press, 2:38-163
21. Estrada B., M. A. Bernal, J. Díaz, F. Pomar, F. Merino (2000) "Fruit Development in *Capsicum annuum*: Changes in Capsaicin, Lignin, Free Phenolics, and Peroxidase Patterns", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12):6234-6239.
22. Fujiwake H., T. Suzuki, K. Iwai (1980) "Intracellular Localization of Capsaicin and its Analogues in *Capsicum* fruit II. The Vacuole as the Intracellular Accumulation Site of Capsaicinoid in the Protoplast of *Capsicum* fruit", *Plant and Cell Physiology*, 21(6):1023-1030.
23. Gaspar T., Penel C., Castillo F.J., Greppin H. (1985) "A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development", *Physiol. plant*, 64:428-423
24. Gómez Ladrón de Guevara R., J. Pardo González (1996) "Evolution of Color During the Ripening of Selected Varieties of Paprika Pepper (*Capsicum annuum* L.)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(8):2049-2052
25. 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):102-104.

26. Govindarajan V. S. (1990) "*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):245-355.
27. H van den Berg, Faulks R., H. F. Granado, J. Hirschberg, B. Olmedilla, G. Sandmann, S. Southon, G. Stahl (2000) "The Potential for the Improvement of Carotenoid Levels in Foods and the Likely Systemic Effects", Journal of the Science of Food and agriculture, 80:880-912
28. Haila K. (1999) "Effects of Carotenoids and Carotenoid-Tocopherol Interaction on Lipid Oxidation *in vitro*", Academic Dissertation, University of Helsinki, Faculty of agriculture and forestry, Helsinki.
29. Hoffman P. G. (1983) "Separation and Quantitation of Red Pepper Major Heat Principles by Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31:1326-1330.
30. Hornero Mendez D., R. Gómez Ladrón de Guevara, I. Mínguez-Mosquera (2000) "Carotenoid Biosynthesis Changes in Five Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars During Ripening. Cultivars Selection for Breeding", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:3857-3864.
31. Isidoro E., D. J. Cotter, G. C. J. Fernandez, G. M. Southward (1995) "Color Retention in Red Chile Powder as Related to Delayed Harvest", Journal of Food Science, 60(5):1075-1077.
32. Jaren-Galán M., M. I. Mínguez-Mosquera (1999) "Quantitative and Qualitative Changes Associated with Heat Treatments in the Carotenoid Content of Paprika Oleoresins", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10):4379-4383.
33. Lenhinger (1990) "Bioquímica", Editorial Omega, México, pp. 190

34. Lacker T. (1999) "Separation and Identification of Various Carotenoides by C30 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography Coupled to UV and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometric Detection", *Journal of Chromatography A*, 854:37-44.
35. Márkus F., H. G. Daood, J. Kapitany, P. A. Biacs (1999) "Change in the Carotenoid and Antioxidant Content of Spice Red Pepper (Paprika) as a Function of Ripening and Some Technological Factors", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1):100-107
36. Mike's Pepper Garden. (2001) "Overview of Major Capsaicinoids", www.edgein.home.mindspring.com,
37. Minguez-Mosquera M. I., D. Hornero Méndez (1993) "Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.) Paprika, and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(7):1616-1620.
38. Minguez-Mosquera M. I., D. Hornero-Méndez (1994a) "Comparative Study of the Effect of Paprika Processing on the Carotenoids in Peppers (*Capsicum annuum*) of the Bola and Agridulce Varieties, 42(7):1555-1560.
39. Minguez-Mosquera M. I., D. Hornero Mendez (1994b) "Formation and Transformation of Pigments During the Fruit Ripening of *Capsicum annuum* Cv. Bola and Agridulce", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1):38-44
40. Minguez-Mosquera M. I., M. Jaren-Galan (1995) "Kinetics of the Decolouring of Carotenoid Pigments", *Journal Science Food Agricultural*, 67:153-161.
41. Minguez- Mosquera M. I., D. Hornero-Méndez, R. Gómez-Ladron de Guevara (2000) "Carotenoid Biosynthesis Changes in Five Red Pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars During Ripening. Cultivar Selection For Breeding", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:3857-3864.

