



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización del Aroma de Chiles por
Extracción SPME y Analizado por CG/EM.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A
NAHOLI DAVID ALEJANDRI RAMÍREZ



MEXICO, D.F.

2008



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: HUMBERTO RAMÓN GÓMEZ RUÍZ
Vocal: FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS
Secretario: ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ
1^{er} Suplente: LUZ SANDRA SÁNCHEZ DEL ÁNGEL
2^o Suplente: ERIKA MARÍA RAMÍREZ MAYA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 108 de Espectrometría de Masas. Departamento de Química
Analítica.
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. HUMBERTO RAMÓN GÓMEZ RUÍZ

SUSTENTANTE:

NAHOLI DAVID ALEJANDRI RAMÍREZ

Agradecimientos

A Jehová, por darme de lo bueno y de lo malo, y quitarme de lo bueno y de lo malo. Y porque cuando me quita de lo bueno y me da lo malo, también me da fuerza, sabiduría o la compañía y el apoyo de los que me aman. Y cuando me da de lo bueno y me quita de lo malo, también me da alegría, tranquilidad o libertad para compartirlo con los que amo.

A mis padres, por su enseñanza, confianza y amor.

Al Hepy que ha sido siempre un ejemplo a seguir gracias por tus consejos, estar siempre conmigo y ayudarme a crecer.

A la Hemy que me ha tenido tanta paciencia por su apoyo todos estos años, por su comprensión y ayudarme a que este momento llegara.

A mis hermanas, Yun y Yur, por aguantar mis chacaladas y entenderme, compartir tantas cosas y cuidarme.

A la UNAM y a la Facultad de Química, por darme la oportunidad y el orgullo de ser PUMA. Por ser el lugar en el que encontré mi destino y mi destino me encontró a mí, por darme tantas lecciones y ser testigo de mi crecimiento.

Al Maestro Humberto Gómez, por ser un excelente profesor y compartir conmigo sus experiencias y conocimientos; por su paciencia, apoyo, confianza y afecto.

A la Dra. Araceli Peña, por su amabilidad, paciencia y por sus valiosas sugerencias y aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la Maestra Fany, por su generosidad científica y valiosas críticas al discutir los resultados de este trabajo. Además de su comprensión y constante estímulo.

A la Maestra Lucía Hernández, por hacer más amenas las tardes de vapores de bromo y compartir sus conocimientos y apoyarme cuando lo he necesitado.

A todos mis profesores, en especial a Rodolfo Fonseca, Ruth Martin y José Sámano; por enseñarme que la pasión y la humildad son los ingredientes más importantes para el éxito en cualquier campo.

A mis amigos, Víctor, Toño, Daniel, David, Paul, Napoleón, Bryan, Ken, Robert, Marcus y Peter; por ayudarme tanto en mi desarrollo personal, me han dado muchas lecciones invaluable e inolvidables y me han dado a su modo lo mejor de ustedes.

A mis amigas Priscila, Aída, Paula y Alma; sin ustedes esto podría haber parecido un infierno, gracias por todo su apoyo y su amistad.

A mi Albis:

Gracias por ayudarme a darle a mi vida múltiples sentidos.

Gracias por enseñarme a ver en mí a un humano y disfrutar de mi debilidad y mis limitaciones.

Por estar a mi lado y compartir tu vida con la mía.

Por ser la mejor mujer y mi tesoro, por amarme como me amas y cuidarme como cuidas.

Albita, te dedico mi tesis con todo mi amor.

TE AMO.

A todos los que no están en este papel pero están conmigo. ¡Muchas gracias!

-Índice

	Página
1	Introducción..... 1
2	Antecedentes 2
2.1	Capsicum..... 2
2.1.1	Taxonomía..... 2
2.1.2	Perspectiva Histórica 3
2.1.3	Importancia Comercial..... 4
2.1.4	Composición Química y Aporte Nutricional 5
2.1.5	Chiles Procesados..... 8
2.1.6	Oleorresinas 9
2.2	Aroma..... 9
2.2.1	Precepción del Sabor y del Aroma 10
2.2.2	Técnicas Analíticas para la Evaluación del Aroma 11
2.3	Cromatografía de Gases (CG) 15
2.3.1	Principios de Cromatografía 15
2.3.2	Principios de Cromatografía de Gases (CG) 17
2.4	Espectrometría de Masas (EM)..... 19
2.4.1	Principios de Espectrometría de Masas (EM)..... 20
2.5	Sistemas Acoplados CG/EM 24
2.6	Microextracción en Fase Sólida (SPME) 25
2.6.1	Principios de SPME..... 25
3	Objetivos 32
4	Desarrollo Experimental 33
4.1	Muestras 33
4.2	Materiales y reactivos 33
4.3	Equipo 34
4.4	Metodología..... 34
4.4.1	Preparación de las muestras..... 34
4.4.2	Optimización de la extracción..... 35

4.4.3	Optimización de la separación	36
4.4.4	Optimización de la inyección	38
4.5	Identificación de los componentes del aroma de los chiles.....	38
5	Resultados y Discusión	39
5.1.1	Optimización de la extracción.....	39
5.1.2	Optimización de la separación	47
5.1.3	Optimización de la inyección	50
5.2	Análisis de diferentes tipos de chiles.	51
5.3	Identificación de los componentes del aroma de los chiles.....	51
5.4	Composición del aroma de las diferentes variedades de chiles.	52
6	Conclusiones.....	53
7	Bibliografía.....	55
	Apéndice I.....	57
	Apéndice II.....	65

1 Introducción

El género *Capsicum*, miembro de la familia solanácea, es cultivado extensamente alrededor del mundo y utilizado para aderezar los alimentos, especialmente debido a su pungencia característica, y sus atractivos aroma y color.

A pesar de la atención dada a la pungencia de los chiles, relacionada al contenido de capsaicina, el olor juega un importante rol en el sabor de este tipo de alimentos y en la aceptación de los consumidores.

El análisis de compuestos volátiles potencialmente relacionados con el aroma de los chiles ha sido un reto para muchos investigadores, ya que se han identificado un gran número de compuestos volátiles, pero sólo una pequeña fracción de ellos contribuye a sus atributos sensoriales.

Los métodos actuales para determinar la calidad de los chiles, y sus productos derivados, no contienen información de la cantidad y calidad de los compuestos que componen el aroma de los mismos, y los cuales le dan su valor real. Por esto, es necesario el desarrollo de un método de análisis que tome en cuenta la importancia del perfil aromático de los chiles como parámetro de calidad de los mismos.

En el análisis de los componentes del aroma, las técnicas de preparación de muestras más comunes son: extracción con disolventes, destilación por arrastre con vapor, análisis de espacio sobrenadante, entre otras. Estos métodos son laboriosos, tardados y caros y pueden conducir a conclusiones erróneas acerca del aroma intacto de los chiles, relacionadas con artefactos introducidos debido al intervalo de tiempo requerido entre la preparación de la muestra y los pasos en interacción con el disolvente. Una técnica para la preparación de muestras para la evaluación de compuestos volátiles en chiles debe ser simple, rápida, barata y compatible con los instrumentos analíticos.

La microextracción en fase sólida, SPME (por sus siglas en inglés), es una técnica alternativa, rápida, que no requiere de disolventes. Esta técnica no solo es más rápida, sino que produce extractos más limpios que las extracciones líquido-líquido o líquido-sólido.

Desarrollar un método para el análisis del aroma del chile utilizando las ventajas que da dicha técnica puede ayudar a obtener perfiles de aroma más confiables. El desarrollo de este método podría traer como resultado, la generación de patrones para la elaboración de saborizantes correspondientes a las diferentes variedades de chile sin que su sabor este necesariamente asociado al picor característico de este alimento, así como estándares para el control de calidad de los chiles con base a su sabor y no sólo con base a su apariencia como actualmente se realiza.

2 Antecedentes

.1 Capsicum

El género *Capsicum*, miembro de la familia de las solanáceas, lleva en algunas culturas occidentales un nombre relacionado con la pimienta; por ejemplo, en inglés se llama chili pepper; en francés, piment enragé o poivre rouge; en italiano peperone y pimentão picante en portugués. Sin embargo, no tiene ninguna relación con las pimientos de la familia de las piperáceas.^{1,2}

La palabra “chile” es una variación de “chilli” derivada del dialecto náhuatl (Azteca), mientras que “aji” es una variación de “axi” del arahuaco. Aunque el chile es conocido por diversos nombres dentro de un mismo país, e incluso en diferentes estados y provincias, el nombre botánico del chile es *Capsicum*. La palabra proviene de la base griega “Kpto” que significa “morder o picar”, en referencia al picor o pungencia.³

La función principal del chile, ha sido la de modificar, desde hace miles de años, los sabores del régimen alimenticio básico del mexicano, estimulan el apetito, agregan aroma y textura al alimento, y crean atractivo visual en los platillos.⁴

El chile es uno de los elementos más importantes en la dieta mexicana; más que cualquier otro ingrediente, el chile identifica a la comida mexicana, tanto nacional como internacionalmente. Los chiles son consumidos por todos los niveles sociales en México y por tanto puede ser considerado un común denominador entre las clases sociales y uno de los rasgos que identifican a los mexicanos.

.1.1 Taxonomía

La posición taxonómica del chile puede ser representada de la manera siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Género: *Capsicum*.

El género *Capsicum* comprende una muy amplia gama de variedades, variando en forma, color, pungencia y posición de los frutos. Las características florales, no obstante, muestran considerable consistencia y son útiles para identificación taxonómica. El género ha sido clasificado con base en características morfológicas y más recientemente en características genéticas.³

Los estudios genéticos encuentran similitudes entre el grupo *C. annuum* y los grupos *C. frutescens* y *C. chinense*.

Como su nombre lo indica *Capsicum annuum* es una planta anual que, sin embargo, suele crecer como perenne en zonas tropicales. Esta especie se describe de la siguiente forma: Las plantas cultivadas crecen a una altura de 30 a 75 cm, según el tipo de chile al que pertenezcan y

las condiciones ambientales en las que se encuentran. Los pedúnculos son solitarios, rara vez se presentan en pares en el mismo nódulo, y generalmente están colgantes. Las flores son de corola, de tono blanco lechoso, con anteras azules o moradas; el cáliz es dentado. Existe una gran variedad en la forma y el tamaño del fruto, de tono verde o amarillo en el estado tierno, pero adquiere color rojo, amarillo ó café en el maduro.

La especie *frutescens* es una de las especies más conocidas comercialmente por su uso como base en la elaboración de la salsa Tabasco, de procedencia americana. Las plantas cultivadas miden entre 40 y 75 cm, tienen dos o más pedúnculos por nódulo, y cáliz truncado o ligeramente dentado. La corola es de color amarillento o blanco verdoso, con anteras azules o moradas. El fruto crece tanto en posición erecta como colgante y tiene una gran variedad de formas. Es de color verde o amarillo en su estado tierno, y se convierte en un tono al rojo vivo al madurar.

La especie *chinense* se conoce en México con el nombre popular de “chile habanero” y se cultiva principalmente en la península de Yucatán. La planta crece a una altura de 40 a 75 cm, tiene de 3 a 5 flores por nódulo, con pedúnculos generalmente declinantes. El cáliz carece de dientes, pero presenta una indentación marcada entre la base y el pedúnculo. El color más común de la corola es blanco mate con anteras azules o moradas. Su fruto puede ser de forma esférica o alargada, con el pericarpio liso ó arrugado, de colores anaranjado, amarillo, salmón, rojo o café. Las semillas son arrugadas y se le considera el grupo más picante de todos los chiles.

La especie *baccatum* se describe como hierba o arbusto pequeño, que alcanza entre 1 y 1.5 m de altura. En general presenta una sola flor por nódulo, con cáliz dentado y corola blanquizca, de seis o más segmentos y con manchas amarillentas, verdosas o cafés en la base de cada lóbulo. Las anteras son amarillas con filamentos largos. El fruto tiene varias formas, pero generalmente se desarrolla de manera alargada y cae en posición colgante de la planta; rara vez toma una posición erecta. Madura en varios tonos de café, rojo, anaranjado, y amarillo limón. Las semillas son de color crema o amarillo. El grupo se identifica con facilidad por las manchas amarillentas o parduzcas en la base de la corola.

La especie *pubescens* es la única especie cultivada de flores moradas. Sus características generales corresponden a una hierba o arbusto trepador que puede alcanzar una altura de tres metros. Es perenne, con duración de 4 a 5 años, y tolera bajas temperaturas; generalmente las flores son solitarias, de cáliz dentado y corola de color violeta, con el centro blanco y anteras moradas. El fruto es de forma globular o alargada y cae en posición colgante en la planta.¹

Las especies *baccatum* y *pubescens*, tienen una distribución geográfica mucho más limitada que las especies *annuum*, *chinense* y *frutescens*.

.1.2 Perspectiva Histórica

Se cree que el chile se originó en la región andina de Bolivia, Perú, y Ecuador hace casi 10,000 años.⁴

El chile es una de las primeras plantas domesticadas en América Central. En el valle de Tehuacán (Puebla), que es uno de los mejores ejemplos documentados de asentamientos en Mesoamérica, existe evidencia arqueológica del consumo de chile en fechas anteriores al séptimo milenio a. C., mucho antes del cultivo de maíz y frijol. Los primeros hallazgos de chile (en coprolitos y restos carbonizados) probablemente fueron cosechados en su hábitat natural. No obstante chiles domesticados similares a las variedades modernas tanto en tamaño y forma

pueden ser encontrados desde el quinto milenio hacia adelante. Parece que los nativos de América comenzaron a domesticar los chiles entre los años 5200 y 3300 a. C.²⁻⁴

Los Aztecas, Mayas e Incas utilizaron el chile como base de su alimentación y tenían el chile en tan alta estima que lo retiraban de su dieta cuando ayunaban para ganar favores y complacer a los dioses.

Para el tiempo en que los españoles llegaron a México en el siglo XVI, los aztecas cosechaban docenas de variedades de chiles. El día de hoy, todas las variedades domesticadas son derivadas de cinco especies domesticadas de chile, y ninguna difiere sustancialmente de aquellas domesticadas por los nativos americanos.^{2,4}

Las distribuciones originales de las especies de *Capsicum* parecen haber sido desde el sur de México extendiéndose hacia Colombia.

Cristóbal Colón fue uno de los primeros europeos en encontrar al chile, y lo llamo "Pimiento" debido a su similitud en sabor con las pimientas del Viejo Mundo del género *Piper*.

Los europeos observaron que el chile era un colonizador natural, fácil de transportar, y que permanece viable por varios años. Como consecuencia el chile fue llevado hacia España y rápidamente se propagó hasta otras partes del mundo. Los portugueses llevaron el chile a sus colonias alrededor del mundo, incluyendo África, Arabia, y Asia, donde creció rápidamente.⁴

En aquellos tiempos remotos, las especias fueron símbolo de status para las personas ricas que las comían en Europa y a través del Mediterráneo. Las especias tuvieron un enorme valor comercial, no sólo como saborizantes, sino como medicina, conservadores, y perfumes.

A diferencia de las especias exóticas y raras llevadas a Europa, que eran costosas e inasequibles excepto para las clases altas, el chile crece cómodamente en los climas tropicales de Asia y estuvo disponible rápidamente a la gente común.

La mayoría de la gente no es tan aventurada cuando se trata de nuevos alimentos, simplemente no comemos alimentos desconocidos. Sin embargo, el chile fue aceptado e integrado rápidamente en las cocinas del mundo. El chile fue incorporado tan rápidamente en los alimentos de Asia que en los años 1700 un taxónomo francés confundió el origen de una de las especies y la llamó *Capsicum chinense*.²

.1.3 Importancia Comercial

Aunque hay algunas cifras de producción disponibles, el estimado total del comercio internacional de *Capsicum* es muy difícil de estimar. Durante finales de los 90 se estimó que la producción mundial total de chile fue de alrededor de 25 millones de toneladas. La producción de chile crece año con año mientras los consumidores desarrollan más y más el gusto por este alimento.³

Los productores más importantes son: India, México, China, Pakistán, Corea, y Bangladesh. México produce el 8.22 % de la producción mundial de chile en fresco, ocupando el segundo lugar a nivel mundial y es el tercer país exportador de la hortaliza.^{3,5}

La producción nacional en 2006 alcanzó una cifra estimada de un millón 800 mil toneladas, principalmente de chile verde y, en menor medida, chile seco, con un valor de 10 mil 900 millones

de pesos; es una muy importante actividad generadora de empleos, al ocupar 29 millones de jornaleros en el campo.⁵

Los mexicanos somos los mayores consumidores de chile en el mundo con un promedio anual de ocho kilos por habitante.⁵

En casi todo el país se cultiva el chile, los productores más importantes son los estados de Zacatecas, Sinaloa, Chihuahua y Nayarit.¹ Zacatecas ocupa el primer lugar en producción con el 47% y en superficie cosechada con el 54%, manteniendo esta posición en los últimos cinco años.⁵

Casi todos los chiles cultivados en México pertenecen a la especie *annuum*. A la vez, es el grupo de más importancia económica en el mundo y de distribución geográfica más amplia. Se cultiva en todos los países especialmente en los del Tercer Mundo.

No es fácil describir el cultivo del chile actualmente en términos generales, ya que hay grandes variaciones según las condiciones ambientales, y culturales de cada zona. Hay regiones en las que utilizan tecnología agrícola avanzada para la producción comercial orientada a la exportación; en cambio, en las zonas de pocos recursos económicos y de bajo nivel cultural tienden a conservar los métodos y las herramientas tradicionales.¹

En México hay más variedades de chiles cultivados que en cualquier otro país, es posible sembrar casi todos los tipos en cualquier zona, aunque algunos se adaptan mejor a ciertas condiciones ambientales que otros, esto ha generado la especialización regional en la producción de algunos de ellos. La variedad de chiles que existen en México, la producción que se registra prácticamente durante todo el año, son condiciones que favorecen el desarrollo del cultivo en el territorio nacional.⁵

En México hay al menos 150 tipos de chile conocidos, algunos de los más comunes están listados por especie en la Tabla 1.

Tabla 1. Especies y variedades de chiles⁴

Especie	Variedades
<i>C. annuum</i>	Ancho, cascabel, chilacate, de árbol, güero, pasado, chilhuacle negro, chipotle, fresno, guajillo, jalapeño, mirasol, mulato, pasilla, poblano, dulce, Santa Fé, serrano, típico.
<i>C. annuum</i> (Variedad Avicular)	Pájaro, chiltepín, piquín, ululte, parado, costeño.
<i>C. chinense</i>	Habanero, Uxmal.
<i>C. pubescens</i>	Rocoto, manzano, perón, canario, caballo.
<i>C. baccatum</i>	Cusqueño, ají amarillo, escabeche, cuerno de oro.
<i>C. frutescens</i>	Tabasco.

.1.4 Composición Química y Aporte Nutricional

Debido a que el chile, como la mayoría de las especias, es usado en pequeñas cantidades como “aditivos alimentarios” únicamente, contribuye muy poco en la nutrición humana. No obstante, las especias juegan indirectamente un papel extremadamente valioso en una buena nutrición ayudando a aumentar el atractivo y la apreciación de alimentos que son nutricionalmente importantes para nosotros.

Los frutos de la mayoría de las especies de *Capsicum* contienen cantidades significativas de vitaminas D, C, E y provitamina A cuando se encuentran frescos (ver Tabla 2). Además, gracias a que el chile no contiene grasa, ni colesterol, es muy bajo en sodio y en calorías, es un gran aditivo para una dieta saludable.²

El chile, estimula el apetito, aumenta la secreción salival y funciona como tónico del jugo gástrico.¹

En la Tabla 2, se menciona el aporte de nutrimentos de diferentes variedades de chiles. La información que en ella aparece se tomó de las tablas de valor nutritivo de los alimentos del Instituto Nacional de Nutrición, “Salvador Zubirán”, 1982.

Tabla 2. Composición química de algunas variedades de chiles.

	Proteína (g)	Grasas (g)	Hidratos de Carbono (g)	Tiamina (mg)	Niacina (mg)	Retinol (IU)	Vitamina C (mg)
CHILES FRESCOS							
Cristalino	1.7	0.2	7.3	0.12	1	13	252
Chilaca	1.5	0.3	7.3	0.08	1	194	178
Habanero	2.2	0.8	5.3	0.11	0.7	59	94
Jalapeño	1.2	0.1	5.3	0.06	0.6	28	72
Poblano	2.6	0.6	10.4	0.14	1	41	364
Largo	2.7	0.2	2.6	0.21	1.4	42	120
Serrano	2.3	0.4	7.2	0.14	0.05	56	65
CHILES SECOS							
Ancho	11.5	9.8	62.7	0.18	5.3	3081	76
Cascabel	12.9	6.4	63.6	0.22	8.9	1716	55
Guajillo	11.6	8.6	56.7	0.19	4.8	3281	100
Morita	13.2	5.4	61.6	0.22	15	993	79
Mulato	9.6	5.1	65	0.22	5.3	4333	108
Pasilla	12.7	9.6	60.5	0.37	8.6	9030	68
Piquín	14.4	6.4	64.9	0.32	14.5	500	36

Fuente: Tablas de valor nutritivo de los alimentos del Instituto Nacional de Nutrición, “Salvador Zubirán”

Se ha comprobado que el chile tiene además propiedades laxantes, anti-irritantes, analgésicas, rubefaciente, tónico gástrico, y estimulante. Se ha comprobado también que la capsaicina, compuesto químico que da lo picante al chile, actúa como agente contra el dolor al reaccionar con un elemento llamado sustancia P que participa en los mecanismos nerviosos de la transmisión del dolor. Cremas hechas con la capsaicina a partir de chiles son el medicamento tópico más recomendado para combatir la artritis.²

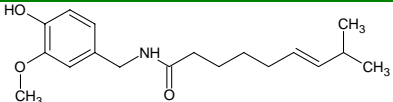
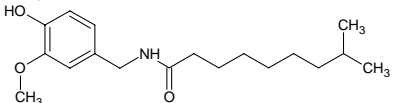
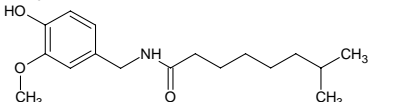
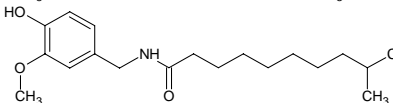
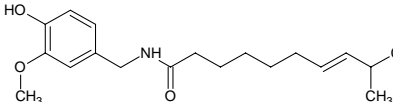
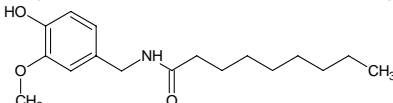
Otra Propiedad que tiene el chile es su poder antioxidante, lo que permite que al ingerir cantidades adecuadas de este y otros alimentos de origen vegetal principalmente, se pueda lograr una disminución en la oxidación de lípidos y oxidaciones enzimáticas, retardándose así el desarrollo de algunas enfermedades crónicas, incluyendo problemas de corazón y cáncer. Los componentes químicos y fotoquímicos de las plantas verdes, pueden mejorar una serie de pasos

relacionados con la carcinogenesis, especialmente los mecanismos relacionados con la modulación de reacciones de peróxidos de lípidos.

El género *Capsicum* se caracteriza popularmente por ser un condimento picante. Este factor está determinado por la cantidad de capsaicinoides en el fruto, estos se encuentran principalmente en sacos a lo largo de la pared interna del fruto o placenta. Diferentes combinaciones de estos capsaicinoides producen las características de pungencia de las variedades de chiles individuales.²

Existen 14 capsaicinoides conocidos, entre ellos la capsaicina, que es la forma más común. Es un compuesto fenólico, de color ligeramente amarillo y virtualmente no tiene sabor ni olor; es insoluble en agua caliente y soluble en éter, alcohol, cloroformo y acetona. Este compuesto químico es tan potente que la persona promedio puede detectar su pungencia a una dilución de 10 ppm.²

Tabla 3. Algunos capsaicinoides identificados en especies *Capsicum*.

Fórmula Estructural	Nombre del capsaicinoide
	Capsaicina
	Dihidrocapsaicina
	Nordihidrocapsaicina
	Homodihidrocapsaicina
	Homocapsaicina
	Nonivamida

La capsaicina está controlada por un gene dominante; los chiles dulces, como el pimiento morrón, carecen de este gene. Su grado de acritud cambia según la variedad del chile y la relación del tejido placentar con sus paredes. Por ello, los pequeños suelen ser más picosos que los de fruto grande.¹

El nivel de pungencia de cualquier chile es afectado por su constitución genética, clima, condiciones de crecimiento, y edad del fruto.²

El poder fisiológico de la capsaicina es evidente para cualquiera que ha consumido chile picante en alguna forma: el corazón comienza a latir rápidamente, la salivación y el sudor aumentan, la nariz comienza a moquear, y el tracto gastrointestinal trabaja excesivamente.²

El aroma característico y sabor del fruto es impartido por el aceite volátil o aceites esenciales. Los componentes químicos que proveen el sabor varían en concentración en diferentes partes del fruto.⁴

Los terpenos usualmente contribuyen a la frescura aromática de la especia, los derivados oxigenados, que incluyen alcoholes, ésteres, ácidos, aldehídos y cetonas son los principales contribuidores a la sensación aromática de una especia. Los compuestos derivados del benceno proveen notas dulces, cremosas, y florales.⁴

.1.5 Chiles Procesados

Los chiles están disponibles en muchas formas: frescos, secos, o congelados; enteros, molidos, picados, como pastas, extractos, o infusiones.⁴

El sabor fresco que los consumidores buscan de los chiles se obtiene inicialmente de su aroma, éste es debido a los componentes volátiles en la especie y pueden perderse durante la cosecha, almacenamiento, procesamiento, o manejo de la misma.⁴

Los chiles enteros frescos tienden a ser muy aromáticos cuando son asados o freídos en aceite. Los aceites esenciales desaparecen rápidamente a altas temperaturas, especialmente si los chiles son procesados en un sistema acuoso, pero también pueden perderse a temperatura ambiente o cuando estos son cortados o dañados.⁴

El sabor está intacto en chiles enteros y se libera más lentamente que el de los chiles molidos, especialmente cuando son sujetos a técnicas de preparación como el freído o el asado. Cocinar o procesar, cambia los componentes químicos del chile y sus proporciones en diferente grado, a menudo dando lugar a diferentes perfiles de sabor. Los chiles también liberan sabores únicos cuando son cocinados. El sabor generalmente es intensificado, chiles que no tienen un aroma muy fuerte en su estado fresco, desarrollan intensos sabores después de ser asados o hervidos.⁴

Cuando son molidos, se genera movimiento rápido de aire y calor que disipa algunos de los aceites volátiles e incluso cambia algunas notas de sabor mediante la oxidación. Esto deja una mayor concentración de compuestos menos volátiles que dan mayor sabor pero menos aroma debido a la pérdida de aceites esenciales.⁴

El chile seco tiene algunas ventajas sobre el fresco: se puede almacenar por varios meses sin que se deteriore, es más ligero para el transporte y su precio es menos fluctuante, no están sujetas a disponibilidad estacional, son más fáciles de procesar, y tienen un menor costo.⁴

Para algunas variedades, las formas frescas tienen diferentes perfiles de sabor que las formas secas. Por ejemplo, ahumar, asar, o secar cierto chile cambia significativamente su sabor y color. Cuando el chile jalapeño es ahumado y secado, cambia su sabor y color completamente, dándole una nueva identidad, llamada chile chipotle.⁴

Algunos chiles son llamados por diferentes nombres cuando son secados. Ejemplos de chiles frescos y secos están listados en la Tabla 4.

