



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

DETERMINACIÓN DE CAPSAICINA Y DEHIDROCAPSAICINA EN ALIMENTOS POR  
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-EXTRACCIÓN DIRECTA-CROMATOGRAFÍA DE GASES  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MEFS-ED-CG-EM)

**TESIS**  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta

**Q.A. ERIKA MARÍA RAMÍREZ MAYA**



TUTOR: Dra. Araceli Peña Álvarez

AÑO: 2007



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.

---

---

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darnos la oportunidad a todos los mexicanos de tener acceso a una educación superior de excelencia y de forma gratuita, para el beneficio del pueblo de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por el tiempo, profesionalismo y conocimientos compartidos en la dirección de este proyecto de investigación.

A mis sinodales por sus comentarios para mejorar este proyecto de investigación y por el tiempo dedicado para aclarar mis dudas.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Minerva, Alejandra, David, Rodrigo, Miguel y Andrea por ser un ejemplo de perseverancia, tenacidad, compromiso y dedicación además por compartir su amistad, sus conocimientos y tiempo en este ciclo en mi vida profesional.

Al maestro Adolfo García Osuna, al Dr. Lino Joel Reyes Trejo y a todas las personas que compartieron conmigo sus conocimientos y tiempo, enseñándome que al final de cualquier camino lo que importa es el ser humano y sólo el conocimiento sirve cuando lo adquieres y lo compartes de forma incondicional.

Y de manera especial a mis padres y mis hermanos por haber hecho de mi el ser humano que soy, por apoyarme en cada proyecto de mi vida y enseñarme que los logros profesionales sólo son una parte de lo que somos como personas.

---

---

*“Sin el chile [los mexicanos]  
no creen que están comiendo”*

Fray Bartolomé De Las Casas

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio 101 de Cromatografía de Gases del Departamento de Química Analítica de la División de Estudios de Posgrado, Edificio “B” de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	V
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 El chile.....	4
2.1.1 Botánica.....	4
2.1.1.1 Morfología y biología floral.....	4
2.1.2 Estructura del fruto.....	5
2.1.3 Composición química.....	6
2.1.4 Usos.....	6
2.1.4.1 Chiles deshidratados.....	7
2.1.4.1.1 Chile Chipotle.....	8
2.1.4.2 Chiles en salmuera, escabeche y encurtidos.....	8
2.1.4.3 Oleoresina, aceites esenciales y pigmentos.....	9
2.1.4.4 Salsas.....	9
2.2 Capsaicinoides.....	10
2.2.1 Tejido y localización subcelular de los capsaicinoides.....	12
2.2.2 Biosíntesis de los capsaicinoides.....	12
2.2.3 Mecanismo del picor.....	14
2.2.4 Usos de los capsaicinoides.....	15
2.3 Estudios previos sobre la caracterización y cuantificación de capsaicinoides en chiles y productos elaborados con base a esta especie.....	16
2.4 Microextracción en Fase Sólida (MFS).....	17
2.4.1 Procedimiento.....	21
2.4.1.1 Optimización del procedimiento de Microextracción en Fase Sólida.....	22
2.4.1.1.1 Selección del modo de extracción.....	22
2.4.1.1.2 Selección de la fibra.....	23
2.4.1.1.3 Selección de la técnica de agitación .....	23
2.4.1.1.4 Optimización del tiempo de extracción.....	24
2.4.1.1.5 Determinación de la temperatura de extracción.....	24
2.4.1.1.6 Optimización de pH.....	24
2.4.1.1.7 Efecto de la adición de sal.....	25
2.4.1.1.8 Optimización de la desorción.....	25
2.4.2 Aplicación de MFS en alimentos.....	25
2.5 Cromatografía de Gases Espectrometría de Masas.....	26
3. OBJETIVOS.....	29
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	30
4.1 Extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina.....	30
4.1.1 Materiales y equipo.....	30
4.1.2 Reactivos.....	31
4.1.3 Estándares.....	31
4.1.4 Muestras.....	31
4.1.4.1 Acondicionamiento de las muestras.....	31
4.1.4.2 Cantidad de muestra analizada.....	32
4.1.5 Capsaicinoides analizados.....	33
4.2 Análisis cromatográfico.....	33
4.2.1 Condiciones cromatográficas.....	33
4.2.2 Identificación de capsaicinoides.....	33

4.2.3 Cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina.....	34
4.3 Microextracción en Fase Sólida modo extracción directa (MEFS-ED).....	34
4.3.1 Dispositivo para Microextracción en Fase Sólida modo Extracción directa (MEFS-ED).....	34
4.3.2 Selección de parámetros para MEFS-ED.....	35
4.3.2.1 Selección de fibra y tiempo de splitless.....	37
4.3.2.2 Evaluación del pH de extracción.....	37
4.3.2.3 Temperatura de extracción.....	37
4.3.2.4 Perfil de tiempo de extracción.....	37
4.3.3 Procedimiento para la MEFS-ED.....	37
4.3.3.1 Linealidad.....	38
4.3.3.2 Precisión.....	38
4.3.3.3 Recobro.....	
4.3.3.4 Análisis de capsaicina (C ) y dehidrocapsaicina (DHC) por MEFS-ED-CG- EM en muestras.....	39
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	40
5.1 Resultados y análisis de resultados por MEFS-ED-CG-EM.....	40
5.1.2 Selección de parámetros para MEFS-ED-CG-EM.....	40
5.1.2.1 Selección de fibra y tiempo de splitless.....	40
5.1.2.2 Efecto del pH de la disolución de extracción.....	43
5.1.2.3 Temperatura de extracción.....	46
5.1.2.4 Perfil de tiempo de extracción.....	47
5.2 Linealidad.....	47
5.3 Precisión.....	48
5.4 Recobro.....	48
5.5 Análisis de muestras por MEFS-ED-CG-EM.....	50
5.5.1 Análisis cualitativo.....	50
5.5.2 Análisis cuantitativo.....	57
6. CONCLUSIONES.....	65
7. RECOMENDACIONES.....	67
8. ANEXOS.....	68
9. BIBLIOGRAFÍA.....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Composición del pimiento verde .....	9
<b>Tabla 2.</b>	Estructuras de los capsaicinoides y capsinoides.....	13
<b>Tabla 3.</b>	Criterio de selección de modo de extracción.....	24
<b>Tabla 4.</b>	Características de las fibras utilizadas.....	33
<b>Tabla 5.</b>	Muestras analizadas, características y lugar de adquisición.....	34
<b>Tabla 6.</b>	Capsaicinoides analizados.....	35
<b>Tabla 7.</b>	Valores de pKa y equilibrios ácido-base de la capsaicina.....	47
<b>Tabla 8.</b>	Linealidad del método MEFS-ED-CG-EM.....	49
<b>Tabla 9.</b>	Precisión del método MEFS-ED-CG-EM.....	50
<b>Tabla 10.</b>	Concentración de capsaicina en muestras de chiles analizados por los dos métodos de extracción.....	51
<b>Tabla 11.</b>	Concentración de dehidrocapsaicina en muestras de chiles analizados por los dos métodos de extracción .....	51
<b>Tabla 12.</b>	Cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina ( $\mu\text{g/g}$ ) en muestras por MEFS-ED-CG-EM .....	60

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

AOAC	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
ASTA	Sociedad Americana de Comercio de Especies
C	Capsaicina
<i>C. annum</i>	<i>Capsicum annum</i>
<i>C. baccatum</i>	<i>Capsicum baccatum</i>
<i>C. chinense</i>	<i>Capsicum chinense</i>
<i>C. frutesces</i>	<i>Capsicum frutesces</i>
<i>C. pubescens</i>	<i>Capsicum pubescens</i>
CA	Carbón activado
CANAINCA	Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias
CCEM	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar
CFSC	Cromatografía de Fluidos Supercríticos
CG	Cromatografía de Gases
CL	Cromatografía de Líquidos
cm	Centímetro
CV	Coeficiente de Variación
CW	Polietilenglicol
CX	Carboxen
DE	Desviación estándar
DHC	Dehidrocapsaicina
DRG	Zona de ganglios dorsales
DVB	Divinilbenceno
EM	Espectrometría de Masas
g	Gramo
hr	Hora
$K_{fs}$	Constante de distribución entre la fibra y la matriz de la muestra
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
MEFS	Microextracción en fase sólida
MEFS-CG	Microextracción en fase sólida y análisis en Cromatografía de Gases
MEFS-CL	Microextracción en fase sólida y análisis Cromatografía de Líquidos
MEFS-ED	Microextracción en fase sólida-extracción directa
MEFS-ED-CG-EM	Microextracción en fase sólida y análisis en Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
MEFS-EPM	Microextracción en fase sólida protegida con membrana
MEFS-HS	Microextracción en fase sólida-Head Space (vapor sobrenadante)
mg	Miligramos
n	Número de muestras
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PM	Peso molecular
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SCAN	Barrido Total de Iones
SIM	Monitoreo Selectivo de iones
TPR	Resina templada
UI	Unidades Internacionales
UV	Ultravioleta
VR <sub>1</sub>	Receptor Subtipo 1 de Vaniloides
µg	Microgramo



## **RESUMEN**

Se desarrolló un método por Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-ED-CG-EM) para la cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina, capsaicinoides mayoritarios, responsables de la pungencia o picor que caracteriza a los chiles y es uno de los atributos más apreciados en esta especie.

Para realizar la Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa (MEFS-ED) se desarrolló un dispositivo de extracción de los analitos el cual no permite el contacto de la matriz con la superficie de la fibra, evitando su deterioro. Cabe mencionar que en la actualidad no existe un dispositivo de esta naturaleza de forma comercial. La Microextracción se realizó utilizando una fibra PDMS, buffer de fosfatos pH 7 como disolvente, agitación a 1200 rpm y extracción a 50 °C durante 40 min. La cuantificación se realizó por CG-EM utilizando las áreas de cada pico cromatográfico e identificando cada compuesto mediante la comparación con sus estándares y su espectro de masas con la base de datos del NIST (National Institute of Standard and Technology).

El método desarrollado presentó aceptable linealidad en el intervalo de concentración de 0.109-1.323 µg/mL para la capsaicina y 0.107-1.713 µg/mL para la dehidrocapsaicina con coeficientes de correlación (r) mayores de 0.997.

Se analizaron 15 muestras; 2 chiles frescos, 9 chiles secos y 4 tipos diferentes de salsas, los chiles analizados son algunos de los más representativos cultivados en México y las salsas fueron analizadas porque son una de las formas de consumo más común de esta especie en nuestro país.

EL método MEFS-ED-CG-EM, comparado con otras metodologías, es más sensible para la extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina, requiere menor volumen de muestra para el análisis, elimina el uso de disolventes orgánicos y emplea un montaje experimental simple y de bajo costo.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El chile es actualmente la especia más importante en la alimentación, debido a la gran variedad de formas, aromas, usos y colores que tiene. El chile, el jitomate, el cacao, la vainilla y la calabaza, son originarios de México y forman parte de los legados más importantes de Mesoamérica al mundo en cuanto a alimentación se refiere.

De América, el chile fue llevado a Europa, Asia y África por los conquistadores españoles y portugueses, y se convirtió en un cultivo de uso mundial. A partir del siglo XVI, el chile comenzó a ser parte esencial en la cocina y costumbres de todo el mundo.

Lo atractivo de los chiles no sólo es su sabor sino también la pungencia (sensación picante) lo que lo hace apetitoso para el hombre. La diversidad y la riqueza de los platillos preparados con este producto son impresionantes. Desde los típicos y consistentes moles de Puebla, Oaxaca y Yucatán, por hablar sólo de los más conocidos, hasta las refinadas salsas y adobos del Estado de México, Guadalajara o San Luis Potosí; la variedad de gustos, sabores e ingredientes que en las cocinas del país se emplean en conjunción con los diferentes chiles, ha permitido el desarrollo de una gastronomía característica, de un gusto peculiar, que no obstante las transformaciones y las influencias, conserva una tónica particular, debida, justamente, a la variedad de formas y maneras en que en nuestro país se consume el chile.

En México existen más de 40 variedades de chiles y destaca a nivel mundial por tener la mayor variabilidad genética de *Capsicum annum*, que ha dado origen a un gran número de variedades o tipos de chiles, entre los que destacan el Serrano, Jalapeño, Ancho, Pasilla, Guajillo y de Árbol. Sin embargo, ocupa el tercer lugar de la producción mundial de chiles frescos detrás de países como China y Turquía y el noveno lugar en producción de chiles secos detrás de países como India, China, Bangladesh, Perú, Pakistán, Etiopía, Vietnam y Myanmar.<sup>(1)</sup>

En México, el sector productivo de chiles de la Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias (CANAINCA) se encuentra en el tercer sitio en la producción con el 8% de la participación, sólo superado por las bebidas y las legumbres. El sector chiles de la industria generó una derrama económica en 2000, de 2,616 millones de pesos.<sup>(2)</sup>

Pese a que en México existe la mayor diversidad genética de chiles, la gran importancia económica y cultural que posee para los mexicanos, en nuestro país no se ha desarrollado una cultura de preservación y mejoramiento de esta hortaliza, mucho menos investigación que permita caracterizar los componentes de cada especie que la hace única a nivel mundial.

Aunque existen diversos métodos para la cuantificación de capsaicinoides, compuestos químicos responsables del picor, que abarcan desde los métodos Espectrofotométricos<sup>(3)</sup> hasta Cromatografía de Líquidos y Gases con acoplamiento a un Espectrómetro de Masas la constante en todos los métodos propuestos es que el tiempo de preparación de muestra es largo, lo que implica un consumo elevado de disolventes orgánicos, o los montajes experimentales requeridos son de alto costo.<sup>(4-12)</sup>

Por tal motivo, se planteó el desarrollo y optimización de una metodología por Microextracción en Fase Sólida por el modo de Extracción Directa (MEFS-ED) acoplada a Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) para cuantificar capsaicina y dehidrocapsaicina (capsaicinoides mayoritarios) en chiles frescos, secos y salsas, debido a que es una técnica simple, rápida, reduce las etapas de preparación de muestra, requiere menor cantidad de muestra, sin el uso de disolventes orgánicos, con un montaje experimental sencillo y de bajo costo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El Chile

En México se utiliza la palabra chile proveniente del náhuatl *chilli* para referirse a todo producto proveniente del género *Capsicum*, el nombre científico del género deriva del griego *kapso* (picar), todos los chiles pertenecen a este género.<sup>(13,14)</sup>

#### 2.1.1 Botánica

El género *Capsicum* es miembro de la familia *Solanaceae* donde se incluyen el jitomate y el tabaco. El género *Capsicum* incluye más de 26 especies, sólo 12 especies más algunas variedades son utilizadas por el hombre. Las cinco especies de *Capsicum* domesticadas y más cultivadas son: *C. annuum* (Jalapeño, Serrano, Ancho, Pasilla, Guajillo, de Árbol y Piquín), *C. baccatum* L., *C. frutescens* (Tabasco), *C. chinense* (Habanero), *C. pubescens* (Manzano) (Figura 1).<sup>(13,15)</sup>

La descripción taxonómica filogenética de los chiles esta descrita como:<sup>(15)</sup>

División: Spermatophyta

Línea: Angiospermae

Clase: Dicotyledones

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Capsicum*



**Figura 1.** Diferentes variedades de Chiles en México

### **2.1.1.1 Morfología y biología floral**

La planta del chile es una angiosperma dicotiledónea, son hierbas o arbustos anuales. Las flores son hermafroditas, solitarias y axiales, tienen de cinco a ocho pétalos, entre cinco y ocho estambres y de dos a cuatro pistilos. En la base de estos se encuentra el ovario donde se encuentran los óvulos. El ovario es el lugar donde los óvulos, al ser fecundados producen semillas. Los óvulos están unidos a través de un hilillo llamado funículo a una parte del ovario llamada placenta (vena del chile).<sup>(13)</sup>

### **2.1.2 Estructura del fruto**

El chile botánicamente llamado baya, es un fruto simple, carnoso, hueco, lleno de aire en cuyo interior se encuentran las semillas.

En el fruto del chile se pueden distinguir una región capsular externa correspondiente al pericarpio y un eje, éste último está formado por el pedúnculo grueso y corto que varía en la forma, color y acritud rematado por el cáliz y su prolongación dentro del fruto llamado corazón. En la región capsular externa pueden distinguirse tres regiones: base, cuerpo y ápice. La base del fruto está formada por el extremo de un pedúnculo y los tejidos desarrollados a partir del receptáculo floral, pudiendo ser cóncava, convexa o plana. El pericarpio es coriáceo y el color puede variar de verde a púrpura o rojo, de anaranjado a rojo. El cuerpo del fruto presenta una superficie suave, frecuentemente asurcada y con depresiones o rugosidad transversal.

La cavidad del fruto es la parte interior del pericarpio. La placenta con las semillas y las costillas o septos sobresalen de ella formando el corazón. El corazón está cubierto por el tejido placentario, su forma está relacionada con la forma del fruto es globosa si el fruto es semiesférico, alargado-cónica en los rectangulares y en forma de cono corto en los frutos prismáticos, las semillas se encuentran en la superficie de la placenta (Figura 2). Los componentes mayoritarios del fruto son: semilla, pericarpio, placenta y pedúnculo.

Todos estos componentes pueden variar dependiendo de la variedad y las condiciones climáticas donde se desarrolló la planta y el fruto.<sup>(13-15)</sup>

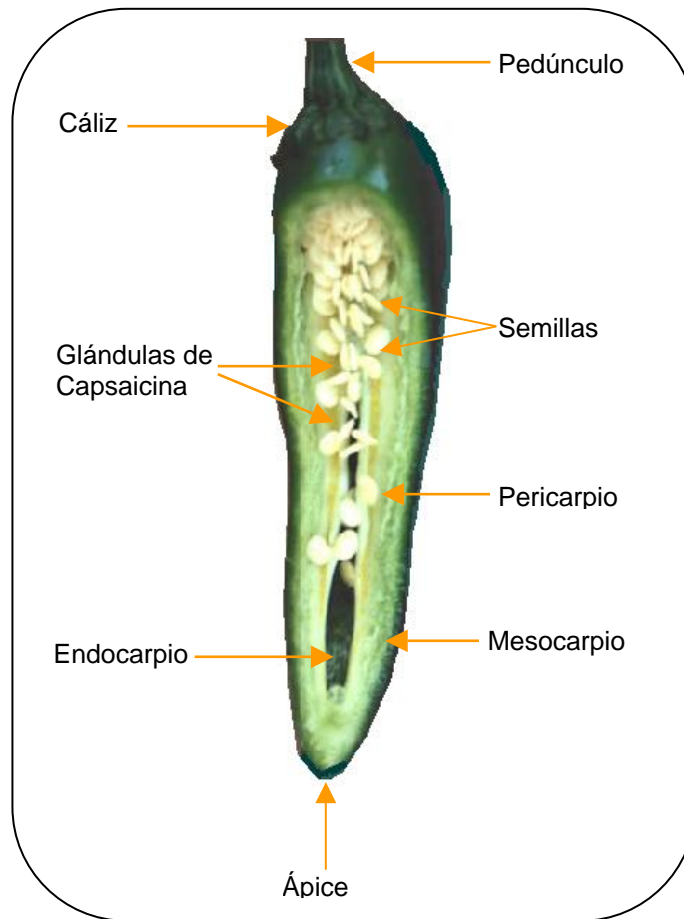


Figura 2. Corte transversal del chile, donde se pueden distinguir sus componentes <sup>(14)</sup>

### 2.1.3 Composición química

Los chiles verdes como maduros, son un importante constituyente que imparte picor, sabor y color a la comida. El picor (pungencia) es debida a un grupo de sustancias conocidas como capsaicinoides cuyos componentes mayoritarios son la capsaicina y dehidrocapsaicina, este grupo también incluye otros homólogos de estas sustancias considerados componentes menores, estos se encuentran presentes principalmente en el pericarpio y en la placenta de la fruta. La capsaicina es un compuesto cristalino, picante e inodoro. El fruto verde posee una mayor cantidad de capsaicina que un chile maduro, la variación de la composición de los frutos depende de la fase de maduración. Los chiles son una buena fuente de energía, proteína y minerales (Tabla 1).<sup>(16)</sup> Además, son una buena fuente de antioxidantes al contener flavonoides (quercentina, luteolina), ácidos fenólicos, carotenoides ( $\beta$ -caroteno, capsantina, etc.) y tocoferoles, vitamina A y vitamina C.<sup>(17)</sup>

**Tabla 1.** Composición del Pimiento verde (por 100 g de porción comestible) <sup>(15)</sup>

Componente	Contenido	Componente	Contenido
Humedad (g)	85.3	Riboflavina (mg)	0.39
Proteína (g)	2.9	Fósforo (mg)	80
Grasa (g)	0.6	Hierro (mg)	1.2
Minerales (g)	1.0	Sodio (mg)	6.5
Fibra (g)	6.8	Potasio (mg)	217
Hidratos de carbono (g)	3.0	Cobre (mg)	1.55
Calcio (mg)	3.0	Tiamina (mg)	0.19
Magnesio (mg)	24	Vitamina A (UI)	292
Cloruro (mg)	15	Vitamina C (mg)	111

Los chiles también contienen compuestos volátiles aromáticos que forman parte del sabor global de los alimentos que se sazonan con ellos.

#### 2.1.4 Usos

Los usos de los chiles son muy variados, su principal aplicación es en la industria de los alimentos de acuerdo a las características de sabor y color que imparten. Las industrias involucradas en el procesamiento de los chiles son muy variadas:

- Deshidratación de chiles. Elaboración de chile Chipotle
- Elaboración de chile en salmuera, en escabeche y encurtidos
- Obtención de oleorresinas, aceites esenciales y pigmentos
- Elaboración de salsas

##### 2.1.4.1 Chiles deshidratados

La conservación de los alimentos por deshidratación es uno de los métodos más antiguos, el cual tuvo su origen en los campos de cultivo cuando se dejaban deshidratar de forma natural. Este procedimiento proporciona estabilidad microbiológica, debido a la reducción de la actividad del agua y disminuye la actividad fisicoquímica. Para conseguir esto, la transferencia de calor debe ser tal que se alcance el calor latente de evaporación y que se logre que el agua o el vapor de agua atraviese el alimento y lo abandone.

Los frutos frescos se extienden en bandejas, enteros o en rodajas, se secan a 65 °C favoreciendo la retención del color, mejora el color inicial y la acritud. El tiempo de secado de los frutos enteros es de 12 horas y rebanados en 6 horas.

Las plantas deshidratadoras generalmente “maquilan” el secado del producto fresco. El chile se coloca en charolas de malla que a su vez son depositadas en carros metálicos para ser introducidos a los túneles de secado. Los túneles trabajan con un sistema de aire forzado caliente utilizando gas o diesel como combustible. El tiempo de secado depende del sistema y de la humedad de los chiles. El tiempo promedio de secado en la mayoría de los casos es de 4 horas por sección. Los chiles se secan hasta una humedad final de 7-8%. Cada sección corresponde a una cantidad específica de carros que generalmente son 5 carros y que varía de acuerdo a la capacidad de secado de cada planta.

Este método de conservación aporta otras ventajas derivadas de la reducción del peso, en relación con el transporte, manipulación y almacenamiento.<sup>(16)</sup>

#### **2.1.4.1.1 Chile Chipotle**

El chile Chipotle es un chile seco y ahumado, de color café oscuro, textura arrugada, es uno de los chiles más picosos. Cuando fresco, es el chile Jalapeño verde el cual después se pone a secar al sol y se ahuma con carbón; en la actualidad el proceso es más controlado y se realiza de forma industrial. Su nombre proviene del Náhuatl; *Chilli*, Chile y *Poclli*, humo, “Chile Ahumado”. La técnica de ahumado data de la época Prehispánica, con este chile se hacen salsas picantes y guisos que a veces llaman enchipotlados.<sup>(18)</sup>

#### **2.1.4.2 Chiles en salmuera, en escabeche y encurtidos**

El uso de la sal para la conservación de los alimentos está muy extendido, debido a que aporta sabor, ejerce un efecto conservador e influye en la textura y otras características de los encurtidos. El salado y la salmuera son las principales aplicaciones de la sal en la preparación de los encurtidos y salsas.

Los Jalapeños, los Serranos y los Chipotles son los chiles que más frecuentemente se conservan en escabeche. El escabeche es una salsa o adobo que se hace con aceite frito, vino o vinagre, hojas de laurel y otros ingredientes, para conservar y hacer sabrosos los



chiles. Esta es la forma más común de chiles enlatados que se encuentran a la venta en el mercado.

El chile es de las especies más comunes para encurtidos, tienen en común su aderezo con vinagre pues es la característica fundamental del encurtido. Los chiles pueden someterse a fermentación ácido-láctica o bien no fermentarse. También pueden elaborarse numerosos tipos de encurtidos mediante adiciones de azúcares, especias, esencias y aromas, éstos pueden pasteurizarse para mejorar su conservación.<sup>(2)</sup>

#### **2.1.4.3 Oleorresinas, aceites esenciales y pigmentos**

De los chiles deshidratados, se extrae la oleorresina (extractos totales a los que se les ha eliminado el disolvente), las oleorresinas contienen los componentes que constituyen el color, sabor, pungencia y factores sensoriales relacionados del material original, se usan como aditivos en alimentos y en diferentes productos. Se utiliza además en la preparación de carnes frías y embutidos; como componente de pinturas; como repelente en la agricultura y la ganadería menor contra mamíferos depredadores; en la industria tabacalera para mejorar el sabor de ciertas mezclas de tabaco; en la industria farmacéutica como estimulante; en la industria cosmética para la elaboración de champú y jabón, así como para producir pigmentos colorantes para lápices labiales y polvos faciales; en la fabricación de aerosoles para defensa personal; en la industria militar, donde se emplea en la fabricación del llamado gas-pimienta.<sup>(2)</sup>

El chile rojo en polvo, rico en capsantina (ingrediente que determina la cantidad de pigmento en un chile), se emplea en la avicultura como alimento para las gallinas, con objeto de obtener una intensa coloración amarilla, muy apreciada, tanto en las yemas de los huevos como en la piel de los pollos.

#### **2.1.4.4 Salsas**

En México, el sector productivo chiles de la Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias (CANAINCA) se encuentra en el tercer sitio en la producción con el 8% de la participación, sólo superado por las bebidas y las legumbres.

Así mismo, junto con las salsas y condimentos, presentan en total un 10% de crecimiento, ubicándose en el segundo lugar de crecimiento de la mezcla total de la industria.

El sector chiles de la industria generó una derrama económica en 2000, de 2,616 millones de pesos. El sector se compone por cinco segmentos: Serrano, Jalapeño, Chipotle, Morrón y otros chiles (Güeros, Largos, Pimientos, Poblanos, etc.).