42. New Mexico University (2003) Chile Pepper Institute, www.chilepepperinstitute.org
43. Nuez V. F., Gil O. R., Costa G. J. (1996) "El Cultivo de Pimientos, Chiles y Ajíes", Editorial Mundi prensa, España, pp. 15-111
44. Oliver J., A. Palou, A. Pons (1998) "Semi-Quantification of Carotenoides by High-Performance Liquid Chromatography: Saponification-Induced Losses in Fatty Foods", Journal of Chromatography A, 829:393-399.
45. Perucka I. (2000) "Extraction and Determination of Capsaicinoides in Fruit of Hot Pepper *Capsicum annuum* L. by Spectrophotometry and High-Performance Liquid Chromatography", Food Chemistry, 71:287-291.
46. Pomar F., M. A. Bernal, J. Díaz, F. Merino (1997) "Purification, Characterization and Kinetic Properties of Pepper Fruit Acidic Peroxidase", Photochemistry, 46(8):1313-1317.
47. Robledo P. A. (1991) "Aplicación de la Biotecnología al Cultivo de *Capsicum annuum*. I. Efecto del Origen del Explante Sobre la Producción de Capsaicinoides Sobre la Producción de Capsaicinoides y la Respuesta Morfogénica *in vitro*", Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo México, 101 p.
48. Romeyer F. M. J. J. Macheix, J. P. Goiffon, C. C. Reminiac, J. C. Sapis (1983) "The Browning Capacity of Grapes, 3. Changes and Importance of Dihydroxycinnamic Acid-Tartaric Acid Esters During Development and Maturation of the Fruit", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 31:346-349.
49. Rouhi A. M. (1998) "Vanilloids: Hot Relief for Pain", Chemical and Engineering News, 31-34.

50. Ros Barceló A., Bernal M. A., A. A. Calderón, M. A. Pedreño, R. Muñoz, Merino de Cáceres (1997) "Capsaicin Oxidation by Peroxidase from *Capsicum annuum* (Var. Annuum) Fruits", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(7):1041-1044
51. Ros Barceló A., Morales M., Pedreño M. A. (1998) "Specific compartmentalization of preoxidase isoenzymes in relation to lignin biosynthesis in the plant cell. In lignin and lignin biosynthesis; Lewis N.G., Sarkanen S., eds, ACS symposium series 697, American Chemical Society: Washington D.C.
52. Rylsky I. (1986) "Pepper (*Capsicum*)", *CRC Handbook of Fruit Set and Development*, USA, pp. 341-354
53. Sakrasno N., M. M. Yeoman (1993) "Phenylpropanoid Metabolism During Growth and Development of *Capsicum frutescens* Fruits", *Phytochemistry*, 32:839-844
54. Santamaría R. I., M. D. Reyes-Duarte, E. Barzana, D. Fernando, F. M. Gama, M. Mota, A. López-Munguia (2000) "Selective Enzyme-Mediated Extraction of Capsaicinoids and Carotenoides from Chili Guajillo Puya (*Capsicum annuum* L.) Using Ethanol as Solvent", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7):3063-3067.
55. Schmitt M. M., E. Schüler, M. Braun, D. Häring (1998) "Horseradish Peroxidase: an Effective but Unselective Biocatalyst for Biaryl Synthesis", *Tetrahedron*, 39:2945-2946.
56. Sigma-Aldrich (2001) "Hoja de Especificaciones del Producto no. 21750 Capsaicina Natural, Proveniente de *C. Annuum* var., annuum."
57. Smith C.G., W. Stopford (2002) "Health Hazards of Pepper Spray", 1-9
58. Surh Y.J., S. S. Lee (1995) "Capsaicin, a Double-Edged Sword: Toxicity, Metabolism, and Chemopreventive Potential", *Life Sciences*, 56(22):1845-1855.

59. Suzuki T., T. Kawada, K. Iwai (1980) "Intracellular Localization of Capsaicin and its Analogues, Capsaicinoid in *Capsicum* Fruit 1. Microscopic Investigation of the Structure of the Placenta of *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. *Karayatsubusa*", *Plant and Cell Physiology*, 21(5):839-853.
60. Suzuki T., K. Iwai (1984) "Constituents of Red Pepper Species", *Chemistry, Biochemistry, Pharmacology and Food Science of the Pungent Principle of Capsicum Species Alkaloids*, 23:227-299
61. Thomas B. V. (1998) "Simple Method for Quantitation of Capsaicinoides in Peppers Using Capillary Gas Chromatography", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:2655-2663.
62. Torres E., B. Siminovich, E. Barzana, R. Vázquez-Duhalt (1998) "Thermodynamic Hydrophobicity of Aqueous Mixtures of Water-Miscible Organic Solvents Predicts Peroxidase Activity", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4:155-159.
63. Trejo P. D. (2000) "Producción de Chile Guajillo (*Capsicum annuum* L.) Mediante Riego por Cintilla Bajo Tres Distancias Entre Plantas y Acolchado", Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Durango México, 100 p.
64. University of Quebec (2002) "Le Titrage du Peroxyde», www.er.uqam.ca
65. van Daurzen M. P. J., F. van Rantwijk, R. A. Sheldon (1997) "Selective Oxidation Catalyzed by Peroxidases", *Tetrahedron*, 53(39):13183-13218
66. van de Velde F., F. van Rantwijk, R. A. Sheldon (2001) "Improving the Catalytic Performance of Peroxidases in Organic Synthesis", *Trends in Biotechnology*, 19(2):73-80.