Tabla 4. Nombres de algunos chiles en versión fresca y seca.

Chile Fresco	Chile Seco
<i>Jalapeño</i> : acorchado, candelaria, cuaresmeño, espinalteco, huauchinango, tres lomos, peludo, jarocho	Chipotle, morita, típico, huachinango, mora, ahumado, pocchilli
<i>Serrano</i> : verde, Pánuco, serranito	Balín, típico, largo
<i>Poblano</i> : corazón, verdeño, esmeralda	Ancho, mulato, chino, joto
<i>Anaheim</i>	Pasado
<i>Chilaca</i> : apaseo, pabellón	Pasilla, negro, prieto, para deshebrar
<i>Piquín</i> : chiltepín, piquillo	Cascabel, chiltepín, piquín, Cobán
<i>Ají amarillo</i>	Cusqueño
<i>Mirasol</i> : real mirasol, miracielo	Cascabel, puya, trompo, guajillo

.1.6 Oleorresinas

Una oleorresina es el producto obtenido de la extracción por disolvente de especias maduras secas o frescas, picadas o hechas polvo, con la remoción subsecuente del disolvente.

Las oleorresinas tienen el sabor completo, aroma, y pungencia de los chiles frescos o secos ya que contienen los compuestos volátiles y no volátiles, incluyendo resinas y gomas.⁴

Las oleorresinas tienen mayores ventajas sobre el chile seco entero o en polvo; ya que se eliminan las bacterias durante el proceso, esto permite un almacenamiento más prolongado, sin problemas de hongos, insectos o pérdida del color. Las oleorresinas poseen un nivel de picor uniforme. También aportan ventajas económicas ya que no requieren que el fruto sea de primera categoría, por lo que resulta ser la manera más fácil de utilizar los chiles lacrados o maltratados sin disminuir la calidad del producto.

Algunos de los problemas que se presentan en la elaboración de las oleorresinas son debidos al alto contenido de humedad de los chiles utilizados, muy pocos chiles son sometidos a este proceso debido al contenido tan elevado de agua en el mesocarpio que les impide deshidratarse bien. Algunos chiles como el Jalapeño y serrano producen olores y sabores desagradables al convertirlos en oleorresinas, quizás debido a reacciones que se producen con el disolvente.¹ Por lo que el uso de oleorresinas de chile en la industria alimentaria es muy limitado principalmente a oleorresinas de paprika (Pimiento rojo).

.2 Aroma

El consumo de alimentos es esencial para la supervivencia de cada organismo viviente. Fallar en la detección de alimentos contaminados o tóxicos puede tener consecuencias letales. Por lo tanto, no es sorprendente que los humanos utilicen todos sus cinco sentidos para analizar la calidad de sus alimentos. Un primer juicio acerca del valor de un alimento se hace de acuerdo a su apariencia y olor. La comida que se ve y huele atractiva es tomada hacia la cavidad oral. Aquí, basado en un análisis sensorial complejo que no está restringido al sentido del gusto sino también incluye el olfato, tacto y oído, se toma la decisión final de ingerir o rechazar el alimento.⁶

Los sabores y aromas son sensaciones químicas producidas por un vasto número de moléculas liberadas por el alimento durante su consumo. Muchos sistemas sensoriales están involucrados en la detección de sabor dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas estimulantes como volatilidad y solubilidad en lípidos y agua, junto con las propiedades receptivas de diferentes detectores presentes en la nariz y cavidad oral.⁶

.2.1 Precepción del Sabor y del Aroma

Tres modalidades quimiosensoriales, olfativa, gustativa y trigeminal, contribuyen a la percepción del sabor. Son diferentes con respecto a sus respectivos sustratos biológicos pero son difícilmente distinguibles en la experiencia del consumidor. En la vida cotidiana, las personas generalmente no están conscientes de los orígenes de las sensaciones químicas experimentadas durante su alimentación, lo que justifica el uso de la categoría global “flavour” (“gout” en francés). Incluso en condiciones experimentales, aunque los estímulos olfativos y gustativos pueden ser distinguidos a menudo, no es fácil distinguir los estímulos trigeminales de los olfativos y gustativos. La razón es la existencia de interacciones multimodales. Algunas de estas interacciones ocurren a un bajo nivel, cercanas a la fase de recepción; otras resultan de la convergencia de diferentes mensajes sensoriales hacia una o varias aéreas integradoras comunes, a niveles más altos en el cerebro.⁶

.2.1.1 Procesamiento de la Información Olfativa

Ya sea mediante la vía ortonasal o retronasal, las moléculas volátiles interactúan con el epitelio olfativo donde las células sensoriales tienen receptores a los que los odorantes pueden unirse reversiblemente como el primer paso hacia la generación de una señal eléctrica. Las células sensoriales son las neuronas. Una neurona receptora tiene un polo dendrítico conectando pequeños cilios inmersos en la mucosa nasal. La membrana ciliar alberga macromoléculas receptoras. La célula posee un axón que se proyecta al bulbo olfatorio y transporta señales eléctricas producidas por la activación del receptor. En el bulbo olfatorio, los axones sinaptizan con neuronas de segundo orden que, a su vez, se proyectan hacia la corteza olfatoria primaria. De ahí, el mensaje olfativo es enviado a muchas otras áreas en el cerebro.⁶

Los receptores de odorantes son miembros de una super familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Todos tienen la misma estructura general con siete regiones hidrofóbicas transmembranales. Difieren con respecto a sus secuencias de aminoácidos respectivas que son especialmente variables en la tercera, cuarta y quinta regiones de la proteína. Generalmente se piensa que estas regiones “hipervariables” determinan una cavidad de unión con el odorante donde tienen lugar las interacciones ligando-receptor. La estructura de los receptores y sus propiedades no han sido determinadas directamente pero son en mayoría inferidas del análisis de los genes que los codifican.⁶

Estos genes son sorprendentemente numerosos y diversos, y esto está obviamente relacionado a la capacidad de los animales de discriminar entre un número muy grande de odorantes. Los genes olfatorios constituyen la familia más grande de genes en el genoma de los vertebrados. En los humanos, el número de genes olfatorios es menor a mil, además, una gran fracción de ellos (alrededor del 60%) parecen ser no funcionales, se les llama “pseudogenes”.⁶

En general, las células sensoriales muestran una baja selectividad, a menudo respondiendo a una proporción sustancial de odorantes puros utilizados como estímulos, es decir, una célula puede responder a muchos odorantes y un odorante puede estimular muchas células.⁶

La transducción olfatoria es la conversión de la energía de la unión entre odorante-receptor en una señal eléctrica, esta involucra una cascada de reacciones enzimáticas comenzando con la activación de una proteína G. De la transducción olfatoria de las diferentes señales percibidas se forma una representación olfativa, misma que se totaliza con las representaciones trigeminal y gustativa en la corteza cerebral para producir una representación integral del flavour.⁶

.2.2 Técnicas Analíticas para la Evaluación del Aroma

Históricamente, el aroma fue considerado el componente principal del sabor y, así, los químicos saboristas se enfocaron en el estudio de volátiles en alimentos mientras que otra información sensorial fue desatendida. Mientras más aumenta el conocimiento relacionado a la percepción sensorial y se desarrollan relaciones más cercanas con científicos sensoriales, los químicos saboristas han llegado a apreciar la naturaleza multimodal de la percepción humana. De esta manera, ha habido un creciente esfuerzo depositado en la química de la información sensorial no olfativa y sus interacciones para formar la percepción del sabor. Desafortunadamente, nuestro entendimiento de cómo los componentes no volátiles influyen en la percepción del sabor es muy incompleta y por eso las investigaciones desarrolladas se han enfocado en reflejar el conocimiento en el campo de los componentes volátiles.

Tradicionalmente el análisis del aroma de los alimentos se realiza empleando jueces quienes describen las características sensoriales de estos productos. Por necesidad la caracterización sensorial de un juez, es una descripción subjetiva del alimento, lo que hace que la evaluación de dos jueces para un mismo producto pueda diferir de manera importante.

Por otro lado esta caracterización del aroma utiliza descriptores poco útiles desde el punto de vista del químico analítico ya que no pueden ser utilizados como elementos de control de calidad en la producción de los alimentos, en particular del Chile.

.2.2.1 Criterios para la Elección del Método Analítico.

Los componentes del aroma de un alimento pueden ser cientos o miles de moléculas de naturaleza química muy diversa, que se encuentran presentes en diferentes proporciones. De manera que para poder definir un aroma a través de la identificación de los componentes individuales (análisis químico) requiere del empleo de poderosos métodos químicos de separación como la cromatografía de líquidos o la de gases.

Sin embargo, existen numerosos métodos analíticos que se pueden utilizar para abordar un problema de sabor. Se puede simplemente acoplar el método de espacio sobrenadante estático para el aislamiento del aroma con cromatografía de gases, o complicarse utilizando tediosas extracciones de aroma y destilaciones o utilizar la olfatometría. Se debe considerar la naturaleza de la muestra (composición, concentraciones de los componentes aromáticos y propiedades físicas) ya que esta influye en la elección del método analítico. Por ejemplo, la extracción por disolvente de un alimento no sería de gran valor si el alimento contiene lípidos ya que se extraerá no sólo a los compuestos volátiles sino también a los lípidos. Más aún, cada método ofrece diferentes fortalezas y debilidades muy separadas de la capacidad para aislar compuestos del aroma. Los métodos automatizados ofrecen precisión y permiten el análisis de un número mayor de muestras.

La mayor parte de la variación en los resultados finales viene del paso de aislamiento del aroma. Siempre que este proceso pueda ser automatizado, la variación disminuye mejorando el valor de los resultados. La capacidad de manejo de muestras también difiere grandemente con la metodología. Los métodos automatizados hacen posible una operación continua las 24 horas (probablemente 40 o más muestras/día), mientras que métodos tediosos y de intensa labor como el sistema Soxhlet están limitados a una o dos muestras/día.

La estabilidad del método a través del tiempo es crítica, por ejemplo, los absorbentes usados en los métodos de microextracción en fase sólida (SPME) y Stir-bar se pueden deteriorar con el paso del tiempo y el uso, y en consecuencia, puede cambiar el perfil de volátiles obtenido. Los métodos de purga y trampa, extracción por disolvente y destilación, y extracción simultánea son estables a través del tiempo. Es importante considerar la muestra, volátiles de interés, tiempo de análisis y los objetivos del estudio analítico cuando se elige un método analítico.⁶

En términos de objetivos analíticos, uno puede desear:

1. Obtener un aislado completo del aroma para identificar exactamente y cuantificar cada constituyente del aroma en un alimento.
2. Identificar solamente componentes clave de un perfil de aroma, esto es, aquellos componentes que son responsables del aroma característico del alimento.
3. Identificar una mala nota en un producto alimenticio.
4. Monitorear cambios con el tiempo en el aroma.
5. Predecir atributos sensoriales.
6. Determinar si un alimento está adulterado.

Cada una de estas tareas impone diferentes requerimientos en la metodología.

Una de las tareas analíticas más desafiantes es obtener un perfil analítico completo y exacto de los componentes del aroma presentes en un alimento. Las dificultades comienzan con la elección de una muestra para su estudio.⁶

Si se desea obtener el perfil de aroma del chile jalapeño, por ejemplo, ¿qué muestra, o limitado número de muestras de chile jalapeño es representativo de todos los chiles jalapeños? Idealmente el analista seleccionará chiles jalapeños que sean característicos de ese tipo de chile y estén libres de defectos.⁶

Cada persona tiene una expectativa diferente o preferencia por cierto alimento dado. Este problema normalmente se afronta reclutando a un individuo, o grupo de individuos, que tengan experiencia en el sabor y aroma del alimento dado para que realicen la selección de la muestra. Aunque los expertos a menudo están en desacuerdo casi tan ampliamente como los consumidores, existe otra alternativa; el analista debe elegir muestras para el estudio y por lo tanto, asume que no existe un método “perfecto” para hacerlo. De esta forma el analista analizará una muestra, o grupo de muestras, con la esperanza de que sean características del producto que desea caracterizar.⁶

Cada método para el aislamiento del aroma suministra una visión sesgada y única de los compuestos volátiles en el alimento. Así, si uno desea tener una visión completa de los componentes del aroma del alimento, debe utilizar varias técnicas de aislamiento en combinación. Mientras que cada técnica producirá un aislado único del aroma, la combinación de técnicas podría producir una visión cualitativa razonablemente completa del perfil del aroma del alimento.⁶

La tarea de identificar únicamente los compuestos que tienen significancia sensorial puede parecer menos complicada que tener una visión analítica exacta de todos los compuestos del aroma del alimento debido a que están involucrados un número menor de compuestos. Desafortunadamente, esta tarea tiene otros obstáculos que la hacen más complicada. En este caso, no tiene que aislar todos los volátiles del alimento y entonces determinar cuál de estos tiene una contribución sensorial. Determinar cuáles compuestos tienen contribución sensorial ha sido

sujeto de considerable investigación durante los últimos 20 o más años y a pesar de este esfuerzo, se ha tenido un éxito muy limitado.

El problema inicial nuevamente es decidir una muestra apropiada para el estudio. Si se desea determinar los compuestos característicos del aroma del chile habanero, por ejemplo, no se puede analizar todos los chiles habaneros en el mercado para desarrollar una descripción química que abarque todos los chiles habaneros del mundo. Típicamente se seleccionan dos o tres muestras considerados característicos del chile habanero y sirven como modelos de estudio.⁶

La única forma para determinar qué componentes caracterizan el aroma de un alimento es mediante la evaluación sensorial. La aplicación de la evaluación sensorial en este contexto es muy complicada. Se deben utilizar métodos sensoriales para validar la lista de compuestos característicos del aroma.

.2.2.2 Preparación de la Muestra

Debe enfatizarse que la preparación de la muestra es el paso más crítico en todo el proceso analítico de componentes volátiles. La preparación de la muestra es complicada por varios factores:

Nivel de concentración: los niveles de odorante son generalmente bajos, típicamente en los intervalos de ppm, ppb o ppt. Por eso, es necesario no sólo aislar los componentes sino también concentrarlos varios órdenes de magnitud.

Matriz: los volátiles están frecuentemente dentro de las células y deben ser liberados por lisis. La muestra frecuentemente contiene componentes no volátiles como lípidos, proteínas, o carbohidratos, que complican el proceso de aislamiento. Estos componentes pueden crear problemas de formación de espuma y emulsificación durante el procedimiento de aislamiento y pueden crear artefactos si se llegan a inyectar en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases. Los parámetros termodinámicos y cinéticos con una liberación del sabor de los alimentos, dependen no solamente de la composición sino también del estado físico de la matriz; cuando se trata de sistemas sólidos o viscosos, hay más parámetros involucrados; los alimentos reales son a menudo más complejos, con composición y estructura heterogénea.⁶

Complejidad de los aromas: la composición aromática de los alimentos frecuentemente es muy diversa. Complicando el panorama está el hecho de que los componentes presentes cubren los intervalos de polaridad, solubilidad, y pH.⁷

Variación de la volatilidad: los componentes poseen puntos de ebullición que varían desde debajo de la temperatura ambiente hasta aquellos que son sólidos, como la vainillina (p.eb. 81°C).⁷

Estabilidad: muchos componentes en el aroma son inestables y pueden ser oxidados por el aire o degradados por el calor o condiciones ácido-base extremas.

Independientemente de que técnica de preparación de muestra sea empleada, es críticamente importante evaluar la calidad sensorial del aislado. Ninguna técnica resultará óptima para cada muestra, y se deben realizar evaluaciones para asegurar que no ocurra la descomposición y pérdida de componentes deseados.

En la actualidad, los procedimientos más comunes reportados en la literatura para el aislamiento de aromáticos son los métodos de espacio sobrenadante y extracción por disolvente. Otra de las técnicas de preparación de muestra más comunes empleada en la actualidad involucra la destilación por arrastre con vapor seguida de la extracción con disolvente. La ventaja principal es que el paso de destilación separa los compuestos volátiles de los no volátiles. La destilación por arrastre con vapor funciona mejor para compuestos que son ligeramente volátiles e insolubles en agua.⁷

Puesto que los compuestos del aroma, por su naturaleza, deben abandonar la matriz del alimento y viajar a través del aire para ser percibidos, generalmente son excelentes candidatos para el análisis por cromatografía de gases (CG). La CG implica el análisis de compuestos orgánicos volátiles, es decir, materiales que existen en la fase de vapor, por lo menos a las temperaturas típicas de operación de CG entre 40 y 300°C.

Aunque muchos de estos compuestos pueden ser extraídos por disolvente, destilados o aislados de otra manera, frecuentemente es preferible tomar ventaja de su volatilidad y basarse más bien en técnicas de análisis de espacio sobrenadante. Las técnicas de muestreo de espacio sobrenadante frecuentemente son divididas en tres categorías: espacio sobrenadante estático, espacio sobrenadante dinámico, y purga y trampa. En cualquier caso el principio fundamental es el mismo, los analitos volátiles del material sólido o líquido son muestreados mediante la atmósfera que rodea a la muestra ya que esta atmósfera se encuentra en equilibrio con el material de la muestra. Todas las técnicas de espacio sobrenadante comparten ciertas ventajas y consideraciones. La más importante es que los analitos son removidos de la matriz de la muestra sin el uso de disolventes orgánicos, así el cromatograma resultante no tiene pico correspondiente al disolvente. Esto puede ser especialmente importante cuando los compuestos de interés son los primeros en eluir, o son disolventes, y la presencia de un pico correspondiente al disolvente podría diluir y enmascarar los picos de los analitos.⁷

Afortunadamente, la mayoría de los compuestos del aroma son volátiles, y se han establecido procedimientos para su aislamiento tomando ventaja de su volatilidad. Una aproximación ideal para el aislamiento del aroma y su análisis suministraría una muestra analítica cuya composición es idéntica a la mezcla química dentro de la matriz, es decir, libre de disolventes y otras impurezas, y que es completada en algunos minutos. La microextracción en fase sólida (SPME) está emergiendo rápidamente como una técnica robusta para la rápida extracción sin disolvente o preconcentración de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en una variedad de disciplinas científicas. La técnica de SPME es independiente de la forma de la matriz; líquidos, sólidos y gases pueden ser analizados con facilidad.⁷

Los materiales sólidos que contienen odorantes presentan retos adicionales al analista. Se necesita abordar los efectos de la matriz, los componentes del aroma a menudo están presentes en forma encapsulada, los problemas de homogeneidad toman importancia, y los parámetros de equilibrio entre las fases sólida y gaseosa no están tan bien definidos como el caso de los líquidos. La mayor parte de estos problemas pueden ser resueltos convirtiendo el material sólido en una solución o suspensión antes de su análisis. El análisis cualitativo mediante SPME es idealmente apropiado para la caracterización de mezclas desconocidas de compuestos orgánicos volátiles en matrices sólidas.⁷

.3 Cromatografía de Gases (CG)

La cromatografía se ha convertido en el método dominante para el análisis de sabores y fragancias. Esto es debido a que la complejidad de las muestras que se analizan obliga a que algún tipo de separación sea lograda antes de que los analitos componentes puedan ser medidos y caracterizados, y la cromatografía de gases ofrece el máximo poder de resolución para la mayoría de estas mezclas de volátiles. Sin embargo, aun bajo las mejores condiciones es muy difícil poder resolver todos los componentes en estas muestras complejas.

.3.1 Principios de Cromatografía

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar de dos modos distintos. El primero de ellos se basa en la forma en que las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. En la cromatografía en columna, un tubo estrecho contiene la fase estacionaria a través de la cual se hace pasar la fase móvil por presión. En la cromatografía planar, la fase estacionaria se fija sobre una placa plana o a los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad.⁸

La elución en columna implica el transporte de una especie (eluato) a través de una columna por la adición continuada de nueva fase móvil. Una única porción de la muestra se introduce en la parte superior de la columna después de lo cual los componentes de la muestra se distribuyen entre las dos fases. La introducción de fase móvil adicional (eluyente) hace que la fase móvil que contiene una parte de la muestra avance por la columna, donde tiene lugar un posterior reparto entre la fase móvil y las porciones frescas de fase estacionaria a las que accede. Al mismo tiempo, tiene lugar una distribución entre el eluyente nuevo y la fase estacionaria en el lugar en el que inicialmente se ubicaba la muestra.

Las sucesivas adiciones de la fase móvil hacen avanzar las moléculas de eluato por la columna en una serie de transferencias continuas entre las fases estacionaria y móvil. Sin embargo, debido a que el movimiento de los eluatos solo puede ocurrir en la fase móvil, la velocidad media a la que una zona de eluato migra en la columna depende de la fracción de tiempo que reside en esta fase. Esta fracción de tiempo es pequeña para las sustancias que son retenidas fuertemente por la fase estacionaria y es grande cuando es más probable la retención en la fase móvil. En el mejor de los casos, las diferencias de velocidad que resultan hacen que se separen los componentes de la mezcla en bandas, o zonas, que se localizan a lo largo de la columna.

Si un detector que responde a la concentración del eluato se coloca al final de la columna, y se registra su señal en función del tiempo, se obtienen una serie de picos. Este gráfico denominado cromatograma, es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

Es evidente que el movimiento de avance por la columna aumenta la distancia entre dos bandas. Sin embargo, al mismo tiempo tiene lugar un ensanchamiento de ambas zonas, lo que disminuye la eficacia de la columna como sistema de separación. Aunque el ensanchamiento de banda es inevitable, por lo común se pueden encontrar unas condiciones en las que ocurra más lentamente que la separación de bandas. De este modo, con frecuencia es posible una resolución clara de las especies siempre que la columna sea lo bastante larga o muy eficiente (Figura 1).

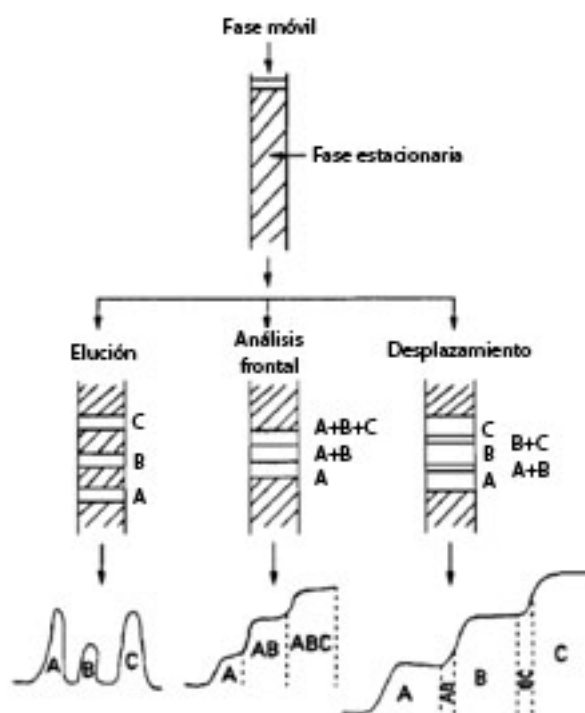
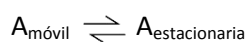


Figura 1. Diferentes modos de desplazamiento de zonas en cromatografía de columna.

La eficacia de la columna cromatográfica para separar dos eluatos depende, en parte, de las velocidades relativas con las que eluyen las dos especies. Esas velocidades están determinadas por la magnitud de las constantes de los equilibrios en función de las cuales las especies se distribuyen entre las fases estacionaria y móvil.⁸

En general los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones sencillas que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil. Así, para el analito A, se puede escribir:



Una separación cromatográfica se optimiza variando las condiciones experimentales hasta que los componentes de la mezcla se separan completamente en el menor tiempo posible. Los

experimentos de optimización tienen como objetivo bien: reducir el ensanchamiento de banda, o bien modificar las velocidades relativas de migración de los componentes.⁸

Es importante considerar que, los cromatogramas no conducen a una identificación positiva de las especies presentes en una mezcla, pero si proporcionan a menudo la evidencia segura de la ausencia de ciertos compuestos. Así, si en la muestra no aparece un pico con el mismo tiempo de retención que un patrón en las mismas condiciones, se puede asumir que el compuesto en cuestión está ausente.

.3.2 Principios de Cromatografía de Gases (CG)

En cromatografía de gases (CG), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas portador, las señales producidas por los analitos al pasar por un detector son registradas en mediante un sistema de análisis de datos (Figura 2). A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.⁸

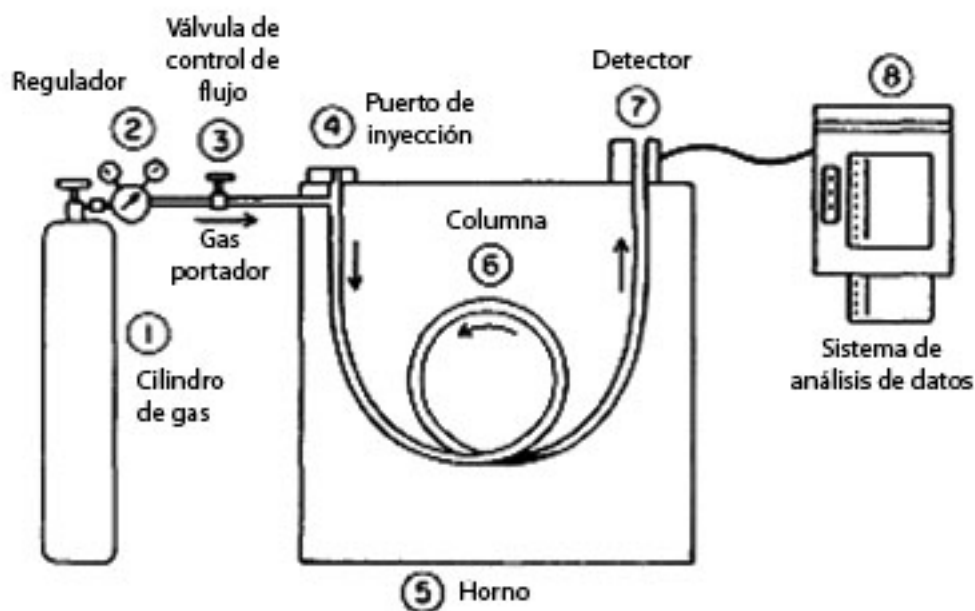


Figura 2. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de gases típico.

La cromatografía de gases se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

Los gases portadores deben ser químicamente inertes, entre ellos se encuentran el helio, el nitrógeno y el hidrógeno. La elección de los gases está con frecuencia determinada por el tipo de detector que se utiliza. El flujo normalmente se controla con un regulador de presión de dos niveles colocado en el cilindro de gas, y otro regulador instalado en el cromatógrafo. El intervalo de presiones de entrada normalmente oscila entre 10 y 50 psi, lo que conduce a flujos de 25 a 150 mL/min en columnas empacadas, y de 1 a 2.5 mL/min en columnas capilares. Generalmente, se supone que los flujos serán constantes si la presión de entrada se mantiene constante. Los flujos

pueden determinarse mediante un rotámetro situado en la cabeza de la columna. Muchos cromatógrafos modernos están equipados con medidores electrónicos de flujo, y son controlados por un microprocesador o una aplicación de cómputo para mantener el flujo al nivel deseado.