Las industrias salseras en todo el mundo han ido en aumento. Actualmente muchos países han empezado a elaborar salsas, en pequeñas compañías con sabores diversos.<sup>(2)</sup>

## 2.2 Capsaicinoides

Ciertos compuestos presentes en algunas especias y hortalizas generan sensaciones características como quemante, cortante, aguijonante que se conocen colectivamente como sensación picante o pungencia.<sup>(19)</sup> La pungencia de los chiles (*Capsicum sp.*) se debe a un grupo de sustancias de naturaleza pseudo alcaloide llamadas capsaicinoides. La estructura química de todos los capsaicinoides es similar, son vanillilamidas de ácidos monocarboxílicos que varían solamente por lo largo de la cadena hidrocarbonada (C<sub>8</sub>-C<sub>11</sub>) y por la presencia o ausencia de un doble enlace en dicha cadena (Tabla 2). La principal característica de estas moléculas es la estructura aromática llamada grupo vanillilo (proveniente de una vanillilamina) como el de la vainillina, así los capsaicinoides forman parte de una familia de compuestos químicos llamados vaniloides.<sup>(13,19)</sup>

La capsaicina es el capsaicinoide de mayor pungencia y es representativa de estos principios picantes, específicamente se trata de un pseudo-alcaloide, siendo un producto de la condensación del ácido decilénico y de la 3-hidroximetoxibencilamina. Los capsaicinoides son análogos de la capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida), dehidrocapsaicina (8-metil-N-vanillil-nonanamida), nordehidrocapsaicina, homocapsaicina I, homocapsaicina II, homodehidrocapsaicina I, homodehidrocapsaicina II, N-vanilliloctanamida, N-vanillilnonanamida, N-vanillildecamida. Se han identificado doce compuestos diferentes de capsaicinoides, pero la capsaicina y la dehidrocapsaicina son los responsables de aproximadamente el 90% del picor y son los componentes mayoritarios de la especie *Capsicum*. La cantidad total de capsaicinoides varía ampliamente entre las diferentes especies (*C. Annuum*, *C. Baccatum* L., *C. Frutescens*, *C. Chinense*, *C. Pubescens*).<sup>(14)</sup>

La mayoría de los capsaicinoides son pungentes y desarrollan su acción irritante en tejidos orales, en la garganta y el estómago, pero existen capsaicinoides no pungentes como la ω-hidroxicapsaicina. Existe un grupo de sustancias no pungentes con estructuras similares a los capsaicinoides, llamados capsinoides. Los capsinoides tienen las mismas cadenas

hidrocarbonadas que los capsaicinoides, pero el anillo aromático es derivado de un vainillil-alcohol en lugar de vanillilamina (Tabla 2). Se ha encontrado que ambos tipos de compuestos tienen propiedades antioxidantes semejantes.<sup>(20)</sup>

**Tabla 2.** Estructuras de los capsaicinoides y capsinoides<sup>(20)</sup>

Capsaicinoides	Capsinoides
Compuesto	Compuesto
Capsaicina	Capsiate (*)
Dehidrocapsaicina	Dehidrocapsiate (*)
Nordehidrocapsaicina	Nordehidrocapsiate (*)
Homocapsaicina I	-----
Homodehidrocapsaicina I	-----
Homocapsaicina II	-----
Homodehidrocapsaicina II	-----
Nonivamida	-----
$\omega$ -Hidroxicapsaicina (*)	-----

\* Compuestos no pungentes

### 2.2.1 Tejido y localización subcelular de los capsaicinoides

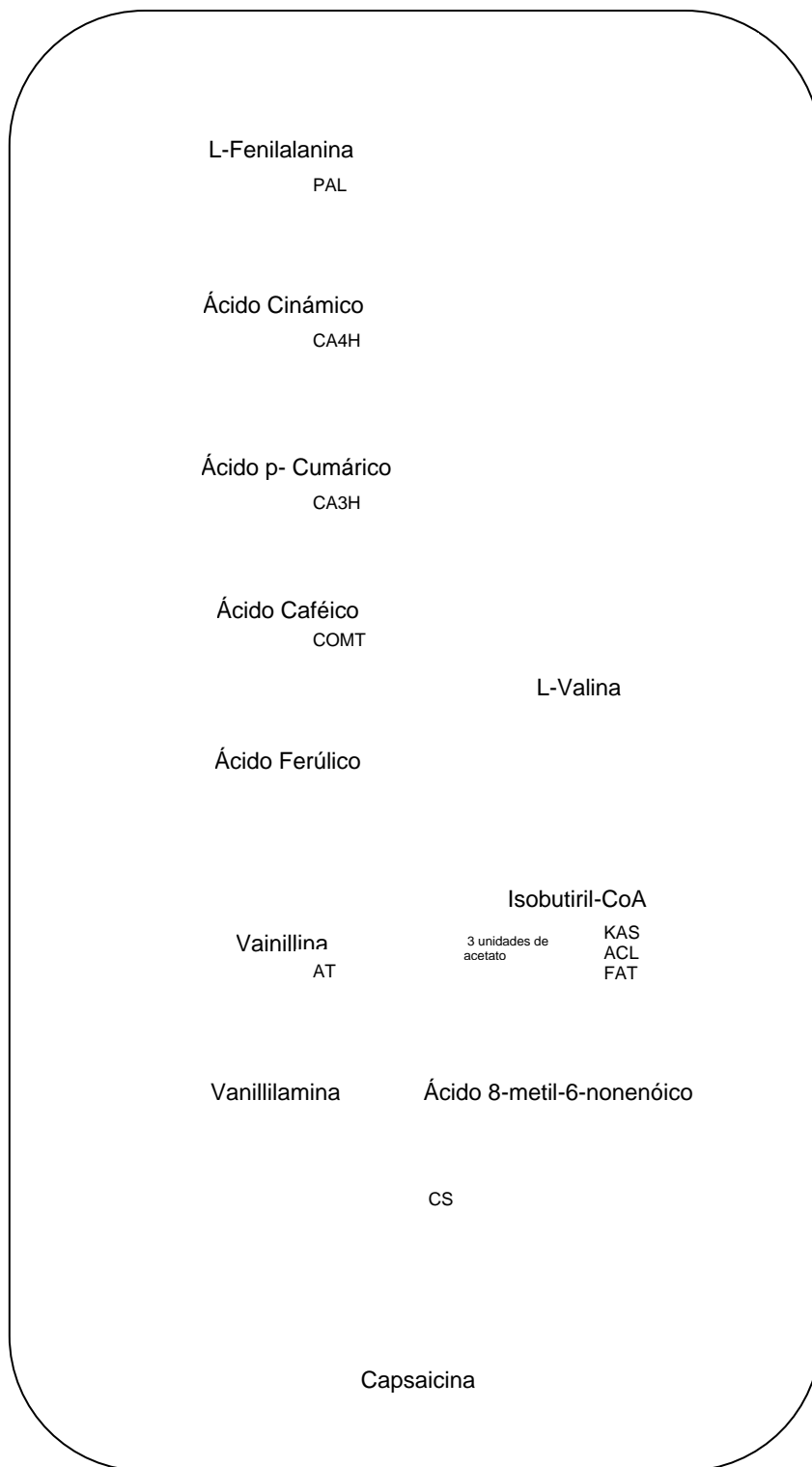
La acumulación de capsaicinoides esta inicialmente asociada con el desarrollo primario del órgano de la planta: la fruta. Los capsaicinoides se acumulan en etapas primarias del desarrollo de la fruta y se reservan hasta la etapa final del crecimiento. El lugar de acumulación de capsaicina es la placenta, más que en el pericarpio, en cualquier etapa de desarrollo del fruto. Una pequeña cantidad de capsaicina se encuentra en las semillas y en el pericarpio.

La biosíntesis y la acumulación de la capsaicina ocurre en la placenta, ahí se acumula en vesículas y vacuolas de células epidérmicas de la placenta. La localización de las enzimas necesarias para la biosíntesis de capsaicinoides es consistente con que la placenta es el lugar de biosíntesis ya que las enzimas para su biosíntesis (KAS ( $\beta$ -cetoacil-sintetasa) y FAT (ácido graso transferasa)) se ha demostrado que se encuentran en la epidermis placentaria.<sup>(20)</sup>

La cantidad de capsaicina es genéticamente controlada, pero está sujeta a variables ambientales como temperatura, luz, suelo, humedad y nivel de fertilización.<sup>(21)</sup>

### 2.2.2 Biosíntesis de los capsaicinoides

La ruta de biosíntesis de la capsaicina está bien caracterizada. La vanillilamina de los capsaicinoides es derivada de la L-fenilalanina sintetizada vía ácido cinámico como sucede para la síntesis de la lignina después de la formación de ácido caféico o alternativamente a la del ácido ferúlico. Mientras que la cadena de ácidos grasos proviene de la L-valina (Figura 3). También se ha sugerido que la L-leucina interviene en la formación de los ácidos grasos utilizados en la biosíntesis de capsaicinoides. La L-valina genera los ácidos grasos para la formación de la capsaicina y dehidrocapsaicina, mientras que a partir de la L-leucina se sintetizan los ácidos grasos que se incorporan en la formación de la nordehidrocapsaicina y homodehidrocapsaicina. Otros sugieren que la L-valina y L-leucina se utilizan en la síntesis de las cadenas de ácidos grasos de números par e impar; la condensación de la vanillilamina y la cadena de ácidos grasos es catalizada por la enzima capsaicina-sintetasa.<sup>(14,20)</sup>

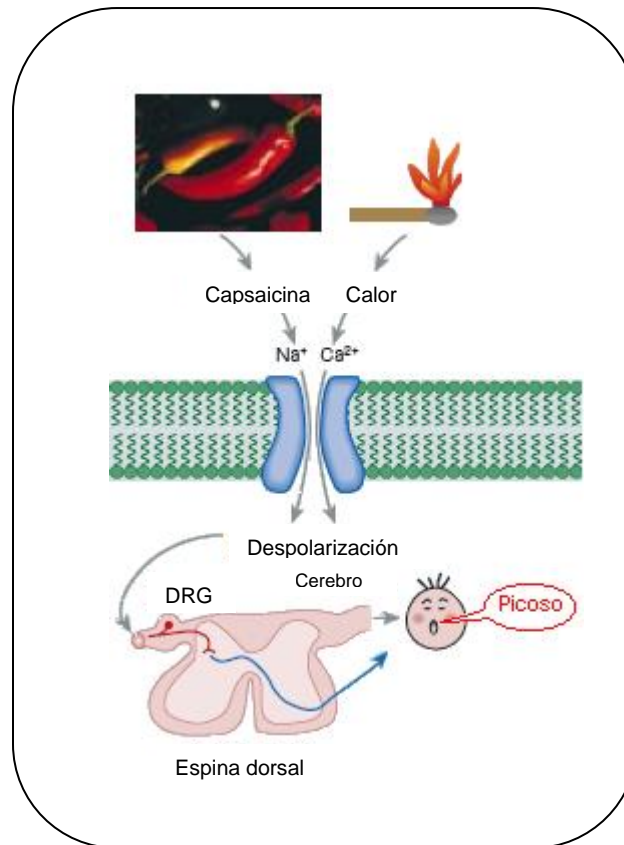


**Figura 3.** Ruta propuesta para la biosíntesis de capsaicina en *Capsicum* mostrando las principales enzimas e intermediarios: PAL (fenilalanina-amonía-liasa), CA4 (ácido cinámico 4-hidroxilasa), CA3H (ácido cumárico 3-hidroxilasa), COMT (ácido caféico O-metil-transferasa), AT (amino-transferasa), KAS ( $\beta$ -cetoacil-sintetasa), FAT (ácido graso transferasa), CS (capsaicina-sintetasa). Las flechas discontinuas indican diferentes etapas, los signos de interrogación indican que los pasos de síntesis todavía no están bien caracterizados.<sup>(20)</sup>

### 2.2.3 Mecanismo del picor

La capsaicina es una toxina neural de naturaleza pseudo-alcaloide que activa un grupo de neuronas sensoriales periféricas que responden al dolor provocado por estímulos químicos, mecánicos o térmicos. Dichas neuronas son llamadas nociceptores pues transmiten información sobre el daño en tejidos en diversas partes del cuerpo hacia la médula espinal y el cerebro. Se cree que estas neuronas nociceptivas liberan en la médula espinal un neurotransmisor de naturaleza peptídico, llamado sustancia P, cuando reaccionan a la capsaicina, es decir, la liberación de la sustancia P en esta región significa dolor.

En nuestra lengua tenemos terminaciones nerviosas de neuronas nociceptivas que reaccionan a la capsaicina y que transmiten señales hacia la médula espinal en su parte del tallo cerebral. En las membranas de dichas fibras sensoriales se encuentran proteínas que actúan como receptores de la capsaicina, pero que responden no sólo a ella sino también al calor y la acidez. Cada uno de estos receptores es una proteína que forma una puerta de entrada hacia la célula de iones positivos (cationes), conocida como canal catiónico o VR<sub>1</sub> (Receptor Subtipo 1 de Vaniloides) que al activarse cuando la capsaicina se une a una parte del canal, abre paso a los iones positivos, principalmente calcio, disueltos en el fluido extracelular o suero (donde dichos iones se encuentran en grandes concentraciones, 2 mM), permitiendo su entrada al espacio intracelular en donde su concentración es menor (alrededor de 100 nM). Como los iones son entidades cargadas eléctricamente, al entrar alteran las propiedades eléctricas de la célula receptora, lo cual genera señales bioeléctricas hacia la médula espinal en donde las terminaciones nerviosas de las fibras sensoriales nociceptivas liberan el neurotransmisor del dolor, la sustancia P. Como el receptor proteico también responde al calor, eso explica por qué el chile se percibe como caliente. La Figura 4 muestra de forma esquemática el proceso en el que los mamíferos percibimos la sensación de picor.<sup>(13,22)</sup>



**Figura 4.** Los chiles y el dolor generado por el calor, activan las fibras nerviosas sensoriales a través del canal VR<sub>1</sub> (conocido como receptor Subtipo 1 de Vaniloides) que es activado por la presencia de capsaicina, cuando el canal es activado se abre permitiendo el flujo de Ca<sup>2+</sup> y Na<sup>+</sup>, el flujo despolariza las células neuronales del dolor iniciando un impulso nervioso desde la zona de ganglios dorsales (DRG) al cerebro.<sup>(22)</sup>

#### 2.2.4 Usos de los capsaicinoides

Los capsaicinoides tienen características que los hacen interesantes para su uso en las industrias farmacéuticas, de los alimentos y en agricultura.

La capsaicina puede causar inflamación neurogénica en algunas circunstancias, pero tiene propiedades analgésicas y anti-inflamatorias en el uso de cremas y geles en aplicación tópica que ayudan a disminuir la neuropatía diabética y el dolor provocado en artritis reumatoide.<sup>(23)</sup>

Los capsaicinoides poseen propiedades que benefician la salud humana, reducen la absorción de grasa por las células del epitelio y el nivel de colesterol en la sangre (ratas y hámsteres). Asimismo estimulan la respiración y la vaso constricción, la presión aórtica y el

bombeo cardiaco, también disminuyen la sensibilidad en la piel humana, razón por la cual se han usado para aliviar el dolor muscular.<sup>(14)</sup>

Los capsaicinoides y capsinoides presentan actividad antioxidante protegiendo de la oxidación al ácido linoléico, la capsaicina así como la cumarina reducen la susceptibilidad de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se cree es el factor que desarrolla y provoca el avance de la arterosclerosis.<sup>(17,24)</sup> Además son protectores contra efectos mutagénicos y carcinogénicos, también poseen actividad como antígenotóxicos.<sup>(4)</sup>

En bajas concentraciones los capsaicinoides aumentan los mecanismos de defensa del estómago al poseer actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas como *Helicobacter pylori*, algunos géneros de *Salmonella*, *Clostridium* y *Bacillum*.<sup>(5)</sup> De la misma manera presentan moderada actividad antimicrobiana y antifúngica por lo que han aplicado como agroquímicos, sin embargo, no poseen actividad insecticida.<sup>(20)</sup>

De igual forma son ampliamente usados como inductores del dolor en aerosol de defensa personal y a nivel militar en la elaboración de gases tóxicos (gas pimienta).<sup>(6)</sup>

También se utilizan en forma de oleorresinas en la elaboración de carnes frías como chorizos, salchichas y mortadelas, del mismo modo se usan como complementos en salsas y frituras.<sup>(2)</sup>

### **2.3 Estudios previos sobre caracterización y cuantificación de capsaicinoides en chiles y productos elaborados con base en esta especia**

Existen una gran variedad de métodos que se han usado en el análisis de capsaicinoides en las más variadas muestras - chiles turcos, chiles coreanos, chiles mejorados genéticamente, muestras de ropa, cremas, armas de defensa personal-, estos incluyen métodos Sensoriales,<sup>(25)</sup> Espectrofotométricos,<sup>(3)</sup> Cromatografía de Gases (CG),<sup>(26,27)</sup> Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM),<sup>(7-10)</sup> Cromatografía con Fluidos Supercríticos (CFSC),<sup>(28,29)</sup> Cromatografía de Líquidos con detectores UV y Fluorescencia (CL),<sup>(3,23,30-32)</sup> Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (CL-EM) con diferentes tipos de sistemas de ionización y analizadores máscos,<sup>(4,5,11,12)</sup> Cromatografía de Líquidos acoplada a RMN,<sup>(33-34)</sup> Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (CCEM)<sup>(35)</sup> y análisis con enzimas realizando Inmunoensayos.<sup>(36)</sup>



El objetivo de estos métodos es realizar la cuantificación o caracterización de los capsaicinoides a través de metodologías más eficientes, reducción del número de pasos y el tiempo de preparación de muestra.

El método oficial propuesto por la AOAC para determinación de capsaicinoides en *Capsicums* y sus extractos (oleorresinas), consiste en la extracción de la muestra, por extracción Soxhlet con etanol durante 5 hrs, el extracto es filtrado y analizado por CL con detector de UV o Fluorescencia.<sup>(37)</sup>

#### 2.4 Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

La Microextracción en Fase Sólida es una técnica desarrollada por Pawliszyn y colaboradores en 1990 y fue propuesta como un método rápido de extracción de compuestos orgánicos volátiles de muestras líquidas, libre de disolventes. Esta técnica emplea una fibra de sílice fundida que es recubierta en su exterior por una fase estacionaria o adsorbente en la mayoría de los casos polimérico.<sup>(38)</sup> El analito en la muestra es directamente extraído y concentrado en la fase estacionaria, y después es desorbido por temperatura en el inyector de un Cromatógrafo de Gases o mediante el empleo de un disolvente en una cámara especial de desorción previo a su análisis por Cromatografía de Líquidos.<sup>(39)</sup> Esta técnica se emplea para extraer compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de muestras acuosas, generalmente ambientales, biológicas y alimentos, aunque es útil también en muestras sólidas y gaseosas.

El principio en el que se basa la MEFS es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza en el momento en que la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción termina cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la fibra y la muestra.

El dispositivo para MEFS consiste de un contenedor de fibra similar a una jeringa, conteniendo una barra de acero inoxidable semejante a una aguja dentro de la cual esta insertada la fibra de sílice fundida, la cual puede ser expuesta o retraída dentro de la aguja por medio de un émbolo (Figura 5). La fibra de sílice fundida esta recubierta con una capa relativamente delgada de alguna de las fases estacionarias poliméricas, la cual concentra los

analitos orgánicos durante la adsorción o absorción desde la matriz de la muestra. La fibra por sí misma es químicamente inerte y muy estable aún a alta temperatura (Figura 6).<sup>(38)</sup>

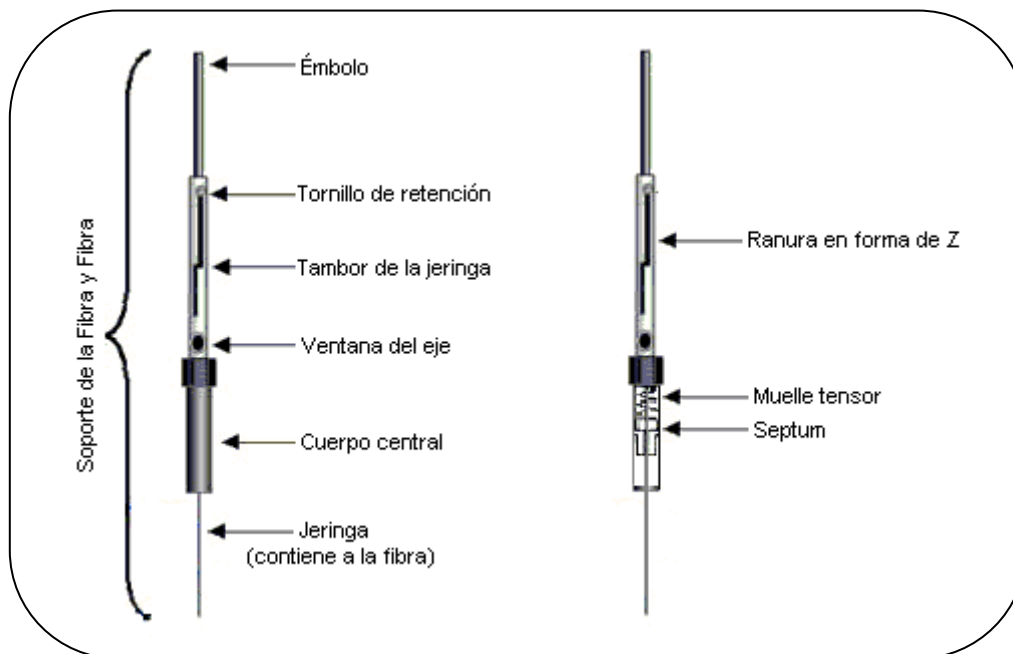


Figura 5. Dispositivo para Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

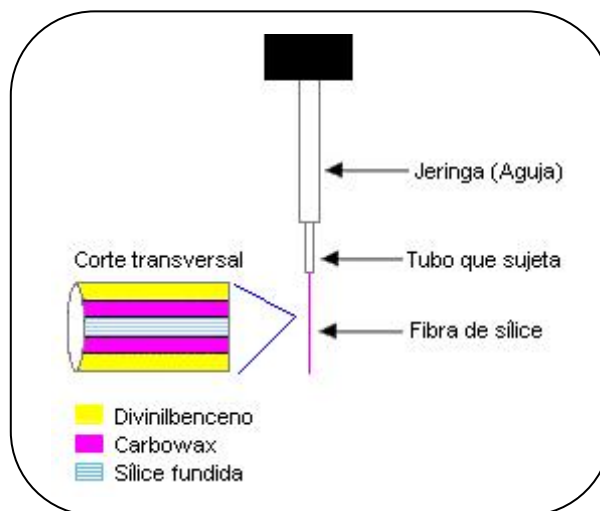
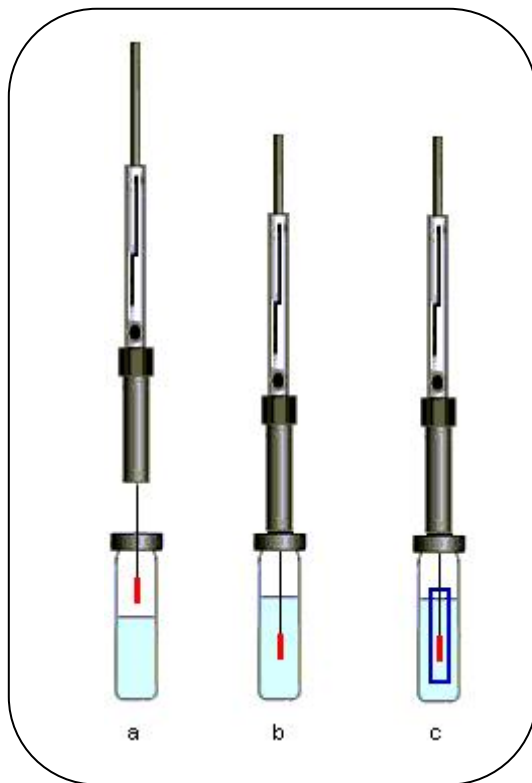


Figura 6. Dispositivo de MEFS amplificado, se muestra como está colocada la fibra y el corte transversal de una fibra dual de DVB/Carbowax

La MEFS no es una técnica de extracción exhaustiva, tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de partición de los analitos, se obtiene una relación proporcional entre la cantidad de los analitos adsorbidos por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra

antes de alcanzar el equilibrio de partición. Por lo tanto el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo por MEFS.

Existen 3 tipos básicos de extracción: Extracción Directa (MEFS-ED), Headspace (MEFS-HS) y Extracción Protegida con Membrana (MEFS-EPM) o extracción indirecta con membrana (Figura 7). En el modo MEFS-Extracción Directa la fibra se sumerge directamente en muestras líquidas y los analitos son transportados directamente de la matriz de la muestra hacia la fase de extracción (fibra). En el modo MEFS-Headspace la fibra se expone en la fase vapor o espacio de cabeza que existe sobre una muestra sólida, líquida o gaseosa, los analitos son transportados a través del aire enriqueciendo la fibra, este modo se utiliza para extracción de compuestos volátiles, de tal forma que se protege la fibra de interferencias de alto peso molecular o de compuestos no volátiles presentes en la matriz de la muestra. Además, MEFS-Headspace permite la modificación de la matriz como el cambio de pH sin dañar la fibra.



**Figura 7.** Modos de operación de MEFS (a) Headspace, (b) Extracción Directa, (c) Extracción Protegida con Membrana.

En el modo MEFS-Extracción Protegida con Membrana la fibra se protege utilizando una membrana que le sirve como barrera, se utiliza en muestras con muchas interferencias en donde los compuestos tienen baja volatilidad para ser analizados por MEFS-Headspace.

Una membrana hecha de un material apropiado puede añadir selectividad al proceso de extracción, la cinética de extracción con membrana es sustancialmente más lenta que en MEFS-Extracción Directa porque los analitos necesitan difundir a través de la membrana antes de ser extraídos en la fibra.<sup>(38)</sup> La eficiencia del proceso que se tiene en MEFS es dependiente de la constante de distribución  $K_{fs}$ , éste es el parámetro característico y describe las propiedades de la fibra y su selectividad hacia el analito, en comparación con otros componentes de la matriz.

Existen diferentes tipos de fibras, con diferentes polaridades, de acuerdo a los tipos de fase estacionaria con las que están elaboradas, también se tienen diferentes espesores de película, dentro de las que destacan: polidimetilsiloxano (PDMS) la cual se considera una fibra de recubrimiento polimérico de aplicación general, poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), polietilenglicol/divinilbenceno (CW/DVB), polietilenglicol/resina templada (CW/TPR), carbón activado/polidimetilsiloxano (CA/PDMS), Carboxen (CX), hasta fibras con materiales especializados como fibras de intercambio iónico para remover iones metálicos y proteínas en disoluciones acuosas. La fase estacionaria puede estar químicamente unida a la fibra de sílice fundida, diferentes fases pueden entrecruzarse mediante enlace parcialmente cruzado o enlace altamente cruzado. Las ventajas de estas fases en MEFS son similares a las obtenidas como fases estacionarias en CG.<sup>(38)</sup> La Figura 8 esquematiza las propiedades de polaridad y retención de cada fase.