67. Whitaker J. R. (1990) "Principles of Enzymology for the Food Sciences", Marcel Decker Inc., USA, 591-600.
68. Whitaker J. R. (1999) Manual Practico del Curso: "Enzimas y Proteínas en la Industria de los Alimentos", UAQ-CONCYTEQ, pp. 17.
69. Zamski E., O. Shoham (1987) "Ultrastructure of Capsaicinoid Secreting Cells in Pungent and Nonpungent red pepper (*Capsicum annuum* L.) Cultivars", Botanical Gazette, 148(1):1-8.

7. ANEXOS

7.1. Elección y optimización del método de extracción de carotenoides y capsaicina a partir de la suspensión acuosa donde se lleva a cabo la reacción.

Como parte del trabajo experimental se procedió a establecer el método de extracción tanto de carotenoides como de capsaicina a partir de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción. Las técnicas analíticas propuestas originalmente no se utilizaron por las siguientes razones.

- a) En el caso de la determinación de carotenoides, el método está diseñado para trabajar con muestras secas y en nuestro caso la reacción enzimática se lleva a cabo en medio acuoso. La muestra contiene agua que interfiere con el análisis, dado que es miscible con la acetona empleada para la extracción. Se descartó el secado de la muestra después de la reacción, debido al efecto negativo de este proceso sobre el contenido de carotenoides, lo que afectaría la estimación del efecto de la adición de peroxidasa.
- b) En el caso de la determinación de capsaicinoides se requiere hacer la extracción a partir de muestra seca utilizando acetonitrilo. El acetonitrilo es miscible con el agua y como en el caso anterior el agua contribuiría a la dilución de la muestra y no conduciría a la extracción de los compuestos de interés.

Bajo estas circunstancias se propuso como disolvente al cloroformo debido a que es inmisible en agua y tanto los carotenoides como la capsaicina son solubles en él.

Para asegurarse de que el método con cloroformo como disolvente reportaba resultados confiables, se procedió a determinar carotenoides totales y porcentaje de rojos utilizando cloroformo en lugar de acetona.

Durante el período en el cual se llevó a cabo la elección y optimización del método de extracción de carotenoides y capsaicina a partir de la suspensión acuosa donde se llevaría a cabo la reacción, cada determinación se llevó a cabo con al menos 25 repeticiones, tratando de

que todos se llevaran a cabo bajo las mismas condiciones para asegurar así la reproducibilidad y exactitud del método.

7.1.1. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos a partir de muestra seca utilizando cloroformo como disolvente.

En este caso el método que se siguió prácticamente es el mismo que el descrito en la sección 3.4.2., salvo que las determinaciones se realizaron utilizando cloroformo como disolvente para determinar si éste era efectivo para extraer los colorantes. Posteriormente, el disolvente se evaporó en el rotavapor hasta sequedad y el extracto se redisolvió en acetona. Esto se hizo con la finalidad de que al realizar las lecturas en el espectrofotómetro UV-vis se obtuviera la lectura del extracto con la acetona como disolvente en todos los casos y así obtener un resultado comparable. El experimento también se realizó utilizando acetona, para poder comparar resultados. En ambos casos se partió de la técnica analítica base propuesta por la Dra. Sandra Naranjo Modad y Dr. Vicente Ridaura Sanz (sección 3.4.2.), que emplea chile molido y seco.

7.1.2. Extracción y determinación de carotenoides y capsaicina a partir de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción, utilizando cloroformo como disolvente.