La eficacia de la columna requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que sea introducida correctamente; la inyección lenta de muestras concentradas provoca un ensanchamiento de las bandas y una pobre resolución. El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o septum, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna.⁸

Para la inyección "split" se emplea un sistema divisor de la muestra que permite pasar a la cabeza de la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechándose el resto mediante un sistema de purga, generalmente este modo de inyección se aplica a muestras muy concentradas. El método de inyección "splitless", es un método especial para el análisis de cantidades traza, en este método no existe división del flujo. Esta técnica aumenta la sensibilidad ya que casi toda la muestra entra en la columna. Durante la inyección la válvula de purga permanece cerrada. Después de que la muestra se vaporiza en el inyector y pasa a la columna, la válvula vuelve a abrirse para purgar al inyector (Figura 3).⁸

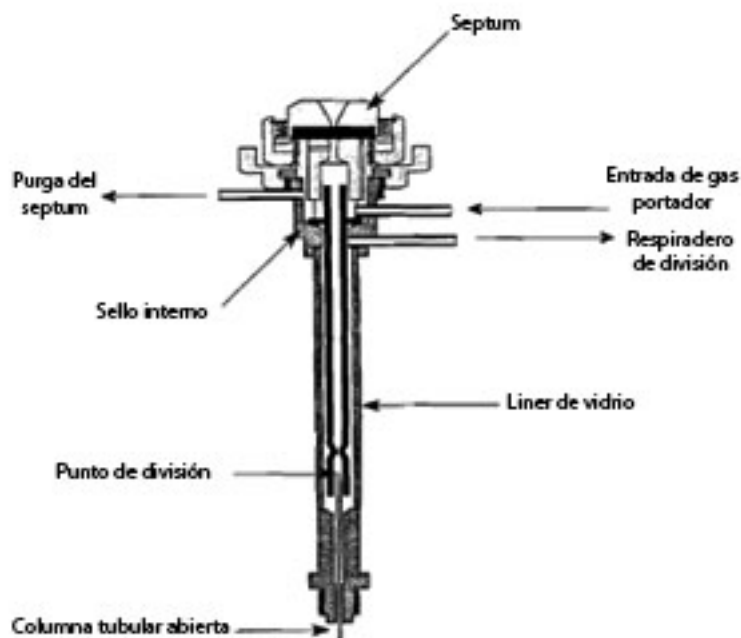


Figura 3. Diagrama esquemático de un inyector split/splitless para CG.

Las columnas cromatográficas varían desde menos de 2 hasta 50 m de longitud, o más. Están construidas con acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón.

La temperatura de la columna es una variable importante, por ello la columna se introduce dentro de un horno de temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. Para muestras cuyos componentes presentan un amplio intervalo de temperaturas de ebullición, a menudo es

conveniente utilizar un programa de temperatura, con lo que se aumenta la temperatura de la columna bien de forma continua o bien por etapas, al mismo tiempo que tiene lugar la separación.

En la cromatografía de gases, la selectividad depende de la elección de la fase estacionaria. El orden de elución en CG depende del punto de ebullición.⁸

Para que una especie tenga un tiempo de residencia razonable en la columna, debe presentar cierto grado de solubilidad en la fase estacionaria. La polaridad es el efecto del campo eléctrico en la inmediata vecindad de la molécula, y se mide por el momento bipolar de la especie. Las fases polares contienen grupos funcionales como $-\text{CN}$, $-\text{CO}$ y $-\text{OH}$. Las fases estacionarias del tipo hidrocarbonado y dialquilsiloxanos son no polares, mientras que las fases de poliéster son altamente polares.

Para la obtención de un cromatograma es necesario primero un detector, el cual es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración. Cuando la concentración es alta tiende a ser no lineal, pero a bajas concentraciones la cantidad mínima detectable está definida como la concentración cuya respuesta es tres veces mayor que su nivel de ruido.

Las características de un detector son las siguientes:

Sensibilidad. Denota la cantidad de señal generada para determinada concentración de una muestra, puede medirse como la pendiente de la gráfica de la respuesta del detector en función de la concentración de la muestra.

Ruido. Es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruido largos y cortos en un período de tiempo dado. Estas perturbaciones que se producen en la línea base del detector se deben a las propiedades eléctricas del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica, o a fluctuaciones en el flujo.

Respuesta universal. Significa que el detector genera una respuesta para todos los componentes de la muestra, exceptuando el gas portador.

Respuesta selectiva. Significa que el detector sólo responde a determinados tipos de compuestos.

Intervalo lineal. En un gráfico logarítmico de la respuesta del detector en función de la concentración de la muestra, es el intervalo en el cual la curva es lineal y tiene una pendiente de $1.0 \pm 5\%$.

Existen diferentes tipos de detectores para las más diversas aplicaciones.

.4 Espectrometría de Masas (EM)

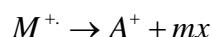
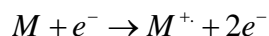
En la técnica de espectrometría de masas (EM), las moléculas de muestra entran a una cámara al vacío donde son ionizadas por uno de varios métodos, siendo el más común el bombardeo de electrones. La abundancia de los iones creados, que varían desde el ion molecular hasta pequeños fragmentos iónicos es determinada como una función de su relación m/z . La abundancia relativa de cada m/z puede ser graficada como un histograma, llamado espectro de

masas, el cual es único para cada compuesto y sirve como una huella digital que ayuda a su identificación y caracterización.

4.1 Principios de Espectrometría de Masas (EM)

La espectrometría de masas (EM) es una metodología espectroscópica en la cual se generan espectros característicos y únicos para las moléculas de distintos compuestos.

El principio bajo el cual operan los espectrómetros de masas es el de promover la ionización de las moléculas de un compuesto y posteriormente separar y cuantificar los distintos iones que se han producido. Cuando una molécula interacciona con una fuente de alta energía ($\approx 70\text{eV}$) se promueve la salida de un electrón del orbital molecular, con ello se genera un ión que se denomina ión molecular (M^+); si el ión queda con un exceso de energía que no es capaz de estabilizar, se fragmenta expulsando un fragmento neutro (mx) formando un fragmento (A^+) de menor masa.



Si el ión fragmento A^+ aún posee un exceso de energía que no pueda estabilizar, este continuará fragmentándose expulsando más fragmentos neutros y produciendo iones de masa cada vez menores.

Cualquiera de los iones formados puede seguir distintos mecanismos de fragmentación, sin embargo, para un compuesto determinado existirán ciertas estructuras iónicas más estables y que generarán iones preferentes. Esto depende solamente de la cantidad de energía que recibió la molécula durante la ionización, todos los mecanismos de fragmentación que puede seguir una molécula constituyen un patrón de fragmentación y éste es característico y único para una molécula.

Los procesos en espectrometría de masas son unimoleculares, consecutivos y competitivos, esto quiere decir que cada molécula de un compuesto se comportará en forma distinta e independiente de las demás.

Si después de la ionización los iones formados son separados en función de su masa, se obtendrá la información de la masa molecular original y también el registro de los distintos fragmentos de dicha molécula (Figura 4).

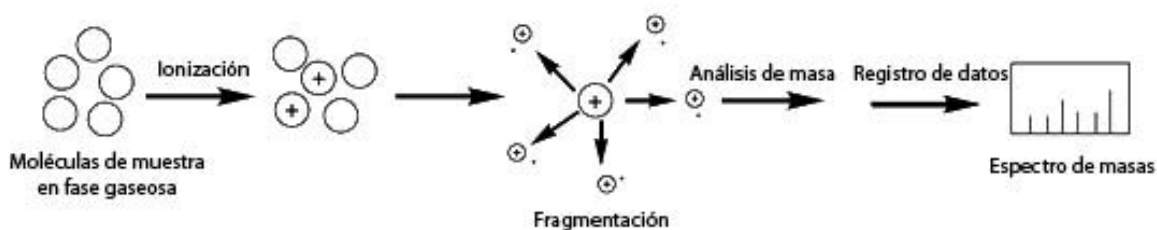


Figura 4. Concepto básico del análisis por EM

Los espectrómetros de masas están diseñados para separar los iones de masas distintas que se producen en la ionización según su relación masa carga (m/z); sin embargo, la mayoría de los iones producidos se forman con una sola carga ($z=1$), por lo que la relación masa carga es igual a la masa ($m/z = m$). El otro valor que se registra en los espectrómetros de masas, es el número de iones de un mismo valor de m/z que se generan y se define como la intensidad de las señales, el valor de intensidad está directamente relacionado con la estabilidad del ión formado y esto es un reflejo de la estructura del mismo.

Un espectro de masas está constituido por una serie de señales en un sistema de dos ejes, uno es la escala másica o de valores m/z y el otro corresponde a la intensidad de las señales o abundancia de los iones.

Los espectrómetros de masas requieren de una fuente de ionización y un separador de iones de acuerdo a su relación m/z , un detector que permita registrar los iones y su intensidad y un registrador.

Dado que el instrumento se encuentra al vacío, se requieren de sistemas especiales de introducción de muestras; primero que permitan gasificar los compuestos y después que no rompan el sistema de vacío del equipo.

El proceso requiere que los iones que se introduzcan puedan llegar hasta el detector sin haber sufrido cambios, para esto se requiere que no exista otro gas presente que pueda dar lugar a colisiones ión-molécula. Esto se logra con alto vacío ($1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-7}$ torr) y es por ello que los espectrómetros de masas cuentan con bombas mecánicas y bombas de difusión o turbomoleculares que permiten alcanzar estos niveles de vacío.

La cámara de ionización es el principal elemento de un espectrómetro de masas, ya que la obtención de un buen espectro de masas depende de que se haya realizado una buena ionización. La mayoría de los espectrómetros de masas cuentan con una cámara de ionización por impacto electrónico (IE), a la cual fluyen las moléculas de muestra gasificada y dentro de ella, interaccionan con un haz de electrones, producido por el paso de corriente a través de un filamento de renio o tungsteno, la energía de los electrones se establece por la diferencia de potencial del filamento (Figura 5).

El dispositivo multiplicador de iones o multiplicador de electrones es el más comúnmente utilizado para detectar los iones, permite una respuesta rápida y además genera una señal proporcional al número de iones que llegan a él.

Los espectros de masas pueden ser evaluados para determinar la estructura original de los analitos y comparados con librerías de referencia para la identificación positiva, proporcionando una capacidad cualitativa sin paralelo.

El poder de resolución del espectrómetro de masas es tal que cada valor entero de m/z puede servir como un canal independiente aislado para la detección cromatográfica. Las masas exactas de los átomos no se localizan en estos enteros, por el contrario, más bien tienen valores de masa ligeramente arriba y abajo de estos números, así que se debe ser cuidadoso al utilizar una escala de masas nominal. La diferencia entre la masa nominal y la masa exacta de un ión podría originar que la m/z de un ión en particular sea asignada dependiendo de la composición elemental y la masa total para ese ión. Esta diferencia es llamada efecto de masa y toma más importancia a

mayores m/z . No obstante, la mayoría de los sistemas CG/EM se pueden ajustar para corregir los defectos y asignar el número de masa nominal apropiado a cada m/z .⁷

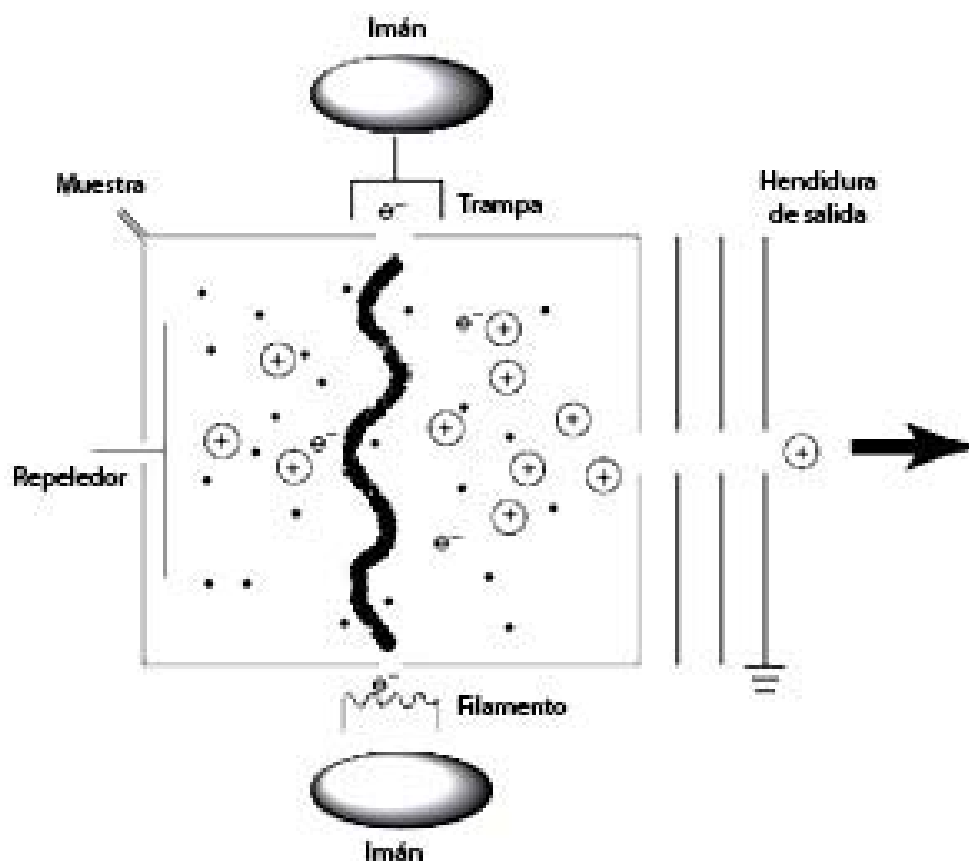


Figura 5. Diagrama esquemático de una fuente de ionización por impacto electrónico.

El analizador o separador másico, tiene la función de separar el haz iónico en todos sus componentes según su relación m/z .

Los espectrómetros de masas generalmente son clasificados con base en su analizador de masas. Los primeros instrumentos comerciales CG/EM usaron analizadores de sector magnético; los de uso más común en la actualidad son de filtros de cuadrupolo, trampas de iones, y más recientemente instrumentos de tiempo de vuelo.

Sector magnético. Los instrumentos con sector magnético, separan los iones de diferentes valores m/z mediante un enfoque direccional de la dispersión del momentum. Cuando iones de diferente m/z pero energía cinética idéntica entran a un campo magnético, viajan en diferentes trayectorias circulares de esta manera pueden ser separados. En realidad, el sector magnético actúa como un analizador de momentum, y dispersa cada ión de acuerdo a su relación momentum-carga (Figura 6).

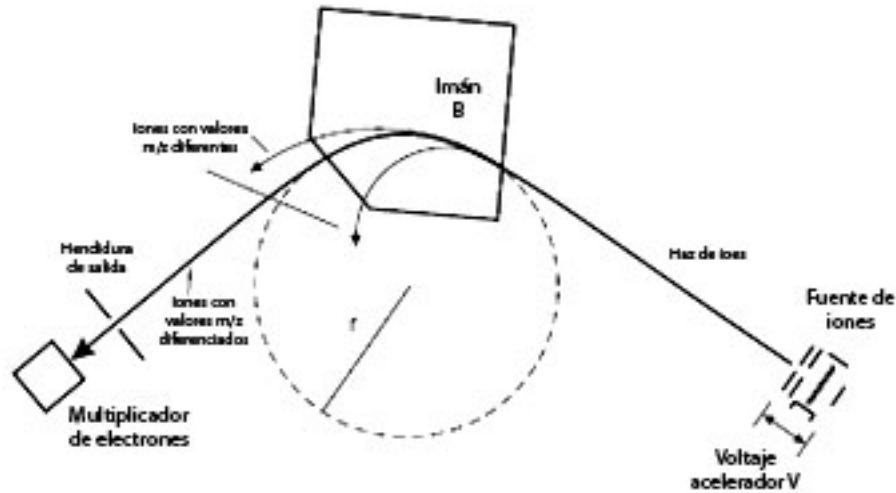


Figura 6. Analizador de masas de sector magnético.

Filtro de masas de cuadrupolo. Este instrumento es más compacto, más barato y más robusto que cualquier otro tipo de espectrómetro de masas. También presenta la ventaja de su elevada velocidad de barrido, de manera que se puede obtener un espectro de masas completo en menos de 100 ms. El corazón de un instrumento cuadrupolar es el conjunto de cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo positivo y el otro se une al terminal negativo. Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia que están desfasados 180 grados. Para obtener un espectro de masas con este dispositivo, los iones se aceleran en el espacio entre las barras mediante un potencial de 5 a 10 V. entre tanto, las tensiones de corriente continua y de corriente alterna se incrementan simultáneamente, mientras se mantiene constante su relación. En cualquier momento, todos los iones excepto aquellos que tengan un determinado valor m/z inciden en las barras y se convierten en moléculas neutras. Por tanto, sólo los iones cuyo valor de m/z esté dentro de un intervalo limitado alcanzarán al detector. Generalmente, los instrumentos cuadrupolares separan fácilmente iones que difieren en su masa en una unidad (Figura 7).

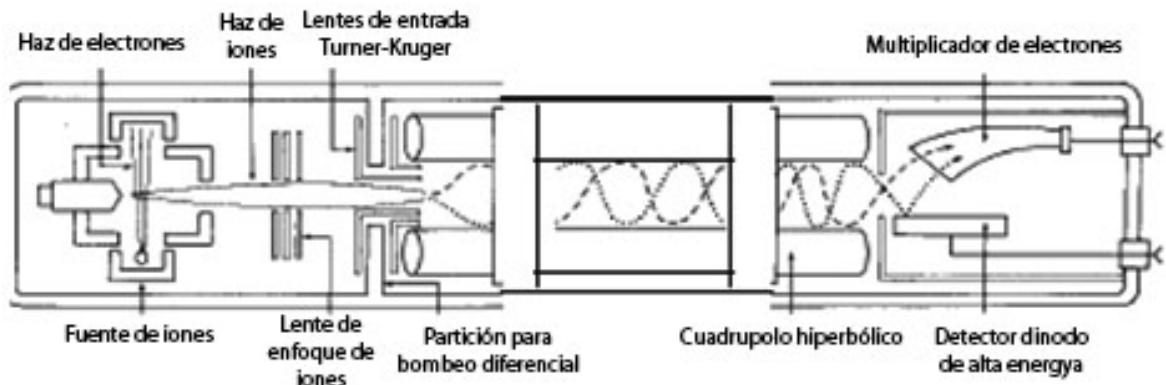


Figura 7. Analizador de masas tipo cuadrupolo.

Tiempo de vuelo. En los instrumentos de tiempos de vuelo (TOF), los iones positivos se producen periódicamente mediante el bombardeo de la muestra con impulsos cortos de electrones, iones secundarios o fotones generados por láser. Estos impulsos suelen tener frecuencias de 10 a 50 kHz y un tiempo de vida de 0.25 μ s. Los iones producidos de esta manera son acelerados después mediante un impulso de campo eléctrico de 10^3 a 10^4 V que tiene la misma frecuencia que el impulso de ionización, pero desfasada. Las partículas aceleradas pasan al tubo analizador de aproximadamente un metro de longitud y que no está sometido a ningún campo. Debido a que todos los iones que entran en el tubo idealmente tienen la misma energía cinética, sus velocidades dentro del tubo deben variar inversamente con sus masas, llegando al detector antes las partículas más ligeras que las más pesadas. Los tiempos de vuelo habituales son de 1 a 30 μ s. Desde el punto de vista de la resolución y de la reproducibilidad, los instrumentos que emplean separadores de tiempo de vuelo no son tan satisfactorios como aquellos que utilizan separadores magnéticos o cuadrupolares. Sin embargo, algunas ventajas compensan, en parte, estas limitaciones; entre ellas, la sencillez, la robustez, facilidad de accesibilidad a la fuente de iones, un intervalo de masas virtualmente ilimitado y rapidez en la adquisición de datos.

.5 Sistemas Acoplados CG/EM

La combinación de la cromatografía de gases (CG) para la separación y la espectrometría de masas (EM) para la detección e identificación de los componentes de una mezcla de compuestos ha llegado a ser la herramienta analítica definitiva en el laboratorio analítico de investigación y comercial. El sistema CG/EM es una herramienta analítica poderosa y fácil de usar. La cromatografía de gases sufre de algunas debilidades, como el requerimiento de compuestos que puedan ser volatilizados en las condiciones de operación de los equipos, pero el problema principal es la falta de una prueba definitiva de la identificación de los compuestos detectados mientras son separados.^{9,10}

El espectrómetro de masas toma el material inyectado, lo ioniza al alto vacío, enfoca esos iones y sus productos de fragmentación a través de un analizador de masas, y entonces colecta y mide las cantidades de cada ión seleccionado en un detector. Un espectrómetro de masas es una excelente herramienta para identificar claramente la estructura de un compuesto único pero no es útil cuando se trata de una mezcla.

La combinación de los dos componentes en un sistema CG/EM forma un instrumento capaz de separar mezclas en sus componentes individuales, identificándolos y proveyendo información cuantitativa y cualitativa de las cantidades y estructura química de cada compuesto. Sin embargo, este sistema mantiene las debilidades de ambos componentes, requiere de compuestos volátiles y tiene ciertos límites de peso molecular (Figura 8).^{10,11}

Acoplando los sistemas de cromatografía de gases y espectrometría de masas se logra resolver el principal problema que se tiene con la técnica de CG, que es la identificación cualitativa de los componentes separados, ya que esta no es absoluta y tan solo se tiene como parámetros el tiempo de retención, las características de operación y la fase estacionaria. La espectrometría de masas nos permite la identificación cualitativa de los eluatos en cromatografía.

El acoplamiento CG/EM ha dado como resultado una herramienta analítica muy poderosa para el análisis de compuestos orgánicos y se ha logrado que los niveles de sensibilidad se incrementen notablemente. Con este sistema es posible registrar sustancias en el nivel de picogramos.

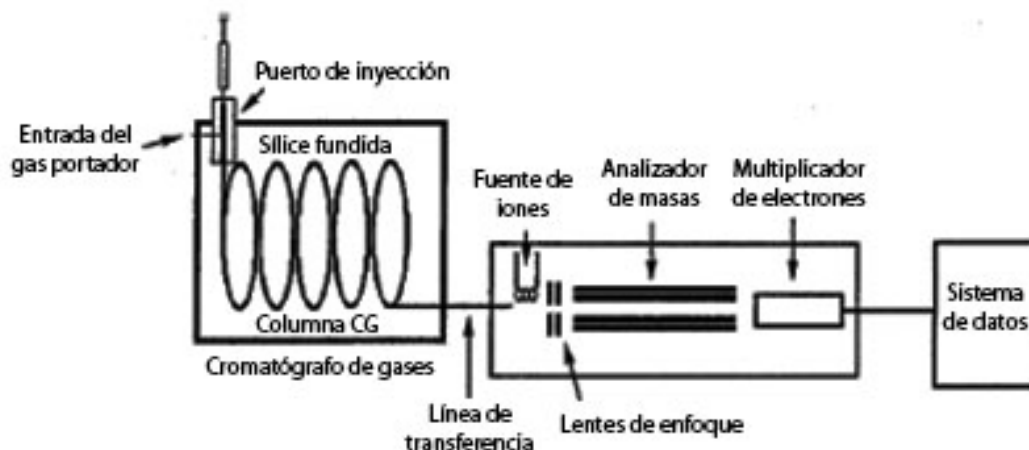


Figura 8. Diagrama esquemático de un sistema CG/EM acoplado

La ventaja principal de los equipos CG/EM radica en el poder identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja en un tiempo corto y con cantidades pequeñas de muestra.

.6 Microextracción en Fase Sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida (SPME) es un método innovador, completamente libre de disolventes utilizado entre otras cosas para concentrar sabores y fragancias y que reduce significativamente el tiempo y costo requeridos para la preparación de muestras, por lo tanto representa una excelente alternativa ante las técnicas convencionales de extracción.

Desde su aparición, esta técnica se ha vuelto muy popular para determinar compuestos volátiles y semivolátiles debido a sus ventajas sobre los métodos convencionales de extracción. Ha sido aplicada en el análisis de una amplia variedad de muestras, incluyendo ambientales, aire de interiores, alimentos, muestras biológicas, analitos orgánicos contaminantes, residuos de pesticidas, medicamentos, etc.

Una ventaja muy importante de la técnica de SPME es que puede ser combinada con otros procesos cromatográficos o espectrométricos. Si SPME es combinada con espectrometría de masas, es posible identificar cada analito (SPME-CG/EM).

Además, es menos costosa que muchos otros métodos de preparación de muestra.⁷

.6.1 Principios de SPME

Esta técnica fue desarrollada para satisfacer la necesidad de una rápida preparación de muestra tanto en el laboratorio como *in situ*. En esta técnica una pequeña cantidad fase extractora se dispersa en un soporte sólido que se expone a la muestra por un periodo de tiempo bien definido. Puede darse el caso de que una vez finalizado este periodo de tiempo, la fase de extracción y la matriz de la muestra se encuentren en equilibrio, o bien se encuentren en un estado previo al equilibrio. En cualquier caso, la cuantificación puede realizarse basada en la acumulación de analitos sobre la cubierta a través del tiempo.

La idea crucial y prominente del método de SPME es la geometría inteligente del agente de extracción.

La técnica SPME toma ventaja del equilibrio de extracción (absorción-adsorción selectiva de la matriz a la cubierta). En este primer paso, como ya se describió, se expone la fase extractora a la muestra y así, los analitos con alta afinidad por el sorbente son extraídos selectivamente. El segundo paso consiste de la desorción de todos los compuestos extraídos por la fibra en un instrumento analítico.¹²

Generalmente en SPME se utilizan fibras cubiertas de diferentes compuestos. El transporte de los analitos de la matriz hacia la cubierta comienza tan pronto como la fibra cubierta ha sido colocada en contacto con la muestra. Típicamente la extracción se considera terminada cuando la concentración de analitos ha alcanzado el equilibrio, es decir, la cantidad extraída es constante dentro de los límites del error experimental y es independiente a un aumento en el tiempo de extracción.

Las ventajas más visibles de SPME son los volúmenes extremos de las muestras. El sistema es pequeño y conveniente, las fibras pueden utilizarse para la extracción de analitos de muestras muy pequeñas. También permite la rápida extracción y transferencia a un instrumento analítico.

Existen tres tipos básicos de extracción (Figura 9) que pueden realizarse con SPME: extracción directa (DI-SPME), espacio sobrenadante (HS-SPME) y con protección de membrana. En el modo de extracción directa, la fibra cubierta es insertada dentro de la muestra y los analitos son transportados directamente de la matriz de la muestra a la fase de extracción.

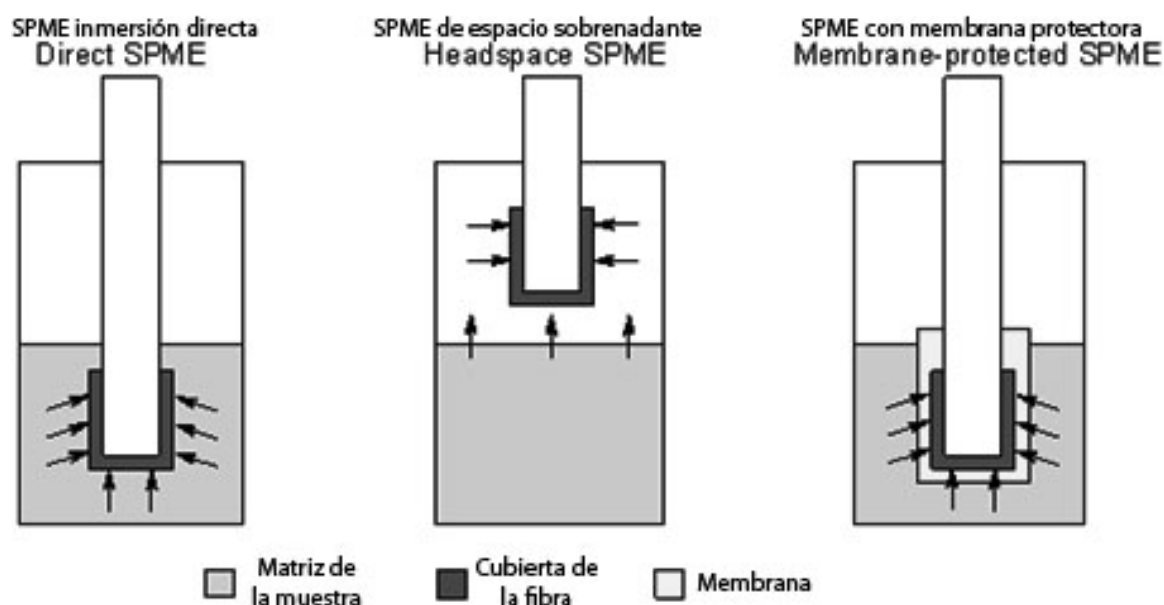


Figura 9. Diferentes modalidades de SPME.