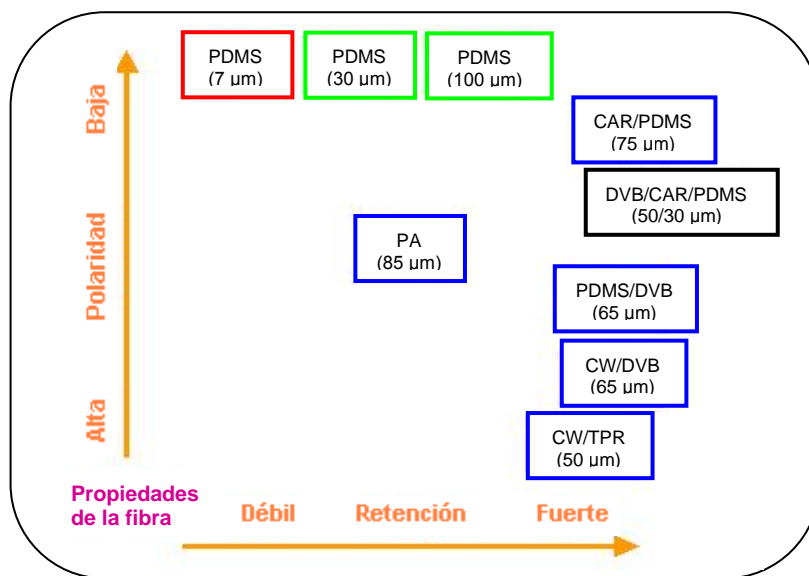
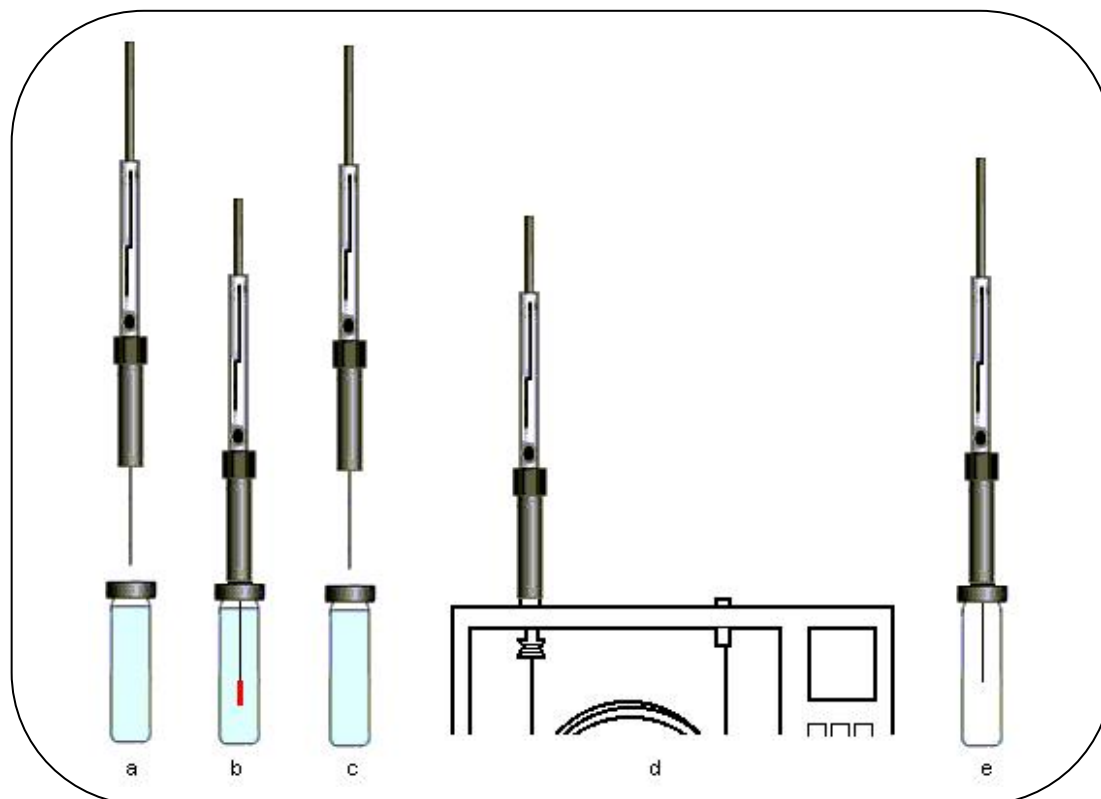


Figura 8. Propiedades de Fibras para MEFS disponibles comercialmente: **enlazadas**, **no enlazadas**, **parcialmente entrecruzadas**, **altamente entrecruzadas**<sup>(39)</sup>

### 2.4.1 Procedimiento

La fibra debe acondicionarse previo al análisis para remover contaminantes que pueden estar adsorbidos e interfieren con los analitos de interés, esto se realiza en el inyector del Cromatógrafo de Gases de acuerdo a las indicaciones del proveedor. La muestra se coloca dentro de un vial el cual se sella con un septum y un tapón de rosca horadado. La aguja que contiene la fibra en su interior se inserta en el septum, el émbolo se baja hasta exponer la fibra con la muestra, entonces se presenta el reparto de los analitos desde la matriz de la muestra hacia la fase estacionaria de la fibra.<sup>(39)</sup> La agitación de la muestra se realiza frecuentemente empleando una pequeña barra magnética o sonicación para incrementar la velocidad de transferencia de analito y evitar bajos coeficientes de difusión. Después de un tiempo adecuado de extracción, la fibra se retrae dentro de la aguja y ésta se remueve del septum e inserta directamente en el inyector de un CG o dentro de la cámara de desorción de la interfase MEFS-CL. La desorción del analito desde la cubierta de la fibra se realiza por calentamiento de ésta en el puerto de inyección del CG o por dilución con disolvente dentro de la cámara de desorción de la interfase MEFS-CL, donde los analitos son transferidos directamente a la columna cromatográfica para su análisis (Figura 9).



**Figura 9.** Procedimiento de MEFS-ED. (a) la fibra acondicionada está lista para la extracción, (b) se introduce en el vial de muestra y se expone la fibra, (c) se retrae la fibra y se retira del vial de extracción, (d) proceso de desorción en el CG, (e) la fibra está lista para realizar un nuevo análisis.

Para el análisis de compuestos volátiles en muestras con matrices complejas, el modo MEFS-Headspace es más adecuado debido a que la fibra no está en contacto directo con la muestra y por lo tanto prolonga su tiempo de vida. En el caso de inmersión de la fibra hay un daño en la fibra y un decremento en la extracción ocasionado por la influencia de adición de sales a saturación, pH de la disolución o la presencia de compuestos en una matriz compleja los cuales interfieren en la extracción de los analitos. Los compuestos de alto peso molecular como las proteínas pueden adsorberse de manera irreversible en la fibra modificando las propiedades de la fase estacionaria disminuyendo su capacidad de extracción y reproducibilidad de resultados.

### 2.4.1.1 Optimización del proceso de MEFS

En MEFS los analitos son extraídos directamente de la muestra hacia la fibra, por este motivo se deben optimizar las condiciones de extracción que aseguren la máxima sensibilidad del analito por la fibra y la eficiencia de la extracción, las cuales se describen a continuación.

#### 2.4.1.1.1 Selección del modo de extracción

La selección del modo de extracción debe hacerse considerando la matriz de la muestra, la volatilidad de los analitos y la afinidad de éstos por la matriz (Tabla 3). La eficiencia en la extracción de cada uno depende de las propiedades de los analitos y la matriz de la muestra.

**Tabla 3.** Criterio de selección de modo de extracción<sup>(38)</sup>

Modo de MEFS	Propiedades del analito	Matrices
Directa	Media o baja volatilidad	Muestras gaseosas, líquidas (preferentemente simples)
Headspace	Alta a media volatilidad	Líquidos (incluyendo mezclas complejas, sólidos)
Protección con membrana	Baja volatilidad	Muestras complejas

Los compuestos no volátiles de la muestra son concentrados y permanecen en la fibra reduciendo su tiempo de vida y la reproducibilidad en la extracción. Por lo tanto la técnica más adecuada de extracción deberá seleccionarse considerando la naturaleza de la matriz en la muestra. MEFS-Extracción Directa es más sensible que MEFS-Headspace para analitos presentes predominantemente en un líquido sin embargo, MEFS-Headspace exhibe menor ruido de fondo que MEFS-Extracción Directa y es adecuada para la extracción de

analitos más volátiles en la mayoría de las muestras sólidas, líquidas y gaseosas. La técnica de MEFS en combinación con CG-EM es inadecuada para la extracción de compuestos menos volátiles o térmicamente lábiles, sin embargo, MEFS combinada con CL resulta más adecuada para estos compuestos.<sup>(39)</sup>

#### 2.4.1.1.2 Selección de la fibra

La afinidad del analito por la fibra depende de las interacciones moleculares entre el analito y las distintas fases estacionarias que recubren las fibras, por tener diferentes propiedades y espesores, se seleccionan de acuerdo a los diferentes compuestos que se desean extraer. Polidimetilsiloxano (PDMS) se prefiere para la extracción de analitos no polares, sin embargo, se puede aplicar a compuestos más polares si se optimizan las condiciones de extracción, además esta fibra es capaz de resistir altas temperaturas en el inyector, por arriba de 300 °C. En general, los compuestos volátiles requieren una cubierta de polímero gruesa, mientras que una cubierta delgada es efectiva para compuestos semivolátiles. Por otro lado, fibras cubiertas con películas más gruesas requieren mayor tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción, pero proveen mayor sensibilidad debido a la mayor masa de analitos que se pueden extraer. Una fibra polar como la de Poliacrilato (PA), es adecuada para la extracción de analitos más polares como fenoles y alcoholes. Fibras con fases estacionarias mixtas que contienen copolímeros de Divinilbenceno (DVB), resina templada (TPR), o Carboxen (CAR: soporte poroso de carbón activado), incrementan la capacidad de retención debido al efecto potencial de adsorción y distribución hacia la fase estacionaria. PDMS/DVB, CAR/DVB, Carbowax y CW/TPR pueden emplearse para la extracción de analitos polares de bajo peso molecular. La fibra CAR/PDMS muestra mejor eficiencia de extracción que una fibra PDMS de 100 µm de espesor, pero su reproducibilidad es más pobre y consume mayor tiempo para alcanzar el equilibrio.<sup>(39)</sup>

#### 2.4.1.1.3 Selección de la técnica de agitación

La agitación se utiliza ampliamente porque acelera la transferencia de analitos desde la matriz de la muestra hacia la cubierta de la fibra; ésta determina el tiempo de equilibrio en matrices acuosas debido a que el tiempo de equilibrio progresivamente decrece con el incremento en la velocidad de agitación, debe evitarse una agitación incontrolable ya que podría causar baja reproducibilidad en este tiempo de equilibrio. Existen diferentes tipos de agitación como sonicador, movimiento de la fibra, etc., siendo la más común la agitación magnética.<sup>(38)</sup>

#### 2.4.1.1.4 Optimización del tiempo de extracción

En MEFS la cantidad de analitos extraídos en la fibra depende no sólo de la polaridad y espesor de la fase estacionaria, sino también del tiempo de extracción y la concentración de analitos en la muestra. La extracción se mejora por agitación de la muestra, adición de sal, cambio del pH y variación de la temperatura. El tiempo de extracción está principalmente determinado por la velocidad de agitación y el coeficiente de partición del analito entre la cubierta de la fibra y la matriz de la muestra. Aunque, la MEFS tiene una mayor sensibilidad en el punto de equilibrio, el equilibrio total no es necesario para un análisis preciso y exacto por MEFS, debido a la relación lineal entre la cantidad de analito adsorbido por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra en condiciones de no equilibrio. En tales casos, el tiempo de extracción y las condiciones de transferencia de masa deben combinarse y controlarse cuidadosamente.

Para un análisis con mayor exactitud y precisión, se requiere un tiempo de extracción constante, así como el empleo del mismo tamaño de vial y volumen de la muestra durante todo el análisis.<sup>(38)</sup>

#### 2.4.1.1.5 Determinación de la temperatura de extracción

Para incrementar la extracción de los analitos en MEFS, usualmente se realiza un proceso de calentamiento de muestra. El aumento en la temperatura de extracción causa un incremento en la velocidad de extracción y simultáneamente un efecto sobre la constante de distribución que depende del analito y del intervalo de temperatura de trabajo. Una adecuada temperatura provee mayor sensibilidad y velocidad de extracción de los analitos.<sup>(38)</sup>

#### 2.4.1.1.6 Optimización de pH

El pH de la muestra afecta el equilibrio de disociación de los analitos en medio acuoso, por lo que el ajuste del pH puede mejorar la sensibilidad para los analitos con propiedades ácido-base. Se debe incrementar o disminuir el pH de tal forma que se incremente la concentración de las especies neutras en la muestra para que se incremente la cantidad de analito extraído. Para la completa conversión de las especies ácidas a su forma neutra, el pH debe estar en al menos dos unidades debajo del pKa para determinado analito. Para los analitos básicos, el pH debe ser mayor que  $pK_a+2$ . La optimización del pH debe incluir la adición de disolución buffer.



Es difícil implementar el cambio de pH en MEFS-ED porque el contacto de la fibra con disoluciones con altos o bajos valores de pH pueden dañarla, la MEFS-Headspace es la mejor opción cuando se modifica el pH de la muestra.<sup>(38)</sup>

#### **2.4.1.1.7 Efecto de la adición de sal**

La eficiencia de la extracción también se mejora por la adición de sales solubles a la muestra, generalmente se emplea cloruro de sodio, carbonato de sodio, carbonato de potasio y sulfato de amonio. La adición de sales propicia la extracción de analitos sobre la fibra debido al efecto salino (“salting-out”) el cual produce un cambio en la fuerza iónica de la disolución favoreciendo la extracción de los compuestos volátiles. La adición de sales se prefiere en el modo MEFS-Headspace para evitar daño de la fibra, ya que si se emplea por inmersión en la disolución de la muestra o la fibra tiene contacto con disoluciones de pH muy alto o muy bajo, ésta se daña.

#### **2.4.1.1.8 Optimización de la Desorción**

La desorción térmica eficiente de un analito en el puerto de inyección de un CG depende de su volatilidad, del espesor de la cubierta de la fibra, de la profundidad de la inyección, de la temperatura del inyector y tiempo de exposición. Se requiere un inyector de CG con un inserto de calibre angosto para asegurar alto flujo lineal y exponer la fibra inmediatamente después de que la aguja se introduzca dentro del inserto. La profundidad de exposición de la aguja deberá ajustarse para colocar la fibra en el centro de la zona caliente del inyector. Los inyectores split/splitless deben operarse en el modo splitless. Generalmente la temperatura óptima de desorción es aproximadamente igual al punto de ebullición del analito menos volátil. El tiempo de desorción depende de la temperatura del inyector y de la velocidad de flujo lineal alrededor de la fibra.<sup>(38,39)</sup>

#### **2.4.2 Aplicación de MEFS en alimentos y bebidas**

La combinación de MEFS-Headspace y CG o CG-EM ha sido utilizada ampliamente en el análisis de varios alimentos ya que el aroma y sabor son uno de los criterios de calidad más importantes en productos frescos y procesados, la información cualitativa y cuantitativa es deseada en la caracterización de estos productos. Los compuestos que producen el sabor y el aroma se encuentran en extremadamente bajas concentraciones en matrices alimenticias muy complejas y consisten de un grupo muy amplio de compuestos orgánicos de diferentes polaridades y reactividades; afortunadamente estos compuestos son volátiles característica

que se ha utilizado para aislarlos de los alimentos. La MEFS-Headspace se ha empleado en la determinación de compuestos volátiles en frutas y vegetales como manzanas, fresas, cebollas, tomates y chiles. También en el análisis del perfil de compuestos que caracterizan el olor en jugos, refrescos de cola y en bebidas alcohólicas.<sup>(39-45)</sup>

La MEFS-Extracción Directa es usada en la determinación de los componentes del sabor y aroma en frutas y es más efectiva para la extracción de compuestos volátiles en agua que el modo MEFS-Headspace. La sensibilidad de MEFS-Extracción Directa es comparable o superior que las extracciones convencionales con disolventes en la extracción de ésteres, terpenoides y lactosas en jugos de frutas y bebidas.

La preparación y análisis de muestras por Microextracción en Fase Sólida Extracción Directa-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-ED-CG-EM) se han aplicado en la determinación de cafeína y compuestos de sabor y fragancia en varios tipos de bebidas que incluyen jugos, bebidas de cola, café, té y brandy así como para determinar el bouquet del vino. De igual forma se ha aplicado para monitorear mentol en algunos ingredientes en alimentos como papas fritas, café, bebidas de cola, enlatados, goma de mascar y en la determinación de residuos de plaguicidas, herbicidas, insecticidas organofosforados y otros agroquímicos en vino, plantas, jugos y bebidas de fruta, al ser estos químicos ampliamente usados en el mundo con fines agrícolas o no agrícolas; el riesgo a la salud está relacionado con su uso y sus residuos en alimentos impactan en la vida de las personas alrededor del mundo.<sup>(38,39)</sup>

## 2.5 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

La técnica analítica acoplada Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) es la más ampliamente usada para el análisis de mezclas complejas. El poder de esta metodología reside en la unión de dos poderosas técnicas dentro de un sistema acoplado, donde la Cromatografía de Gases (CG) se emplea para separar los componentes de una mezcla basada en sus diferentes afinidades por la fase estacionaria en la columna y la Espectrometría de Masas (EM) se emplea no sólo para detectar y cuantificar las diferentes especies que eluyen de la columna sino que además provee información definitiva sobre su identidad.

La Cromatografía de Gases está limitada a muestras volátiles y no es adecuada para muestras termolábiles, es decir, deben ser térmicamente estables, con peso molecular relativamente bajo o deben ser derivatizables. Usualmente emplea espectrometría de masas para la confirmación de la identidad del pico cromatográfico, ya que una de las desventajas de la Cromatografía de Gases, como en toda la Cromatografía en general, es que no se puede confirmar la identidad o estructura de las señales cromatográficas. Los tiempos de retención de los analitos están relacionados con el coeficiente de partición, este tiempo es característico pero no es único o específico de cada compuesto. Por lo tanto, los datos del cromatógrafo de gases por sí solos no se pueden emplear para identificar a los compuestos.<sup>(46)</sup>

El equipo más simple de CG-EM emplea un cromatógrafo de gases con un inyector split/splitless, una columna capilar, una cámara de ionización y un analizador de masas, el analizador cuadrupolar o ion cuadrupolares, es el más simple y común. Se requiere un alto grado de automatización y un sistema de control de los datos que pueden generarse (tiempo, relación masa/carga e intensidad). La muestra, conteniendo los analitos de interés, se introduce en el inyector del cromatógrafo de gases para su análisis por CG-EM. El efluente que sale de la columna del CG es ionizado y fragmentado por un bombardeo de electrones en la cámara de ionización, los iones son acelerados y dirigidos hacia el analizador de masas, entonces el analizador selectivamente permite a los fragmentos de una cierta relación masa/carga ( $m/z$ ) ser separados. El proceso de análisis involucra una fuente de generación de iones, un analizador o separador másico, un detector y un registrador que permita tener en forma permanente las señales generadas.<sup>(47)</sup>

Esta técnica es muy sensible ya que alcanza límites de detección del orden de picogramos, puede ser altamente selectiva y adecuada por la flexibilidad con respecto al tipo y calidad de los datos del espectro de masas, el analista puede escoger entre diferentes tipos de ionización existentes y modos de análisis (barrido total de iones (SCAN, por su nombre en inglés) y monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés)), el control del intervalo y resolución de masas, así como otros parámetros experimentales. La selectividad y sensibilidad se pueden mejorar a través del uso de técnicas de ionización química selectiva y/o técnicas de monitoreo selectivo de iones (SIM).<sup>(48)</sup>

El espectro de masas obtenido es característico del analito, es decir es único. El perfil de iones en un espectro de masas resulta de la fragmentación de una molécula la cual la caracteriza y la diferencia de otras moléculas y de otros grupos de compuestos. Sin embargo, cada familia de compuestos exhibe algunos patrones de fragmentación característicos en sus espectros de masas, esta información es útil en la propuesta de su identidad. Dentro de los constituyentes del aroma y sabor se encuentran aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos, ácidos grasos, aminas, amidas y hasta compuestos heterocíclicos los cuales exhiben sus propios patrones de fragmentación característicos.<sup>(49)</sup>

La identificación de los compuestos individuales es usualmente alcanzada a través de la comparación de un tiempo de retención relacionado con un estándar conocido y un espectro de masas obtenido experimentalmente por el mismo tipo de ionización, generalmente electroionización, comparado contra el espectro de masas de la base de datos del NIST (National Institute of Standard and Technology). La cuantificación es usualmente obtenida relacionando la respuesta del ión seleccionado de la muestra con aquella de un estándar de concentración conocida. Sus aplicaciones primarias incluyen el análisis de drogas, explosivos, productos del petróleo y contaminantes en aire, agua y suelos; su empleo abarca diversas áreas como química clínica, ciencia ambiental, análisis de alimentos y bebidas, ciencia forense y monitoreo industrial de proceso. La técnica se considera madura, robusta y adecuada para una amplia variedad de aplicaciones.<sup>(46)</sup>

La selectividad en el análisis por CG-EM es sobresaliente ya que provee evidencia concluyente para la presencia de un compuesto debido a la combinación de la información proporcionada por el cromatógrafo de gases y la información estructural proveniente del espectrómetro de masas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

- Desarrollar y optimizar un procedimiento para la cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina en chiles por Microextracción en Fase Sólida Extracción Directa acoplada a Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-ED-CG-EM).

#### **3.2 Objetivo Particular**

- Aplicar la técnica desarrollada para cuantificar el contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina en chiles y salsas.

## **4. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina**

La concentración de capsaicinoides en los chiles es muy variable de acuerdo a cada variedad de chile analizado; debido a esta característica fue necesario realizar una extracción y concentración de los analitos antes del análisis cromatográfico. Para su extracción y concentración se utilizó Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa (MEFS-ED) empleando agua caliente como disolvente; cabe indicar que este disolvente no ha sido reportado. De los 8 capsaicinoides identificados en chiles en trabajos previos se cuantificaron capsaicina y dehidrocapsaicina por ser los dos compuestos mayoritarios, utilizando curvas de calibración.

Los materiales, equipo, reactivos y el desarrollo experimental del presente trabajo se detallan a continuación.

#### **4.1.1 Materiales y Equipo**

- Agitadores magnéticos de 5 mm x 3 mm y 10 mm x 3 mm
- Balanza Analítica Mettler, modelo H54AR
- Jarra de carburo de tungsteno con balines y Molino de Balines Spex Industries, modelo 545
- Jeringas Hamilton de vidrio de 5,10, 20, 50, y 100  $\mu$ L
- Dispositivo para Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa desarrollado en el laboratorio
- Fibras: Polidimetilsiloxano (PDMS, 100  $\mu$ m) y Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS/DVB, 65  $\mu$ m) y soporte de la fibra para inyección manual (Supelco, Bellafonte, P.A., USA). Las fibras fueron acondicionadas de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Tabla 4)
- Material de vidrio Pyrex: matraces aforados de 1, 2, 5,10 y 25 mL y pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL Tipo A, probeta de 50 mL, vasos de precipitado de 10, 50 y 100 mL. Equipo de extracción Soxhlet. Viales de vidrio (11 mL de capacidad) con tapón horadado de polipropileno y septa de teflón (politetrafluoretileno).
- Papel filtro Whatman No. 4 (cat. No. 1004125)
- Parrilla con agitador magnético Cole-Parmer, modelo 04644-Series

**Tabla 4.** Características de las fibras utilizadas

Fibra	Espesor de la película ( $\mu\text{m}$ )	Temperatura de acondicionamiento ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo de acondicionamiento (hr)	pH óptimo de trabajo
PDMS/DVB	65	260	0.5	2-10
PDMS	100	250	1.0	2-11

#### **4.1.2 Reactivos**

Alcohol etílico absoluto anhidro (99.9% de pureza), Diclorometano (99.8% pureza) (J.T. Baker, México) y agua destilada.

#### **4.1.3 Estándares**

Estándares de capsaicina (pureza >97%) y dehidrocapsaicina (pureza aprox. 90%) (Fluka BioChemika, Sigma-Aldrich Suiza).

Las disoluciones estándar de cada compuesto se prepararon por separado pesando aproximadamente 5 mg de cada compuesto, se disolvieron y llevaron al aforo de 10 mL con etanol obteniendo disoluciones concentradas de aproximadamente 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se almacenaron a 4  $^{\circ}\text{C}$ , en viales de vidrio con tapón de rosca y septa sellados con teflón para su uso posterior.

#### **4.1.4 Muestras**

Se analizaron 15 muestras; 2 variedades de chiles frescos, 9 de chiles secos y 4 tipos diferentes de salsas, las características y lugar de adquisición se enlistan en la Tabla 5.

Los chiles frescos fueron liofilizados para eliminar la humedad y trabajar muestras secas. Los chiles fueron molidos y homogeneizados hasta obtener un polvo fino.

##### **4.1.4.1 Acondicionamiento de las muestras**

Los chiles secos se limpiaron, se les retiraron las semillas, los cabos y se trocearon. Se llenó la jarra de carburo de tungsteno a la mitad y ésta se introdujo en el molino de balines. Los chiles se molieron durante 10 min, excepto el chile Cascabel debido a la dureza del pericarpio fue necesario molerlo durante 20 min.

Los chiles frescos se limpiaron, se les retiraron las semillas, los cabos y se picaron. Se determinó el peso de la muestra, se adicionó nitrógeno líquido y se liofilizaron durante 12

hrs, después de este periodo de tiempo se determinó el peso de la muestra liofilizada y por diferencia de peso se calculó el contenido de humedad y se molieron bajo las mismas condiciones que los chiles secos.

Para el análisis de las salsas, éstas se colocaron en un vaso de precipitado de 1 L, se colocó un agitador magnético (0.5 cm x 2.5 cm) y se dejó en agitación durante 20 min a 1200 rpm, después de este tiempo se tomó la muestra para ser analizada.

De la salsa verde Del Monte se separaron los sólidos suspendidos y sólo se analizó el líquido.

**Tabla 5.** Muestras analizadas, características y lugar de adquisición

Muestra	Tipo de chile	Lugar de Compra	Marca	Presentación
Chile Árbol de Yahualica	Seco	Superama	Valle verde	250 g
Chile Canica	Seco	Central de Abasto	Granel	Granel
Chile Cascabel	Seco	Central de Abasto	Granel	Granel
Chile Chilpaya	Seco	Veracruz	Granel	Granel
Chile Chipotle Meco	Seco	Central de Abasto	Granel	Granel
Chile Costeño	Seco	Oaxaca	Granel	Granel
Chile Guajillo Puya	Seco	Central de Abasto	Granel	Granel
Chile Habanero	Fresco	Gigante	Granel	Granel
Chile Jalapeño	Fresco	Gigante	Granel	Granel
Chile Pico de Pájaro	Seco	Merced	Granel	Granel
Chile Piquín	Seco	Central de Abasto	Granel	Granel
Salsa Mexicana	--	Gigante	Del Monte	210 g
Salsa Roja Habanero	--	Gigante	Gigante	140 mL
Salsa Tajín	--	Gigante	Tajín	170 mL
Salsa Valentina	--	Gigante	Tamazula	370 mL

#### **4.1.4.2 Cantidad de muestra analizada**

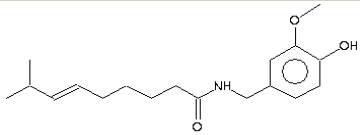
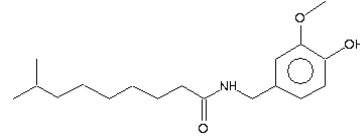
Debido a la diferencia del contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina en las muestras, se analizaron diferentes cantidades de cada una para determinar la cantidad adecuada para el análisis cuantitativo. Se eligió trabajar con la menor cantidad de muestra porque al trabajar cantidades de muestra grandes (200 mg para los chiles) el material insoluble de la muestra impedía la extracción y libre difusión de los analitos hacia la fibra en el volumen de disolvente utilizado.



#### 4.1.5 Capsaicinoides analizados

La estructura de los capsaicinoides estudiados así como el peso molecular de cada compuesto se presenta en la Tabla 6. Las características químicas de los compuestos cuantificados se detallan en el Anexo 8.1.