El método que a continuación se presenta tiene como objetivo extraer carotenoides y capsaicina a partir de la mezcla de reacción en medio acuoso, ya que como se mencionó anteriormente los métodos de referencia parten de muestra seca y en nuestro caso se parte de una suspensión. El protocolo que se describe a continuación corresponde a la extracción a partir de la mezcla de reacción blanco, es decir sin peróxido de hidrógeno ni peroxidasa añadida.

La metodología seguida se describe a continuación:

- a. Preparación de la mezcla de reacción:
 1. Pesar 3 g de harina de chile.

2. Agregar 30 mL de buffer tris-acetato pH =7.00
 3. Agitar durante 14 horas a 25° C.
- b. Extracción de carotenoides y capsaicina de la mezcla de reacción:
1. Transferir la mezcla a un embudo de separación.
 2. Agregar 10 mL de cloroformo.
 3. Agitar vigorosamente y dejar reposar el matraz hasta que se separen las fases.
 4. Vaciar el cloroformo en un matraz bola para posterior evaporación.
 5. Repetir los pasos 3 y 4 hasta que el disolvente ya no extraiga color.
 6. Evaporar en rotavapor el extracto hasta sequedad, tomar el peso del extracto.
 7. Redisolver en hexano y transferir a un matraz aforado de 10 mL, aforar.
- c. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos.
1. Del extracto tomar una alícuota de 1 mL para determinar carotenoides totales y transferirlo a un matraz de 100 mL.
 2. Evaporar la alícuota en atmósfera de nitrógeno, aforar a 100 mL con acetona.
 3. Determinar carotenoides totales utilizando acetona como blanco y leer en el espectrofotómetro UV-vis a 422, 460, 495 nm, utilizar las formulas escritas en el método 3.4.2. para realizar cálculos.
- d. Determinación de capsaicina.
1. Del extracto tomar una alícuota de 3 mL para determinar capsaicina y transferirlo a un matraz de 10 mL.
 2. Evaporar la alícuota en atmósfera de nitrógeno, aforar a 10 mL con acetonitrilo grado HPLC y analizar en el sistema HPLC.
 3. Utilizar las condiciones de HPLC descritas anteriormente en el método 3.4.3. de este reporte.

7.1.3. Extracción y determinación de carotenoides y capsaicina a partir de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción, utilizando cloroformo como disolvente.

Debido a las variaciones que se observaron en las determinaciones de carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina mediante el método donde se utilizó únicamente cloroformo, se procedió a realizar algunas modificaciones en el método de extracción, empleamos esta vez acetona y cloroformo. El uso de acetona en la extracción debía facilitar la solubilización de los carotenoides ya que estos son muy solubles en este disolvente (Davis, 1976; Mínguez-Mosquera *et al.* 1993). Adicionalmente, la acetona debería evitar que se formara una interfase entre el agua y el cloroformo que impidiera la extracción de los carotenoides, ya que los compuestos de interés se encuentran repartidos entre las partículas de chile y la fase acuosa circundante. En este ensayo se trató toda la muestra en el embudo de separación durante la extracción con cloroformo y acetona. Los resultados servirían para compararlos con el experimento en el que se centrifuga la muestra y se trata la masa sólida por un lado y el sobrenadante acuoso por el otro.

En el método propuesto se extrajo en primer término con acetona y posteriormente se agregó cloroformo para separar las fases y tener a los carotenoides y capsaicinoides en la fase rica en cloroformo. Posteriormente se obtuvieron los compuestos de interés en forma de oleorresina mediante evaporación. Así mismo se esperaba que la extracción de la capsaicina también se optimizaría con esta modificación porque dicho compuesto es también muy soluble en acetona.

Posteriormente se decidió optimizar la extracción de los compuestos de interés mediante ligeras modificaciones que a continuación se describen.

La metodología seguida básicamente fue la misma que en el experimento 1 de este anexo, sólo que esta vez se utilizan dos disolventes en igual proporción para la parte de extracción en el embudo de separación.

7.1.4. Extracción de capsaicina y carotenoides empleando acetona y cloroformo con centrifugación de la muestra.

Este experimento es muy similar al anterior, pero en éste se centrifuga la muestra al finalizar el tiempo de reacción. De esta manera la extracción de carotenoides y capsaicina se vería favorecida al tratar por separado el sobrenadante y la torta, ya que de alguna manera, las partículas suspendidas se ven mejor expuestas a los disolventes sin que se forme una emulsión debido a la presencia del agua y sin que el agua disuelva la mayoría de los disolventes, restando fuerza a la disolución de los compuestos de interés.