En el modo de espacio sobrenadante los analitos necesitan ser transportados a través de la barrera del aire antes de que alcancen la cubierta. Esta modificación sirve para proteger la cubierta de la fibra del daño por interferencias de alto peso molecular y otros compuestos no volátiles presentes en la matriz de la muestra.

La extracción indirecta a través de una membrana protege también a la fibra del daño de forma similar al modo de espacio sobrenadante. La protección de la membrana es más ventajosa cuando se hace el análisis de analitos que tienen volatilidades muy bajas para poder usar la técnica de espacio sobrenadante.

.6.1.1 Generalidades del Método SPME

La muestra es colocada en un vial o algún contenedor apropiado sellado con una tapa tipo septum (Figura 10, 1). La fibra debe ser limpiada antes de analizar cada muestra porque la cubierta puede absorber compuestos químicos del aire y producir picos espurios en el cromatograma. La limpieza puede hacerse en pocos minutos insertando la fibra dentro del puerto auxiliar de inyección del cromatógrafo de gases. Para muestras líquidas, la aguja de SPME perfora el septum (Figura 10, 2) y la fibra es extendida dentro de la solución.

Durante el muestreo de espacio sobrenadante la fibra se expone dentro de la fase de vapor sobre la muestra líquida o sólida (Figura 10, 3). Después de un tiempo suficiente, se establece un equilibrio entre la muestra y el espacio sobrenadante y el espacio sobrenadante y la fibra de SPME. El equilibrio de partición ocurre entre la fase orgánica líquida de la fibra y la fase de vapor sobre la muestra líquida o sólida. La difusión de los analitos hacia la fibra en la fase de vapor es cerca de cuatro órdenes de magnitud más grande que la difusión en una solución.

Tiempos de absorción de 15 a 30 minutos son típicos para análisis SPME, ya que generalmente no se realiza una extracción exhaustiva. A los compuestos que tienen una mayor volatilidad les toma menos tiempo equilibrarse que a aquellos que son menos volátiles. Después del tiempo apropiado, la fibra es retraída dentro de la aguja (Figura 10, 4), la aguja es removida del septum y entonces es insertada directamente dentro del puerto de inyección del cromatógrafo de gases (Figura 10, 5). Los analitos adsorbidos se desorben térmicamente por el calor del puerto de inyección y son transferidos directamente hacia la columna para su separación (Figura 10, 6) y posterior detección (Figura 10, 7).⁷

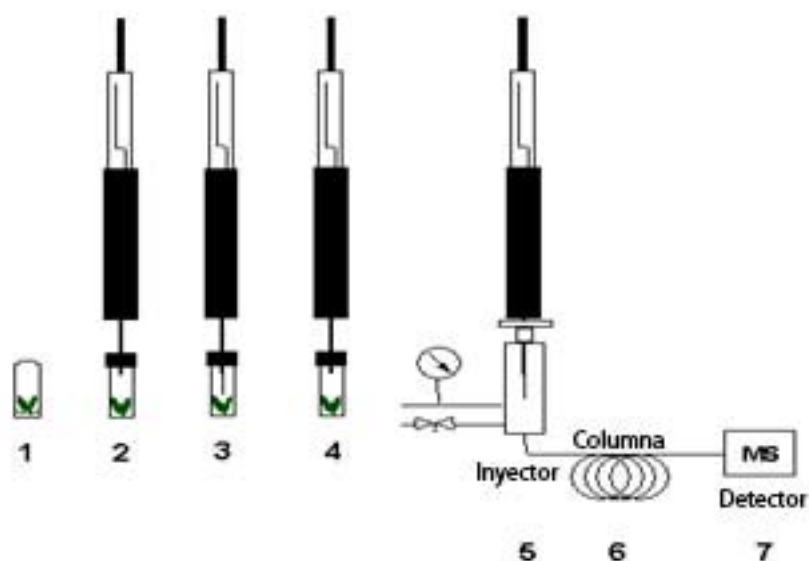


Figura 10. Toma y análisis de muestra mediante SPME.

El uso de un liner en el puerto de inyección con un diámetro interno de 1 mm o menor es recomendado para la obtención de picos más definidos y para una mejor sensibilidad para compuestos altamente volátiles, aunque se pueden obtener separaciones cromatográficas completamente satisfactorias utilizando un liner estándar empacado con lana de vidrio.⁷

Se debe ser cuidadoso y asegurarse de que la superficie superior de la lana de vidrio u otro material de empaque utilizado en el liner está por debajo del nivel de la punta de la fibra de SPME cuando se inserta y extiende dentro del puerto de inyección. Una ventaja de SPME es que previene la entrada de agua hacia la columna capilar del cromatógrafo, y por lo tanto, evita la degradación potencial de la columna.

Regularmente se observan una serie de siloxanos en un análisis por SPME. Algunas posibles fuentes de contaminación de siloxano es el PDMS en la fibra de SPME, el liner silanizado, el septum del inyector, el septum del vial, y la columna capilar. Entre otros contaminantes se incluyen algunos ésteres del ácido ftálico y antioxidantes, hidroxitolueno butilado e hidroxianisol butilado.⁷

Esencialmente, los principios que afectan la extracción de compuestos orgánicos de soluciones utilizando SPME son factores que controlan la partición entre las fases de líquidos inmiscibles en un embudo de separación, un sistema de extracción a contracorriente, o cualquier otra extracción líquido-líquido. Por lo tanto, los factores que afectan una extracción eficiente por estos métodos (tiempo de contacto, eficiencia de mezclado, pH, concentración de sal, temperatura, radios de fase, etc.) también afectan la partición en extracciones SPME.

Cada componente químico se comportará diferentemente dependiendo de su polaridad, volatilidad, coeficiente de partición, el volumen de la muestra y del espacio sobrenadante, la velocidad de agitación, el pH de la solución, y la temperatura de la muestra.

Tanto las técnicas de muestreo directo de líquidos como la de espacio sobrenadante a menudo se benefician de la adición de sal a la solución, o del ajuste apropiado del pH, que acentúa el equilibrio de los compuestos contenidos en el aroma hacia la fibra de SPME. El pH de la muestra es crucial para la extracción por SPME de ácidos y bases.

La temperatura de las muestras debe ser controlada con el uso de un baño de agua o algún otro aparato termoregulado. Calentar la muestra desplaza el equilibrio hacia la fase gaseosa, de esta manera se mejora la sensibilidad ya que aumenta enormemente la difusión de los analitos hacia la fase de vapor. La técnica SPME de espacio sobrenadante es capaz de extraer componentes con puntos de ebullición mucho más altos que la temperatura de muestreo. No es sorprendente, entonces, que las extracciones por espacio sobrenadante de muestras de alimentos suministren considerable detalle acerca de la composición de las especias, hierbas y sabores.⁷

La técnica de SPME es una técnica en la que la extracción raras veces se completa y la recuperación normalmente es lejana al 100%. No obstante, existe una relación lineal entre la cantidad de analitos retenidos en la fibra y la cantidad inicial de analitos en la muestra. La cantidad de analitos extraídos por la fibra (n^∞) en un sistema trifásico (muestra, espacio sobrenadante y fibra) está dada por:

$$n^\infty = \frac{K_{fs}V_f}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} n_0 \quad (1)$$

donde n_0 es la cantidad inicial de analito en la muestra, K_{fs} y K_{hs} son las constantes de distribución fibra-muestra y espacio sobrenadante-muestra, y V_f , V_h y V_s son los volúmenes de la fibra, el espacio sobrenadante y la muestra.

Si se mantiene constante la temperatura y los volúmenes, se puede elaborar una curva de calibración de la respuesta analítica observada para cantidades de analito conocidas utilizando soluciones estándar. Sin embargo, en muestras con matrices complejas, la pendiente de la curva de calibración difiere bastante de la obtenida para las soluciones estándar porque las constantes de distribución dependen de la composición y la polaridad de las muestras y las soluciones. Cuando existe el efecto matriz, normalmente se utiliza el método de adición estándar aunque también puede usarse el método del estándar interno, pero estos estándares deben ser afectados por la matriz de la misma forma que los analitos.

Ninguno de estos métodos resuelve correctamente el problema cuando se trata de muestras sólidas porque los analitos y los estándares añadidos se comportan muy diferentemente. En muestras consistentes de una matriz compleja como en los alimentos, las condiciones ideales no se alcanzan debido a que la concentración absoluta de un compuesto dado no es constante. Los compuestos se forman y degradan continuamente a través de un gran número de reacciones químicas complejas que son afectadas por la temperatura, humedad, y presión.⁷

Un método utilizado para la cuantificación de analitos en muestras sólidas utilizando HS-SPME involucra una extracción múltiple, que elimina el efecto matriz la muestra es extraída varias veces utilizando intervalos de tiempo iguales y las áreas de los picos obtenidos son utilizadas para calcular la cantidad del analito en la muestra.

Un gráfico de la relación de las áreas de los picos y el tiempo de extracción es un prerrequisito para la optimización de un método SPME. Dicho tiempo puede ser obtenido cuando no se detecta aumento en las áreas de los picos cuando se aumenta el tiempo de extracción (Figura 11).

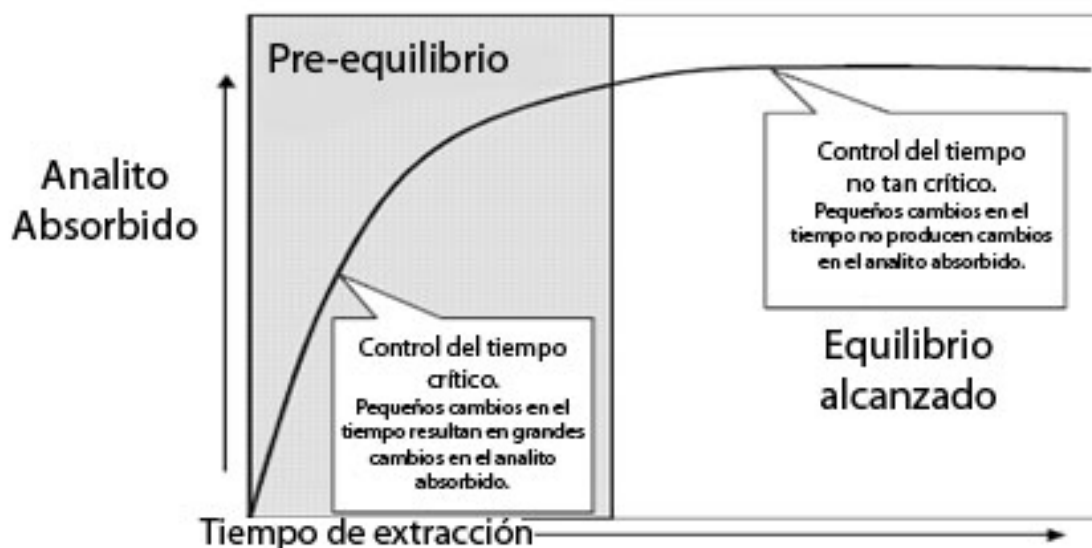


Figura 11. Efecto del control del tiempo de extracción antes y durante el equilibrio.

El complejo equilibrio establecido durante el proceso de SPME hace que la cuantificación de los analitos sea extremadamente difícil. La mayoría de la literatura reporta el uso de la técnica SPME para análisis cualitativos.

Muchos analistas advierten que los resultados cuantitativos obtenidos con SPME son altamente dependientes de las condiciones experimentales y la matriz de la muestra y que las técnicas de calibración externa no son confiables para la cuantificación ya que una matriz sintética no se compara con una muestra auténtica.⁷

Además, se sabe de la existencia de competencia entre analitos por sitios de absorción/adsorción (sitios activos) en la fibra de SPME (Figura 12). Algunos compuestos con una constante de equilibrio fibra-aire muy grande son fuertemente adsorbidos por la fibra y pueden, por tanto, reducir la adsorción de otros compuestos. El fenómeno de competencia ocurre cuando la concentración excede el límite superior del intervalo de linealidad. Tiempos cortos de muestreo son una forma efectiva para reducir la sobrecarga de la fibra especialmente cuando se analizan compuestos tanto de baja como de alta afinidad por la fibra.

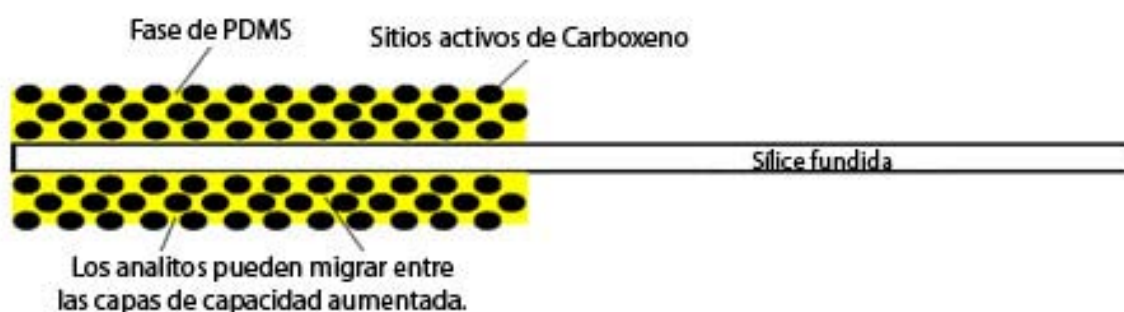


Figura 12. Representación de una fibra de SPME de PDMS-Carboxeno, en este tipo de fibras los sitios activos son más evidentes.

.6.1.2 Desarrollo del método

Desarrollar un nuevo método de SPME en la mayoría de los casos requiere de los siguientes pasos: 1. Selección de la cubierta de la fibra. 2. Selección del reactivo de derivación, si se requiere. 3. Selección del modo de extracción. 4. Selección del método de agitación. 5. Selección de la técnica de separación y detección. 6. Optimización de las condiciones de desorción. 7. Optimización del volumen de la muestra. 8. Determinación del perfil del tiempo de extracción en una matriz pura. 9. Determinación del tiempo de extracción. 10. Cálculo de la constante de distribución. 11. Optimización de las condiciones de extracción (pH, fuerza iónica, temperatura). 12. Determinación de un intervalo lineal para una matriz pura a condiciones óptimas de extracción. 13. Selección del método de calibración. 14. Optimización de las condiciones de extracción para muestras heterogéneas. 15. Verificación del tiempo de equilibrio, sensibilidad e intervalo lineal dinámico de muestras complejas. 16. Determinación de la precisión del método. 19. Automatización del método.¹²

En muchos casos, no todos los pasos necesitan ser llevados a cabo. El conocimiento adquirido de experimentos previos, así como de la literatura, pueden ser aplicados a menudo al problema actual.

.6.1.2.1 Cubierta de la fibra.

Las fibras para SPME están disponibles comercialmente en varios espesores y están cubiertas con polímeros de diferente polaridad desde el no polar polidimetilsiloxano (PDMS) hasta el más polar carbowax. También están disponibles combinaciones de copolímeros carboxeno, PDMS, poliacrilato (PA), carbowax y divinilbenceno (DVB), que ofrecen beneficios añadidos a la extracción de tipos específicos de compuestos y permiten la posibilidad de escoger características de absorción o adsorción.

Para la mayoría de los análisis, especialmente de compuestos volátiles del aroma, una fibra con una cubierta de PDMS (que es la más utilizada) y un espesor de 100 μm es a menudo la opción preferida (Figura 13).

Las propiedades fisicoquímicas del polidimetilsiloxano (PDMS), punto de fusión $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura de transición $-126\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hacen del PDMS la cubierta más resistente y la que tiene un mejor desempeño y una vida útil bastante larga. Las fibras de PDMS son como un estándar en la extracción SPME y por ello siempre se recomienda probar un método de extracción por primera vez utilizando este tipo de cubierta. La selección de cubiertas diferentes todavía es muy empírica.



Figura 13. Fibra para SPME de PDMS (100 μm).

El espesor de las cubiertas de PDMS usuales son de 7 μm , 30 μm y 100 μm , el de las cubiertas de PA es de 85 μm , el de fibras con combinaciones de polímeros como carboxeno-PDMS es de 75 μm y de 65 μm para PDMS-DVB y carbowax-DVB.

En general, las fibras cubiertas con capas más gruesas requieren de un tiempo mayor para alcanzar el equilibrio pero ofrecerán mayor sensibilidad debido a la mayor cantidad de analitos que pueden ser absorbidos. Debe tenerse en consideración que el tiempo de desorción aumenta con el espesor de la fibra.

Una de las limitaciones de la técnica de SPME, es el tiempo de vida útil de las frágiles fibras de sílice fundida. Dichas fibras se rompen fácilmente y en promedio una fibra puede funcionar adecuadamente por 50-100 ciclos de extracción-desorción. El tiempo de vida útil depende de muchos factores, como la naturaleza de los componentes, la matriz de la muestra, el modo de extracción aplicado y del cuidado dado a la fibra. Por eso las fibras deben tratarse con mucho cuidado y el analista nunca debe olvidar que la fibra puede dañarse por temperaturas que estén fuera de las especificaciones del fabricante y por el contacto físico con algún material sólido e inclusive algunas veces líquido.

3 Objetivos

Objetivo principal.

- Desarrollar y optimizar un método para la extracción y el análisis de los componentes del aroma de chiles frescos y secos por SPME-CG/EM para su posible aplicación en: caracterización del aroma de diferentes variedades de chile, control de calidad y desarrollo de nuevos saborizantes.

Objetivos particulares.

- Optimizar las condiciones de extracción SPME (cubierta de la fibra, tiempo, temperatura), para asegurar la recuperación de la mayor cantidad de componentes del aroma.
- Optimizar las condiciones de inyección y de separación, para obtener espectros más puros y facilitar con esto la identificación de los compuestos.
- Utilizar el método desarrollado para caracterizar los componentes del aroma de algunas de las variedades que se comercializan en la Central de Abastos del D.F. con el fin de comprobar el funcionamiento del método

4 Desarrollo Experimental

4.1 Muestras

Las muestras analizadas se obtuvieron en la Central de Abastos del D.F. algunas fueron obsequiadas por los distribuidores o vendedores y otras fueron compradas en los locales comerciales en porciones desde 250 g hasta 1 kg.

En la Tabla 1 se enlistan las diferentes variedades de chiles analizados.

Tabla 1. Tipos de chiles analizados.

<i>Frescos</i>	<i>Secos</i>
Jalapeño	Catarina
Poblano	Cascabel
Habanero	Chipotle
Caribe	Puya
Árbol	Guajillo
Serrano	Canica
Güero	Mulato
Chilaca	Ancho
Pimiento verde	Pasilla
Pimiento rojo	Mora
Manzano	Morita
	Árbol
	Piquín

4.2 Materiales y reactivos

Viales de vidrio de 20 mL de capacidad de 23 x 75 mm (Alltech).

Tapones de aluminio de 20 mm con septum de teflón/silicón (Alltech).

Engargolador de 20 mm (The Finest in Crimping Tools & Accessories).

Viales con tapón de rosca 100/PK (Agilent).

Fibra para SPME de PDMS 100 μm (Supelco).

Fibra para SPME de PDMS 7 μm (Supelco).

Fibra para SPME StableFlex de PDMS/DVB 65 μm (Supelco).

Fibra para SPME de PA 85 μm (Supelco).

Soporte manual para fibra SPME (Supelco).

Aceite esencial de pimienta negra MV-5652 (Quest International).

4.3 Equipo

Cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a espectrómetro de masas HP 5973.

Columna capilar HP 19091J-112 5%-fenil 95%-polidimetilsiloxano (largo 25m, diámetro 320 μ m, espesor de capa 0.52 μ m).

Columna capilar HP 19091J-433 5%-fenil 95%-polidimetilsiloxano (largo 30m, diámetro 250 μ m, espesor de capa 0.25 μ m).

4.4 Metodología

La técnica utilizada para la extracción de los componentes del aroma de los chiles fue la de espacio sobrenadante.

Para todas las etapas de optimización del método, la muestra utilizada fueron chiles jalapeños, con excepción de la optimización de la extracción de chiles secos en los que se utilizó chile piquín seco y de la optimización de la separación en la que también se utilizó una solución de aceite esencial de pimienta negra.

Para la extracción SPME, inicialmente se utilizaron aproximadamente 5 g de muestra, sin embargo, se optó por utilizar la cantidad de muestra que permite tener un espacio sobrenadante de cerca del 50% del volumen del vial.

.4.1 Preparación de las muestras.

Los chiles frescos se lavaron previamente con agua corriente, se secaron con papel absorbente, se les cortó el pedúnculo y se molieron en una licuadora comercial sin añadir agua.

Los chiles secos fueron limpiados con toallas de papel, se les cortó el pedúnculo y se molieron sin añadir agua.

La pasta o el polvo obtenidos dependiendo del caso se colocaron dentro de los viales de 20 mL mediante un embudo con el que se controló el tamaño máximo de partícula (10 mm).

Una vez que la cantidad apropiada se introdujo en el vial, éste se sella utilizando un tapón de aluminio con septum de teflón/silicón y se engargola cuidadosamente para evitar que existan fugas.

Para el control del sellado los viales fueron sumergidos unos instantes en agua caliente, si se observa la aparición de burbujas, es indicación de una mala técnica de sellado y el vial no se procesa.

.4.2 Optimización de la extracción

.4.2.1 Selección de la fibra.

Se probaron 4 tipos de cubierta diferentes para el desarrollo del método de extracción, PDMS 100 μm , PDMS 7 μm , PA 85 μm y PDMS/DVB 65 μm . Para la selección de la fibra, se utilizó un tiempo de exposición de la fibra de 2 horas, que es lo suficientemente grande para aumentar la probabilidad de alcanzar el equilibrio y recuperar la mayor cantidad de analitos posible. Después de este periodo de exposición, las fibras fueron insertadas dentro del puerto de inyección del cromatógrafo por dos minutos (tiempo de desorción).

Se utilizó un método de separación no optimizado para hacer una comparación del número de picos observado para cada tipo de fibra. El método de separación utilizado fue denominado SPME2 y se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones analíticas del sistema CG/EM del método SPME2.

CG (HP 6890)	
Columna capilar	(WCOT) HP 19091J-112 5%-fenil 95%-polidimetilsiloxano 25m (L) x 320 μm (di) x 0.52 μm (ϕ).
Programa de temperatura	60°C (2 min), 7°C/min hasta 300°C, 300°C (2 min).
Gas portador	Helio, 55.2 mL/min
Temperatura del inyector	275°C
Tiempo de desorción	2 min
Tipo de inyección	Split
Relación de Split	30:1
Tiempo de análisis	38.29 min
EM (HP 5973)	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolar
Fuente de impacto electrónico	70 eV
Barrido másico	33-550 uma
Tiempo de retardo (Solvent delay)	0 min

.4.2.2 Temperatura óptima de extracción

Con la fibra seleccionada, se realizaron extracciones utilizando 40 minutos para exponer la fibra a la muestra de chiles frescos a diferentes temperaturas. Ambiente, 30, 40, 50, 60, y 70°C. Se seleccionó una temperatura óptima de extracción mediante la comparación del número de picos y de la suma de las áreas relativas.

El método para el análisis de estas muestras nuevamente fue SPME2.

.4.2.3 Tiempo óptimo de extracción

Una vez determinada la temperatura óptima de extracción, se realizaron diferentes extracciones manteniendo fija dicha temperatura pero utilizando diferentes tiempos de exposición de la fibra: 10, 15, 20, 30, 40, 60 y 120 min. Y se realizaron blancos negativos utilizando viales vacíos en las mismas condiciones de extracción.

El análisis de las muestras se realizó con el método SPME2.

4.3 Optimización de la separación

Con el objeto de optimizar la separación sin la necesidad de realizar todo el procedimiento de extracción SPME, se utilizó una solución c.a. 10 ppm del aceite esencial de pimienta negra utilizando como disolvente cloruro de metileno, asumiendo que el tipo de componentes que conforman el aroma de los chiles son similares a los que se encuentran presentes en el aceite esencial de la pimienta negra.

Para obtener un método que ofreciera una buena resolución de los componentes y un tiempo de análisis relativamente corto, se realizaron modificaciones en el programa de temperatura del horno y en la velocidad del flujo del gas portador.

El método inicial (PIM1) y el optimizado (PIM3F) para la separación de los componentes del aceite esencial de pimienta negra se describen en la Tabla 3 y Tabla 4 respectivamente.

Tabla 3. Condiciones analíticas del sistema CG/EM del método PIM1.

CG (HP 6890)	
Columna capilar	(WCOT) HP 19091J-433 5%-fenil 95%-polidimetilsiloxano 30m (L) x 250µm (di) x 0.25µm (φ).
Programa de temperatura	60°C (2 min), 7°C/min hasta 300°C, 300°C (2 min).
Gas portador	Helio, 19.0 mL/min
Temperatura del inyector	275°C
Volumen inyectado	1 µL
Tipo de inyección	Split
Relación de Split	30:1
Tiempo de análisis	38.29 min
EM (HP 5973)	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadрупolar
Fuente de impacto electrónico	70 eV
Barrido másico	33-550 uma
Tiempo de retardo (Solvent delay)	1 min

Tabla 4. Condiciones analíticas del sistema CG/EM del método PIM3F.

CG (HP 6890)	
Columna capilar	(WCOT) HP 19091J-433 5%-fenil 95%-polidimetilsiloxano 30m (L) x 250 μ m (di) x 0.25 μ m (ϕ).
Programa de temperatura	75°C (2 min), 15°C/min hasta 110°C, 110°C (5 min), 8°C/min hasta 140°C, 140°C (5 min), 4°C/min hasta 175, 10°C/min hasta 275°C.
Gas portador	Helio, 17.8 mL/min
Temperatura del inyector	275°C
Volumen inyectado	1 μ L
Tipo de inyección	Split
Relación de Split	30:1
Tiempo de análisis	36.83 min
EM (HP 5973)	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolar
Fuente de impacto electrónico	70 eV
Barrido másico	33-550 uma
Tiempo de retardo (Solvent delay)	2.5 min

Una vez que se seleccionó un método apropiado, se evaluó utilizando inyecciones de extractos SPME de chiles jalapeños. Lo que resultó en algunas modificaciones posteriores en el programa de temperatura del horno y el flujo del gas portador.

El método PIM3G, que se describe en la Tabla 5 es consecuencia de dichas modificaciones.

Tabla 5. Condiciones analíticas del sistema CG/EM del método PIM3G.