**Tabla 6.** Capsaicinoides analizados

Capsaicinoide	Estructura Química	Peso Molecular (uma)
Capsaicina (C)		305.42
Dehidrocapsaicina (DHC)		307.43

#### 4.2 Análisis Cromatográfico

##### 4.2.1 Condiciones Cromatográficas

Se utilizó un Cromatógrafo de Gases (6890N Agilent Technologies) acoplado a un Detector Selectivo de Masas (5973 Agilent Technologies) con inyector split/splitless y columna capilar de sílice fundida ZB-5 (5% difenil 95% polidimetilsiloxano) de 30 m de longitud x 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno x 0.25  $\mu\text{m}$  grosor de película (Zebron Phenomenex, USA).

Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 260 °C modo "splitless" (3 min). La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230 °C y la temperatura del analizador (cuadrupolar) de 150 °C. Los análisis se realizaron por impacto electrónico a 70 eV; se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN, por su nombre en inglés) de 50 a 550 m/z para la identificación de iones para la cuantificación.

Programa de Temperatura: Temperatura inicial 40 °C isotérmicamente durante 1 min, rampa de 10 °C/min hasta 300 °C manteniendo esta temperatura durante 5 min.

##### 4.2.2 Identificación de capsaicinoides

Para la identificación de los capsaicinoides en las muestras analizadas, se compararon los tiempos de retención y los espectros de masas obtenidos con los estándares, así

como con los espectros de masas de la base de datos de la Biblioteca de Espectros de Masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library versión 2.0 build 19 Nov. 2000).

#### **4.2.3 Cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina**

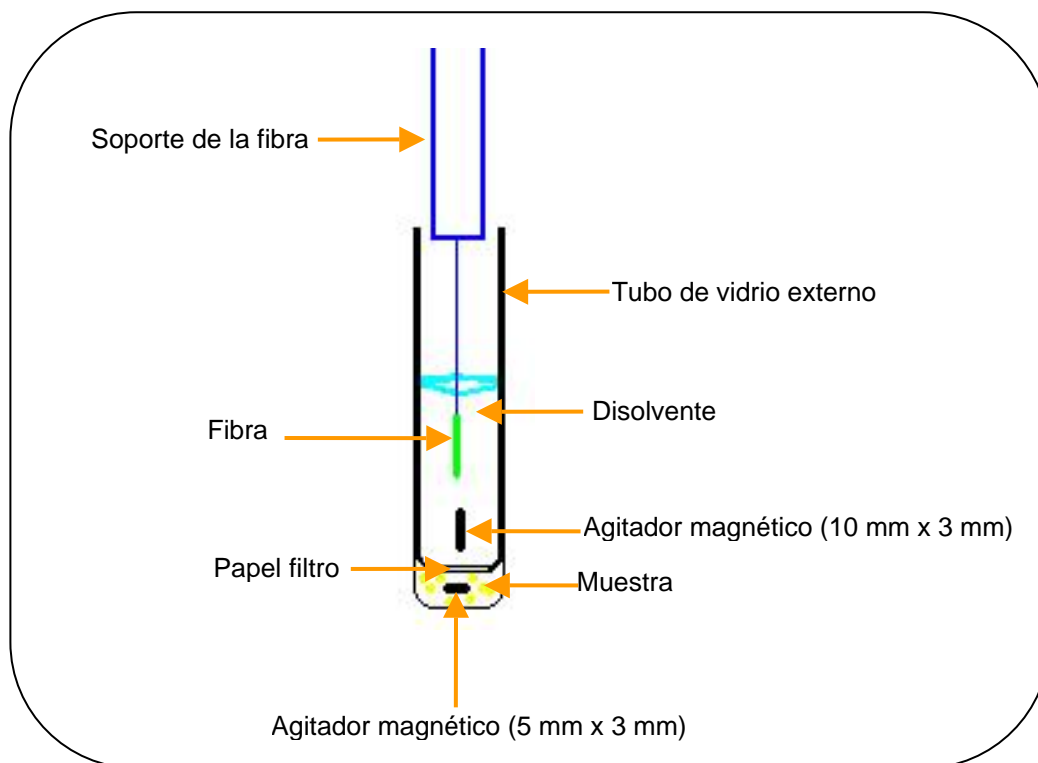
La cuantificación se realizó con base en el área del pico cromatográfico de cada compuesto utilizando curvas de calibración absolutas (Anexo 8.2).

#### **4.3 Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa (MEFS-ED)**

Para realizar la Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa (MEFS-ED) se desarrolló un dispositivo de extracción de los analitos el cual no permite el contacto de la matriz con la superficie de la fibra evitando su deterioro. En la actualidad existe un dispositivo para realizar éste modo de microextracción ya patentado,<sup>(50)</sup> pero no existe comercialmente un dispositivo de esta naturaleza; el dispositivo desarrollado no tiene relación alguna con el ya existente.

##### **4.3.1 Dispositivo para Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa (MEFS-ED)**

El dispositivo consta de tres tubos de vidrio de diferentes diámetros internos (d.i.) y alturas. El tubo externo (7 cm x 1.8 cm d.i.), que contiene la muestra a analizar, el disolvente y un agitador magnético (5 mm x 3 mm). Los tubos internos con la base perforada (6.5 x 1.5 cm d.i. y 6.7 x 1.3 cm d.i.), se colocan uno dentro del otro; entre la base de estos dos tubos se coloca papel filtro. Estos tubos se introducen en el tubo externo realizando la función de un émbolo con base perforada que permite que la disolución entre en el tubo interno y la muestra se mantenga solo en el tubo externo por el uso de papel filtro que sirve como membrana que permite la libre difusión de la disolución extractante hacia la fibra y no permite el paso de la materia insoluble. Se coloca en el tubo interno un agitador magnético (10 mm x 3 mm) para asegurar la perfecta agitación y mejorar la difusión hacia la fibra (Figura 10).



**Figura 10.** Dispositivo de MEFS-ED desarrollado para el análisis de muestras

#### 4.3.2 Selección de parámetros para MEFS-ED

La cantidad de analitos que pueden ser extraídos por MEFS-ED está determinada por la constante de equilibrio del analito entre la fase acuosa y la muestra y por el coeficiente de partición del analito entre la fase acuosa y la fase polimérica de la fibra. Para optimizar la adsorción de los analitos sobre la fibra (colocada en inmersión directa en la muestra) y las condiciones de extracción, es necesario considerar diversos factores que influyen en estos equilibrios como son tipo de fibra, pH, temperatura de extracción, agitación del sistema y tiempo de extracción, para optimizar cada uno de los parámetros de MEFS-ED se utilizó en cada análisis 8 mg de chile Habanero liofilizado. La selección de parámetros para MEFS-ED se describe en el Diagrama 1.

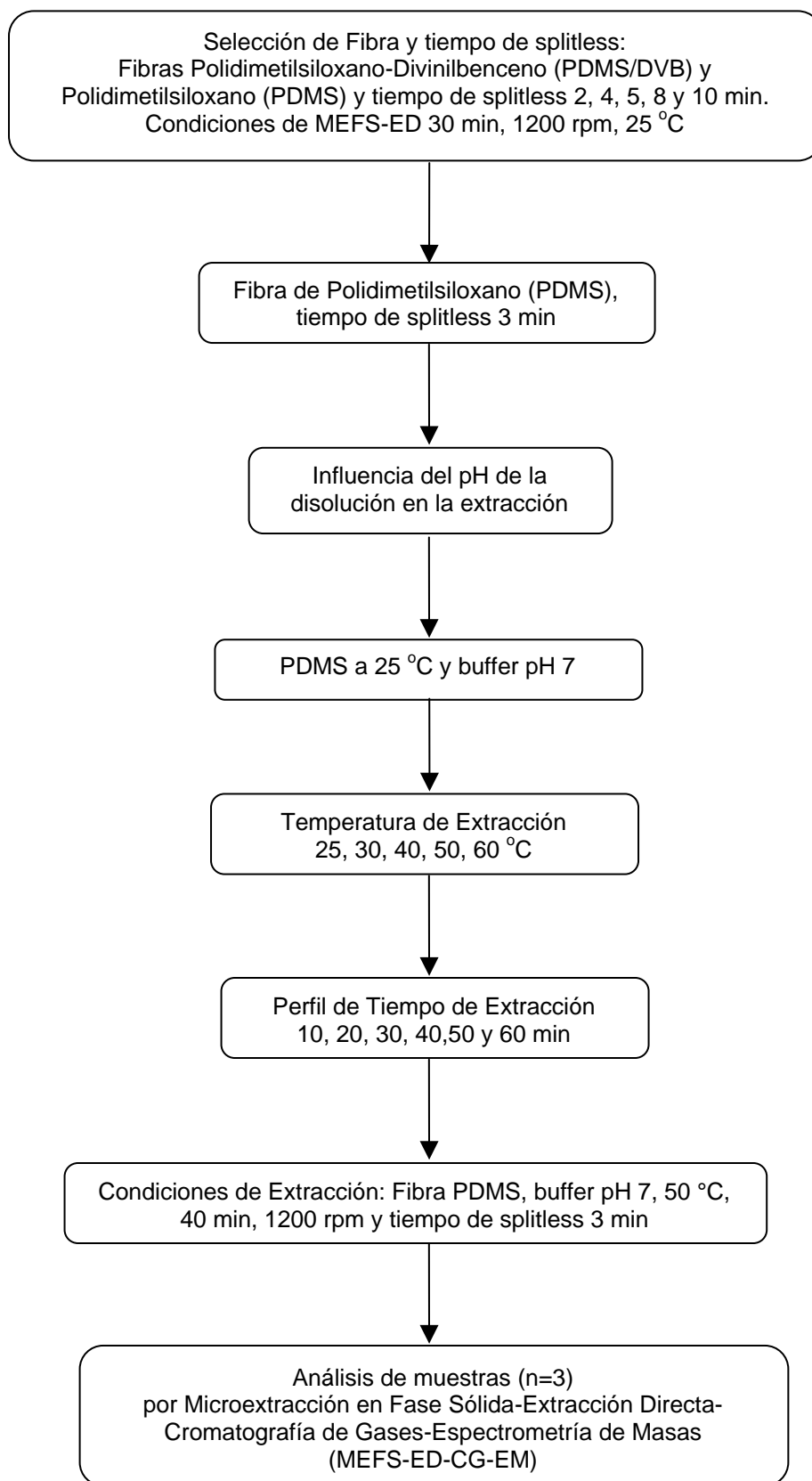


Diagrama 1. Selección de parámetros de MEFS-ED

#### 4.3.2.1 Selección de Fibra y tiempo de splitless

En este trabajo se evaluaron 2 fibras de diferente polaridad: Polidimetilsiloxano (PDMS) y Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS/DVB) utilizando una muestra liofilizada de Chile Habanero como referencia. Cada una de las fibras se acondicionó de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Tabla 4) y se realizó un blanco de extracción de acuerdo a las condiciones establecidas en el inciso 4.2.1. La evaluación de ambas fibras se realizó a 25 °C y la extracción se realizó transfiriendo 8 mg de muestra al dispositivo de extracción diseñado, se adicionaron 5 mL de agua destilada y se montó el sistema de extracción, se selló con teflón y se dejó equilibrar la muestra durante 5 min en agitación a 1200 rpm. Después de este tiempo se realizó la inmersión de la fibra en la disolución y se realizó la extracción durante 30 min. Posterior a la extracción se retiró la fibra y se desorbió en el inyector del CG-EM con los tiempos de splitless de 2, 4, 5, 8 y 10 min. Después de cada desorción se realizó un segundo análisis cromatográfico para evaluar la cantidad de analito no desorbido.

#### 4.3.2.2 Evaluación del pH de extracción

De acuerdo a los resultados de selección de fibra y tiempo de splitless (inciso 4.3.2.1) se eligió la fibra PDMS y un tiempo de splitless de 3 min para evaluar la influencia del pH de la disolución en la extracción. Los valores de pH evaluados para la extracción fueron 6, 7, 8, 9 y 10 utilizando buffer de fosfatos.

#### 4.3.2.3 Temperatura de extracción

De acuerdo a los resultados obtenidos de la influencia del pH de la disolución en la extracción, se eligió trabajar con disolución buffer de fosfatos a un pH de 7. Las temperaturas evaluadas para la extracción fueron 25, 30, 40, 50, 60 y 70 °C.

#### 4.3.2.4 Perfil de tiempo de extracción

Se determinó el perfil de tiempo de extracción utilizando la fibra PDMS, tiempo de splitless de 3 min y 50 °C. Los tiempos de extracción evaluados fueron: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min.

#### 4.3.3 Procedimiento para la MEFS-ED

El procedimiento seleccionado para realizar la MEFS-ED fue: fibra PDMS, buffer de fosfatos pH 7, agitación a 1200 rpm y extracción a 50 °C durante 40 min.

#### 4.3.3.1 Linealidad

Una vez optimizada la técnica MEFS-ED, se prepararon disoluciones estándar en etanol fortificadas con los 2 capsaicinoides en estudio en concentraciones de 500 µg/mL. Se tomaron diferentes alícuotas y se llevaron al aforo de 5 mL de buffer de fosfatos pH 7, para obtener concentraciones en el intervalo de 0.10 a 1.7 µg/mL se colocaron en el dispositivo de extracción y se procedió a realizar la microextracción de acuerdo a las condiciones y procedimiento descritos en los incisos 4.2.1 y 4.3.3.

#### 4.3.3.2 Precisión

Para calcular la precisión se preparó una disolución de etanol fortificada con los 2 capsaicinoides a una concentración de 500 µg/mL de esta disolución se realizaron 3 extracciones independientes de una concentración aproximada de 0.12 µg/mL y se realizó la MEFS-ED de acuerdo al procedimiento y condiciones descritas en los incisos 4.2.1 y 4.3.3. Cada extracción se analizó en el CG-EM, con los resultados obtenidos se calculó la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación (C.V.).

Se calcularon los límites de detección (LD = 2 D.E.) y cuantificación (LQ = 10 D.E.), empleando la desviación estándar obtenida en el cálculo de la precisión.

#### 4.3.3.3 Recobro

Debido a que no es posible tener una matriz para cada tipo de producto analizado (chiles frescos, chiles secos y salsas) libre de capsaicinoides el recobro de la metodología propuesta se realizó preliminarmente comparando el contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina cuantificado por MEFS-ED con el contenido de ambos capsaicinoides extraídos por método de extracción Soxhlet, este método al ser una extracción exhaustiva consideramos la hipótesis de que al utilizar etanol como disolvente extractante y un tiempo de extracción de 5 hrs se extrajeron el 100% de los capsaicinoides de interés de cada muestra. Se analizaron por este método solo el chile de Árbol y el chile Costeño, cada análisis se realizó por triplicado (Anexo 8.3).

Para la cuantificación de los analitos se realizaron curvas de calibración absolutas de cada capsaicinoide en diclorometano (Anexo 8.4).

#### 4.3.3.4 Análisis de capsaicina (C) y dehidrocapsaicina (DHC) por MEFS-ED-CG-EM en muestras

Se pesó determinada cantidad de chile o producto alimenticio, las cantidades analizadas fueron variables debido a la diferencia de contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina en cada una de ellas, se colocaron en el tubo externo del sistema de extracción, se adicionaron 5 mL de buffer de fosfatos de pH 7 y el agitador magnético (5 mm x 3 mm); se colocaron los dos tubos internos con el papel filtro y el agitador magnético (10 mm x 3 mm), el sistema se selló con teflón y se colocó en una parrilla de calentamiento y agitación manteniendo la muestra a 50 °C (baño María) y agitación de 1200 rpm. La muestra se mantuvo bajo estas condiciones durante 5 min antes de la extracción para establecer el equilibrio muestra-disolución, después se realizó la inmersión de la fibra en la disolución y se extrajo durante 40 min enseguida se retrajo la fibra dentro del dispositivo y se colocó en el inyector del CG-EM durante 3 min para la desorción (Diagrama 2). El análisis cromatográfico se efectuó de acuerdo a las condiciones cromatográficas descritas en el inciso 4.2.1. El análisis de las muestras se realizó por triplicado.

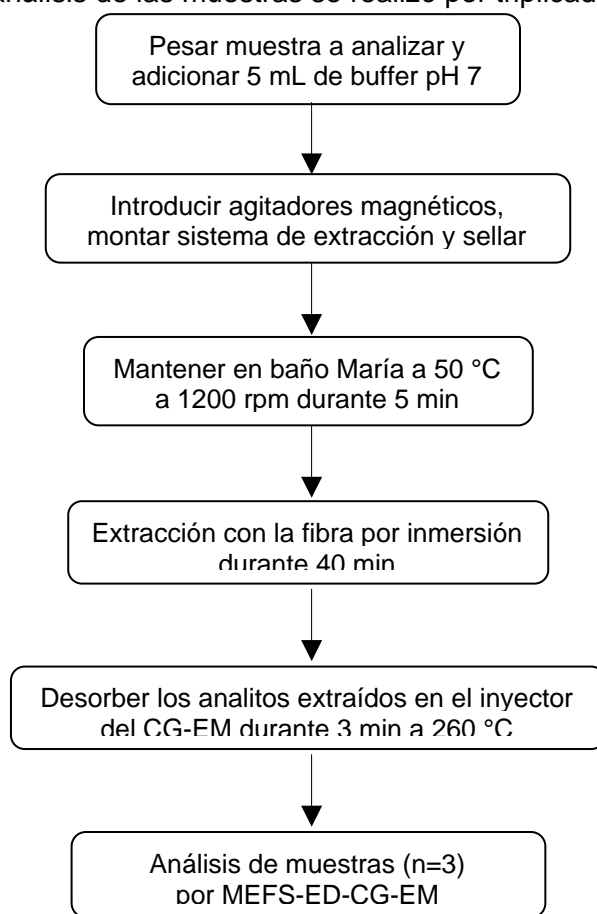


Diagrama 2. Proceso de análisis de muestras por MEFS-ED-CG-EM. Condiciones óptimas establecidas en el inciso 4.3.3

## **5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**

### **5.1 Resultados y Análisis de Resultados por MEFS-ED-CG-EM**

#### **5.1.2 Selección de parámetros para MEFS-ED-CG-EM**

Se decidió trabajar utilizando agua por ser considerado un disolvente adecuado para realizar la MEFS-ED y evitar el deterioro de la fibra, además los analitos a cuantificar son parcialmente solubles en agua caliente.

Para la optimización de las condiciones de Microextracción así como para el análisis cuantitativo se probaron tiempos de equilibrio entre la muestra y la disolución de 5 min hasta 30 min, se observó que el tiempo de equilibrio no modifica la cantidad de analitos extraídos y en tiempos de equilibrio cortos se tenía un mejor control de todas las condiciones experimentales y un tiempo de análisis mas corto.

##### **5.1.2.1 Selección de Fibra y tiempo de splitless**

Se han reportado diferentes trabajos utilizando fibras de DVB/Carboxen/PDMS y PDMS para el análisis de compuestos volátiles en chiles,<sup>(40)</sup> sin embargo, no se han reportado estudios de la extracción de compuestos semivolátiles en estos productos, aunque se han realizado análisis de capsaicina y dehidrocapsaicina por microextracción en modo de extracción directa en telas con aplicaciones en química forense utilizando fibras de PDMS, PDMS/DVB, CAR/PDMS, CW/DVB, DVB/CAR/PDMS, pero no en productos alimenticios.<sup>(9)</sup>

Se eligió trabajar con dos fibras PDMS y PDMS/DVB de diferente polaridad y comparar la capacidad de extracción de los analitos en cada una de ellas.

Las Figuras 11 y 12 muestran el perfil de extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina de cada fibra en función del tiempo de splitless del primer análisis cromatográfico realizado.



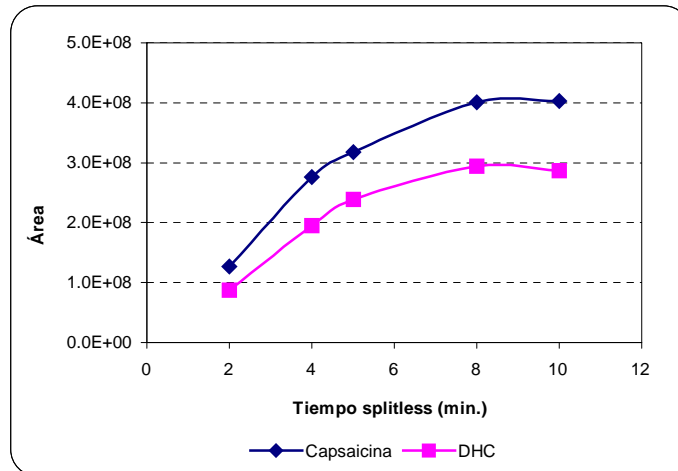


Figura 11. Extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina con fibra PDMS/DVB a 25 °C. Muestra Chile Habanero liofilizado

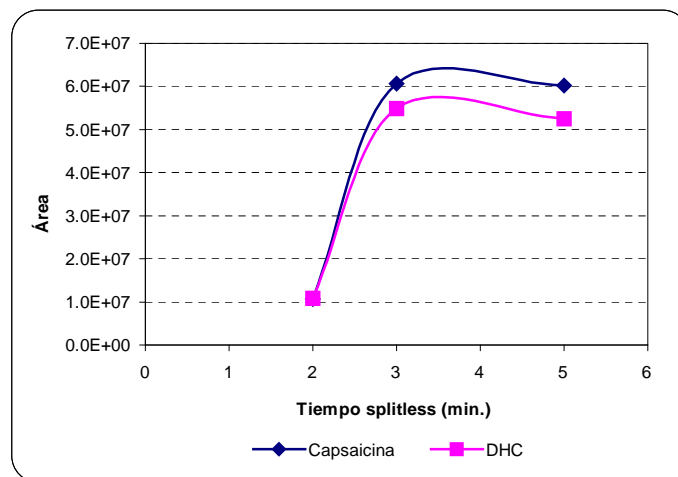
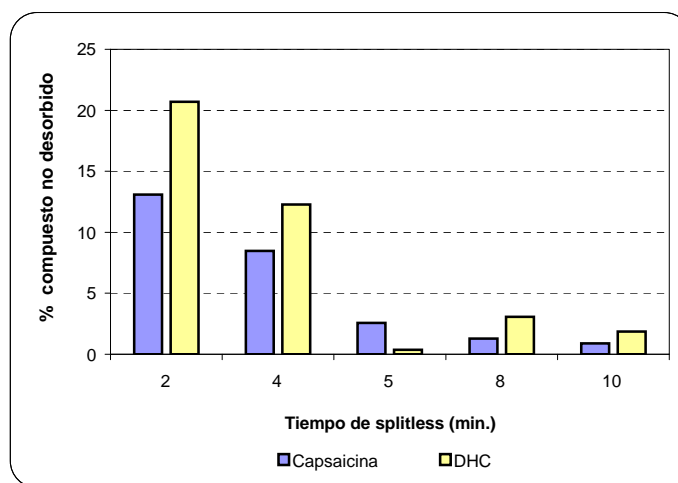


Figura 12. Extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina con fibra PDMS a 25 °C. Muestra Chile Habanero liofilizado

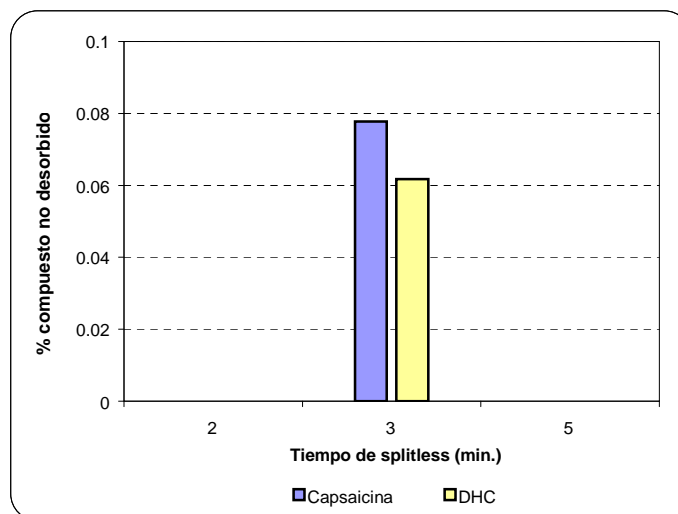
De las Figuras 11 y 12 se observa que el perfil de extracción de los analitos estudiados presenta casi el mismo comportamiento en cada una de las fibras evaluadas. Si se compara la extracción de los capsaicinoides se observa que la fibra de PDMS/DVB extrajo una mayor cantidad de cada compuesto probablemente debido a la polaridad de la fibra, a la estructura química de los analitos y grupos funcionales polares que posee en el anillo aromático, que para ambos compuestos es similar, y longitud de cadena de hidrocarburos lo que les confiere una mayor afinidad hacia la fibra, además que las fibras duales como PDMS/DVB incrementan la capacidad de extracción de los analitos sobre la fibra debido al efecto sinérgico de adsorción y distribución dentro de la fase estacionaria, obteniendo mayor sensibilidad que el empleo de la fibra de PDMS.

Al utilizar la fibra PDMS/DVB (Figura 11) e incrementar el tiempo de splitless la cantidad de compuesto desorbido aumenta; en 8 y 10 min la cantidad de analito que se desorbe es la misma. Por otro lado, al utilizar la fibra de PDMS (Figura 12) se observa que la cantidad de compuesto que se desorbe en un tiempo de splitless de 3 y 5 min es la misma. Por esta razón los tiempos de splitless evaluados en el análisis de extracción de los analitos en cada fibra fueron diferentes debido a la cantidad de analito extraído y desorbido en el primer análisis cromatográfico.

En las Figuras 13 y 14 se muestra el porcentaje de analito extraído que fue retenido en cada fibra evaluada después del primer análisis cromatográfico, es decir, la cantidad de compuesto no desorbido en los diferentes tiempos de splitless evaluados.



**Figura 13.** Segunda desorción de la extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina con la fibra PDMS/DVB



**Figura 14.** Segunda desorción de la extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina con la fibra PDMS

De la Figura 13 se observa que la cantidad de analitos retenidos en la fibra PDMS/DVB en la segunda desorción en los diferentes tiempos de splitless esta en el intervalo de 13.08-0.886% para la capsaicina y del 20.7-1.87% para la dehidrocapsaicina del total de los analitos extraídos (Figura 11), lo que indica que en esta fibra los analitos a estudiar se extraen en mayor cantidad pero la cinética de desorción de estos compuestos en la fibra es lenta, sin embargo, para trabajar con esta fibra sería necesario tiempos de desorción mayores a 10 min. La Figura 14 muestra que la cantidad de analito retenido en la fibra PDMS después de la primera desorción en un tiempo de splitless de 3 min, es menor al 0.1 % del total de los analitos extraídos (Figura 12), lo que indica que en este tiempo de splitless los compuestos extraídos son desorbidos de la fibra casi en su totalidad.

Durante el proceso de desorción los analitos se difunden de la fibra hacia el gas acarreador en el inyector del cromatógrafo de gases y deben ser inmediatamente removidos en tiempos de desorción cortos, por esta razón se seleccionó la fibra PDMS y un tiempo de splitless de 3 min aprovechando que no hay problema de detección de los analitos.

### 5.1.2.2 Efecto del pH de la disolución de extracción

De acuerdo a los resultados obtenidos en la selección de fibra (descritos en el inciso 5.1.2.1) se seleccionó la fibra de PDMS y tiempo de splitless de 3 min para evaluar el efecto del pH de la disolución en la extracción.

Las Figuras 15 y 16 muestran el perfil de extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina en función del pH de una disolución estándar y una muestra de chile Habanero respectivamente.