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos se realizó el estudio de reproducibilidad del método de extracción con centrifugación de la muestra. También se llevó a cabo la comprobación de la eficiencia del método de extracción elegido mediante la adición de un estándar de capsaicina a la mezcla de reacción. En lugar de harina de chile únicamente se adicionó estándar de capsaicina y dehidrocapsaicina a la mezcla. Otra variante para realizar la comprobación de la eficiencia del método de extracción elegido, fue la incorporación de un estándar de capsaicina en la mezcla donde se llevará a cabo la reacción, además de harina de chile. De esta manera, corriendo paralelamente esta muestra y la muestra sin estándar, sería posible tener siempre una cantidad conocida de capsaicina como estándar, y así se podría corroborar que el método de extracción y HPLC funcionaban correctamente.

Como último paso para mejorar la cuantificación de capsaicina en el extracto de chile por medio de HPLC, se procedió a modificar la forma de preparar la muestra que sería inyectada al cromatógrafo de líquidos. El objetivo de esta modificación fue mejorar la resolución de los picos de capsaicina en presencia de otros compuestos de chile.

El método de extracción y cuantificación modificados se describe a continuación:

- a. Preparación de la mezcla donde se lleva a cabo la reacción.
 1. Preparar la siguiente mezcla:
3g de harina de chile guajillo

27 mL de buffer pH 6.00

3 mL de peróxido de hidrogeno 1.0 mM

2. Someter la mezcla descrita a las siguientes condiciones: baño de agua a una temperatura de 25°C, 14 horas con agitación.

b. Extracción de capsaicina y carotenoides.

1. Transferir la mezcla a tubos de centrifuga y centrifugar a 1000 rpm durante 30 minutos.
2. Transferir el sobrenadante a un embudo de separación.
3. Agregar 10 mL de cloroformo.
4. Agitar vigorosamente y dejar reposar el matraz hasta que se separen las fases.
5. Vaciar cloroformo en un matraz bola.
6. Repetir los pasos 3 - 5 hasta que ya no se extraiga mas color con el cloroformo.
7. En cuanto a la parte sedimentada, transferirla a un embudo con el papel filtro whatman número 41.
8. Extraer los pigmentos de la torta con enjuagues de acetona, recibir estos enjuagues en embudo de separación.
9. Agregar 10 mL de cloroformo al embudo de separación y agitar vigorosamente.
10. Reposar hasta que se separen las fases.
11. Repetir los pasos 8 – 10 hasta que la fase rica en cloroformo aparezca sin color.
12. Vaciar la fase inferior del embudo a un matraz junto con el extracto obtenido a partir del sobrenadante y evaporar a sequedad.
13. Disolver con pequeños volúmenes de acetona y transferir el extracto a un matraz de 10 mL, aforar con acetona.

c. Determinación de carotenoides totales y porcentaje de rojos.

1. Tomar la alícuota de 1 mL para determinar carotenoides, transferirlo a un matraz aforado de 100 mL y aforar con acetona.
2. Para determinar carotenoides totales utilizar acetona como disolvente y leer en el espectrofotómetro UV-visible a 422, 460 y 495nm. Para los cálculos utilizar las formulas descritas en el método 3.4.2.

d. Determinación de Capsaicina.

1. En el caso de la capsaicina tomar una alícuota de 5 mL, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y evaporar en atmósfera inerte de nitrógeno hasta sequedad, aforar con la mezcla compuesta por 50% agua acidificada con ácido acético a pH 3.0 y 50% acetonitrilo, ambos reactivos grado HPLC.
2. Mezclar perfectamente la muestra en un agitador automático durante 30 minutos, filtrar a través de un filtro de nylon millipore de 4.5 μm .
3. Utilizar las siguientes condiciones de HPLC para determinar el contenido de capsaicina: Temperatura ambiente, flujo de 1 mL/min, 60 minutos de corrida. Fase móvil isocrática con 50% de acetonitrilo y 50% de agua acidificada con ácido acético a pH 3.0, volumen de inyección de 20 μL y detección a 280 nm en el detector de rearreglo de diodos.

Este método es el que finalmente se utilizó para cuantificar carotenoides totales, porcentaje de rojos y capsaicina en los diferentes ensayos con la harina de chile y peroxidasa.

7.2. Espectros obtenidos a partir de la determinación de carotenoides totales y % de rojos extraídos por el método de extracción 3.4.4.4.