CG (HP 6890)	
Columna capilar	(WCOT) HP 19091J-433 5%-fenil 95%-polidimetilsiloxano 30m (L) x 250 μ m (di) x 0.25 μ m (ϕ).
Programa de temperatura	75°C (2 min), 10°C/min hasta 110°C, 110°C (7 min), 8°C/min hasta 140°C, 140°C (5 min), 4°C/min hasta 175, 10°C/min hasta 275°C.
Gas portador	Helio, 39.7 mL/min
Temperatura del inyector	275°C
Tiempo de desorción	2 min
Tipo de inyección	Split
Relación de split	30:1
Tiempo de análisis	40.00 min
EM (HP 5973)	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolar
Fuente de impacto electrónico	70 eV
Barrido másico	33-550 uma
Tiempo de retardo (Solvent delay)	0 min

4.4 Optimización de la inyección

Ya que la cantidad de muestra que entra a la columna puede modificarse de acuerdo al modo de operación del inyector (split/splitless), se utilizó el modo splitless con una duración de 0.5 minutos, se modificó la temperatura del inyector y el programa de temperatura del horno para evaluar cual ofrecía una mejor respuesta.

En la Tabla 6 se presenta la descripción del método SPME-DRY, que resultó útil para el análisis de los extractos de chiles frescos y secos.

Tabla 6. Condiciones analíticas del sistema CG/EM del método SPME-DRY.

CG (HP 6890)	
Columna capilar	(WCOT) HP 19091J-433 5%-fenil 95%-polidimetilsiloxano 30m (L) x 250 μ m (di) x 0.25 μ m (ϕ).
Programa de temperatura	37°C (2 min), 6°C/min hasta 110°C, 110°C (7 min), 7°C/min hasta 140°C, 140°C (5 min), 3°C/min hasta 175, 15°C/min hasta 275°C.
Gas portador	Helio, 39.5 mL/min
Temperatura del inyector	250°C
Tiempo de desorción	2 min
Tipo de inyección	Splitless
Duración del modo Splitless	0.50 min
Tiempo de análisis	48.79 min
EM (HP 5973)	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolar
Fuente de impacto electrónico	70 eV
Barrido másico	33-550 uma
Tiempo de retardo (Solvent delay)	0 min

4.5 Identificación de los componentes del aroma de los chiles.

Para la identificación de los componentes del aroma de los diferentes chiles analizados, se realizó la interpretación de la fragmentación, así como la comparación con los espectros de masas de las librerías de espectros de masas, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library versión 1.7 build 11/05/1999., Wiley275, y NBS75K.

5 Resultados y Discusión

5.1.1 Optimización de la extracción

Las muestras utilizadas para las extracciones realizadas en esta etapa fueron chiles jalapeños.

.1.1.1 Selección de la fibra.

Las fibras de sílice para SPME con los diferentes tipos de cubiertas disponibles fueron examinadas para la optimización del método. El número de picos obtenidos con cada tipo de cubierta se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidad de picos máxima obtenida con cada tipo de fibra para SPME.

Tipo de cubierta	Picos
PDMS 100µm	37
PDMS 7µm	25
PDMS/DVB 65µm	53
PA 85µm	6

La fibra de PDMS 100 µm (no polar) exhibió una recuperación bastante alta para analitos menos polares, la de PDMS 7 µm (no polar) mostró una menor recuperación de compuestos y tiempos de equilibrio mucho mayores. La Figura 1 muestra el cromatograma obtenido con la fibra de PDMS 100 µm y la Figura 2 el obtenido con la de PDMS 7 µm.

La fibra de PA 85 µm (polar) presenta principalmente afinidad por analitos polares pero solamente se observaron seis picos. La fibra de PDMS/DVB 65 µm (bipolar) (Figura 3) ofreció un mejor desempeño para la extracción de los compuestos presentes en la muestra, ya que consigue extraer una mayor cantidad de compuestos y tiene una recuperación bastante alta tanto para analitos polares como no polares.

Se pudo observar que la naturaleza polar, no polar o bipolar de las cubiertas de las fibras si tuvo efectos en cuanto a la recuperación de analitos, las fibras polares presentaron afinidad por analitos polares, las no polares por analitos no polares y la fibra bipolar, presentó afinidad por ambos tipos de compuestos y por lo tanto recuperó mayor cantidad de analitos.

En cuanto al espesor de la cubierta, se puede observar que mientras mayor es el grosor, mayor es la recuperación de analitos tanto en el número de estos como en su abundancia esto debido a que la fibra de menor espesor se satura más rápidamente, es decir tiene una menor capacidad.

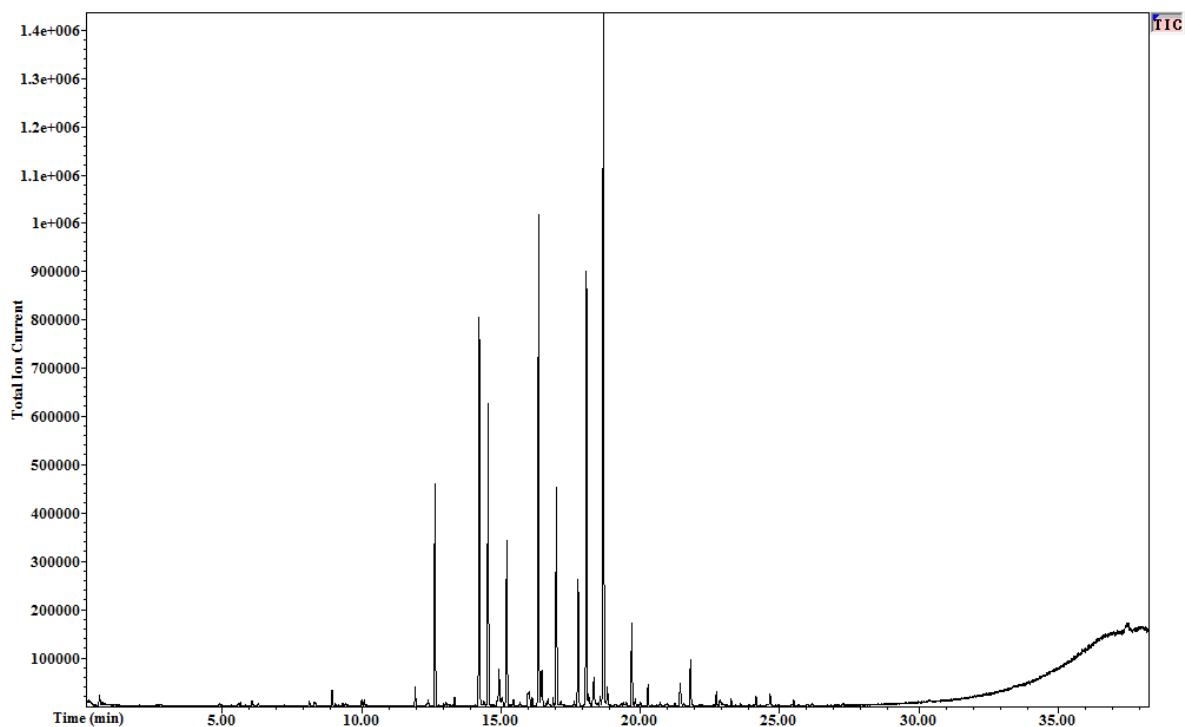


Figura 1. Cromatograma del extracto de chile jalapeño realizado con la fibra de PDMS 100 µm separado con el método SPME2 (37 picos).

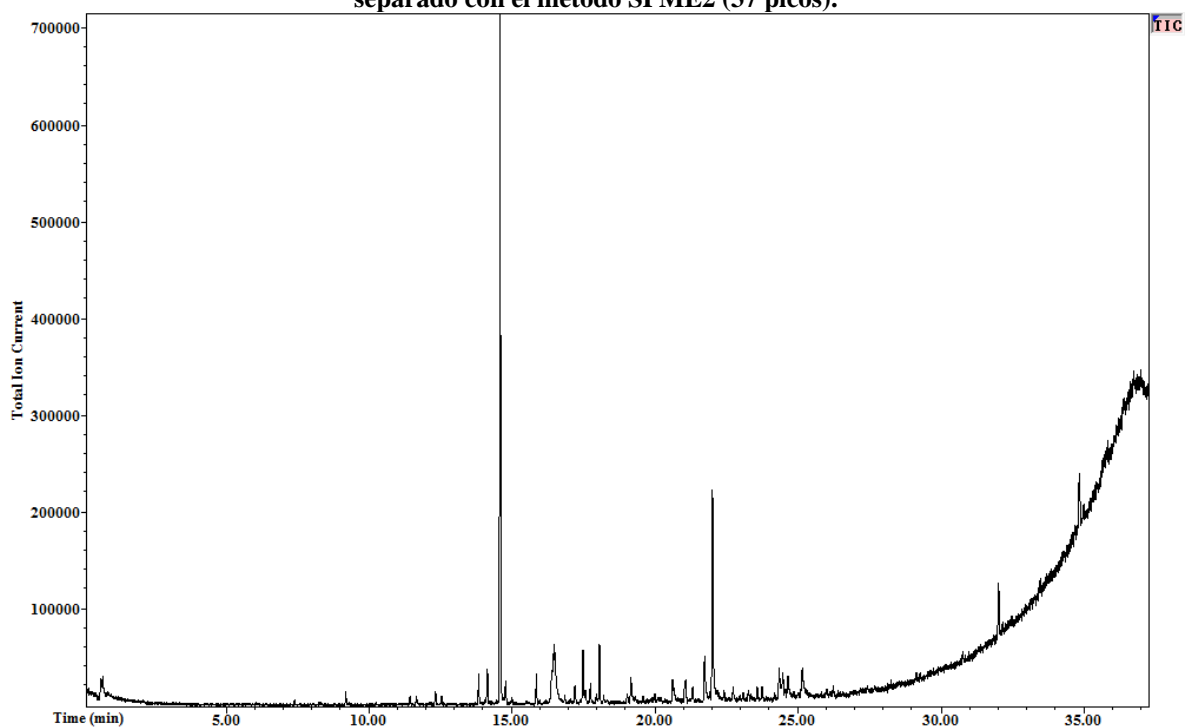


Figura 2. Cromatograma del extracto de chile jalapeño realizado con la fibra de PDMS 7 µm separado con el método SPME2 (25 picos).

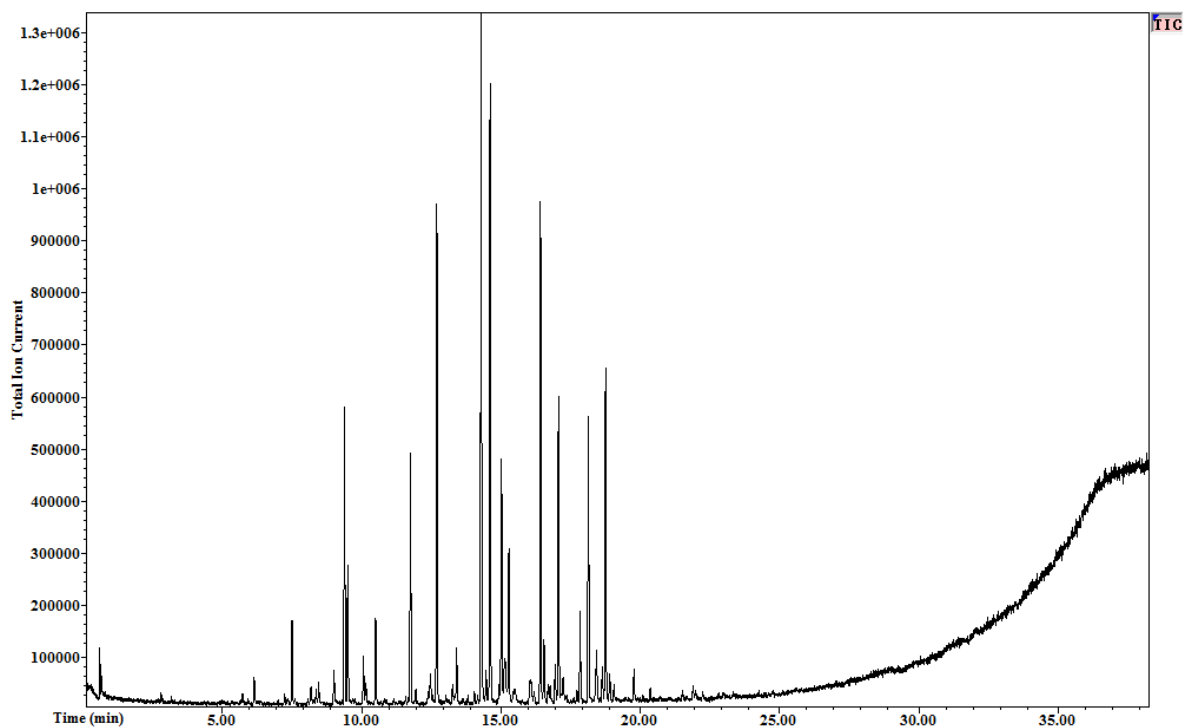


Figura 3. Cromatograma del extracto de chile jalapeño realizado con la fibra de PDMS/DVB 65 μm separado con el método SPME2 (53 picos).

Desafortunadamente, durante la optimización de la separación, la fibra de SPME con cubierta de PDMS/DVB 65 μm , sufrió daños debido al tiempo de uso y se tuvo que continuar el desarrollo del método utilizando la fibra con cubierta de PDMS 100 μm ya que esta fue la fibra que ofreció el segundo mejor desempeño para la extracción de los compuestos de la muestra.

.1.1.2 Temperatura óptima de extracción

Con la fibra con cubierta de PDMS 100 μm , se realizó el experimento para la determinación de la temperatura óptima utilizando como muestra chile jalapeño y un tiempo arbitrario de 40 min, también se realizaron blancos negativos utilizando viales vacíos en las mismas condiciones. La suma de las áreas corregidas nos indica la abundancia con la que se recuperan los analitos y el número de picos obtenidos indica los diferentes analitos recuperados por la fibra; estos valores fueron comparados y se seleccionó la temperatura de 60°C como la mejor para chiles frescos (Tabla 2) y la de 90°C para la extracción de las muestras de chiles secos (Tabla 3).

Con la temperatura de 50°C (Figura 4) pueden verse únicamente 29 picos, con la de 60°C (Figura 5) se ven 49 picos que fue el máximo de picos obtenido con chiles frescos en esta etapa, y a 70°C (Figura 6) el número de picos decae a 35.

En el caso de los chiles secos, a 80°C (Figura 7) se obtuvieron 45 picos y el máximo de picos obtenidos en esta etapa fue de 52 y se consiguió a 90°C (Figura 8).

Las variaciones en la recuperación de analitos con respecto a la temperatura se deben a los cambios en las constantes de reparto que se establecen durante el equilibrio ya que dichas constantes dependen de la temperatura así como al aumento en la difusión de los analitos hacia la fase de vapor.

Tabla 2. Resultados de la optimización de la temperatura de extracción de chiles frescos.

Temperatura (°C)	Suma de las áreas	Picos
Ambiente	25183368	23
30	17866989	21
40	33787775	23
50	42047812	29
60	94893694	49
70	54386206	35

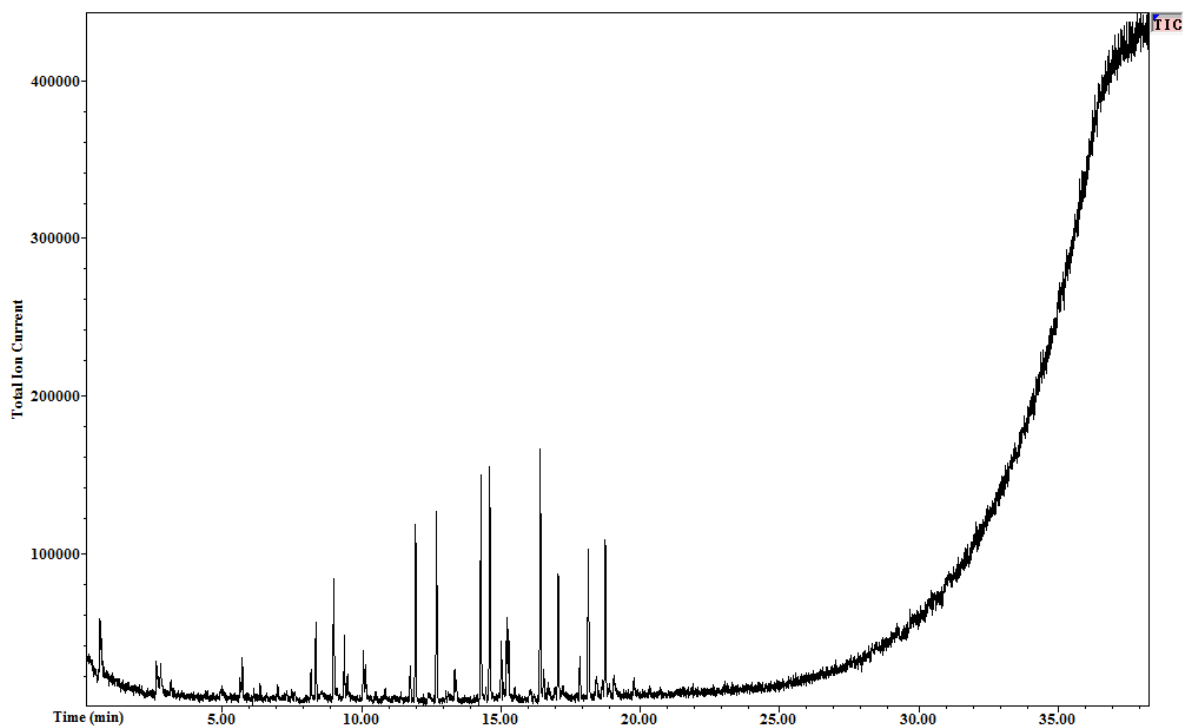


Figura 4. Cromatograma del extracto de chile jalapeño a 50°C separado con el método SPME2 (29 picos).

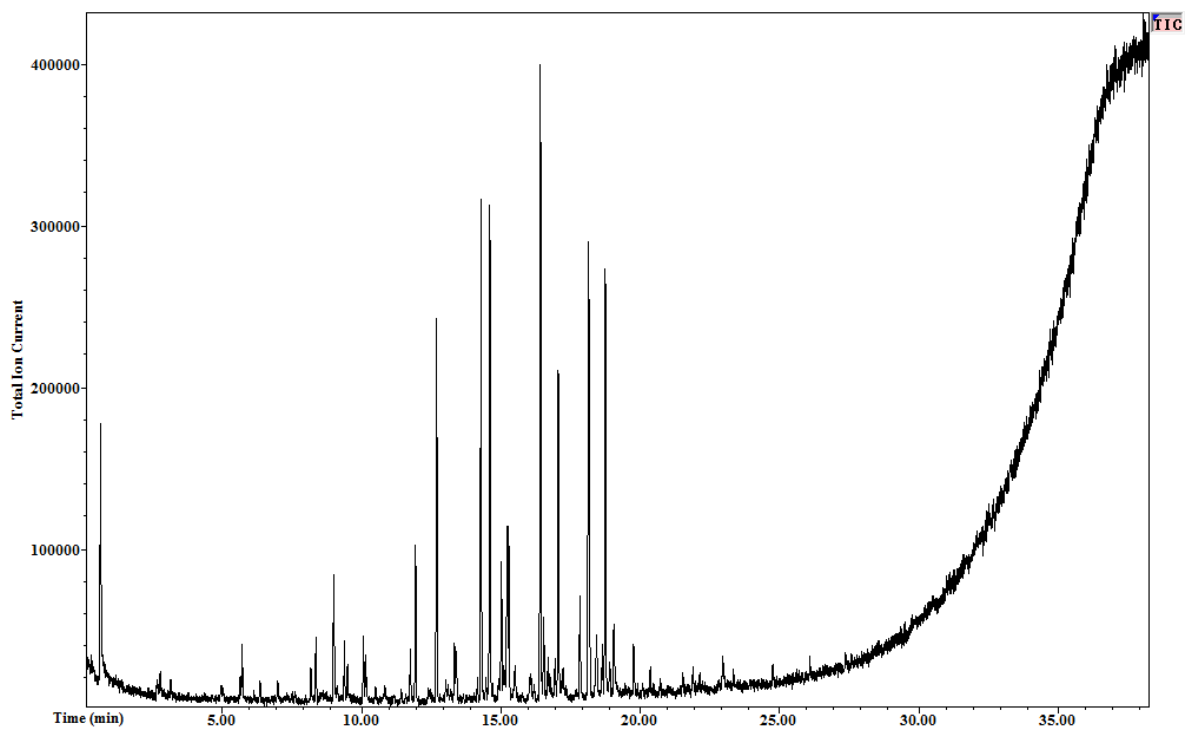


Figura 5. Cromatograma del extracto de chile jalapeño a 60°C separado con el método SPME2 (49 picos).

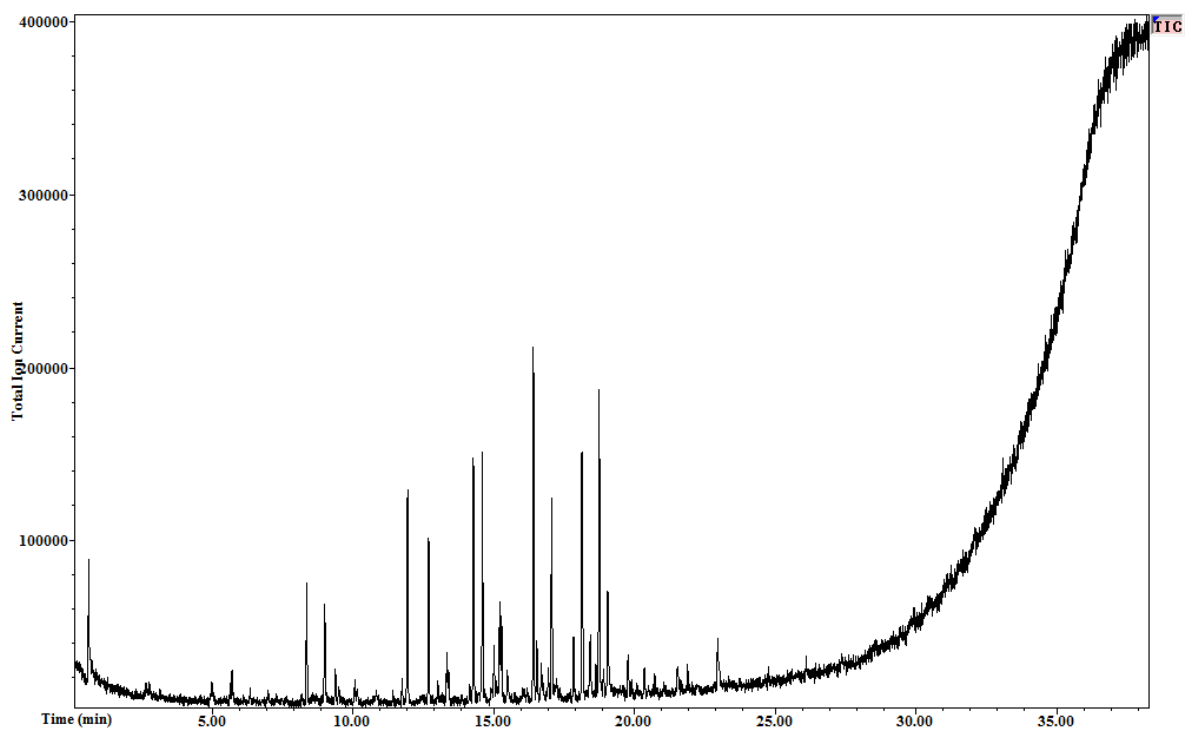
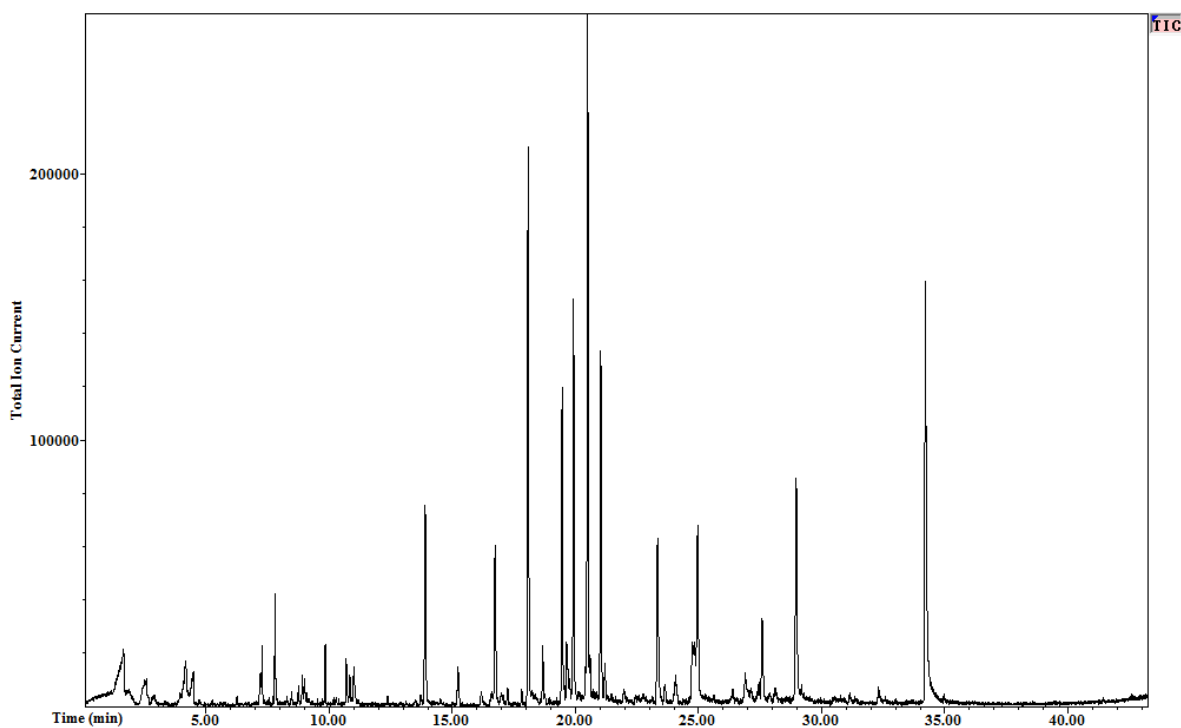


Figura 6. Cromatograma del extracto de chile jalapeño a 70°C separado con el método SPME2 (35 picos).

Tabla 3. Resultados de la optimización de la temperatura de extracción de chiles secos.

Temperatura (°C)	Suma de las áreas	Picos
60	29164894	29
70	43734857	31
80	64361951	45
90	110426492	52

**Figura 7. Cromatograma del extracto de Chile Piquín a 80°C separado con el método SPME-DRY (45 picos).**

.1.1.3 Tiempo óptimo de extracción

Se continuó con la optimización del método usando como muestra Chile jalapeños a diferentes intervalos de tiempo manteniendo constante la temperatura (60°C) y realizando blancos negativos utilizando viales vacíos. En esta parte del experimento, pudimos apreciar como existe competencia por los sitios activos de la fibra, conforme aumentaba el tiempo de exposición de la fibra, el tamaño de algunos de los picos disminuyó, incluso algunos picos no se presentan en tiempos demasiado largos; otros picos aparecen después de 60 minutos de exposición y corresponden a compuestos que forman parte del septum del vial, ya que dichos compuestos fueron observados e identificados en las extracciones de los blancos negativos que se realizaron.