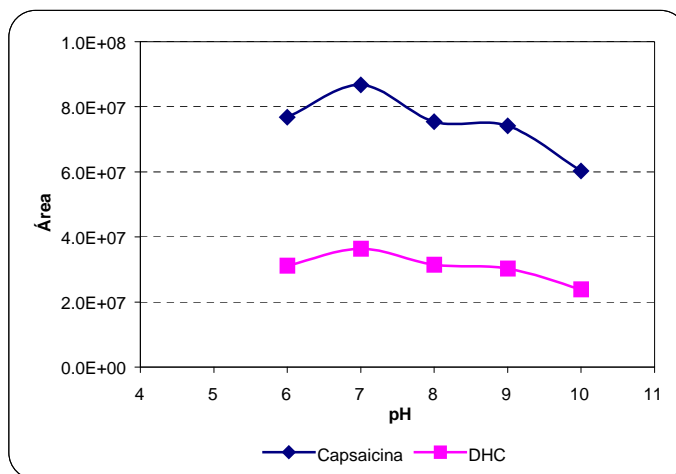
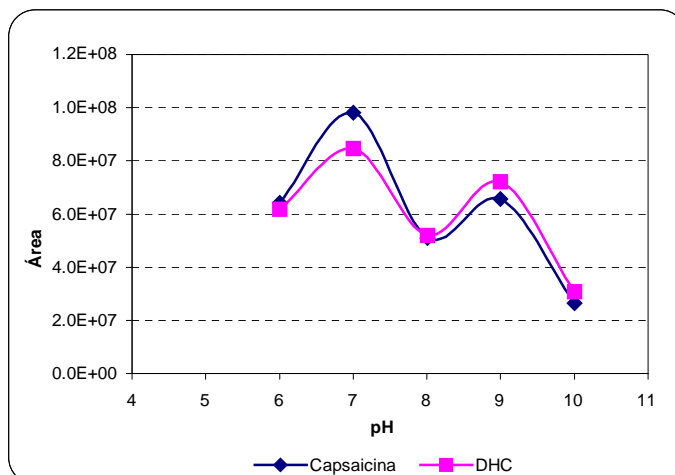


Figura 15. Extracción de la disolución estándar de capsaicina y dehidrocapsaicina en función del pH



**Figura 16.** Extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina de chile Habanero en función del pH

De las Figuras 15 y 16 se observa que la mayor extracción de los compuestos se realiza en un pH neutro, los compuestos a extraer son amidas secundarias, de acuerdo a su estructura son muy estables por el fenómeno de resonancia entre el grupo carbonilo y el nitrógeno vecino por lo que se sugiere que a este pH se tenga una mayor afinidad por la fase orgánica (fibra).

Para explicar el perfil de extracción en función del pH se debe observar que de acuerdo a la estructura de los compuestos a cuantificar estos poseen propiedades ácido-base (Tabla 6). De acuerdo a su estructura estos capsaicinoides poseen tres valores de pKa y de acuerdo al pH de trabajo se modifica la protonación o desprotonación de ciertos grupos funcionales de los analitos. En la Tabla 7 se muestran los valores de pKa y la estructura de la capsaicina en cada uno de los equilibrios ácido-base a diferentes valores de pH, estos valores de pKa fueron calculados teóricamente mediante el programa computacional ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, versión 3, 1997) debido a que en la literatura sólo se encontraban registrados dos valores ( $pK_{a1} -0.66$  y  $pK_2 9.76$ ).

**Tabla 7.** Valores de pKa y equilibrios ácido-base de la capsaicina

pKa	Equilibrios ácido-base
-0.68±0.70	
9.91±0.20	
15.74±0.46	

De acuerdo al intervalo de pH evaluado, a pH menores de 9.9 se tiene la estructura de la capsaicina neutra, a pH mayor la especie predominante es la que presenta desprotonación del fenol, al trabajar a un pH de 10 se tiene aproximadamente un 60% de capsaicina desprotonada la cual es polar y tiene una menor afinidad por la fase orgánica (fibra) lo cual explica que a este pH se tenga la mínima cantidad de analitos extraídos (Figuras 15 y 16).

Los equilibrios ácido base establecidos para la capsaicina de acuerdo a los valores de pKa y los pH evaluados no explican el perfil de extracción de los capsaicinoides en la muestra al observarse dos valores máximos de extracción de los analitos a pH de 7 y 9 (Figura 16).

Al comparar el perfil de la extracción de los estándares y la muestra se observa que en ambos casos el pH de máxima extracción es 7 (pH neutro) sin embargo, el comportamiento de la extracción en pH de 9 es diferente en cada caso. Este perfil de extracción probablemente sea por efecto de la matriz, donde el pH modifica la cantidad de analito extraído de las vesículas y vacuolas de la epidermis de la placenta del chille en donde se

encuentran los capsaicinoides, modificando los equilibrios de difusión matriz-analito, analito-disolución y analito-fibra. Al tener la mayor extracción a un pH de 7 se seleccionó trabajar en disolución buffer a este valor de pH.

Al trabajar MEFS-ED en donde los analitos semivolátiles se extraen directamente de la disolución no fue necesario evaluar la adición de cloruro de sodio para mejorar la eficiencia de la extracción. La fuerza iónica del medio en todas las extracciones fue constante al trabajar con disolución buffer.

### 5.1.2.3 Temperatura de extracción

De acuerdo a los resultados obtenidos de perfil de extracción en función del pH (descritos en el inciso 5.1.2.2) se seleccionó pH 7 para evaluar la temperatura de extracción. La Figura 17 muestra el perfil de extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina en función de la temperatura.

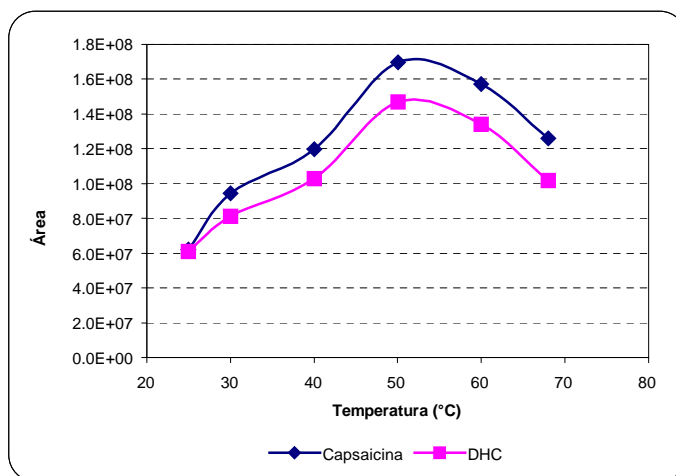


Figura 17. Temperatura de Extracción de capsaicinoides. Muestra chile Habanero liofilizado

En esta gráfica se observa que conforme se incrementó la temperatura de extracción, la recuperación de compuestos semivolátiles aumentó debido a que el calentamiento de la muestra favoreció la extracción de los capsaicinoides de la matriz y favoreció la transferencia de los compuestos hacia la fibra obteniendo un máximo de extracción a 50 °C. A una temperatura mayor la extracción disminuye por efectos de desorción del analito en la fibra. Con base en los resultados obtenidos en la evaluación de la temperatura se eligió realizar la extracción a 50 °C.

### 6.1.2.4 Perfil de Tiempo de Extracción

Se evaluó el perfil de tiempo de extracción con las condiciones establecidas en los incisos anteriores: fibra PDMS y tiempo de splitless de 3 min, buffer pH 7 y temperatura de extracción 50 °C. La Figura 18 muestra la extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina en diferentes tiempos de extracción.

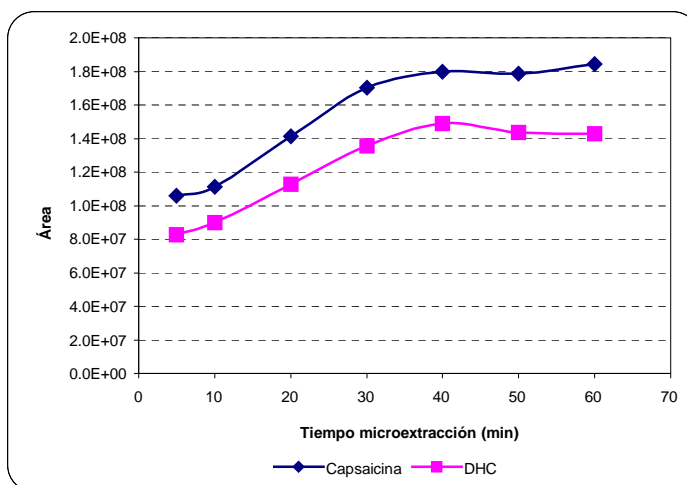


Figura 18. Perfil de Tiempo de Extracción de capsaicinoides. Muestra chile Habanero liofilizado

En la Figura 18 se observa que al incrementar el tiempo de extracción se incrementa la extracción de ambos capsaicinoides. La capsaicina y la dehidrocapsaicina alcanzaron el equilibrio de extracción a los 40 min por lo que se seleccionó este tiempo de análisis.

## 5.2. Linealidad

Una vez seleccionados todos los parámetros para la MEFS-ED se procedió a evaluar la linealidad del método. En la Tabla 8 se observa que la linealidad fue aceptable para los capsaicinoides estudiados en el intervalo de concentración de 0.1 a 1.7 µg/mL con  $r > 0.997$  para ambos compuestos (Anexo inciso 8.2).

Tabla 8. Linealidad del método MEFS-ED-CG-EM

Capsaicinoide	r	Intervalo Lineal (µg/mL)	n
Capsaicina	0.9971	0.109-1.323	5
Dehidrocapsaicina	0.9998	0.107-1.713	5

### 5.3 Precisión

La precisión expresada como coeficiente de variación (C.V.) fue en general < 10% (n=3) para la capsaicina y la dehidrocapsaicina, presentando ésta última el mayor coeficiente de variación como se muestra en la Tabla 9. Estos valores son aceptables en un análisis por MEFS-ED considerando que los analitos se encuentran en diferentes concentraciones a nivel de trazas o en altas concentraciones en las muestras analizadas.

Considerando que la incertidumbre es causada principalmente por la estabilidad de la MEFS-ED, y que esta es independiente de la cantidad de analito, podemos presuponer que la incertidumbre de la medición es constante, y por lo tanto, estimar los límites de detección y cuantificación a partir de la incertidumbre de una disolución estándar cualquiera por lo que se determinó el límite de detección (L.D. = 2 D.E.) y límite de cuantificación (L.Q. = 10 D.E.)<sup>51</sup> para cada uno de los capsaicinoides obteniendo los valores que se reportan en la Tabla 9. Los valores obtenidos de L.Q. para la capsaicina son menores a los valores de concentración obtenidos en las muestras por lo que se pueden cuantificar sin ningún problema. Sin embargo, para la dehidrocapsaicina la concentración obtenida de este compuesto en el chile Cascabel y la salsa Tajín se encuentran por debajo del límite de cuantificación.

**Tabla 9.** Precisión del método MEFS-ED-CG-EM

n = 3	Disolución estándar de Capsaicinoides	D.E.	C.V.	L.D.	L.Q.
Capsaicinoide	µg/mL	µg/mL	%	µg/mL	µg/mL
Capsaicina	0.122	0.0069	4.0	0.0139	0.0697
DHC	0.128	0.011	7.9	0.022	0.108

### 5.4 Recobro

Se determinó el contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina en dos de las muestras analizadas chile Costeño y chile de Árbol, se eligieron estos dos chiles porque son muestras que poseen bajo y alto contenido de capsaicinoides respectivamente y se cuantificaron mediante las curvas de calibración realizadas para el análisis cuantitativo de las muestras por MEFS-ED. El contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina cuantificado por extracción Soxhlet se consideró como el 100% de capsaicinoides en cada chile.



En las Tablas 10 y 11 se muestra la concentración de cada capsaicinoide cuantificado por cada método de extracción utilizado, así como su respectivo recobro.

**Tabla 10.** Concentración de capsaicina (C) en muestras de chiles analizados por los dos métodos de extracción (n=3)

Muestra	Método Soxhlet µg C/g de muestra	MEFS-ED µg C/g de muestra	% Recobro	C.V.
Chile de árbol de Yahuallica	1.65E+03	6.97E+02	42.3	3.0
Chile Costeño	6.84E+02	3.66E+02	53.5	8.6

**Tabla 11.** Concentración de dehidrocapsaicina (DHC) en muestras de chiles analizados por los dos métodos de extracción (n=3)

Muestra	Método Soxhlet µg DHC/g de muestra	MEFS-ED µg DHC/g de muestra	% Recobro	C.V.
Chile de árbol de Yahuallica	1.22E+03	2.12E+02	17.4	2.0
Chile Costeño	5.60E+02	1.28E+02	22.8	9.0

Para la extracción Soxhlet se eligieron el disolvente y el tiempo de extracción tomando como base el Método Oficial de la AOAC 995.03 para la determinación de capsaicinoides en *Capsicums* y sus extractos, que considera estas condiciones de extracción en chiles y oleorresinas para su posterior análisis por Cromatografía de Líquidos.<sup>(37)</sup>

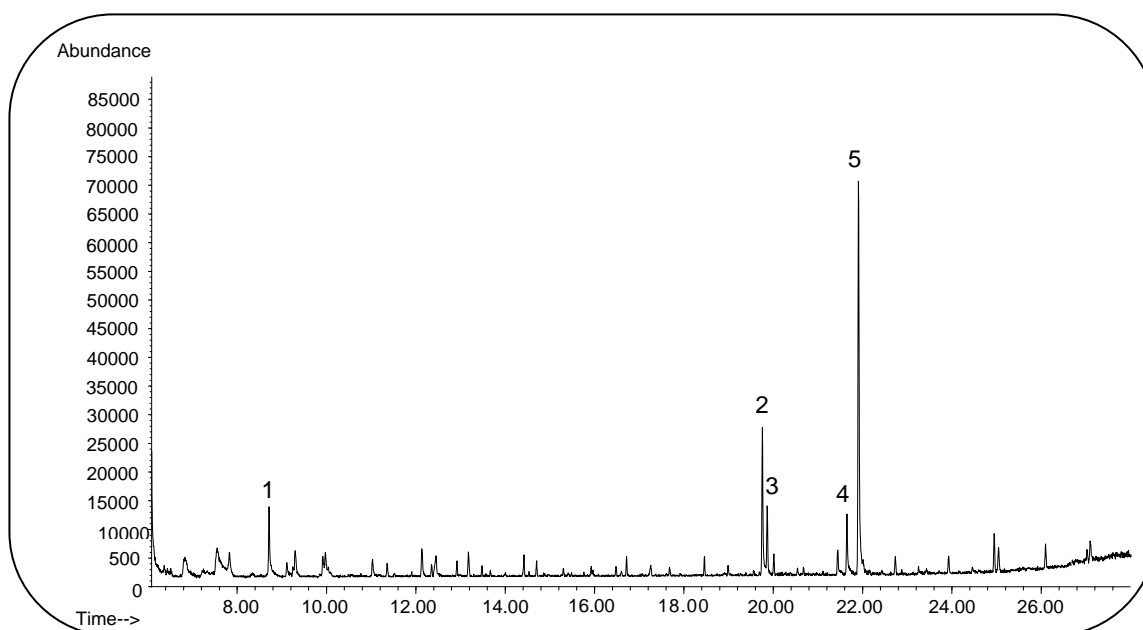
El recobro de capsaicina y dehidrocapsaicina por el método desarrollado no es representativo para todas las muestras ya que sólo se realizó para dos chiles, el resultado de recobro no es confiable para todas las muestras, sin embargo, el método desarrollado presenta una buena reproducibilidad aun trabajando en disolución acuosa en donde los analitos son parcialmente solubles y el tiempo de extracción es relativamente corto (40 min) comparado con el método Soxhlet (5 hrs).

La diferencia de la cantidad extraída de cada capsaicinoide se debe a la polaridad que presenta cada uno de estos compuestos y la afinidad de cada uno de ellos por la fibra en las condiciones establecidas. La diferencia del porcentaje de recobro entre las muestras se debe posiblemente a que al realizar la MEFS-ED se tiene en disolución, diferente material insoluble de acuerdo a la composición de cada chile, que modifica la difusión de los analitos hacia la fibra en el vial de extracción diseñado.

## 5.5 Análisis de Muestras por MEFS-ED-CG-EM

### 5.5.1 Análisis cualitativo

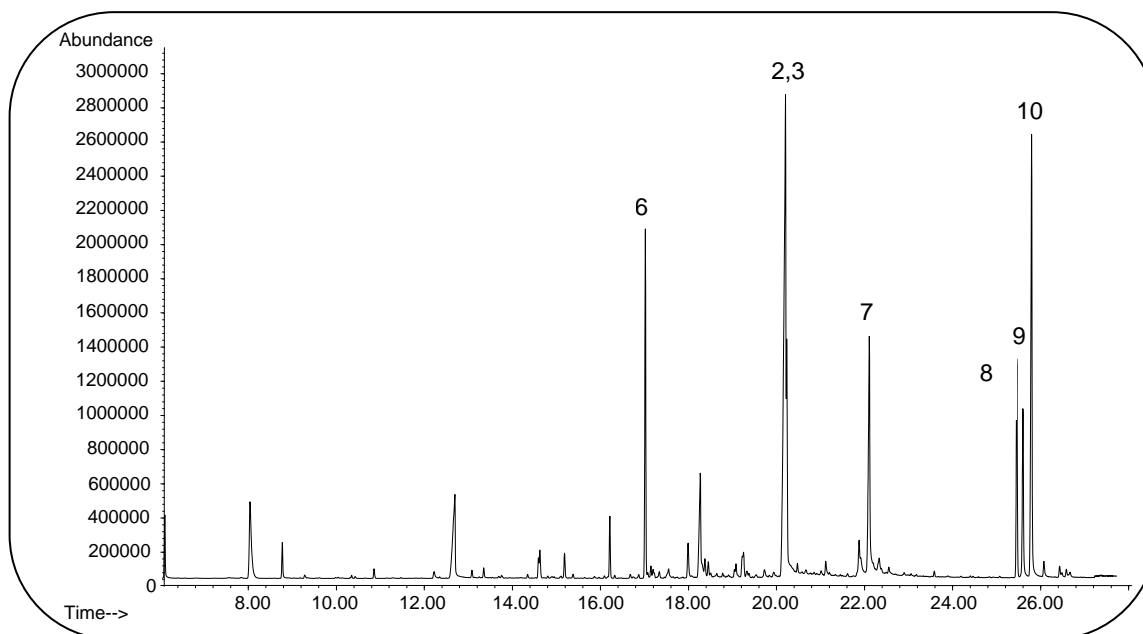
Para el análisis por MEFS-ED una vez acondicionada la fibra se realizó un blanco de extracción de acuerdo al procedimiento y condiciones cromatográficas descritos en los incisos 4.3.3.4 y 4.2.1. Éste se realizó antes de la extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina de la disolución estándar de capsaicinoides y del análisis de cada muestra. La Figura 19 muestra el cromatograma obtenido del blanco de la extracción donde se observa que el disolvente extrae compuestos presentes en la fibra, los compuestos extraídos no interfieren en el análisis de los capsaicinoides a cuantificar, los tiempos de retención de estos compuestos son diferentes a los tiempos de retención de los capsaicinoides de interés.



**Figura 19.** Cromatograma Iónico Total por MEFS-ED-CG-EM del blanco de extracción. (1) Hexametildiclorosiloxano, (2) Ácido Hexadecanóico, (3) Dibutil ftalato, (4) Ácido octadecanóico, (5) Bisfenol A. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso 4.2.1.

Una vez realizado el blanco de extracción se realizó el análisis por MEFS-ED-CG-EM de la disolución estándar de capsaicinoides, la Figura 20 muestra el cromatograma obtenido de este análisis, en donde se observa una buena resolución y eficiencia de los estándares de los compuestos a cuantificar en un tiempo de análisis de 27.5 min.

En este cromatograma se observan diferentes compuestos que se extraen de la fibra con la disolución de extracción sin embargo, ninguno de ellos interfiere en la separación de los capsaicinoides. Cabe señalar que los cromatogramas presentados se obtienen del análisis con una fibra utilizada en la optimización de las condiciones de extracción.

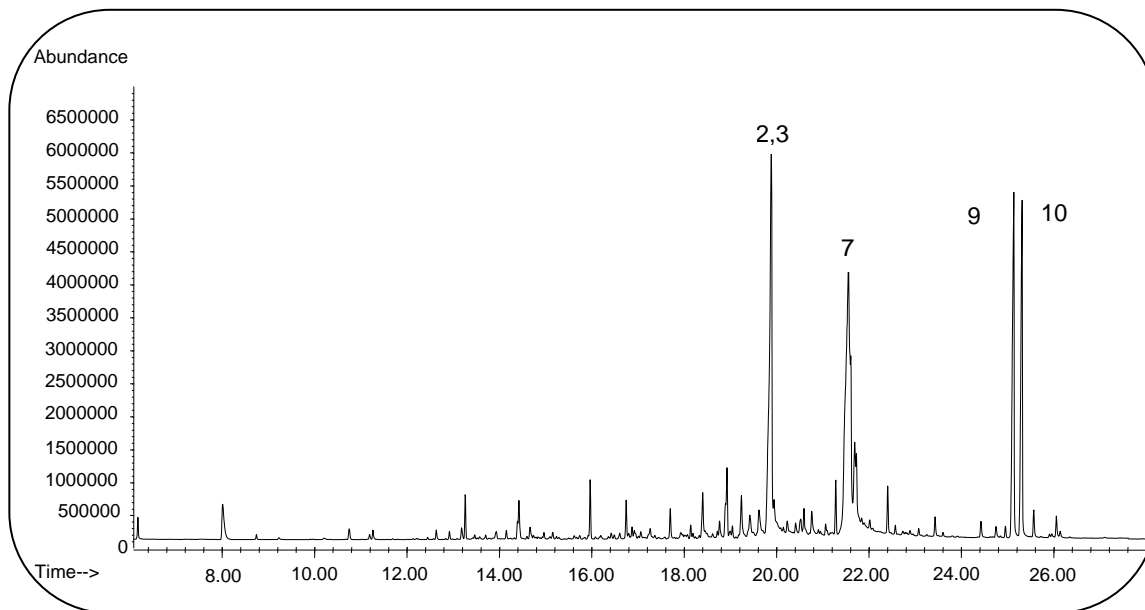


**Figura 20.** Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS-ED-CG-EM de la disolución estándar de capsaicinoides. Se muestran los compuestos extraídos: (2) Ácido hexadecanóico, (3) Dibutil ftalato, (6) p-Benzoquinona, (7) Mezcla de isómeros del ácido octadecanóico, (8) Ácido ftálico, (9) Capsaicina, (10) Dehidrocapsaicina. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso 4.2.1.

La Figura 21 presenta el cromatograma del análisis de una muestra liofilizada de chile Habanero por MEFS-ED-CG-EM en el cual se indican los picos correspondientes a los capsaicinoides en estudio presentando buena resolución y eficiencia en la separación en un tiempo de análisis de 27.5 min.

De acuerdo al perfil de compuestos extraídos para cada muestra analizada se observan los mismos compuestos mayoritarios: ácido hexadecanóico y mezcla de isómeros de ácido octadecanóico, es lógico que formen parte de los componentes mayoritarios debido al contenido de grasa de los chiles y la polaridad de la fibra de extracción. Cada muestra en particular posee compuestos específicos que proporcionan las características especiales de color, olor y sabor a cada producto, extrayéndose tanto compuestos semivolátiles y volátiles. Dentro de los compuestos extraídos se encuentran terpenos, aldehídos, cetonas, oximas, ácido benzoico, este último sólo se pudo apreciar en las salsas analizadas. En las

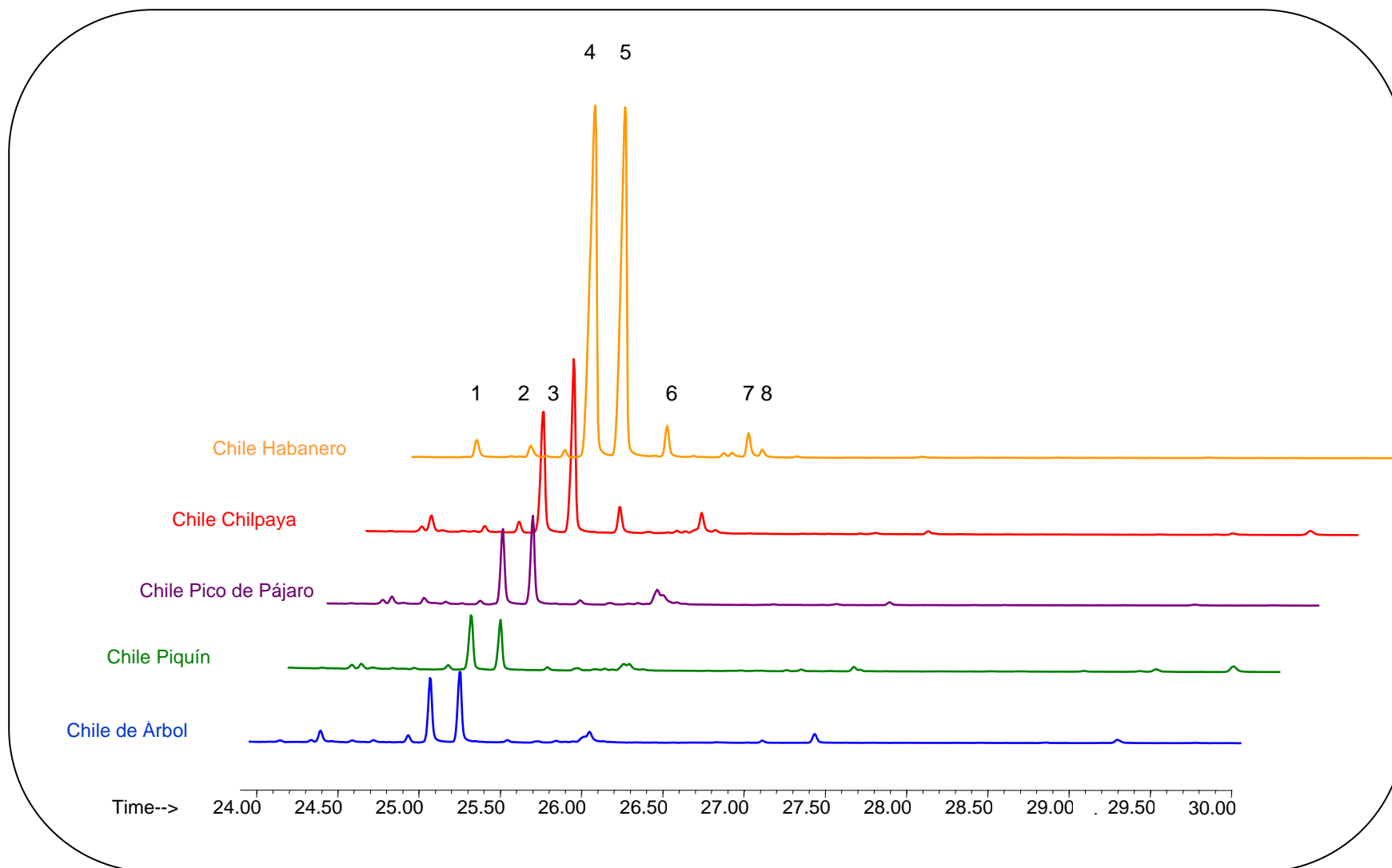
condiciones óptimas del método desarrollado no se aprecia la extracción de compuestos fenólicos libres (ácido protocatequínico, ácido cumárico, ácido clorogénico y ácido ferúlico) característicos de los chiles.



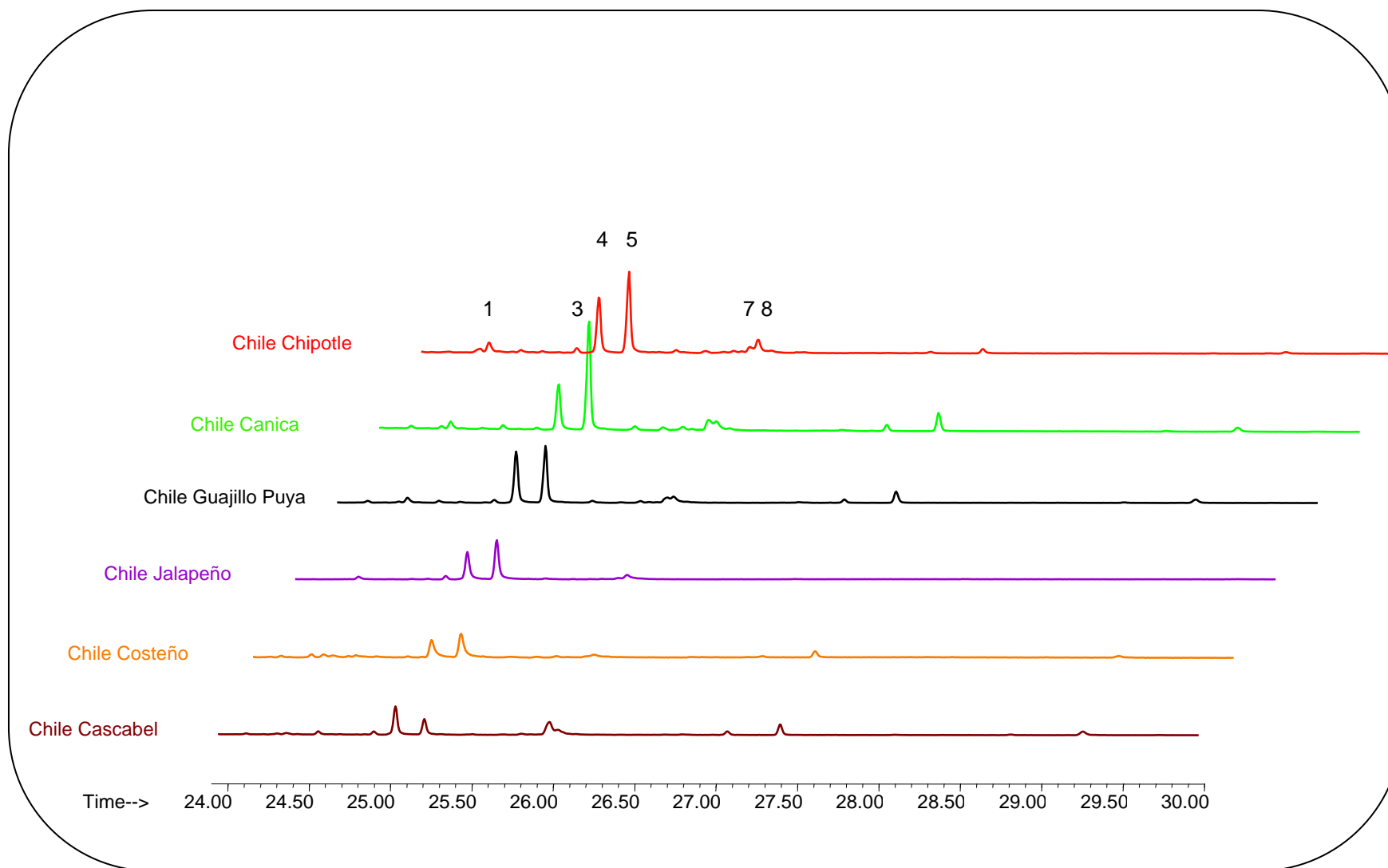
**Figura 21.** Cromatograma Iónico Total del análisis por MEFS-ED-CG-EM de Chile Habanero liofilizado. Se muestran los componentes mayoritarios encontrados: (2) Ácido hexadecanóico, (3) Ácido ftálico, (7) Mezcla de Isómeros del ácido octadecanóico, (9) Capsaicina, (10) Dehidrocapsaicina. Condiciones cromatográficas descritas en el inciso 4.2.1.

Las Figuras 22 y 23 presentan los cromatogramas de los chiles analizados y la Figura 24 presenta el cromatograma de las salsas analizadas por el método desarrollado por MEFS-ED-CG-EM, en un intervalo de 24 a 30 min, tiempo en donde eluyen los capsaicinoides a cuantificar. En estas Figuras también se observa el perfil de homólogos o isómeros de capsaicina y dehidrocapsaicina.

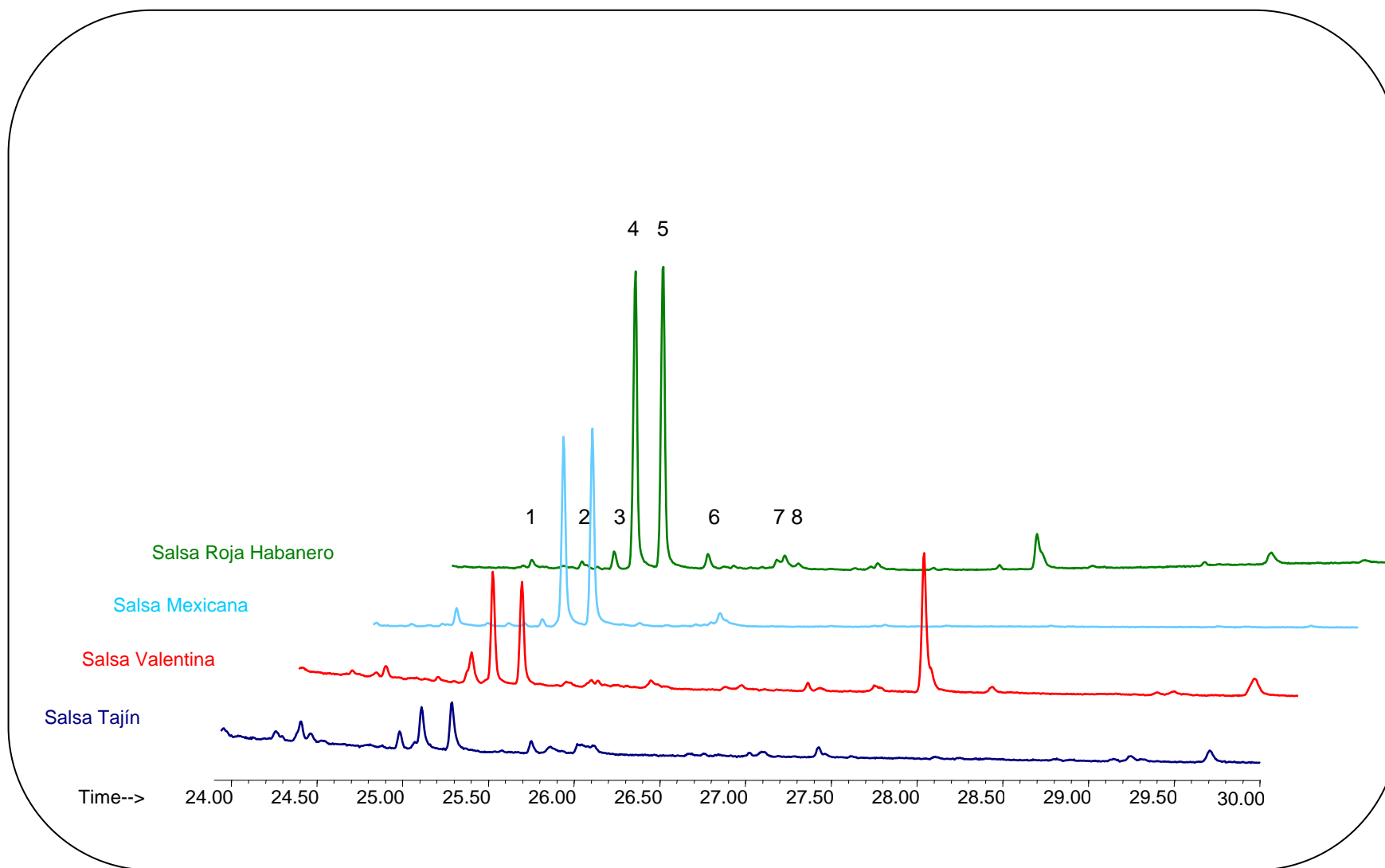
Los patrones de fragmentación de todos los capsaicinoides son similares debido a que éstos presentan la misma estructura aromática básica (grupo vainillilo), la única diferencia entre ellos es el número de carbonos, ramificación y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada (Tabla 2), por lo que las porciones más estables de las moléculas son idénticas, las diferencias que existen entre los espectros de masas de estos compuestos sólo son las pérdidas de cada fracción de la cadena hidrocarbonada así como el ión molecular.



**Figura 22.** Cromatograma Iónico Total de muestras de chiles analizados, se presentan los compuestos identificados (1) Nordehidrocapsaicina, (2) Nonivamida, (3) Diisooctil ftalato, (4) Capsaicina, (5) Dehidrocapsaicina, (6) No identificado, (7) Homodehidrocapsaicina I y (8) Homodehidrocapsaicina II. Condiciones cromatográficas y de análisis incisos 4.2.1. y 4.3.3.4



**Figura 23.** Cromatograma Iónico Total de muestras de chiles analizados, se presentan los compuestos identificados (1) Nordehidrocapsaicina, (3) Diisooctil ftalato, (4) Capsaicina, (5) Dehidrocapsaicina, (7) Homodehidrocapsaicina I y (8) Homodehidrocapsaicina II. Condiciones cromatográficas y de análisis incisos 4.2.1. y 4.3.3.4.



**Figura 24.** Cromatograma Iónico Total de muestras de las salsas analizadas, se presentan los compuestos identificados (1) Nordehidrocapsaicina, (2) Nonivamida, (3) Diisooctil ftalato, (4) Capsaicina, (5) Dehidrocapsaicina, (6) No identificado, (7) Homodehidrocapsaicina I y (8) Homodehidrocapsaicina II. Condiciones cromatográficas y de análisis incisos 4.2.1. y 4.3.3.4. La escala utilizada en este cromatograma se incrementó 5 veces para observar los picos cromatográficos obtenidos.

Los capsaicinoides identificados en cada pico cromatográfico de acuerdo a sus espectros de masas de la base de datos de la Biblioteca de Espectros de Masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library) son: pico (2) nonivamida (PM 293 uma), pico (4) capsaicina (PM 305 uma) y pico (5) dehidrocapsaicina (PM 307 uma), también se identificó en el pico (3) el compuesto diisooctil ftalato, todos con una probabilidad mayor del 87% (Anexo 8.5, espectros 2, 3 y 4); los compuestos presentes en los picos (1), (6), (7) y (8) no se pudieron identificar comparando sus espectros de masas ya que el compuesto propuesto en todos los casos fue la nonivamida con una probabilidad menor del 77%.

De acuerdo al ión molecular y al patrón de fragmentación obtenido de cada espectro de masas de los compuestos no identificados, se sugiere que los compuestos presentes en cada pico probablemente sean: pico (1) nordehidrocapsaicina (PM 293 uma), pico (6) no identificado (PM 307 uma), pico (7) homodehidrocapsaicina I (PM 321 uma) y pico (8) homodehidrocapsaicina II (PM 321 uma). Para asignar a cada pico cromatográfico el compuesto propuesto se realizaron las siguientes consideraciones:

En el pico (1) el espectro de masas presenta el ión molecular a  $m/z$  293 y el fragmento característico a  $m/z$  250 que indica la pérdida de 43 unidades de masa del isopropilo de la cadena hidrocarbonada que posee la nordehidrocapsaicina (Tabla 2 y Anexo 8.5, espectros 1 y 2), a pesar que la señal a  $m/z$  250 es muy pequeña, ésta cumple con la intensidad del 1-3% con respecto al pico base para no ser considerada ruido del espectro.<sup>(52,53)</sup>

No se puede sugerir una estructura del capsaicinoide correspondiente al pico (6), este presenta un peso molecular de 307 uma y el patrón de fragmentación característico de esta familia de compuestos sin embargo, no hay una estructura que tenga el mismo peso molecular y no se trata de la dehidrocapsaicina debido a que presenta diferente tiempo de retención (Anexo 8.5, espectro 5).

Para los picos (7) y (8) se proponen los compuestos homodehidrocapsaicina I (PM 321 uma) y homodehidrocapsaicina II (PM 321 uma) respectivamente, de acuerdo al espectro de masas obtenido para el pico (8) se presenta el ión molecular a  $m/z$  321 y se observa el fragmento característico a  $m/z$  264 que indica la pérdida de 57 unidades de masa del grupo



sec-butilo perteneciente a la cadena hidrocarbonada de la homodehidrocapsaicina II (Tabla 2), lo que confirmaría la identidad de este compuesto (Anexo 8.5, espectros 6 y 7).

De acuerdo a los espectros de masas reportados en otro trabajo bajo las mismas condiciones de ionización, el espectro de masas de la homodehidrocapsaicina II es similar al obtenido en este trabajo.<sup>(7)</sup>

#### 5.4.1 Análisis cuantitativo

Si se considera que el recobro de capsaicina es del 48% y dehidrocapsaicina 20% y es el mismo para todas las muestras, se puede comparar el contenido de ambos capsaicinoides en los productos analizados. En la Tabla 12 se presenta la cantidad de muestra analizada, el contenido de cada capsaicinoide obtenido por MEFS-ED-CG-EM corregido por el recobro obtenido del método desarrollado, así como el contenido total de capsaicina y dehidrocapsaicina cuantificado. Los resultados muestran que el intervalo del contenido de los capsaicinoides es de  $1.1E+01$  a  $6.23E+04$   $\mu\text{g/g}$ , presentando un mayor contenido en los chiles que en las salsas analizadas, lo que era de esperarse, ya que estos productos están elaborados con otros ingredientes como agua, jitomate, cebolla, especias, vinagre, sal, etc., además del chile.

Para la cuantificación de capsaicina en 4 de las muestras analizadas: chile Piquín, chile Pico de Pájaro, chile Chilpaya y chile Habanero, estas exceden el intervalo de concentración de la curva de calibración realizada para la cuantificación de este compuesto, los valores obtenidos se calcularon utilizando esta curva y son valores aproximados, pero estas muestras son las que presentan el mayor contenido de capsaicina. El chile Habanero también excede el intervalo de concentración de la curva de calibración de la dehidrocapsaicina. Por el contrario el chile Cascabel y la salsa Tajín poseen una concentración menor de dehidrocapsaicina, es decir, están por debajo del límite de cuantificación del método desarrollado.

Los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de las muestras analizadas fue  $<10\%$ , excepto para los chiles Costeño (12 % capsaicina y 10% para dehidrocapsaicina) y Chilpaya (11.5% dehidrocapsaicina), salsa Roja Habanero (13.2% capsaicina) y salsa Tajín (20.5% capsaicina y 14.8% dehidrocapsaicina).

**Tabla 12.** Cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina ( $\mu\text{g/g}$ ) en muestras por MEFS-ED-CG-EM (n=3)

Muestra	Cantidad de muestra analizada	Capsaicina $\mu\text{g/g}$ muestra	C.V.	DHC $\mu\text{g/g}$ muestra	C.V.	*Capsaicina y DHC totales $\mu\text{g/g}$ muestra
Chile Cascabel	50	8.28E+01	9.5	<sup>B</sup> 3.46E+01	2.2	1.17E+02
Chile Costeño	5	7.6E+02	12	6.4E+02	10.0	1.4E+03
Chile Chipotle	15	5.08E+02	3	4.44E+02	2.6	9.52E+02
Chile Guajillo Puya	15	8.08E+02	8	5.19E+02	6.5	1.33E+03
Chile de árbol	5	1.45E+03	4.4	1.06E+03	9.5	2.51E+03
Chile Canica	5	5.10E+02	3.6	3.31E+03	7.0	3.82E+03
Chile Jalapeño	10	6.48E+02	1.2	5.92E+02	8.1	1.24E+03
Chile Piquín	5	<sup>A</sup> 4.03E+03	4.5	1.86E+03	4.3	5.89E+03
Chile Pico de pájaro	5	<sup>A</sup> 3.66E+03	7.2	2.57E+03	7.9	6.23E+03
Chile Chilpaya (Veracruz)	5	<sup>A</sup> 6.68E+03	8.8	5.3E+03	11.5	1.2E+04
Chile Habanero	3	<sup>A</sup> 4.10E+04	4.7	<sup>A</sup> 2.13E+04	5.4	6.23E+04
Salsa Valentina	200	2.82E+01	5.7	1.64E+01	5.2	4.46E+01
Salsa Tajín	300	6.1E+00	20.5	<sup>B</sup> 4.5E+00	14.8	1.1E+01
Salsa Roja habanero	10	1.1E+03	13.2	6.42E+02	7.6	1.8E+03
Salsa Mexicana	300	3.17E+01	9.1	2.02E+01	7.1	5.19E+01

<sup>A</sup> Los valores de concentración obtenidos son superiores al intervalo de concentración de la curva de calibración. Valores aproximados

<sup>B</sup> Los valores de concentración obtenidos son inferiores al intervalo de concentración de la curva de calibración. Valores aproximados

\*Capsaicina y dehidrocapsaicina totales en las muestras analizadas, cada capsaicinoide fue calculado tomando en cuenta el factor de recobro obtenido

En las Figuras 25 y 26 se muestra de forma gráfica el contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina de los chiles y las salsas respectivamente. El perfil de estos compuestos fue semejante para la mayoría de los chiles presentando un mayor contenido de capsaicina que de dehidrocapsaicina, excepto en el chile Canica, lo que indica que en este chile el contenido de dehidrocapsaicina es mucho mayor que el de capsaicina.

En las 4 muestras de salsas analizadas el perfil de capsaicinoides fue el mismo en todos los casos, presentando como capsaicinoide mayoritario a la capsaicina. Como se esperaba, la salsa con mayor contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina es la salsa Rojo Habanero, mientras que la salsa Tajín presenta el menor contenido de estos capsaicinoides.

Las Figuras 27 y 28 muestran de forma gráfica el contenido total de capsaicinoides en los chiles y salsas respectivamente, estas figuras muestran que hay productos que tienen una pungencia similar y pueden ser clasificados en diversos grupos de acuerdo a la concentración total de capsaicinoides cuantificados

Dentro de los chiles, el chile Habanero posee el mayor contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina totales ( $6.23E+04 \mu\text{g/g}$  de chile) comparado con todas las muestras analizadas, esto es lo esperado ya que este producto se ha reportado como el de mayor contenido de capsaicinoides en estudios previos y es considerado como extremadamente picoso.<sup>(5,7,32)</sup>

El chile Chilpaya ( $1.2E+04 \mu\text{g/g}$  de chile) es el segundo chile con mayor contenido de capsaicinoides totales, cabe mencionar que este chile posee cinco veces menos capsaicinoides que el chile Habanero.

Los chiles Pico de Pájaro ( $6.23E+03 \mu\text{g/g}$  de chile) y Piquín ( $5.89E+03 \mu\text{g/g}$  de chile) pueden ser considerados otro grupo de chiles con alta pungencia dentro de las muestras analizadas ya que su contenido de capsaicinoides es similar. El chile de Árbol ( $2.51E+03 \mu\text{g/g}$  de chile) y chile Canica ( $3.82E+03 \mu\text{g/g}$  de chile) pueden formar otro grupo de chiles de mismo nivel de pungencia, mientras que los chiles Guajillo Puya ( $1.33E+03 \mu\text{g/g}$  de chile), Costeño ( $1.4E+03 \mu\text{g/g}$  de chile), Jalapeño ( $1.24E+03 \mu\text{g/g}$  de chile) y Chipotle ( $9.52E+02 \mu\text{g/g}$  de chile) poseen aproximadamente la misma pungencia.

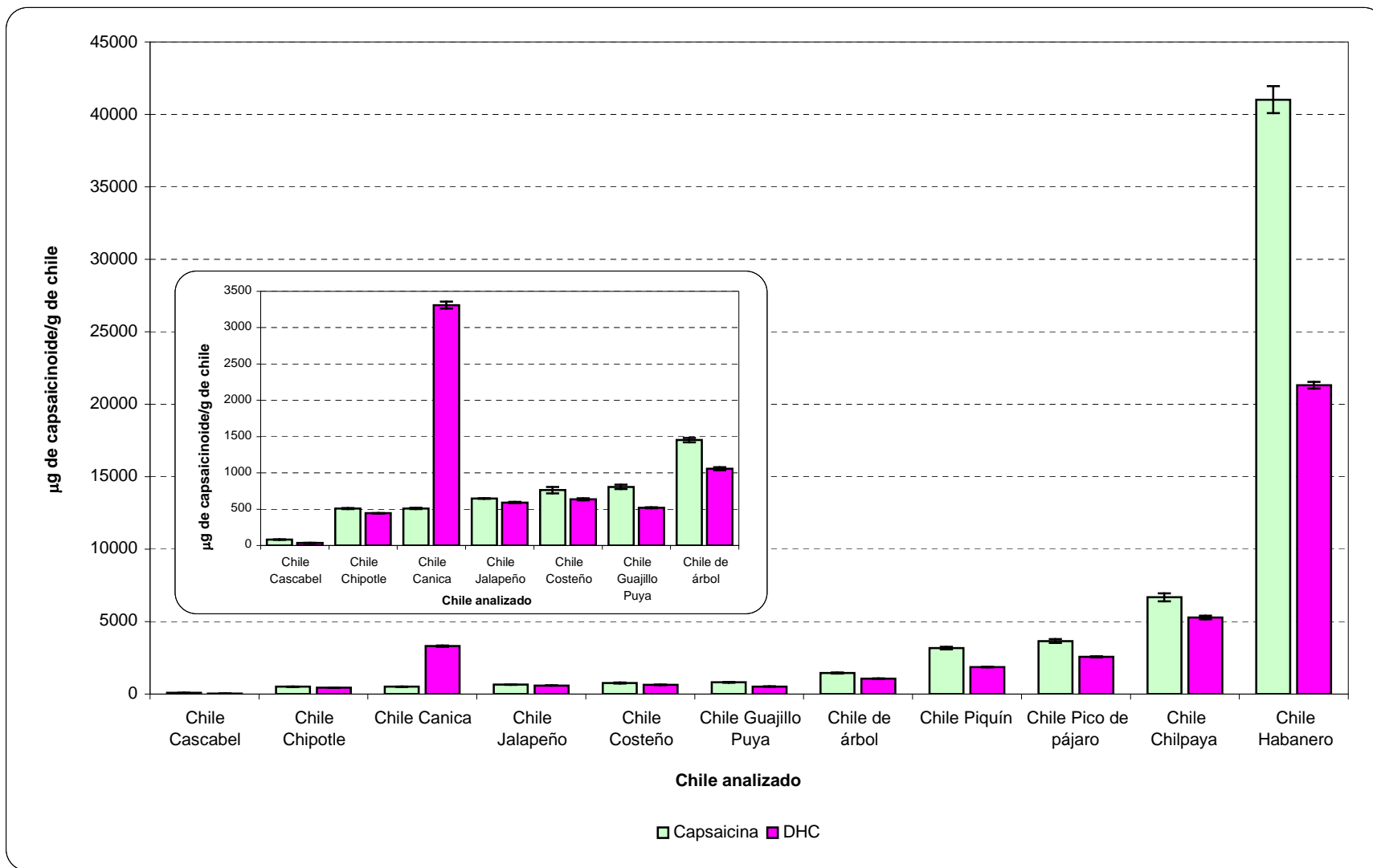
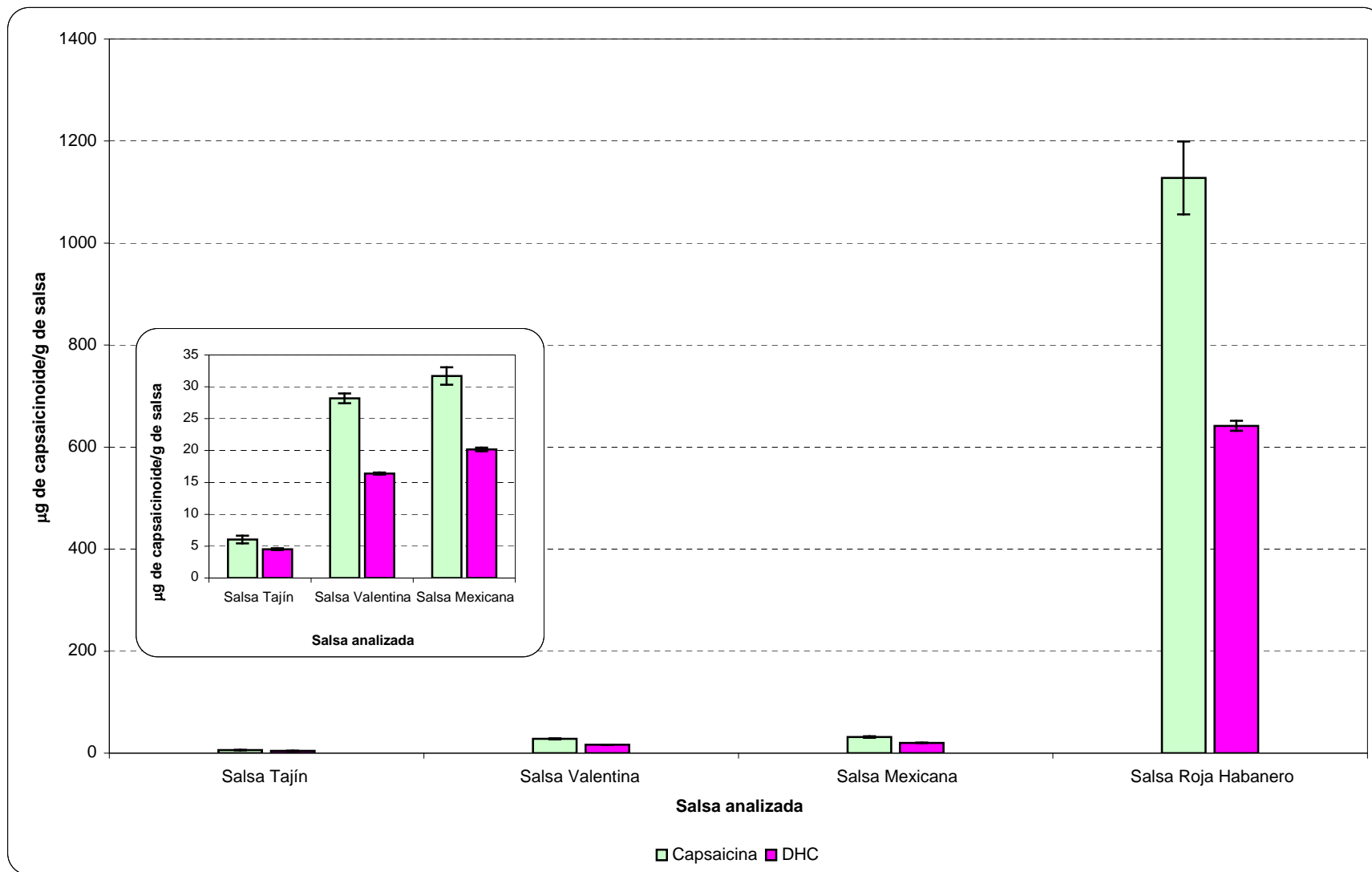


Figura 25. Contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina en las muestras de chile analizados por MEFS-ED-CG-EM. Condiciones cromatográficas y de análisis incisos 4.2.1. y 4.3.3.4



**Figura 26.** Contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina en las muestras de salsa analizadas por MEFS-ED-CG-EM. Condiciones cromatográficas y de análisis incisos 4.2.1. y 4.3.3.4

El chile Cascabel ( $1.17E+02$   $\mu\text{g/g}$  de chile) resultó ser el de menor pungencia de acuerdo al perfil de capsaicina y dehidrocapsaicina totales.