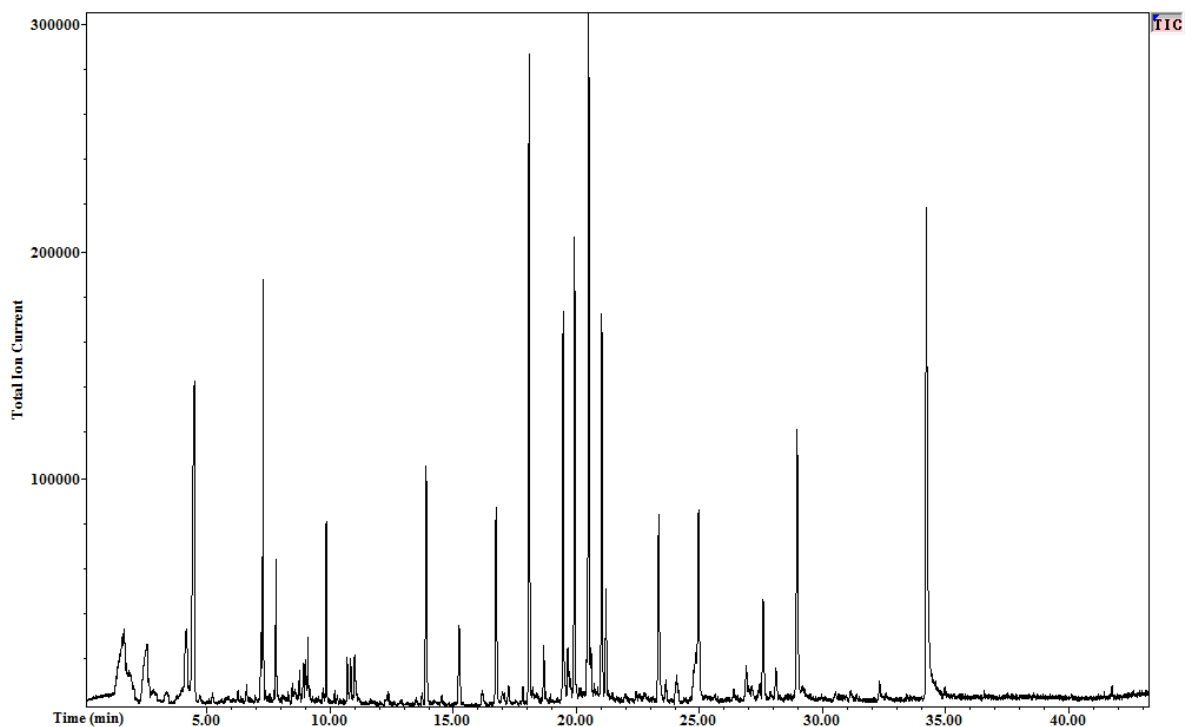


Figura 8. Cromatograma del extracto de Chile Piquín a 90°C separado con el método SPME-DRY (52 picos).

Tabla 4. Resultados de la optimización del tiempo de extracción.

Tiempo (min.)	Suma de las áreas	Picos
10	51314792	22
15	43993713	25
20	263151652	53
30	176341521	48
40	94893694	49
60	182075333	49
120	175897172	28

El mayor número de picos obtenido en esta fase fue de 53 y se alcanzó manteniendo expuesta la fibra durante 20 minutos (Figura 10) a una temperatura constante de 60°C. A los 15 minutos (Figura 9) solo se obtienen 25 picos y a los 30 minutos (Figura 11) 48 picos.

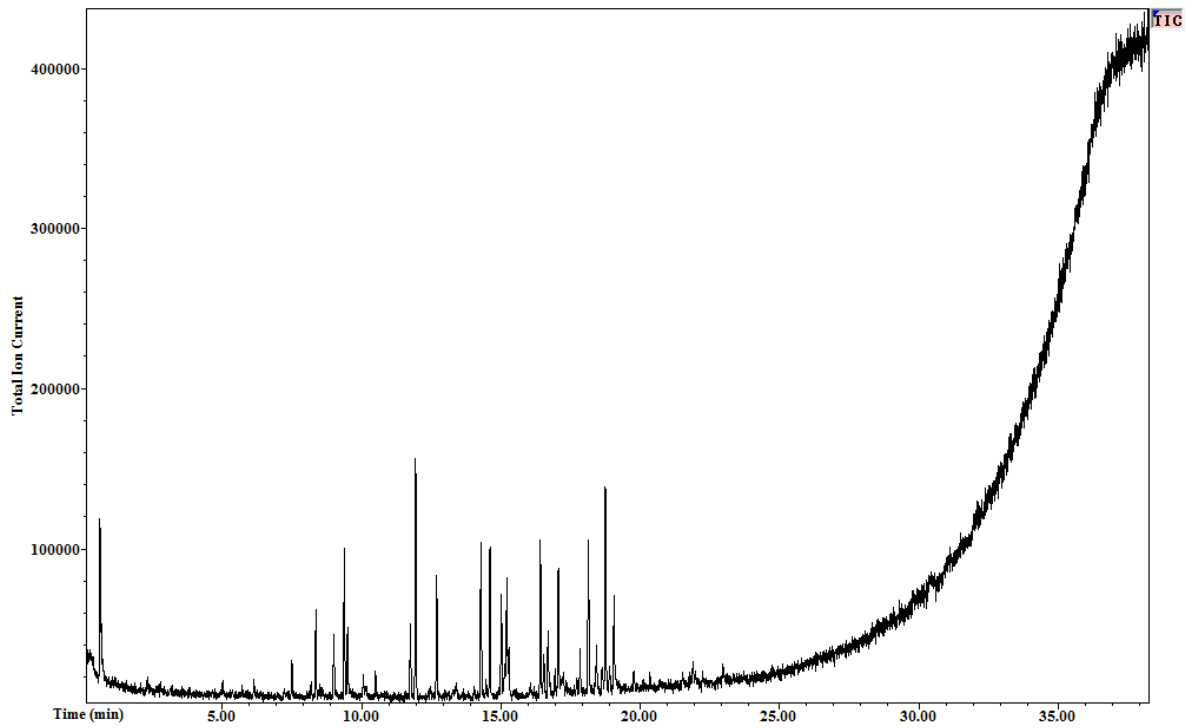


Figura 9. Cromatograma de la extracción realizada a chiles frescos por 15 minutos a 60°C separado con el método SPME2 (25 picos).

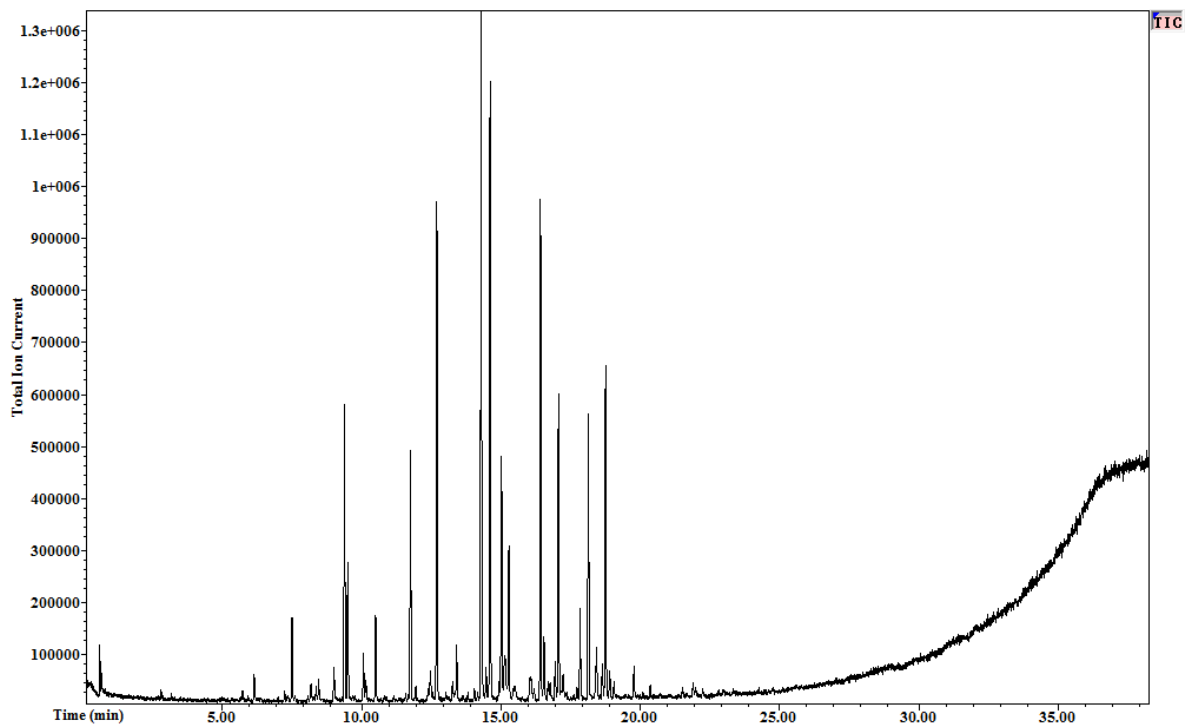


Figura 10. Cromatograma de la extracción realizada a chiles frescos por 20 minutos a 60°C separado con el método SPME2 (53 picos).

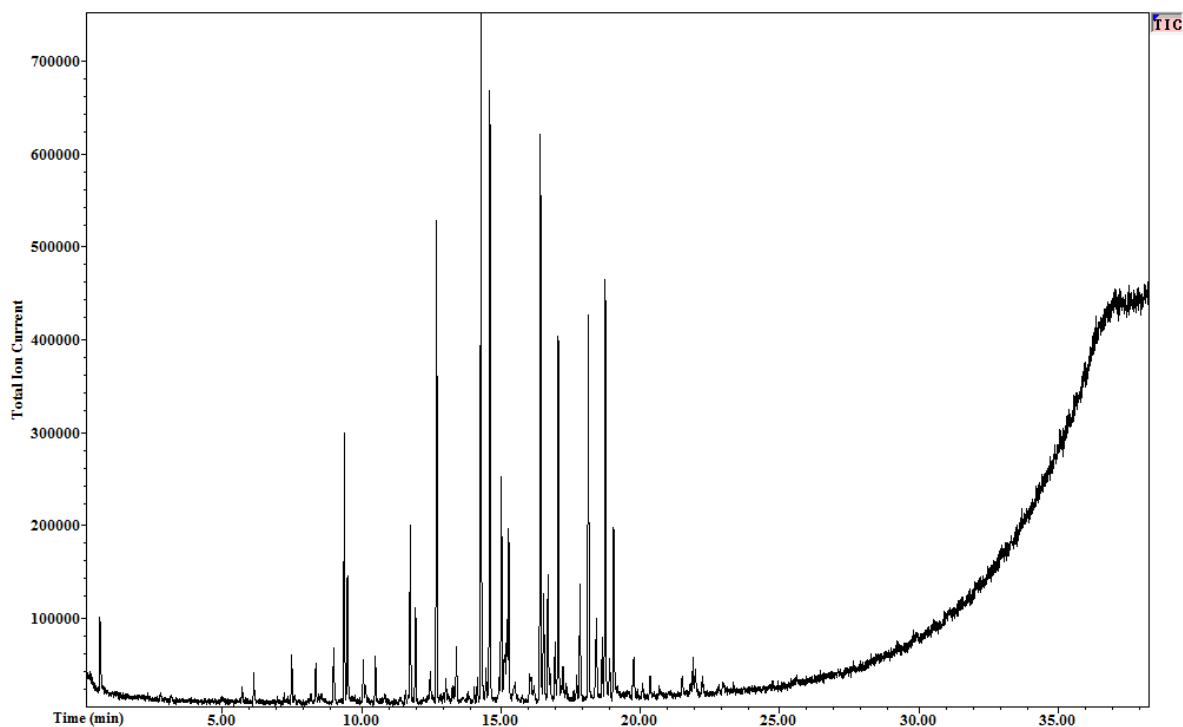


Figura 11. Cromatograma de la extracción realizada a chiles frescos por 30 minutos a 60°C separado con el método SPME2 (48 picos).

5.1.2 Optimización de la separación

Al inicio del desarrollo del experimento, se utilizó un método de separación arbitrario, no optimizado (SPME2), utilizando este método, se seleccionaron la temperatura y el tiempo óptimos para la extracción. La Figura 12 muestra un cromatograma obtenido mediante el uso de dicho método.

Como puede observarse en la Figura 12, la mayoría de los picos se concentran en el intervalo de 6 a 22 minutos, esta situación es algo que conviene perfeccionar y así mejorar la resolución del método.

Para evitar la variación mediante la extracción de varias muestras de chiles en el proceso de optimización de la separación, se utilizó una solución c.a. 10 ppm del aceite esencial de pimienta negra en cloruro de metileno, debido a la similitud de los componentes que esta contiene y los del aroma de los chiles.

Se realizó una primera separación utilizando un método muy parecido al SPME2 y que fue llamado PIM1, una de las principales diferencias es la columna capilar utilizada con 30 metros de largo en lugar de 25, además de diámetro y espesor menores lo que resulta en un aumento del número de platos teóricos y la permanencia en la fase estacionaria por un tiempo menor. La Figura 13 muestra el cromatograma obtenido con el método de separación PIM1.

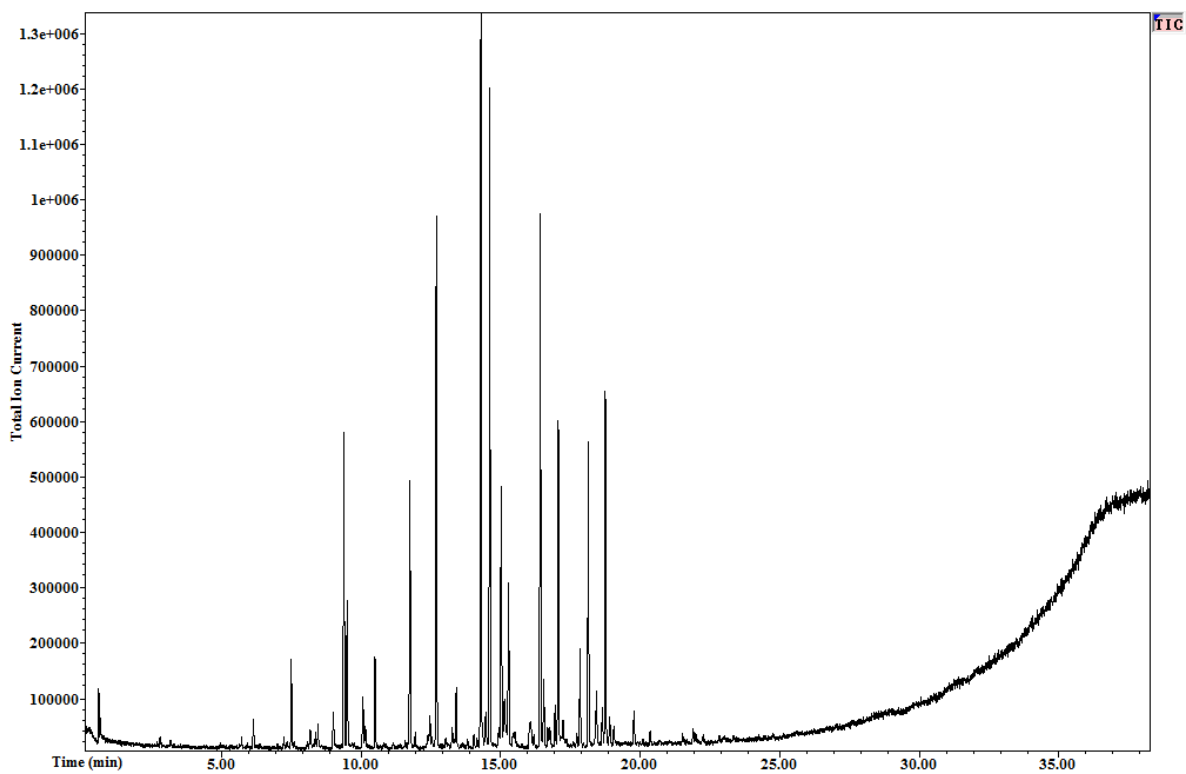


Figura 12. Cromatograma del extracto de chile jalapeño separado por el método SPME2.

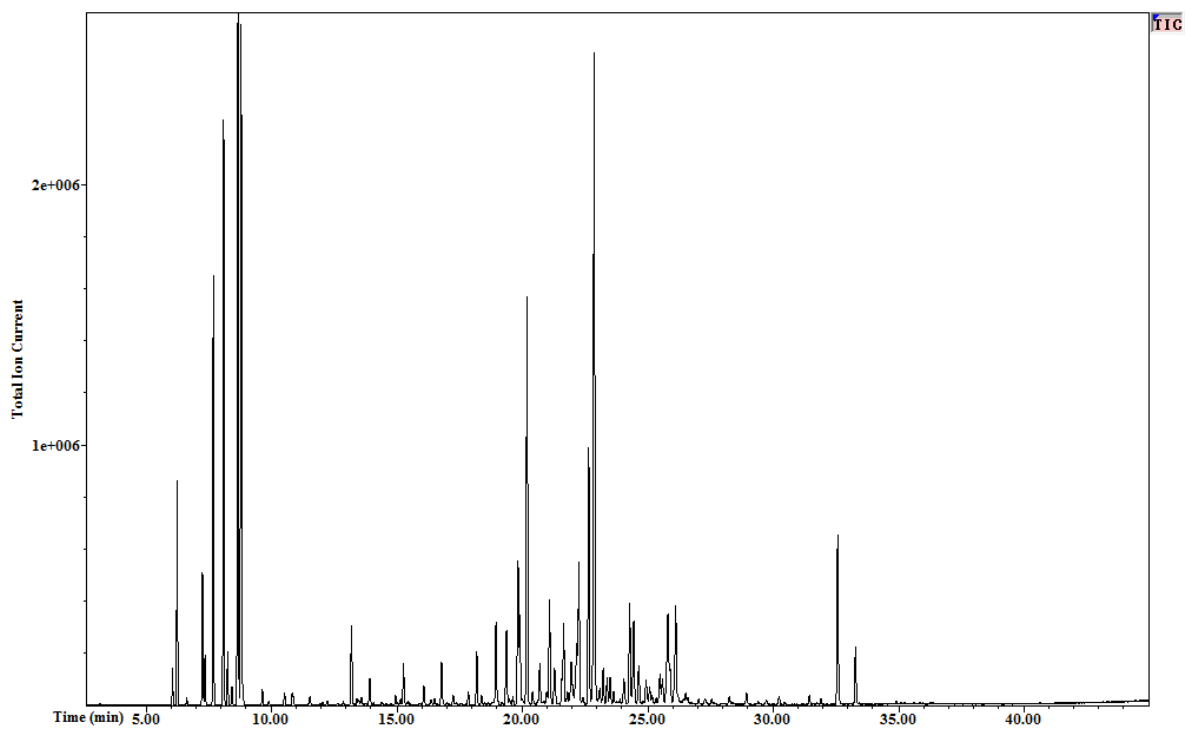


Figura 13. Cromatograma de la solución de aceite esencial de pimienta negra separada por el método PIM1.

La separación de los componentes del aceite esencial de pimienta fue optimizada modificando principalmente el programa de temperatura del horno del cromatógrafo, esto es debido a que los componentes de la mezcla presentan un amplio intervalo de temperaturas de ebullición y el aumento de la temperatura del horno por etapas es una buena estrategia para favorecer la separación de los mismos. El cromatograma que muestra el resultado de dicha optimización se presenta en la Figura 14.

Se obtuvo una notable mejora en la separación del aceite esencial de pimienta negra y entonces se evaluó este método de separación utilizando extractos SPME de chile jalapeño, se realizaron algunas modificaciones en el programa de temperatura del horno para ajustar el método de separación a los componentes del chile y obtener la mejor resolución posible en el menor tiempo de análisis. La Figura 15 muestra un cromatograma realizado con el método SPME3G en el que se separaron los componentes extraídos mediante SPME de una muestra de chile jalapeño.

Al terminar esta etapa de optimización de la separación, puede observarse una gran mejora en la resolución de los compuestos, esto puede observarse si se compara la Figura 12 con la Figura 15.

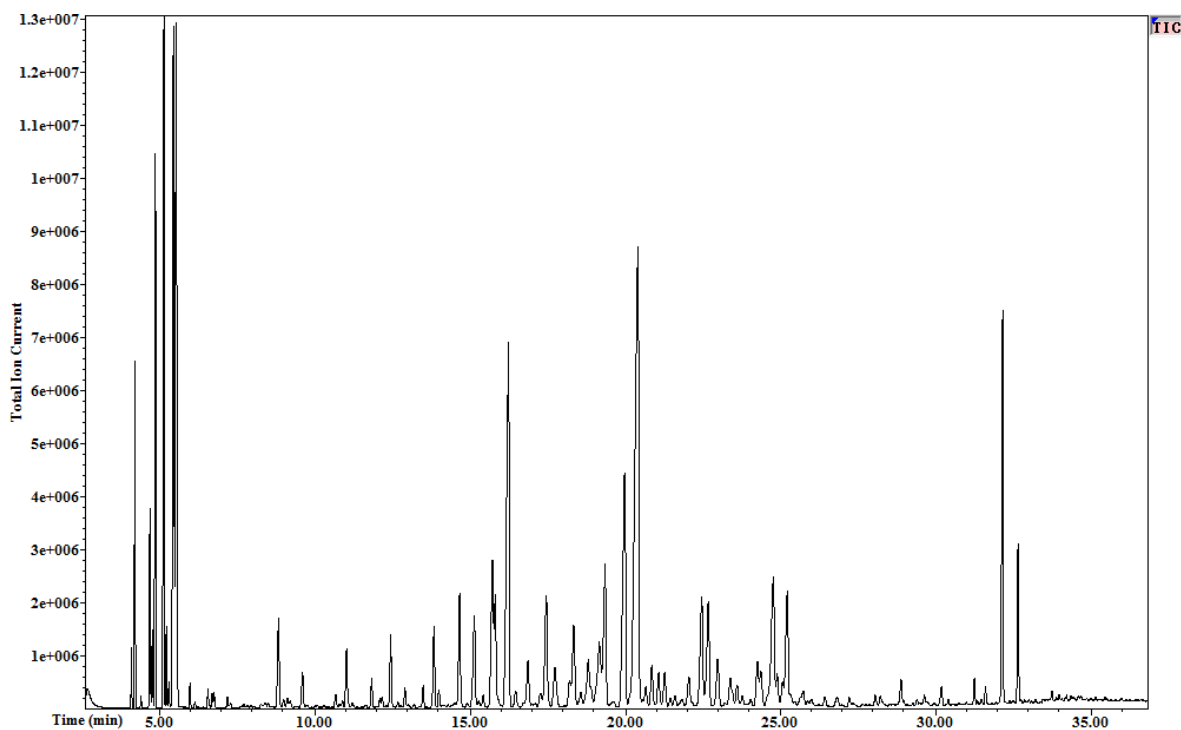


Figura 14. Cromatograma de la solución de aceite esencial de pimienta negra separada por el método PIM3F.

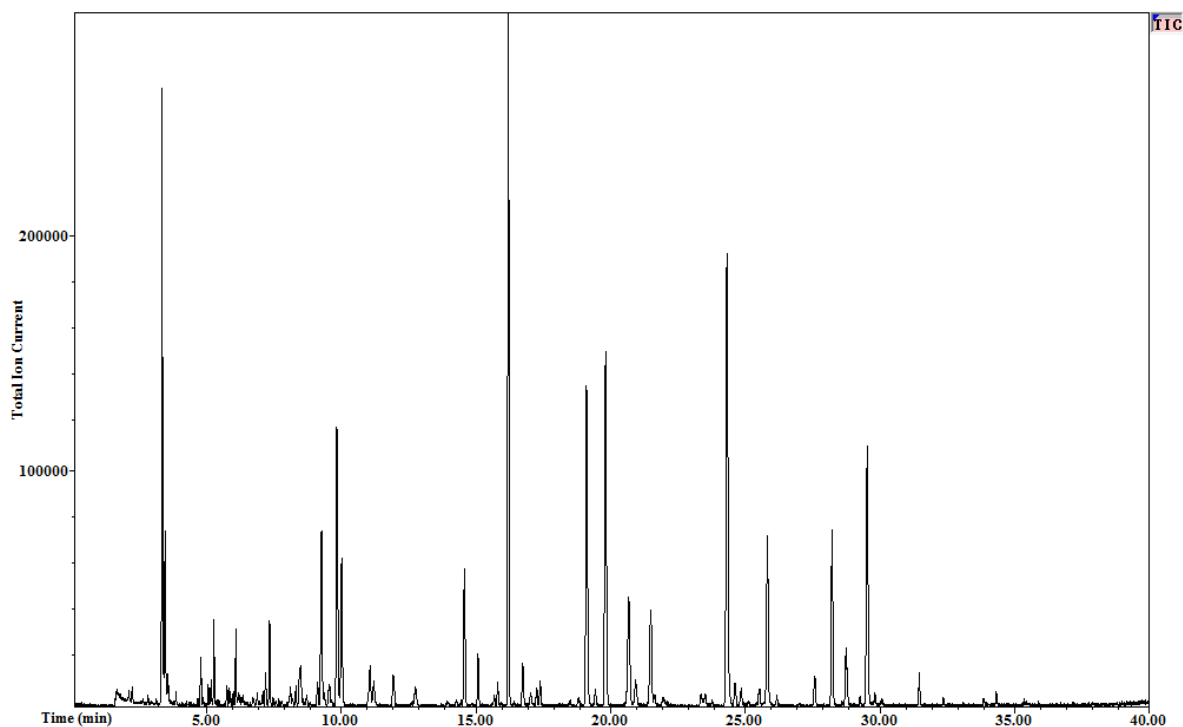


Figura 15. Cromatograma del extracto de chile jalapeño separado por el método SPME3G.

5.1.3 Optimización de la inyección

El modo de inyección split, hace que no toda la muestra entre en la columna, sino que una parte de ella sea expulsada mediante un sistema de purga.

Con el objetivo de obtener picos mejor definidos y espectros más puros, se decidió aumentar la cantidad de analitos que entran a la columna se utilizó el modo de inyección splitless.

Debido a que con el inyector en modo splitless, existe una rápida evaporación inicial de la muestra, esta entra a la columna en mayor cantidad considerablemente mayor que en una inyección split típica. Esto produce la acumulación de analitos al inicio de la columna y el ensanchamiento de los picos de los compuestos que eluyen inicialmente.

Para evitar este efecto se utilizó una trampa fría la menor temperatura que se logró alcanzar con el equipo para poder enfocar los analitos fue de 37°C. Debido a las modificaciones de la temperatura inicial del programa de temperatura se tuvo que ajustar todo el programa para que ofreciera la mejor resolución de los componentes del aroma de los chiles.

La Figura 16 muestra un cromatograma de una muestra de chile jalapeño extraída con la fibra con cubierta de PDMS 100 µm en las condiciones óptimas, y separada utilizando el método optimizado SPME-DRY. Como se aprecia en ella, se tiene una buena resolución para la mayoría de los compuestos extraídos.