La Figura 28 muestra que la salsa con mayor pungencia es la salsa Roja Habanero ( $1.8E+03$   $\mu\text{g/g}$  de salsa), lo cual es lógico si esta elaborada realmente con este chile, las salsas Mexicana ( $5.19E+01$   $\mu\text{g/g}$  de salsa ) y Valentina ( $4.46E+01$   $\mu\text{g/g}$  de salsa) tienen el mismo grado de pungencia de acuerdo a la concentración de capsaicinoides cuantificados, mientras que la salsa Tajín ( $1.1E+01$   $\mu\text{g/g}$  de salsa) es la que menor picor posee, es importante señalar que esta salsa es el producto analizado que posee el menor contenido de capsaicinoides de las 15 muestras analizadas; se trató de relacionar la pungencia de esta salsa de acuerdo al tipo de chile con la que esta elaborada, pero en los ingredientes reportados en la etiqueta no se especifica el tipo de chile usado en su preparación. Cabe mencionar que se está determinando el contenido de capsaicina y dehidrocapsaicina presente en cada muestra, pero estos compuestos dentro de una salsa no sólo son los únicos que producen la sensación de picor, sino todo el conjunto de ingredientes que constituyen al producto.

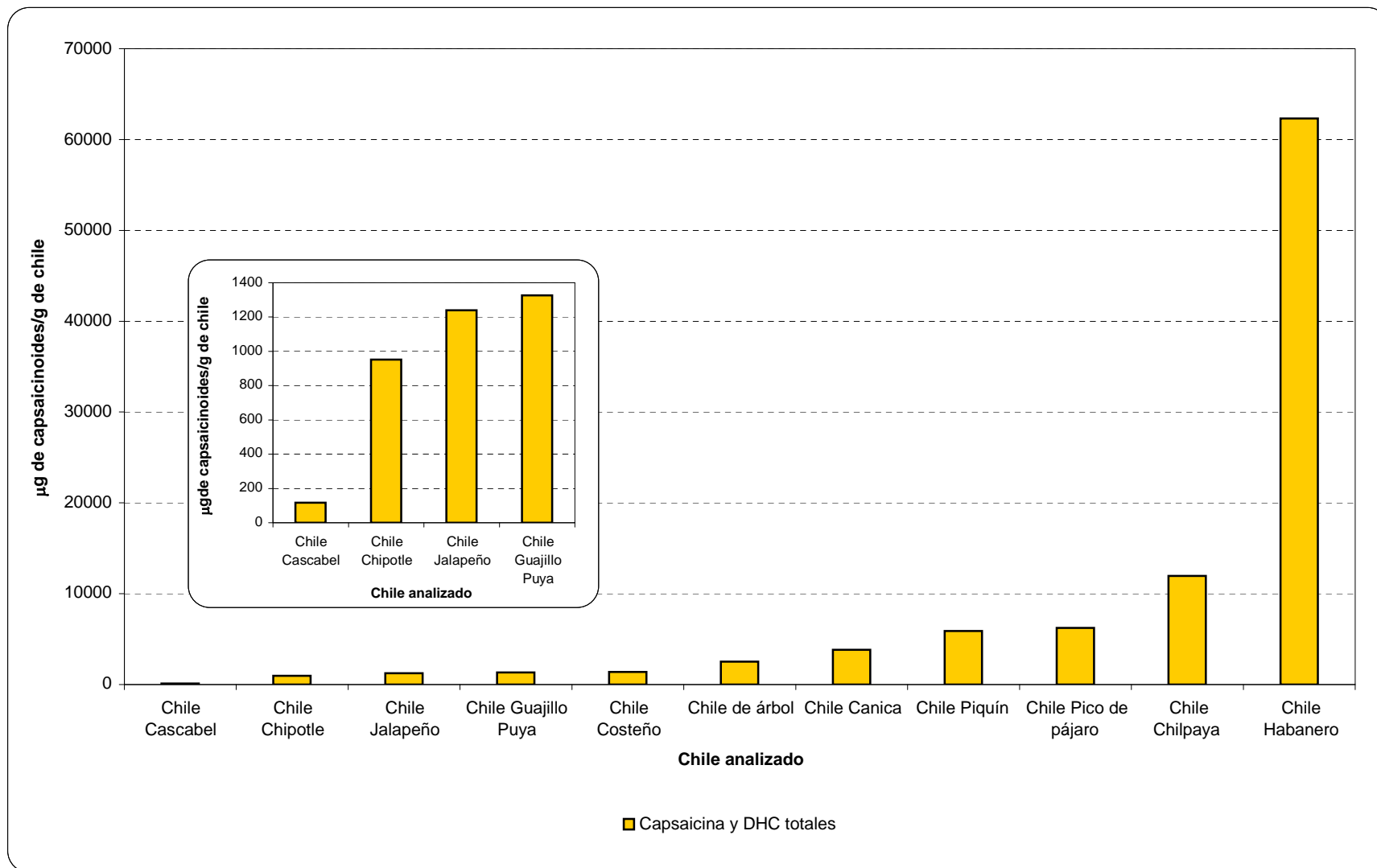
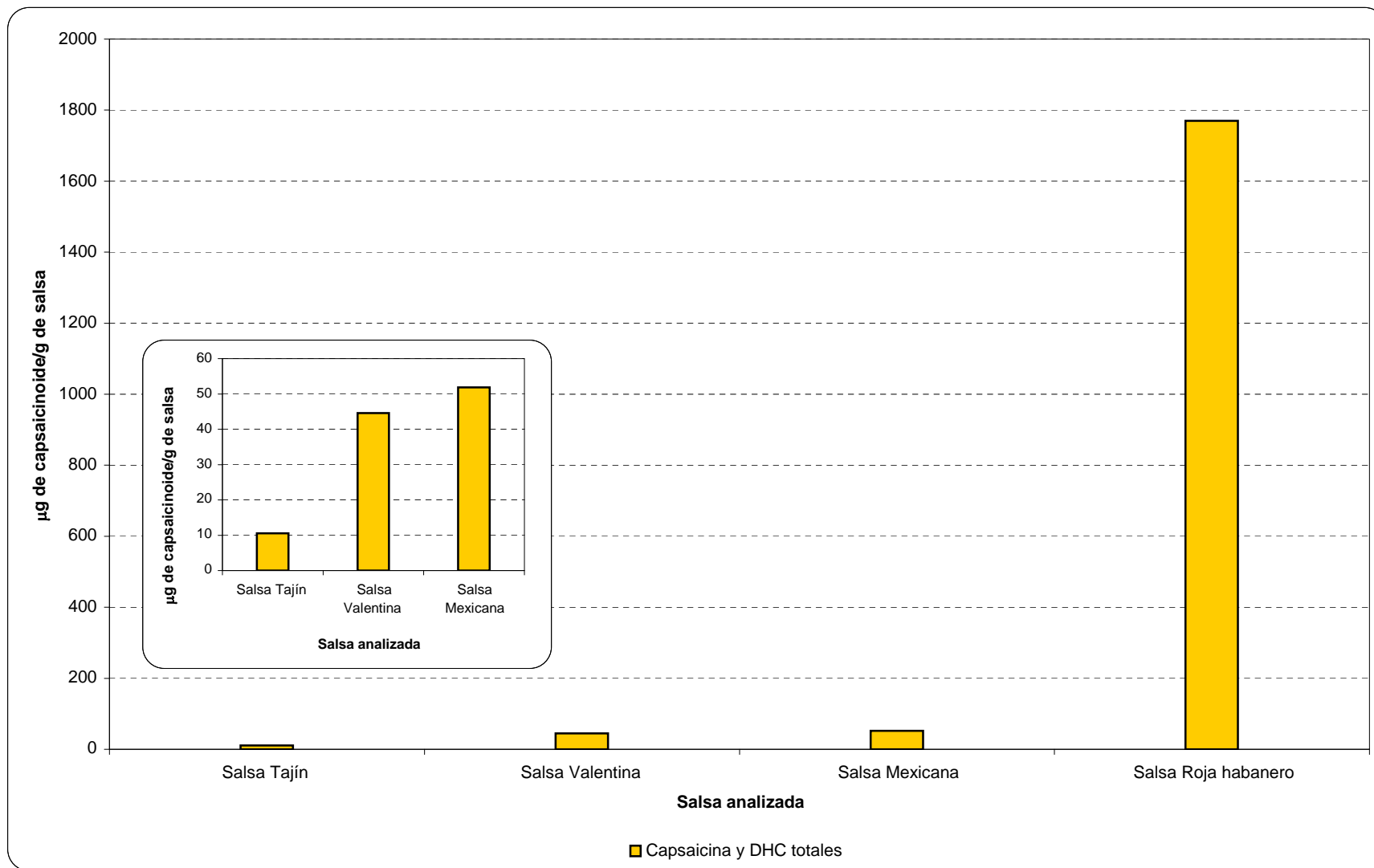


Figura 27. Contenido total de capsaicinoides en muestras de chile analizadas por MEFS-ED-CG-EM. Condiciones cromatográficas y de análisis incisos 4.2.1. y 4.3.3.4



**Figura 28.** Contenido total de capsaicinoides en muestras de salsa analizadas por MEFS-ED-CG-EM. Condiciones cromatográficas y de análisis incisos 4.2.1. y 4.3.3.4



## **6. CONCLUSIONES**

Se desarrolló un método por Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa para la cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina en chiles y salsas seguida de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. El procedimiento reporta buena linealidad en el intervalo de concentración de 0.109-1.323  $\mu\text{g/mL}$  para la capsaicina y 0.107-1.713  $\mu\text{g/mL}$  para la dehidrocapsaicina obteniendo coeficientes de correlación  $r > 0.997$  para ambos capsaicinoides. Se tuvo buena precisión para ambos analitos reportando coeficientes de variación  $< 8\%$ . La metodología desarrollada por MEFS-ED-CG-EM para la extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina fue una técnica simple, rápida ya que reduce las etapas de preparación de muestra, la extracción se realiza en el vial en un solo paso, requirió menor cantidad de muestra, sin el uso de disolventes orgánicos, de fácil manejo, con un montaje experimental sencillo y de bajo costo comparado con el método de extracción Soxhlet.

El método desarrollado puede aplicarse en el análisis de capsaicina y dehidrocapsaicina en chiles y salsas bajo las condiciones establecidas sin tener interferencia de otros analitos en la extracción, separación y cuantificación. Sin embargo, se debe confirmar el porcentaje de extracción de cada analito por el método propuesto.

Se desarrolló un dispositivo que permite realizar MEFS-ED sin que el material insoluble dañe la fibra de extracción, el cual no existe comercialmente, es de uso simple y bajo costo.

El perfil de capsaicinoides obtenido por MEFS-ED-CG-EM fue semejante en las muestras analizadas, siendo la capsaicina el capsaicinoide de mayor concentración en los chiles, excepto para el chile Canica en el cual el capsaicinoide de mayor concentración es la dehidrocapsaicina.

El mismo perfil se obtiene para las salsas analizadas, donde el capsaicinoide de mayor concentración fue la capsaicina seguido de la dehidrocapsaicina.

El chile con la mayor concentración de capsaicinoides totales dentro de las muestras analizadas fue el chile Habanero, mientras que el chile Cascabel fue el de menor concentración y por lo tanto el de menor pungencia de acuerdo al perfil de capsaicinoides totales obtenido.

La salsa Roja Habanero fue la salsa con mayor contenido de capsaicinoides totales, por el contrario la salsa Tajín es la de menor contenido.

## **7. RECOMENDACIONES**

Una vez perfeccionado el dispositivo de Microextracción en Fase Sólida modo Extracción Directa para muestras sólidas desarrollado en el laboratorio se propone patentarlo, su diseño es sencillo, novedoso, de bajo costo y necesita mínima infraestructura para ser utilizado.

Se puede hacer más eficiente el método de extracción de los capsaicinoides cuantificados modificando la polaridad del disolvente extractante, tal vez utilizando una mezcla de agua-etanol mejore la extracción simultánea de los compuestos, ya que estos son completamente solubles en alcohol y la fibra en una disolución con baja concentración de etanol no se daña.

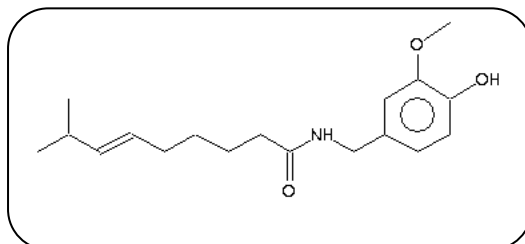
Para determinar el porcentaje de recobro del método desarrollado se propone realizar el análisis de capsaicina y dehidrocapsaicina en todas las matrices analizadas por el método de extracción Soxhlet.

El método desarrollado puede aplicarse en el análisis de otros productos alimenticios como lo son las frituras, y extraer de forma directa los capsaicinoides sin que la cantidad de grasa de la muestra sea un interferente en el análisis y la muestra puede ser analizada sin laboriosos procedimientos de preparación de muestra.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Características Químicas de los capsaicinoides analizados

#### Capsaicina<sup>(54-55)</sup>



Sinónimos: 6-Nonenamida, N-[(4-hidroxy-3-metoxifenil)metil]-8-metil-, (6E9-(9Cl), (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida)

Estado Físico: Sólido cristalino, con cristales planos monocíclicos, blanco, inodoro, muy picante.

Fórmula mínima:  $C_{18}H_{27}NO_3$

Peso molecular: 305.42 g

Punto de fusión: 64-65 °C

Punto de ebullición: 210-220 °C (Mezcla de capsaicinoides)

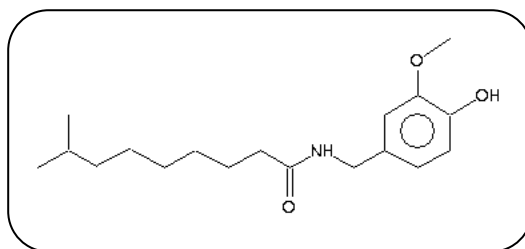
pKa:  $9.76 \pm 0.20$  ácido

pKa:  $-0.66 \pm 0.70$  básico

Solubilidad: prácticamente insoluble en agua fría, soluble en alcohol etílico, éter, acetona benceno, cloroformo, álcali caliente y acetonitrilo; ligeramente soluble en  $CS_2$  y es poco soluble en agua caliente.

Solubilidad molar: ligeramente soluble en un intervalo de pH de 1 a 10

#### Dehidrocapsaicina<sup>(55)</sup>



Sinónimos: Nonanamida, N-[(4-hidroxy-3-metoxifenil)metil]-8-metil-, 8-metil-9(Cl), (8-metil-N-vanillil-nonenamida).

Estado Físico: Sólido cristalino, con cristales planos, blanco opaco, inodoro, muy picante.

Fórmula mínima:  $C_{18}H_{29}NO_3$

Peso molecular: 307.43 g

Punto de fusión: 65 °C

Punto de ebullición: 210-220 °C (Mezcla de capsaicinoides)

pKa:  $9.76 \pm 0.20$  ácido

pKa:  $-0.65 \pm 0.70$  básico

Solubilidad: prácticamente insoluble en agua fría, soluble en alcohol etílico, éter, acetona benceno, cloroformo, álcali caliente y acetonitrilo; ligeramente soluble en  $CS_2$  y es poco soluble en agua caliente.

Solubilidad molar: ligeramente soluble en un intervalo de pH de 1 a 10 en una concentración de  $1.7 \times 10^{-4}$  mol/L a 25 °C.

## **8.2 Linealidad del método**

Para evaluar la linealidad del método se prepararon curvas de calibración absolutas para cada analito a cuantificar. Se evaluaron diferentes compuestos para ser utilizados como estándar interno: imidazol, dulcin, p-cimeno, fenol, vainillina y paracetamol, debido a la baja solubilidad en agua y baja extracción en las condiciones establecidas para los analitos a cuantificar ninguno de éstos fue utilizado, además el uso de un estándar interno no fue necesario debido a que la linealidad que presentan los compuestos a cuantificar es buena.

Para realizar la cuantificación se usaron los datos generados del análisis de regresión lineal empleando el programa computacional Origin (Microcal (TM) Origin<sup>®</sup>, versión 6, 1999), las curvas no se ajustaron a cero y la cuantificación se efectuó utilizando la ecuación de la recta obtenida en cada curva de calibración.

De acuerdo al valor de ordenada al origen y su intervalo de confianza de cada una de las curvas de calibración obtenidas para capsaicina y dehidrocapsaicina se observa que la tendencia lineal parte de cero, es decir, se tiene una ordenada al origen de cero.

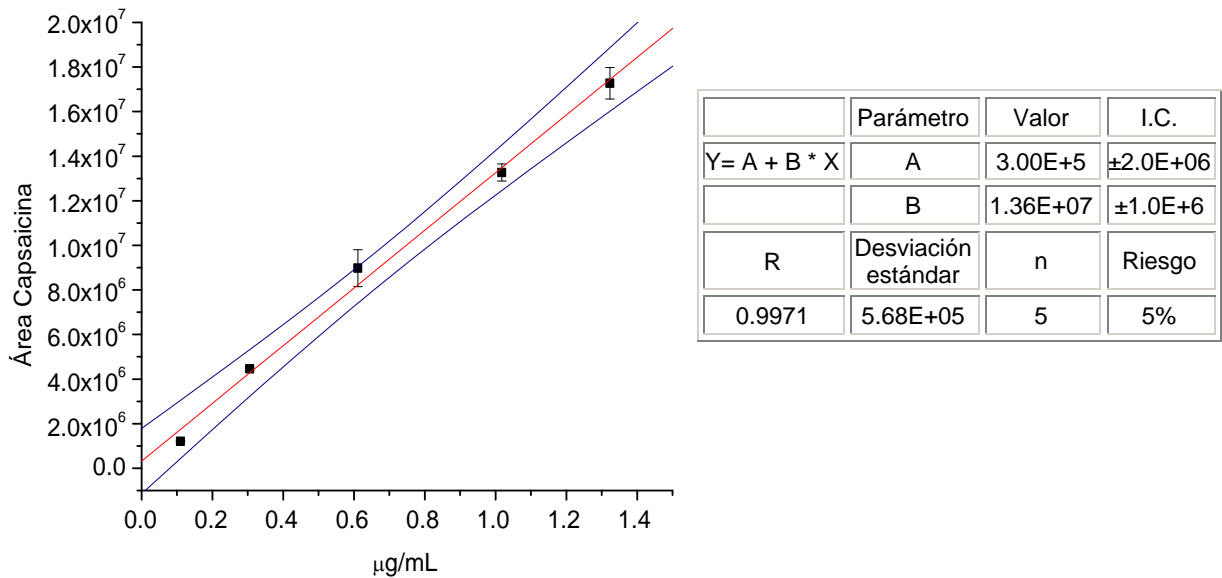


Figura 29. Curva de calibración absoluta para capsaicina

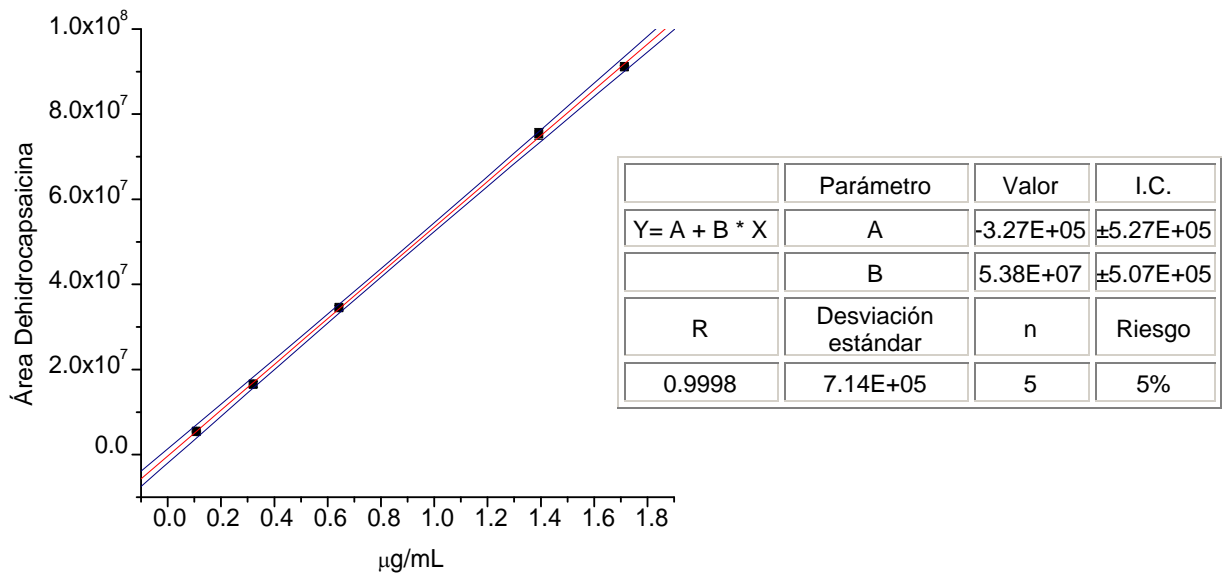


Figura 30. Curva de calibración absoluta para dehidrocapsaicina

### 8.3 Método de extracción Soxhlet

Para la extracción Soxhlet se pesaron aproximadamente 500 mg de cada chile y se utilizaron 50 mL de etanol. Se colocaron en el sistema Soxhlet y se mantuvo a reflujo durante 5 hrs, el extracto obtenido se llevó a sequedad con flujo de nitrógeno. Para el análisis cromatográfico se reconstituyó con una mezcla de diclorometano-etanol (25:1), cada extracción se realizó por triplicado para cada muestra analizada. El análisis cromatográfico de cada extracto se realizó por triplicado de acuerdo a las condiciones establecidas en el inciso 4.2.1.

### 8.4 Curvas de calibración para la cuantificación de los capsaicinoides por el Método de extracción Soxhlet

Para realizar la cuantificación de cada capsaicinoide extraído por Soxhlet se realizó una curva de calibración absoluta de capsaicina y dehidrocapsaicina en diclorometano en un intervalo de concentración de 20-100 µg/mL, utilizando como disolvente diclorometano.

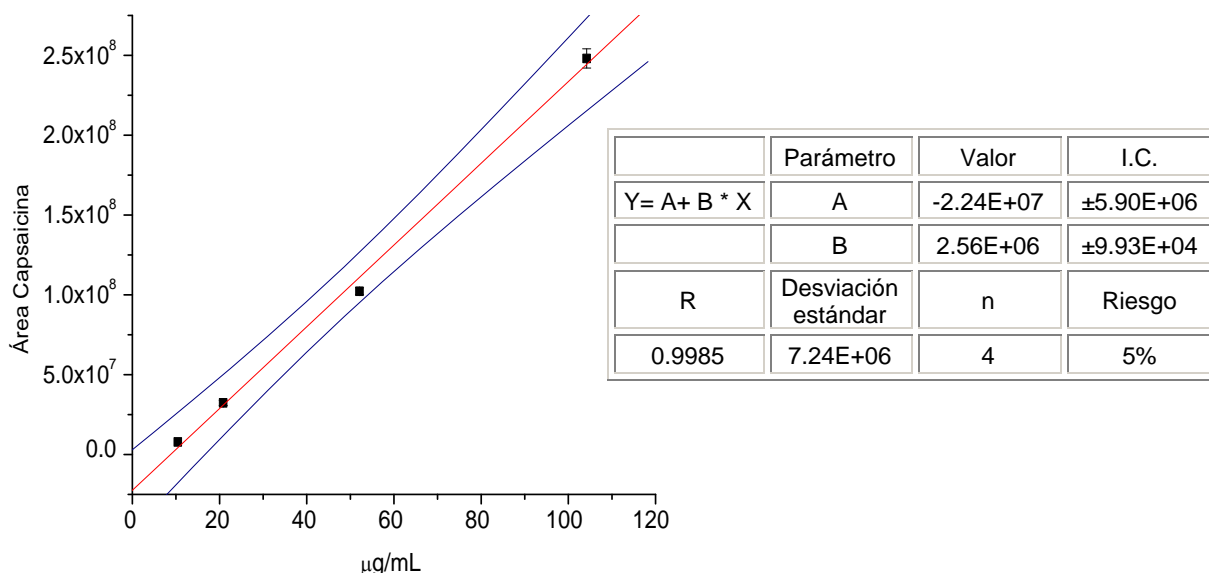
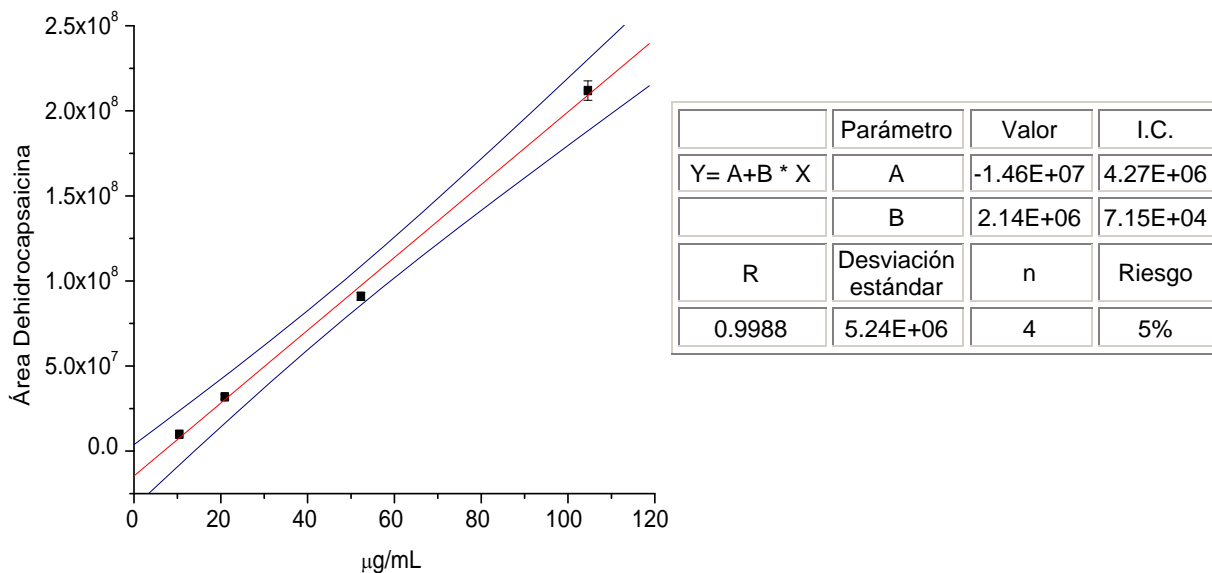


Figura 31. Curva de calibración absoluta para capsaicina en diclorometano



**Figura 32.** Curva de calibración absoluta para dehidrocapsaicina en diclorometano

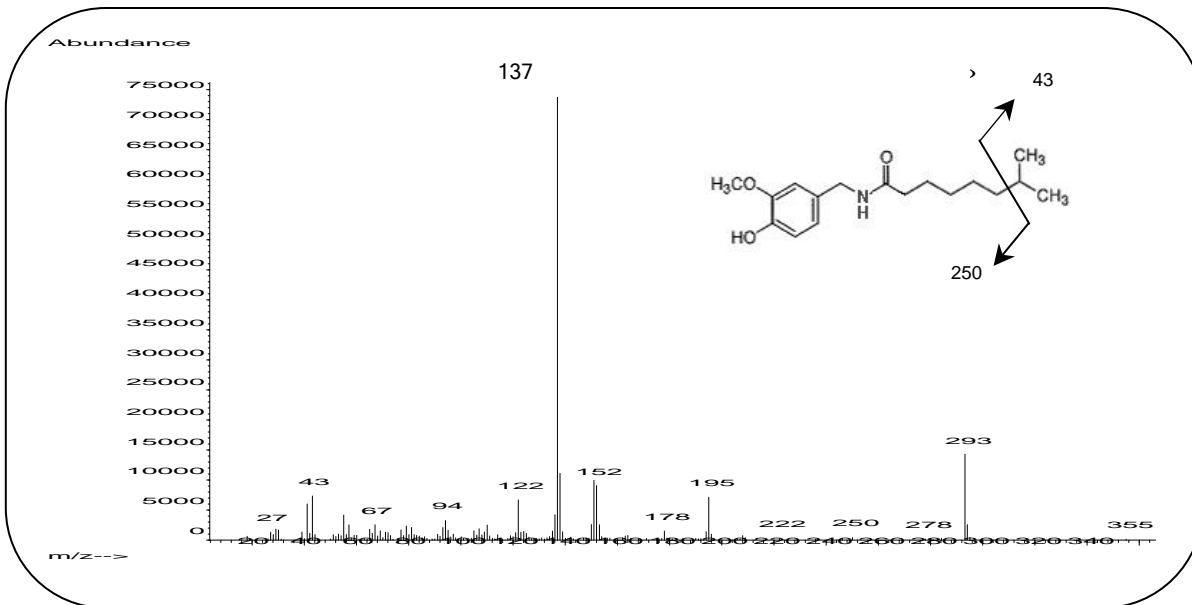
Para realizar la cuantificación se usaron los datos generados del análisis de regresión lineal empleando el programa computacional Origin (Microcal (TM) Origin®, versión 6, 1999), las curvas no se ajustaron a cero y la cuantificación se efectuó utilizando la ecuación de la recta obtenida en cada curva de calibración.