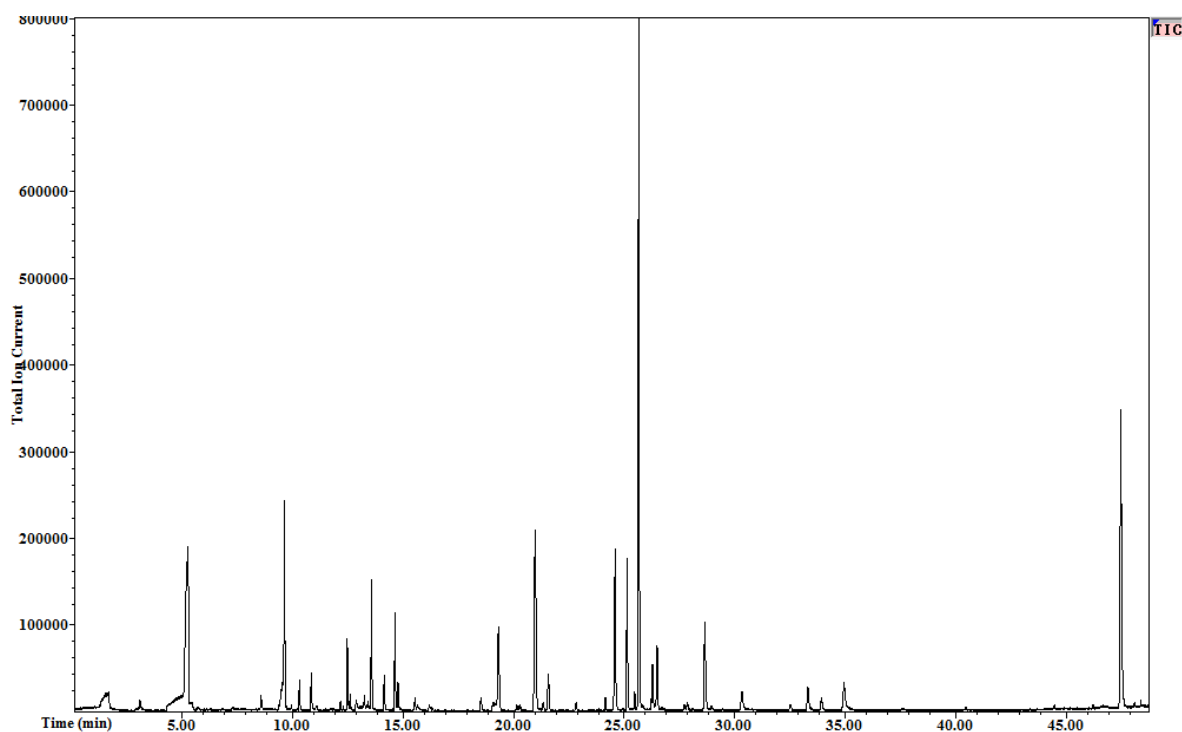


Figura 16. Cromatograma del extracto de chile jalapeño separado por el método SPME-DRY.

4.2 Análisis de diferentes tipos de chiles.

Los diferentes tipos de chiles coleccionados fueron analizados utilizando el método desarrollado y optimizado de acuerdo a su estado fresco o seco.

Tabla 5. Condiciones de análisis para chiles frescos y secos.

Variable	Fresco	Seco
Volumen de espacio sobrenadante	≈ 50%	≈ 50%
Temperatura de extracción	60°C	90°C
Tiempo de extracción	20 min	20 min
Tiempo de desorción	2 min	2 min
Método de separación cromatográfica	SPME-DRY	SPME-DRY

4.3 Identificación de los componentes del aroma de los chiles.

Para la identificación de los componentes del aroma de los chiles se compararon los espectros registrados en las librerías de espectros con los espectros extraídos de los escaneos de los diferentes cromatogramas.

Debido a la escasa o nula variación entre el espectro de masas extraído y el reportado en la librería se considera positiva la identificación de todos los compuestos enlistados en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** del **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**.

4.4 Composición del aroma de las diferentes variedades de chiles.

La **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, muestran los diferentes compuestos que se encontraron formando parte del aroma de chiles frescos y/o secos.

Muchos de los compuestos identificados están asociados con una actividad en el órgano olfatorio, principalmente los alcoholes, aldehídos, ésteres, algunos hidrocarburos, y la tetrametilpirazina en conjunto con la 2-metoxi-3-isobutil-pirazina son los principales grupos de compuestos reportados como los principales responsables del aroma de ciertos chiles.

Los compuestos volátiles que se encontraron presentes con mayor frecuencia en los chiles son: Limoneno, ácido propiónico, hexanal, 2-metil-tetradecano, mosleno, 3-metil-butanal, heptadecano, 5-etil-2,2,3-trimetil-heptano, 1,1-dimetilpropil-pentanoato, 2-metil-3-metilbutil-butanoato, 2-metil-tetradeceno, pentadecano y hexadecano.

En general los chiles secos presentaron un mayor número de aldehídos e hidrocarburos y un menor número de ésteres con respecto a su forma fresca.

Uno de los compuestos que la literatura cita como característicos del aroma de los chiles es la tetrametilpirazina,^{11,13-15} esta estuvo presente en la mayoría de los chiles secos y únicamente en un chile fresco, el pimiento verde.

Se pueden apreciar ciertas consistencias en el perfil del aroma de las variedades de una misma especie de chile, por ejemplo, el chile jalapeño, el poblano, el de árbol y el serrano pertenecen a la misma especie *Capsicum annuum*, sin embargo, existen diferencias entre los perfiles aromáticos de estas variedades de las cuales las del chile poblano es la más contrastante.

Como puede verse muchos chiles comparten componentes del aroma en común lo que les confiere una similitud en su sabor, pero también se puede inferir como una ligera variación como la presencia o ausencia de otro componente puede afectar el perfil de sabor de un chile.

En el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se presentan los cromatogramas representativos de cada una de las variedades analizadas y los correspondientes a los blancos de fibra y de blancos de vial + fibra. En estos blancos se observa la presencia de polidimetilsiloxanos, este es un fenómeno muy común al utilizar la técnica de SPME con fibras de PDMS, algunas muestras contienen otro tipo de siloxanos presentes, esto puede deberse al uso de los mismos para el abrillantamiento de los chiles.

5 Conclusiones

Se desarrolló y optimizó un método para el análisis de los componentes del aroma de chiles frescos y dicho método se modificó para el análisis correcto de chiles secos utilizando la técnica de SPME-CG/EM.

Las fibras de tipo bipolar son las más adecuadas para la extracción de los componentes del aroma de los chiles ya que estas presentan afinidad por la mayoría de los compuestos a diferencia de las fibras polares o no polares que sólo presentan afinidad por los compuestos semejantes.

La determinación de la temperatura óptima de extracción resulta muy importante, ya que las constantes de equilibrio dependen de esta y si no se establece un equilibrio, los analitos no pueden recuperarse eficientemente.

El tiempo de extracción es crucial durante la fase previa al establecimiento del equilibrio, una vez que se alcanza el equilibrio, pueden comenzar a presentarse fenómenos de competencia entre los analitos por los sitios activos de la fibra lo que puede traer como consecuencia la obtención de un perfil aromático incompleto o sesgado.

El procedimiento de preparación de muestra es igual para el caso de chiles frescos y chiles secos, con la única diferencia de la temperatura de extracción, esta similitud puede facilitar la automatización del método.

Unas de las ventajas de este método es que se requieren aproximadamente 5 minutos para la preparación del vial y sólo se requieren 20 minutos para la extracción, por lo que se considera un método rápido en el que la introducción de artefactos debido al intervalo de tiempo de preparación de la muestra se ve disminuida de manera significativa.

Al no requerir del uso de disolventes, se trata de un método confiable ya que se evitan posibles reacciones con el mismo.

El método desarrollado se utilizó satisfactoriamente para caracterizar los componentes del aroma de algunas de las diferentes variedades de chile comercializadas en la Central de Abastos del D.F. y podría ser utilizado para el análisis de componentes del aroma de otras variedades de chile.

Ya que con este método puede realizarse muestreo de campo, podría implementarse para la determinación de la calidad de los chiles en las diferentes etapas de comercialización de los mismos.

Con base al método expuesto podrían desarrollarse estándares, generados de muestras estadísticamente representativas, para el control de calidad y el desarrollo de saborizantes y otros productos relacionados con los chiles.

La técnica de SPME presenta la desventaja de que las fibras son muy frágiles y un analista inexperto puede dañarlas fácilmente.

Los perfiles de aroma de las diferentes variedades de chiles analizadas, presentan varias diferencias, estas podrían ser las que hacen especiales y únicas cada una de las recetas tradicionales de la cocina típica mexicana.

5 Bibliografía

1. Long-Solis, J. *Capsicum y cultura: la historia del chilli*. Fondo de Cultura Económica, (1986).
2. Marinelli, J. *Chile Peppers*. Science Press, Mack Printing Group, New York (1999).
3. Amit Krishna De *Capsicum: the Genus Capsicum*. Taylor & Francis, New York (2003).
4. Raghavan Susheela *Handbook of spices, seasonings, and flavorings*. CRC Press, Taylor & Francis, New York (2007).
5. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx. No 19-2006.indd *Sembrando Soluciones (Numeralia)*. [En línea] Julio de 2006. [Citado el: 16 de Diciembre de 2007.] <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/sembrando/2006/19-2006.pdf>
6. Voilley Andre y Etievant Patrick *Flavour in Food*. CRC Press LLC, Boca Raton (2006).
7. Marsili Ray *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*. Marcel Dekker, Inc., New York (2002).
8. Skoog Douglas A., Holler, F. J. y Nieman Timothy A. *Principios de Análisis Instrumental*. McGraw-Hill/Interamericana, Madrid (2001).
9. Handley Alan J. y Adlard Edward R. *Gas Chromatographic Techniques and Applications*. Sheffield Academic Press Ltd., Wilshire (2001).
10. McMaster Marvin y McMaster Christopher *GC/MS A practical User's Guide*. Wiley-VCH, New York (1998).
11. Kocsis, N., Amtmann, M., Mednyanszky, Z. y Korany, K. GC-MS Investigation of the Aroma Compounds of Hungarian Red Paprika (*Capsicum annuum*) Cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* **15**, 195-203 (2002).
12. Pawliszyn, J. *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*. Elsevier Science B.V., Amsterdam (2002).
13. Wilkes, J. G. et al. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *Journal of Chromatography A* **880**, 3-33 (2000).
14. van Ruth, S., Boscaini, E., Mayr, D., Pugh, J. y Posthumus, M. Evaluation of three gas chromatography and two direct mass spectrometry techniques for aroma analysis of dried red bell peppers. *International Journal of Mass Spectrometry* **223-224**, 55-65 (2003).
15. Mazida, M. M., Salleh, M. M. y Osman, H. Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annuum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). *Journal of Food Composition and Analysis* **18**, 427-437 (2005).

16. Sousa, E. T. et al. Multivariate optimization and HS-SPME/GC-MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinense* sp. peppers. *Microchemical Journal* **82**, 142-149 (2006).
17. Lee, M. R., Chang, L. Y. y Dou, J. Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **582**, 19-23 (2007).
18. Rubinson, K. A. y Rubinson, J. F. *Análisis Instrumental*. Pearson Educación S.A., Madrid (2001).
19. Kataoka, H., Lord, H. L. y Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* **880**, 35-62 (2000).
20. Natera Marin, R., Castro Mejias, R., de Valme Garcia Moreno, M., Garcia Rowe, F. y Garcia Barroso, C. Headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar: Validation study. *Journal of Chromatography A* **967**, 261-267 (2002).
21. Plutowska, B. y Wardencki, W. Aromagrams - Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chemistry* **101**, 845-872 (2007).
22. Hummel Thomas y Antje Welge-Lüssen *Taste and Smell: an Update*. S. Karger AG, Basel, Switzerland (2006).
23. Poole Colin F. *The Essence of Chromatography*. Elsevier Science B.V., Amsterdam (2003).
24. McNair Harold M. y Miller James M. *Basic Gas Chromatography*. John Wiley & Sons, Inc., New York (1998).
25. Dass Chhabil *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey (2007).
26. Smith R.Martin *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*. John Wiley & Sons, Inc., New Jersey (2004).
27. McLafferty Fred W. y Turecek Frantisek *Interpretation of Mass Spectra*. University Science Books, Sausalito, CA, USA (1993).

Apéndice I

Tabla 1. Compuestos identificados presentes en las diferentes variedades de chiles frescos.

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Jalapeño	Poblano	Habanero	Caribe	Árbol	Serrano	Güero	Chilaca	Pimiento verde	Pimiento rojo	Manzano
1	1.66	Ácido propiólico	✓			✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	2.66	3-Metil-butanal							✓	✓	✓	✓	✓
3	2.77	2-Metil-butanal										✓	✓
4	4.49	2,3 Butanodiol	✓	✓		✓						✓	✓
5	4.77	Hexanal	✓	✓		✓			✓	✓	✓	✓	✓
6	5.58	4-Metil-1-pentanol		✓						✓		✓	
7	6.33	Propil-ciclopropano		✓							✓	✓	✓
8	7.86	3-Metil-apopineno											
9	8.54	2,2,6-Trimetil-octano		✓									
10	8.55	2,2,6,6-Tetrametil-heptano	✓								✓		
11	8.86	1-Heptanol											
12	8.89	4-Metil-1-(1-metiletil)-bicyclo[3.1.0]hex-2-eno											
13	8.94	Pseudopineno											
14	9.10	2,2,3-Trimetil-pentano										✓	✓
15	9.37	2-Pentil-furano	✓	✓									
16	9.39	1,2,3-Trimetil-benceno							✓	✓	✓	✓	
17	9.45	Ciclogeraniolano	✓		✓				✓				
18	9.82	3-Careno		✓					✓	✓			
19	9.94	3-Metilbutil-butanoato	✓	✓				✓				✓	
20	9.96	Hexil-acetato	✓										
21	9.99	Isoterpinoleno										✓	✓
22	10.11	2,7-Dimetil-1,7-octadieno			✓				✓				
23	10.19	2,2,7,7-Tetrametil-octano											
24	10.20	o-Cymeno								✓			
25	10.30	Limoneno	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
26	10.44	6-Etil-2-metil-octano										✓	

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Jalapeño	Poblano	Habanero	Caribe	Árbol	Serrano	Güero	Chilaca	Pimiento verde	Pimiento rojo	Manzano
27	10.57	Ocimeno		✓					✓		✓		
28	10.72	3,4,5-Trimetil-heptano											
29	10.87	2,3,6,7-Tetrametil-octano	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
30	10.94	5-Etil-2,2,3-trimetil-heptano		✓		✓			✓	✓	✓		
31	10.99	1,1-Dimetilpropil-pentanoato		✓				✓		✓	✓	✓	
32	11.09	Mosleno	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓		
33	11.20	2,5,9-Trimetil-decano								✓	✓		
34	11.36	2,2,3,4,6,6-Hexametil-heptano									✓		
35	11.66	2,3,3-Trimetil-pentano											
36	11.69	3,3,4-Trimetil-heptano											
37	11.78	Tetrametil-pirazina									✓		
38	11.96	3-Metil-decano		✓									
39	12.16	2-Metil-3-metilbutil-butanoato	✓			✓	✓	✓		✓		✓	
40	12.29	3-Metil-3-metilbutil-butanoato			✓	✓		✓					
41	12.47	2-Metil-hexil-propanoato	✓			✓	✓	✓	✓				
42	12.55	2-Etenil-1,1-dimetil-3-metilen-ciclohexano		✓	✓		✓	✓	✓				
43	12.74	2,2,4-Trimetil-hexano	✓										
44	13.10	2-Metil-pentil-butanoato		✓		✓	✓	✓					
45	13.23	trans-3-Hexenil-butanoato	✓	✓			✓	✓	✓				
46	14.13	2-Metoxi-3-isobutil-pirazina	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
47	14.27	cis-3-Hexenil-butanoato		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
48	14.75	Hexil-valerato	✓				✓						✓
49	14.76	2,3,4,5-Tetrahidro-piridazina	✓		✓	✓	✓	✓	✓				
50	15.08	Heptil-butanoato				✓			✓				
51	15.19	4-Acetil-1,2,3,5,5-pentametil-2-ciclopenten-1-ona											
52	15.52	cis-3-Hexenil-valerato	✓		✓		✓	✓	✓				
53	15.63	Hexil-neopentanoato	✓				✓						
54	15.65	2-Metil-hexil-butanoato	✓		✓	✓		✓	✓				
55	15.89	trans-2-Hexenil-valerato			✓								
56	15.97	2-Metil-2-dodeceno			✓	✓	✓	✓					
57	16.49	2,3,6-Trimetil-decano			✓								

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Jalapeño	Poblanero	Habanero	Caribe	Árbol	Serrano	Güero	Chilaca	Pimiento verde	Pimiento rojo	Manzano
58	17.88	Tridecano			✓								
59	18.50	Hexil-hexanoate	✓		✓	✓	✓	✓	✓			✓	
60	19.48	2-Metil-heptil-butanoato		✓	✓	✓					✓	✓	
61	20.04	4-Hexen-1-il-hexanoato			✓	✓	✓		✓				
62	20.27	1,1-Dimetil-2-nonil-ciclopropano	✓		✓		✓	✓					
63	20.49	trans-2-Metilciclohexil-pentanoato			✓								
64	20.97	2-Metil-tridecano	✓		✓	✓	✓	✓					
65	20.99	4-Metil-tridecano			✓	✓			✓	✓			✓
66	21.33	Ylangeno	✓		✓		✓	✓					
67	21.57	α-Cubebeno	✓										✓
68	21.57	Copaeno	✓		✓				✓	✓			✓
69	22.00	cis-3-Hexenil-hexanoato			✓								
70	22.39	ε -Elemeno		✓	✓								✓
71	22.73	2,2-Dimetil-octil-propanoato			✓								
72	22.82	Tetradecano	✓		✓		✓	✓					
73	23.48	Cariofileno			✓								
74	23.61	2-Metilen-biciclo[3.2.0]heptano			✓							✓	✓
75	24.16	Bergamoteno	✓		✓							✓	
76	24.18	2-Metil-octil-butanoato			✓								
77	24.27	Biciclo[3.2.1]octano			✓								
78	24.37	Himachala-2,4-dieno			✓								
79	24.53	Himachaleno				✓			✓				
80	24.60	2-Metil-tetradeceno	✓			✓	✓	✓	✓				
81	24.70	(-)-Isoaromadendreno-(V)			✓				✓				
82	24.70	α-Cariofileno			✓								
83	24.93	(E)- ε -Farneseno					✓	✓					
84	24.94	(Z)- ε -Farneseno			✓			✓					
85	25.14	2-Metil-tetradecano	✓		✓	✓	✓	✓	✓				✓
86	25.43	ε -Maalieno											✓
87	25.49	Longifoleno-(V4)	✓			✓	✓		✓				✓
88	25.53	Isocariofileno			✓	✓							✓

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Jalapeño	Poblano	Habanero	Caribe	Árbol	Serrano	Güero	Chilaca	Pimiento verde	Pimiento rojo	Manzano
89	25.60	£ -Cubebeno			✓	✓							
90	25.69	Aromadendreno	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
91	25.79	£ -lonona	✓		✓		✓						
92	25.87	Eremofileno			✓			✓	✓				
93	26.03	2-Isopropenil-4a,8-dimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno			✓		✓					✓	✓
94	26.22	£ -Himachaleno	✓			✓	✓		✓				✓
95	26.29	Pentadecano	✓		✓	✓	✓	✓	✓				
96	26.40	Valenceno				✓	✓	✓					✓
97	27.03	Cadineno			✓							✓	
98	27.33	1,2,3,4,4a,7-Hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno											
99	27.52	9,10-Dehidro-cicloisolongifoleno			✓								
100	27.77	(Z)-7-Hexadeceno	✓		✓		✓	✓					✓
101	28.65	2-Metil-pentadecano	✓		✓	✓	✓	✓	✓				✓
102	28.95	3-Metil-pentadecano	✓				✓	✓		✓		✓	
103	30.32	Hexadecano	✓		✓		✓	✓	✓			✓	✓
104	32.51	8-Heptadeceno	✓	✓			✓						
105	33.31	2-Metil-hexadecano	✓	✓			✓	✓					
106	33.33	4-Metil-hexadecano	✓	✓					✓				✓
107	34.93	Heptadecano	✓			✓	✓	✓	✓				✓
108	37.57	4-Metil-heptadecano								✓			
109	39.03	Octadecano											✓
110	42.67	Nonadecano		✓									

Tabla 2. Compuestos identificados presentes en las diferentes variedades de chiles secos.

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Catarina	Cascabel	Chipotle	Puya	Guajillo	Canica	Mulato	Ancho	Pasilla	Mora	Morita	Árbol (seco)	Piquín (seco)
1	1.66	Ácido propiólico	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	2.66	3-Metil-butanal	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
3	2.77	2-Metil-butanal	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	
4	4.49	2,3 Butanodiol	✓	✓	✓	✓			✓			✓			
5	4.77	Hexanal	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	5.58	4-Metil-1-pentanol										✓			
7	6.33	Propil-ciclopropano								✓	✓				
8	7.86	3-Metil-apopineno	✓	✓		✓	✓	✓		✓		✓		✓	✓
9	8.54	2,2,6-Trimetil-octano				✓		✓	✓	✓	✓				
10	8.55	2,2,6,6-Tetrametil-heptano		✓	✓		✓		✓	✓	✓			✓	
11	8.86	1-Heptanol		✓					✓	✓					
12	8.89	4-Metil-1-(1-metiletil)-biciclo[3.1.0]hex-2-eno	✓			✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓
13	8.94	Pseudopineno	✓	✓		✓	✓	✓	✓			✓		✓	
14	9.10	2,2,3-Trimetil-pentano						✓	✓	✓	✓			✓	
15	9.37	2-Pentil-furano	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓		✓
16	9.39	1,2,3-Trimetil-benceno	✓			✓			✓		✓			✓	
17	9.45	Ciclogeraniolano								✓	✓				
18	9.82	3-Careno	✓	✓		✓		✓			✓	✓		✓	
19	9.94	3-Metilbutil-butanoato			✓		✓			✓					
20	9.96	Hexil-acetato													
21	9.99	Isoterpinoleno		✓		✓									
22	10.11	2,7-Dimetil-1,7-octadieno													
23	10.19	2,2,7,7-Tetrametil-octano	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
24	10.20	o-Cymeno	✓			✓	✓	✓			✓	✓			
25	10.30	Limoneno	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
26	10.44	6-Etil-2-metil-octano	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
27	10.57	Ocimeno	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Catarina	Cascabel	Chipotle	Puya	Guajillo	Canica	Mulato	Ancho	Pasilla	Mora	Morita	Árbol (seco)	Piquín (seco)
28	10.72	3,4,5-Trimetil-heptano		✓		✓		✓	✓		✓		✓	✓	
29	10.87	2,3,6,7-Tetrametil-octano	✓			✓		✓	✓	✓			✓	✓	
30	10.94	5-Etil-2,2,3-trimetil-heptano	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
31	10.99	1,1-Dimetilpropil-pentanoato	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
32	11.09	Mosleno	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
33	11.20	2,5,9-Trimetil-decano	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
34	11.36	2,2,3,4,6,6-Hexametil-heptano	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	
35	11.66	2,3,3-Trimetil-pentano	✓			✓		✓	✓		✓			✓	
36	11.69	3,3,4-Trimetil-heptano		✓		✓			✓	✓	✓				
37	11.78	Tetrametil-pirazina	✓	✓	✓	✓		✓	✓		✓	✓	✓		
38	11.96	3-Metil-decano	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
39	12.16	2-Metil-3-metilbutil-butanoato	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	
40	12.29	3-Metil-3-metilbutil-butanoato		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
41	12.47	2-Metil-hexil-propanoato						✓	✓	✓		✓			
42	12.55	2-Etenil-1,1-dimetil-3-metilen-ciclohexano		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓				
43	12.74	2,2,4-Trimetil-hexano	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	
44	13.10	2-Metil-pentil-butanoato						✓		✓					
45	13.23	trans-3-Hexenil-butanoato				✓		✓							
46	14.13	2-Metoxi-3-isobutil-pirazina	✓	✓		✓		✓							
47	14.27	cis-3-Hexenil-butanoato													
48	14.75	Hexil-valerato	✓	✓			✓								
49	14.76	2,3,4,5-Tetrahidro-piridazina				✓		✓	✓			✓		✓	
50	15.08	Heptil-butanoato						✓		✓					
51	15.19	4-Acetil-1,2,3,5,5-pentametil-2-ciclopenten-1-ona		✓	✓	✓		✓		✓	✓			✓	
52	15.52	cis-3-Hexenil-valerato													
53	15.63	Hexil-neopentanoato				✓									
54	15.65	2-Metil-hexil-butanoato		✓											
55	15.89	trans-2-Hexenil-valerato				✓		✓							
56	15.97	2-Metil-2-dodeceno													
57	16.49	2,3,6-Trimetil-decano													
58	17.88	Tridecano	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Catarina	Cascabel	Chipotle	Puya	Guajillo	Canica	Mulato	Ancho	Pasilla	Mora	Morita	Árbol (seco)	Piquín (seco)
59	18.50	Hexil-hexanoate										✓			
60	19.48	2-Metil-heptil-butanoato													
61	20.04	4-Hexen-1-il-hexanoato						✓							
62	20.27	1,1-Dimetil-2-nonil-ciclopropano										✓			
63	20.49	trans-2-Metilciclohexil-pentanoato													
64	20.97	2-Metil-tridecano	✓		✓	✓		✓	✓			✓	✓	✓	✓
65	20.99	4-Metil-tridecano		✓						✓	✓	✓		✓	
66	21.33	Ylangeno											✓		
67	21.57	α-Cubebeno	✓	✓				✓	✓	✓		✓			
68	21.57	Copaeno	✓			✓	✓	✓		✓	✓				
69	22.00	cis-3-Hexenil-hexanoato													
70	22.39	£ -Elemeno	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	
71	22.73	2,2-Dimetil-octil-propanoato													
72	22.82	Tetradecano	✓	✓		✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
73	23.48	Cariofileno	✓	✓		✓		✓	✓	✓				✓	
74	23.61	2-Metilen-biciclo[3.2.0]heptano						✓							
75	24.16	Bergamoteno						✓							
76	24.18	2-Metil-octil-butanoato				✓							✓		
77	24.27	Biciclo[3.2.1]octano				✓									
78	24.37	Himachala-2,4-dieno													
79	24.53	Himachaleno												✓	
80	24.60	2-Metil-tetradecano	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
81	24.70	(-)-Isoaromadendreno-(V)	✓				✓					✓			
82	24.70	α-Cariofileno	✓	✓		✓		✓	✓			✓			
83	24.93	(E)- £ -Farneseno						✓		✓		✓	✓		
84	24.94	(Z)- £ -Farneseno		✓		✓		✓	✓				✓	✓	
85	25.14	2-Metil-tetradecano	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
86	25.43	£ -Maaleno		✓					✓	✓			✓		
87	25.49	Longifoleno-(V4)	✓	✓		✓		✓	✓			✓	✓	✓	
88	25.53	Isocariofileno							✓						
89	25.60	£ -Cubebeno		✓	✓	✓			✓						

No.	T.R.	Nombre del compuesto	Catarina	Cascabel	Chipotle	Puya	Guajillo	Canica	Mulato	Ancho	Pasilla	Mora	Morita	Árbol (seco)	Piquín (seco)
90	25.69	Aromadendreno					✓		✓				✓		
91	25.79	£ -lonona	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	
92	25.87	Eremofileno	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	
93	26.03	2-Isopropenil-4a,8-dimetil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidronaftaleno		✓		✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	
94	26.22	£ -Himachaleno	✓					✓	✓					✓	
95	26.29	Pentadecano	✓	✓	✓	✓		✓	✓			✓	✓	✓	✓
96	26.40	Valenceno							✓				✓		
97	27.03	Cadineno		✓		✓									
98	27.33	1,2,3,4,4a,7-Hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno				✓									
99	27.52	9,10-Dehidro-cicloisolongifoleno													
100	27.77	(Z)-7-Hexadeceno										✓		✓	
101	28.65	2-Metil-pentadecano	✓	✓	✓	✓		✓				✓	✓		✓
102	28.95	3-Metil-pentadecano				✓		✓	✓			✓	✓	✓	
103	30.32	Hexadecano	✓	✓		✓	✓	✓				✓	✓	✓	✓
104	32.51	8-Heptadeceno										✓	✓	✓	
105	33.31	2-Metil-hexadecano						✓				✓	✓	✓	✓
106	33.33	4-Metil-hexadecano				✓		✓				✓			
107	34.93	Heptadecano	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
108	37.57	4-Metil-heptadecano			✓							✓			
109	39.03	Octadecano												✓	
110	42.67	Nonadecano										✓			