De acuerdo al valor de ordenada al origen y su intervalo de confianza de cada una de las curvas de calibración obtenidas para capsaicina y dehidrocapsaicina se observa que la tendencia lineal no parte de cero, es decir, la ordenada al origen no tiene un valor de cero, lo que probablemente indica que los datos no sigan una función lineal, pero es difícil definirlo sólo con 4 puntos, aunque al trabajar el intervalo de concentración de 20-100 µg/mL se tenga un coeficiente de correlación razonablemente adecuado (capsaicina  $r=0.9985$  y dehidrocapsaicina  $r=0.9988$ ).

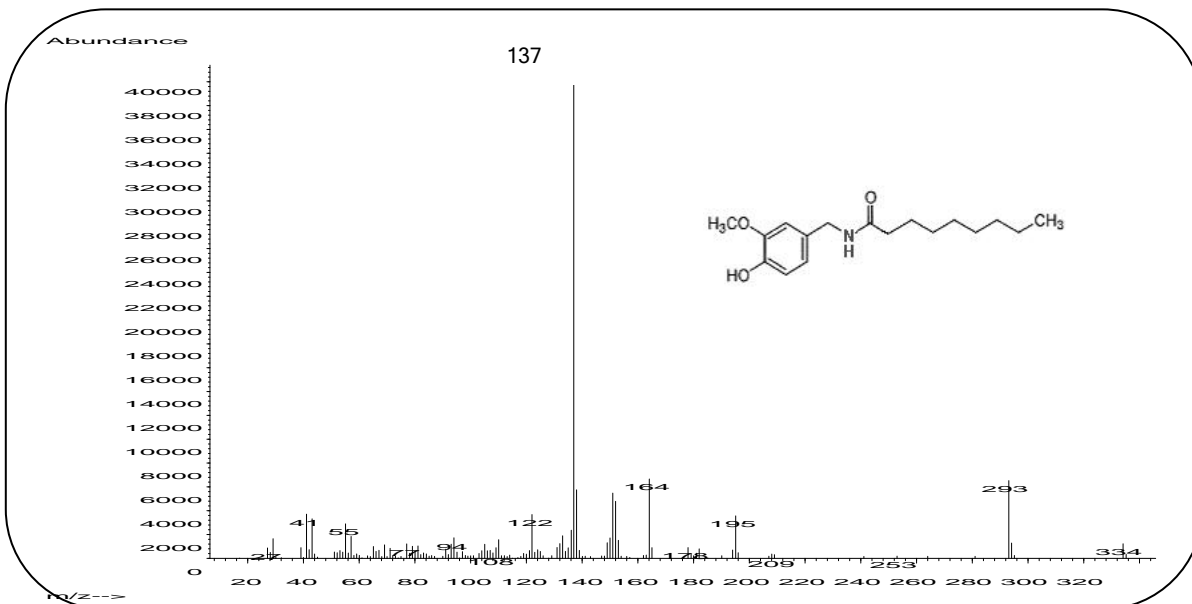


### 8.4 Espectros de masas de los capsaicinoides analizados

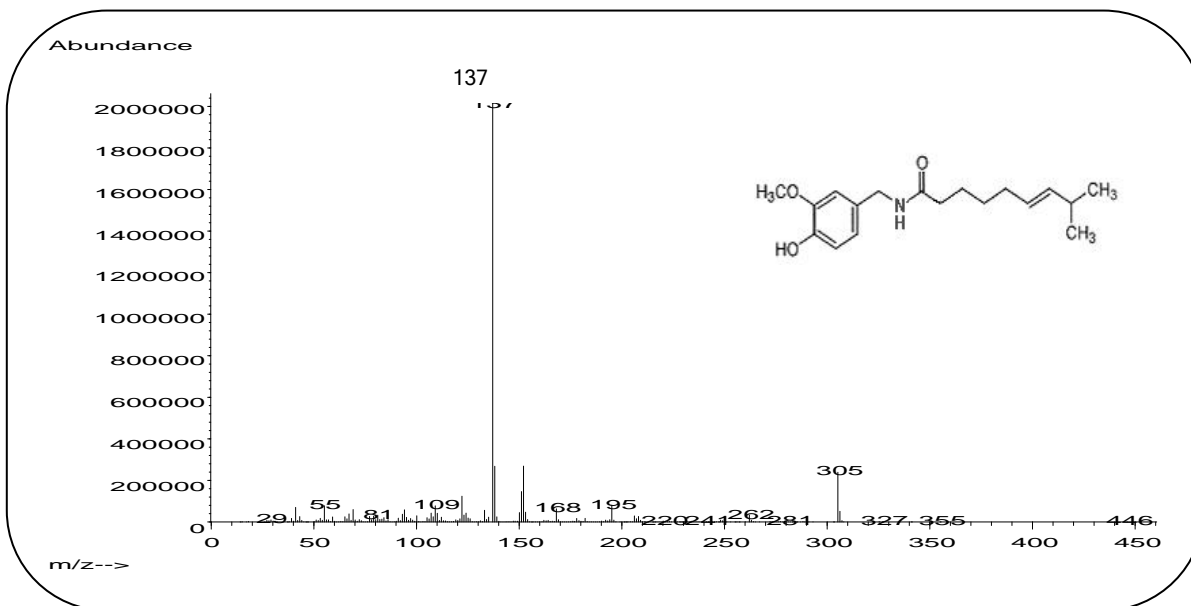
**Espectro 1.** Compuesto propuesto Nordehidrocapsaicina



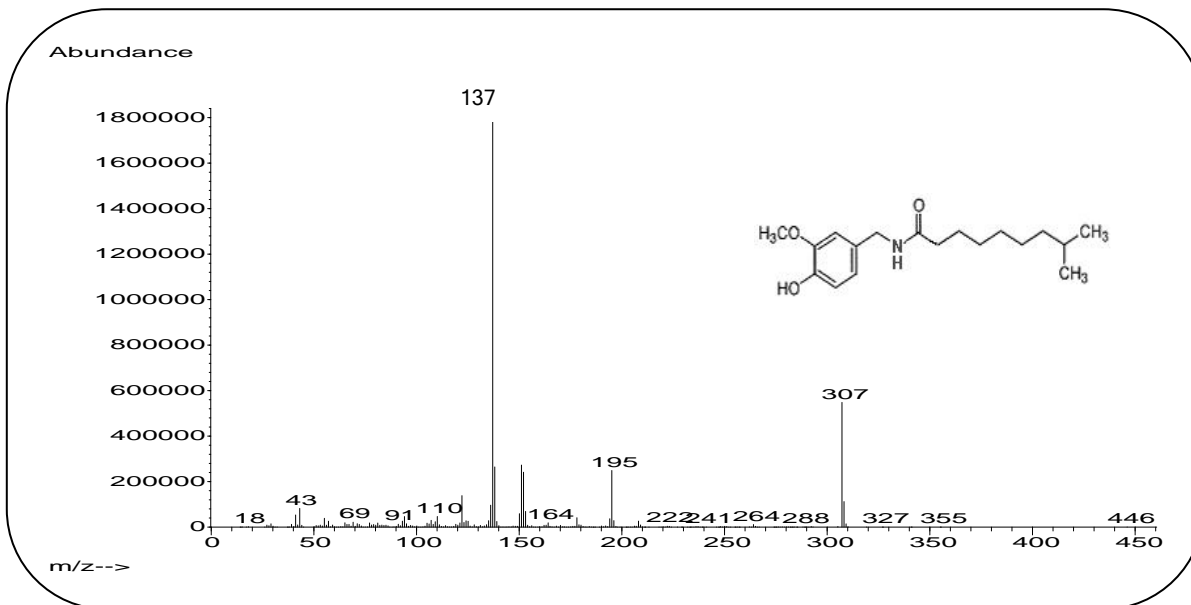
**Espectro 2.** Compuesto identificado Nonivamida



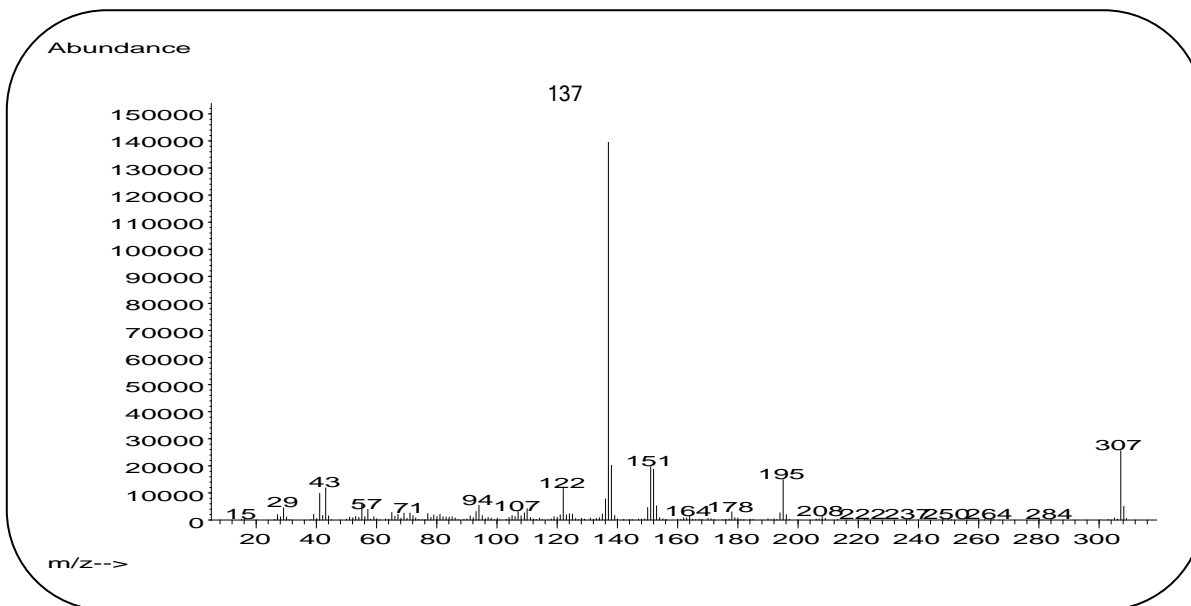
**Espectro 3.** Compuesto identificado Capsaicina



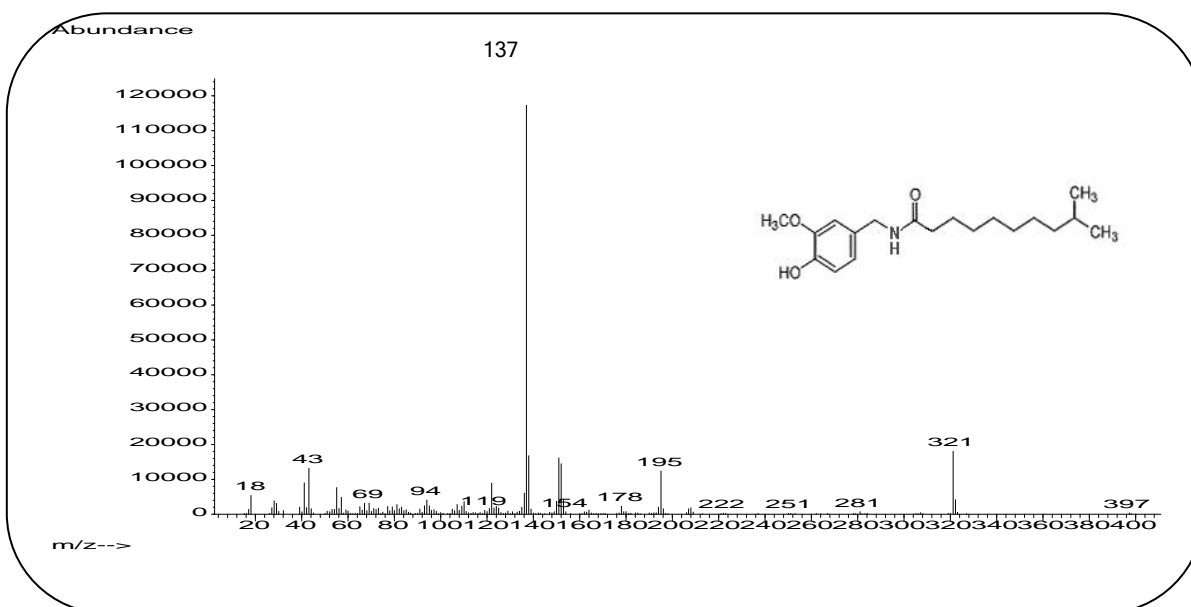
**Espectro 4.** Compuesto identificado Dehidrocapsaicina



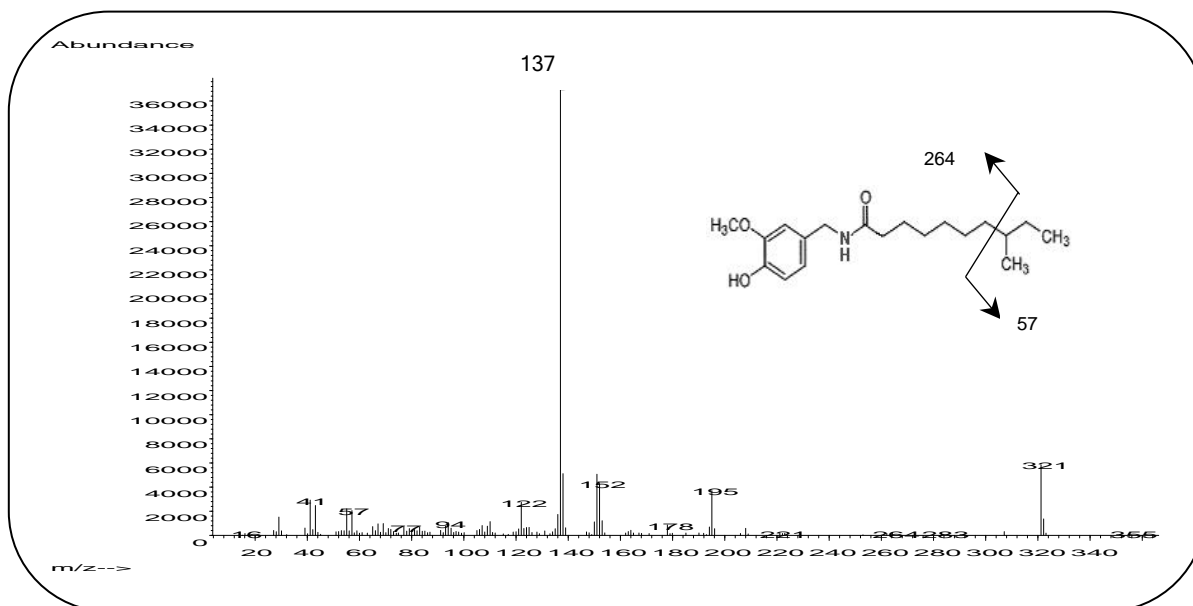
**Espectro 5.** Compuesto no identificado



**Espectro 6.** Compuesto propuesto Homodehidrocapsaicina I



**Espectro 7. Compuesto propuesto Homodehidrocapsaicina II**



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. FAO Statistics Division, **Estadísticas de Producción de Chile Fresco y Seco**, FAOSTAT, 2007 (<http://faostat.fao.org>). Última revisión Marzo de 2007.
2. Consejo Nacional de Productores de Chile (CONAPROCH), **Análisis y diagnóstico de la situación actual del sistema producto**, 2007 ([www.conaproch.org/sp.htm](http://www.conaproch.org/sp.htm)). Última revisión Marzo de 2007.
3. Perucka, I., Oleszek, W., L., **Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high performance liquid chromatography**, *Food Chemistry*, 71:287-291, 2000.
4. Choi, S., Suh, B., Kozukue, E., Kozukue, N., Levin, C., y Friedman, M., **Analysis of the Contents of Pungent Compounds in Fresh Korean Red Peppers and in Pepper-Containing Foods**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:9024-9031, 2005.
5. Kozukue, N., Han, J., Kozukue, E., Lee, S., Kim, J., Lee, K., Levin, C, y Friedman, M., **Analysis of Eight Capsaicinoids in Peppers and Pepper-Containing Foods by High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:9172-9181, 2005.
6. Reilly, C., Crouch, D., Yost, G., Fatah, A., **Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin, and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry**, *Journal of Chromatography*, 912:259–267, 2001.
7. Brett V. Thomas, B., Schreiber, A., y Weisskopf, C., **Simple Method for Quantitation of Capsaicinoids in Peppers Using Capillary Gas Chromatography**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:2655-2663, 1998.
8. Manirakiza P., Covaci A., Schepens P., **Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography with Mass Spectrometric Determination of Capsaicin and Some of its Analogues from Chili Peppers (*Capsicum spp.*)**, *Journal of AOAC International*, Vol. 82, No. 6, pp. 1399-1405, 1999.
9. Spicer, O., Almirall, J., **Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics**, *Talanta*, 67:377-382, 2005.

10. Hawer, W., Ha, J., Hwang, J., y Nam, Y., **Effective separation and quantitative analysis of major heat principles in red pepper by capillary gas chromatography**, *Food Chemistry*, 49:99-103, 1994.
11. Garcés-Claver, A., Arnedo-André, M., Abadía, J., Gil-Ortega, R., y Álvarez-Fernández, A., **Determination of Capsaicin and Dihydrocapsaicin in *Capsicum* Fruits by Liquid Chromatography-Electrospray/Time-of-Flight Mass Spectrometry**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:9303-9311, 2006.
12. Schweiggert U., Carle R., Schieber A., **Characterization of major and minor capsaicinoids and related compounds in chili pods (*Capsicum frutescens* L.) by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry**, *Analytica Chimica Acta*, 557: 236-244, 2006.
13. López Riquelme, G., **Chilli, la especia del Nuevo Mundo**, *Ciencias*, 69:66-75, 2003.
14. Salinas C., J., **Efecto de la aplicación de enzimas peroxidases exógenas sobre el contenido de carotenoides y capsaicinoides en harina del chile**. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. pp. 5-8, 35-41, 2004.
15. Hundal, S., Dhall, R., **Breeding for Hybrid Hot Pepper**, *Journal of New Seeds*, Vol. 6, No. 2/3, pp. 31-74, 2004.
16. Rajiput, J., Parulekar, Y., *El Pimiento*, en Salunke, D., Kadam, S. (editores), **Tratado de Ciencia y Tecnología de las Hortalizas**, Acribia, Zaragoza, España, pp. 203-225, 2004.
17. Rosa A., Deiana M., Casu V., **Antioxidant activity of Capsaicinoids**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:7386-7401, 1999.
18. Rivas A., **Chipotle sabor sofisticado**, suplemento Buena Mesa, *Reforma*, Abril, Ciudad de México, México, pp. 1,4, 2006.
19. Fenema O., **Química de los alimentos**, Acribia, 2<sup>da</sup> edición, Zaragoza, España, pp. 675-676, 1995.
20. Díaz J., Pomar F., Bernal A., Merino F., **Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum annuum* L.**, *Phytochemistry Reviews*, 3:141-157, 2004.
21. Estrada, B., Bernal, M., Díaz, J., Pomar, F., y Merino, F., **Capsaicinoids in Vegetative Organs of *Capsicum annuum* L. In Relation to Fruiting**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:1188-1191, 2002.

22. Clappham, D., **Some like it hot: spicing up ion channels**, *Nature*, 389:783-785, 1997.
23. Kaale, E. Van Schepdael, A. Roets, E. Hoogmartens, J., **Determination of capsaicinoids in topical cream by liquid-liquid extraction and liquid chromatography**, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30:1331-1337, 2002.
24. Ahuja K., Kunde D., Ball M., **Effects of Capsaicin, Dihydrocapsaicin and Curcumin on Copper-Induced Oxidation of Human Serum Lipids**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 6436-6439, 2006.
25. ASTM, **Standard Test Method for Sensory Evaluation of Oleoresin Capsicum**, *Annual Book of ASTM Standards*, pp. 72-75, 1991.
26. Krajewska, A., Powers, J., **Gas Chromatography of Methyl Derivatives of naturally occurring capsaicinoids**, *Journal of Chromatography*, 409:223-233, 1987.
27. Krajewska, A., M., Powers, J., **Pentafluorobenzoylation of capsaicinoids for Gas Chromatography with Electron-Capture Detection**, *Journal of Chromatography*, 457:279-86, 1988.
28. Sato, K., Sasaki, S., Goda, Y., Yamada, T., Nunomura, O. Ishikawa, K., Maitani, T., **Direct Connection of Supercritical Fluid Extraction and Supercritical Fluid Chromatography as a Rapid Quantitative Method for Capsaicinoids in Placentas of *Capsicum***, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:4665-4668, 1999.
29. Perva-Uzunalic A., Skerget M., **Extraction of chilli pepper (var. Byedige) with supercritical CO<sub>2</sub>: effect of pressure and temperature on capsaicinoid and colour extraction efficiency**, *Food Chemistry*, 87: 51-58, 2004.
30. Karnka, R., Rayanakorn, M., Watanesk, S., **Optimization of High-Performance Liquid Chromatographic Parameters for the Determination of Capsaicinoid Compounds Using the Simplex Method**, *Analytical Sciences*, 18: 661-665, 2002.
31. Poyrazoglu E., S., Yemis O. , **Determination of capsaicinoid profile of different chilli peppers grown in Turkey**, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:1435-1438, 2005.

32. Barbero, G., Palma, M., Barroso, C., **Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**, *Analytica Chimica Acta*, 578: 227–233, 2006.
33. Nyberg, N., Baumann, H., Kenne, L., **Application of solid-phase extraction coupled to an NMR flow-probe in the analysis of HPLC fractions**, *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39:236-240, 2001.
34. Thompson, R., Pennino, M., Brenner, M., Mehta, M., **Isolation of individual capsaicinoids from a mixture and their characterization by  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry**, *Talanta*, 70:315–322, 2006.
35. Laskaridou-Monnerville, A., **Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin by micellar electrokinetic capillary chromatography and its application to various species of *Capsicum*, Solanaceae**, *Journal of Chromatography A*, 838:293–302, 1999.
36. Perkins. B., Bushway, R., Guthrie, K., **Determination of Capsaicinoids in Salsa by Liquid Chromatography and Enzyme Immunoassay**, *Journal of AOAC International*, Vol. 85, No. 1, pp. 82-85, 2002.
37. Horwitz, W. (ed.), **AOAC Official Method 995.030 Capsaicinoids in *Capsicums* and their Extractives (Liquid Chromatographic Method)**, *Official Methods of Analysis of AOAC International*, pp. 14-16, 2000.
38. Pawliszyn, J., **Solid Phase Microextraction**, Wiley-VCH Inc., New York, U.S.A., 1997.
39. Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J., **Applications of solid-phase microextraction in food analysis**, *Journal of Chromatography A*, 880:35-62, 2000.
40. Mazida, M., Salleh, M., Osmana, H., **Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME)**, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18:427-437, 2005.
41. De la Calle, D., Reinchenbacher M., **Analysis of Wine Bouquet Components Using Headspace Solid-Phase Microextraction Capillary Gas Chromatography**. *Journal High Resolution Chromatography*, Vol. 21, 7: 373-377, 1998.



42. Fitzgerald G., James K. J., **Characterization of whiskeys using Solid-Phase Microextraction with Gas Chromatography-Mass Spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, 896:351-359, 2000.
43. López R., Aznar M., **Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection**, *Journal of Chromatography A*, 966 :167-177, 2002.
44. Rodríguez-Bencomo J., **Determination of mayor compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography**, *Journal of Chromatography A*, 991:13-22, 2003.
45. Vallejo-Córdoba P., **Tequila Volatile Characterization and Ethyl Ester Determination by Solid Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:5567-5571, 2004.
46. Palmer P.T., **Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Encyclopedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation, San Francisco State University, California, U.S.A., Vol. 13, pp 11728.
47. Skoog D.A., Holler F. J., Mieman, T.A., **Principios de Análisis Instrumental**, Mc Graw Hill, 5<sup>a</sup> edición, Madrid, España, 2001.
48. Mc Nair, H. M. & Miller, J. M., **Basic Gas Chromatography**, Editorial John Wiley & Sons Inc., 1<sup>st</sup> edition, New York, U.S.A., 1998.
49. Tomiaga, M., **Molecular Mechanisms of Trigeminal Nociception and Sensation of Pungency**, *Chemical Senses*, Vol. 30, Suppl 1, pp. 191-192, 2005.
50. Wohleb, R., **Direct vial surface sorbent micro extraction device and method**, *United States Patent and Trademark Office*, 2005.
51. Miller J. N., Miller J. C., **Estadística y Quimiometría para Química Analítica**, Prentice Hall, 4<sup>a</sup> edición, Madrid, España, 2002.
52. McLafferty F. W., **Interpretación de los espectros de masas**, Reverté, Barcelona, España, 1969.
53. Silverstein R. M., Clayton B. G., **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 2<sup>nd</sup>, John Wiley & Sons, Inc., California, U.S.A., pp 8-9, 1967.

54. Budavari, S. y cols., **The Merck Index**, 30<sup>a</sup> edition, Merck & Co., Inc., New Jersey, U.S.A., pp 1760-1761, 2001.
55. **The Science Finder Scholar 2006**. *America Chemical Society*. Última revisión Febrero 2007.
56. Fessenden R. J., Fessenden J. S., **Química Orgánica**, Grupo Editorial Iberoamericana, 2<sup>a</sup> edición, Distrito Federal, México, 1983.