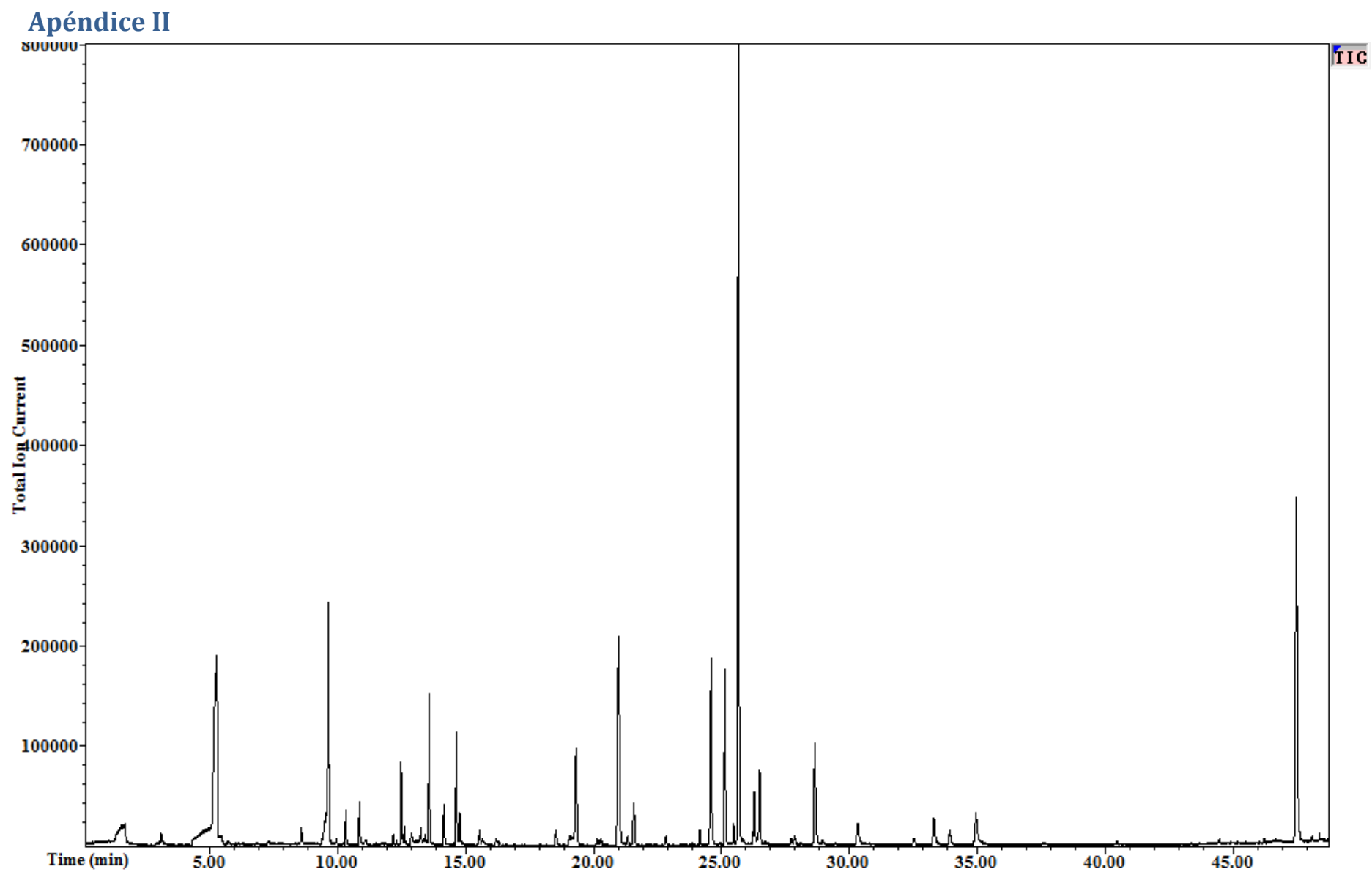


Figura 1. Cromatograma representativo del chile Jalapeño.

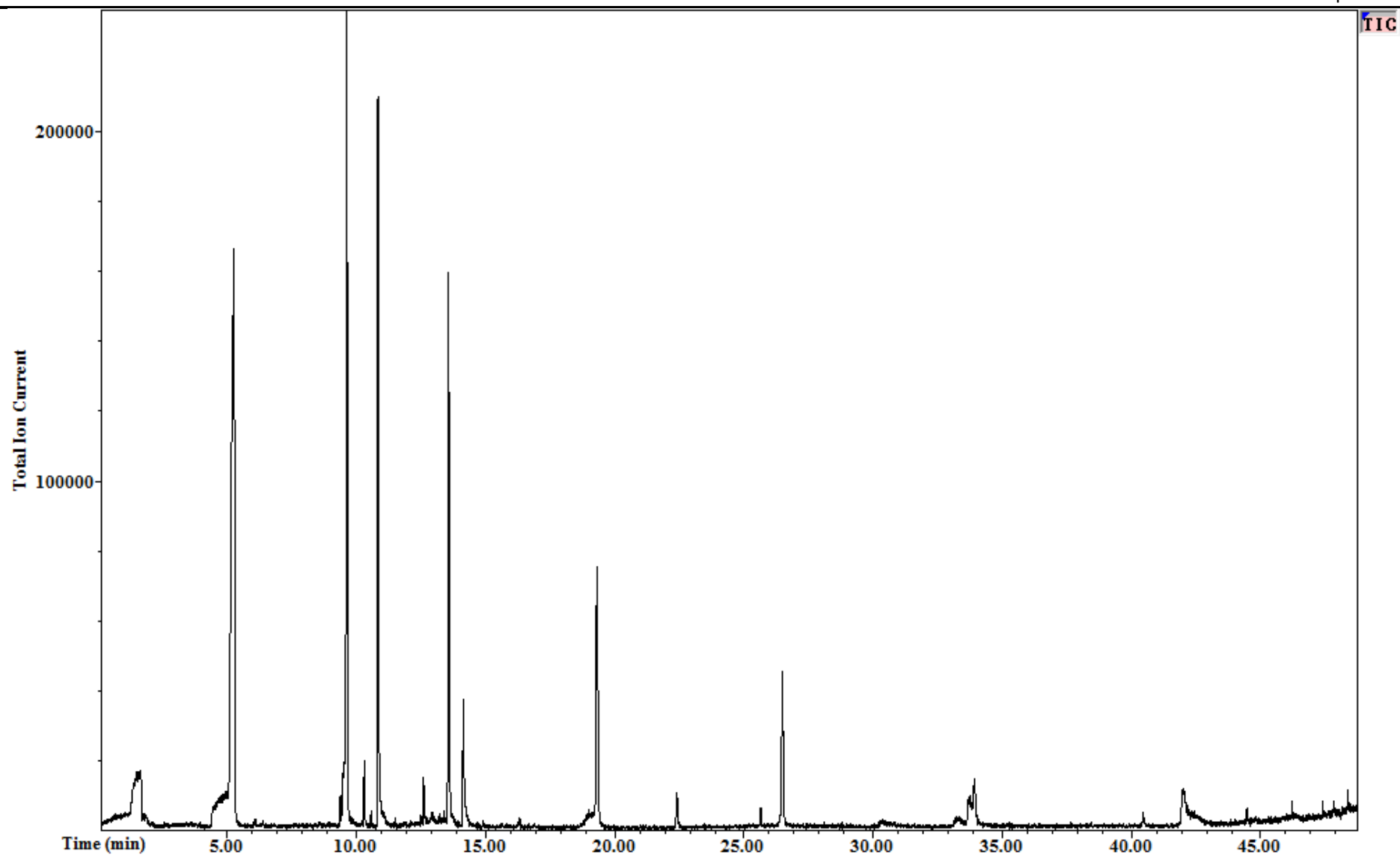


Figura 2. Cromatograma representativo del chile Poblano.

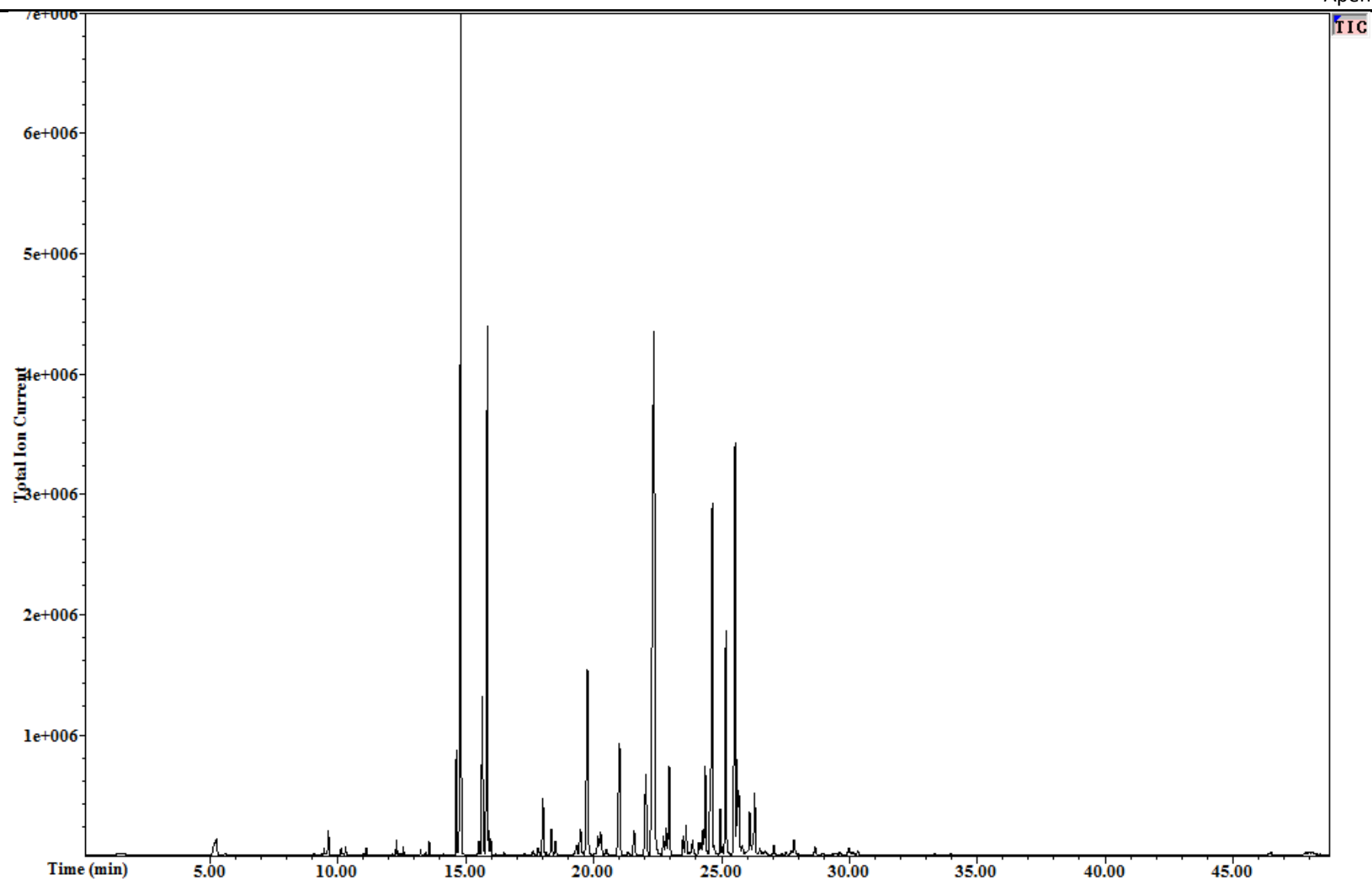


Figura 3. Cromatograma representativo del chile Habanero.

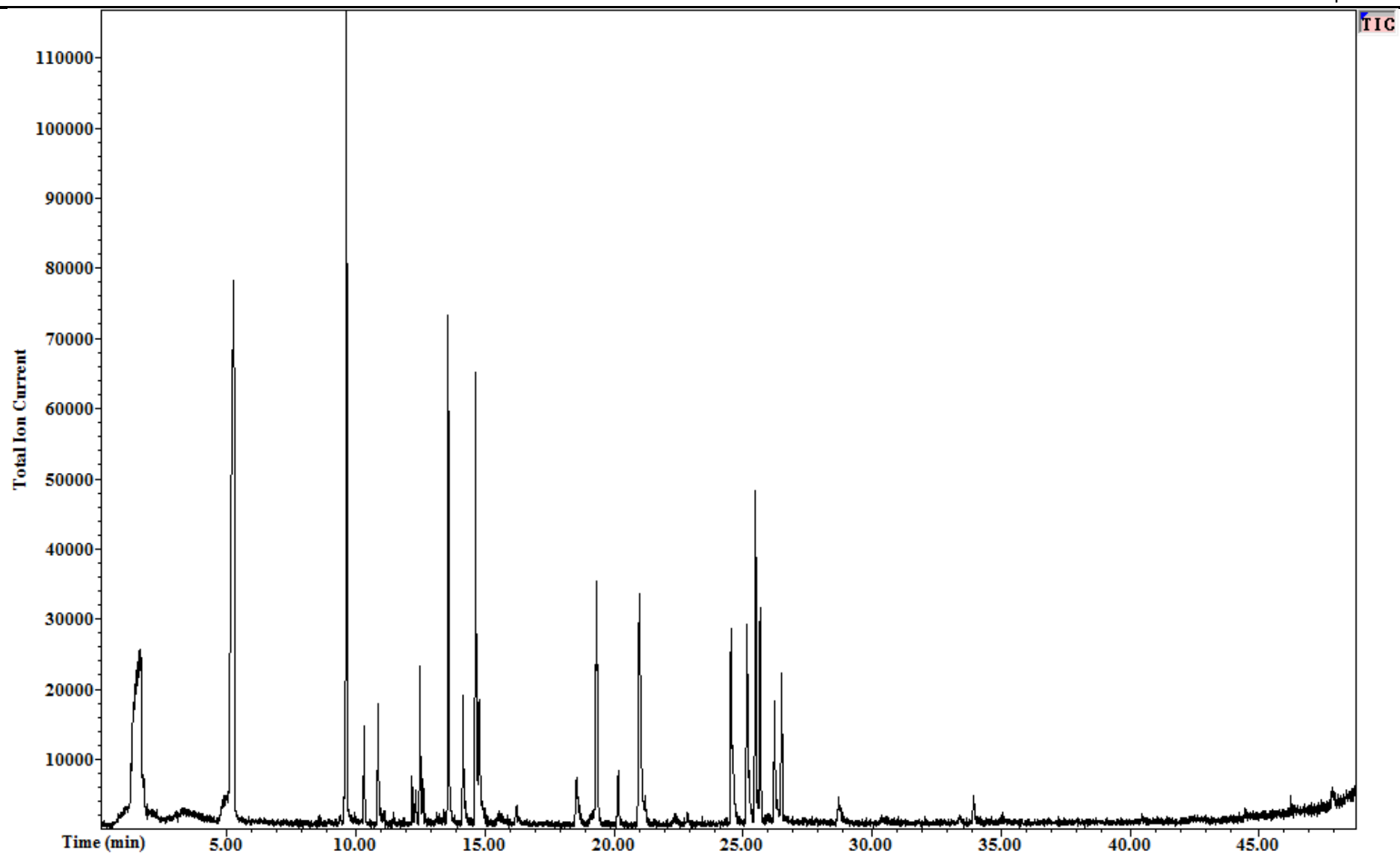


Figura 4. Cromatograma representativo del chile Caribe.

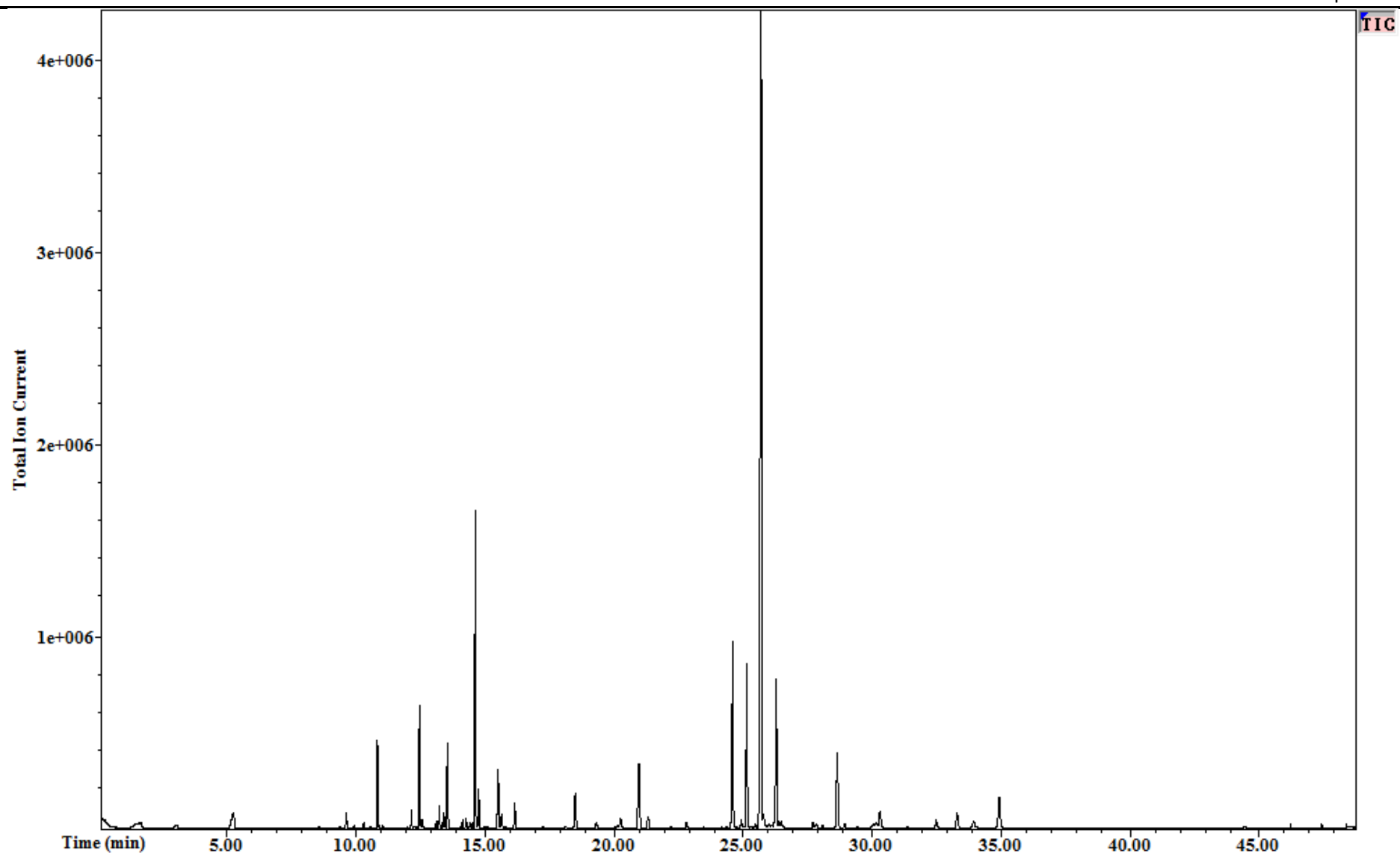


Figura 5. Cromatograma representativo del chile de Árbol.

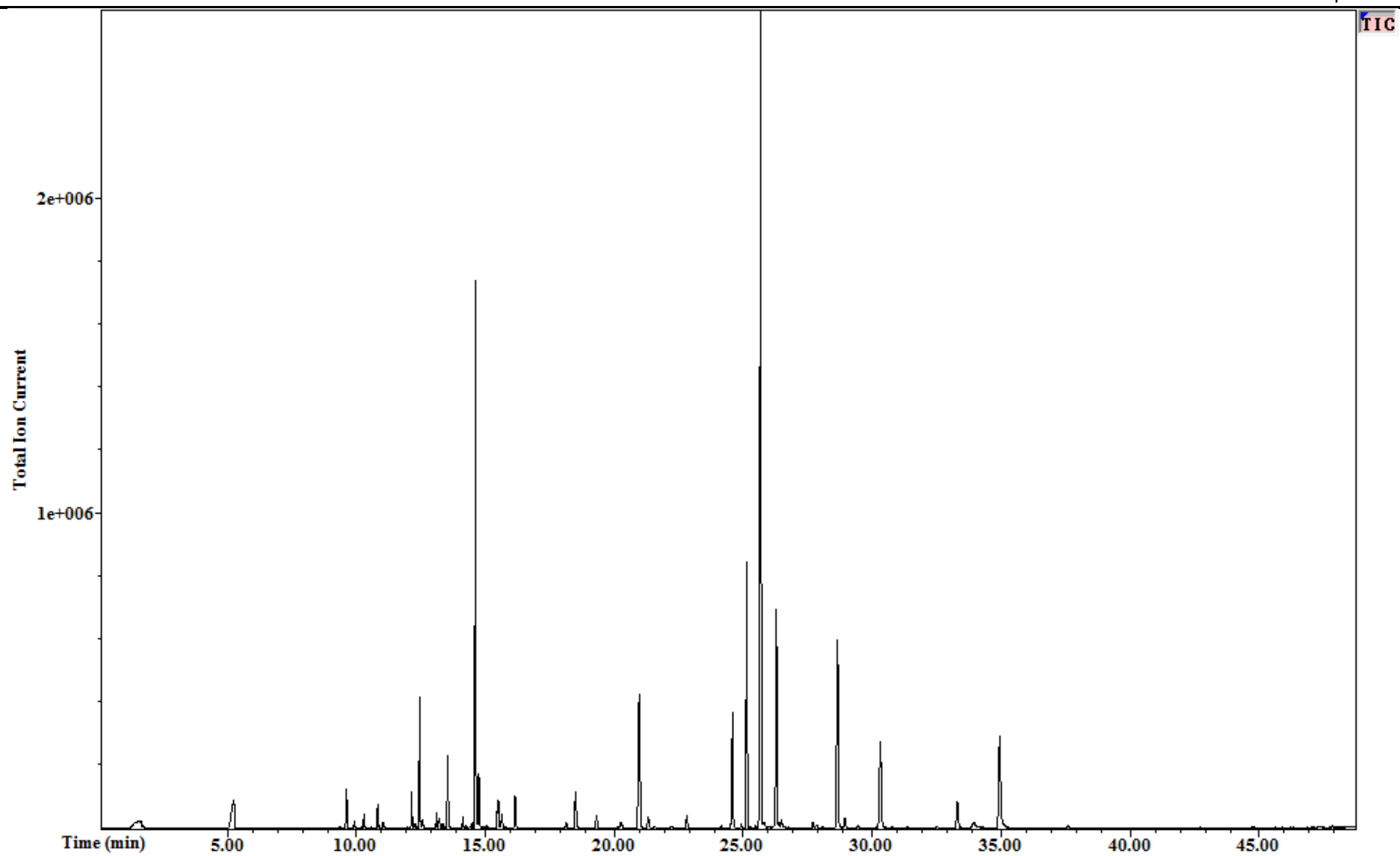


Figura 6. Cromatograma representativo del chile Serrano.

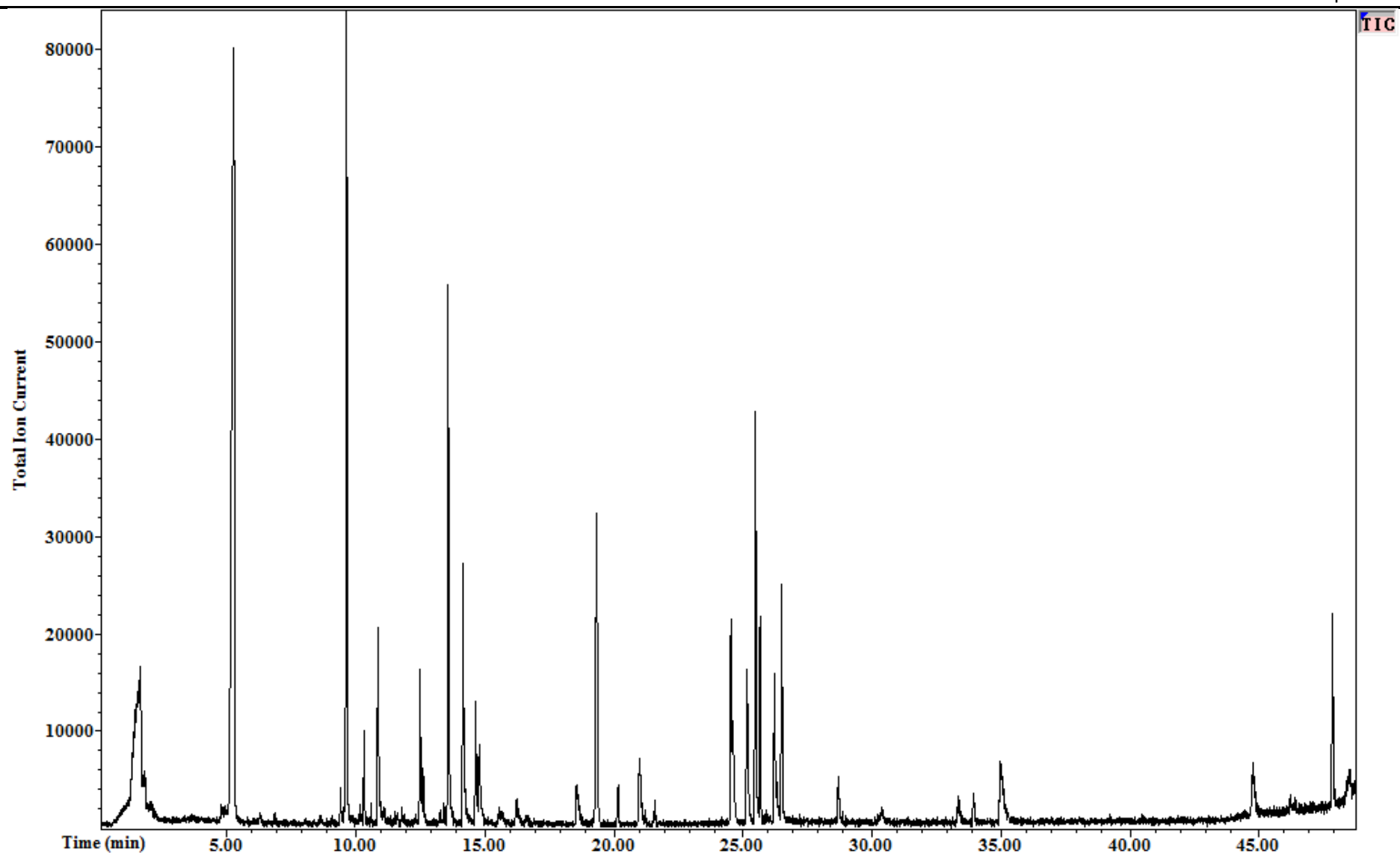


Figura 7. Cromatograma representativo del chile Güero.

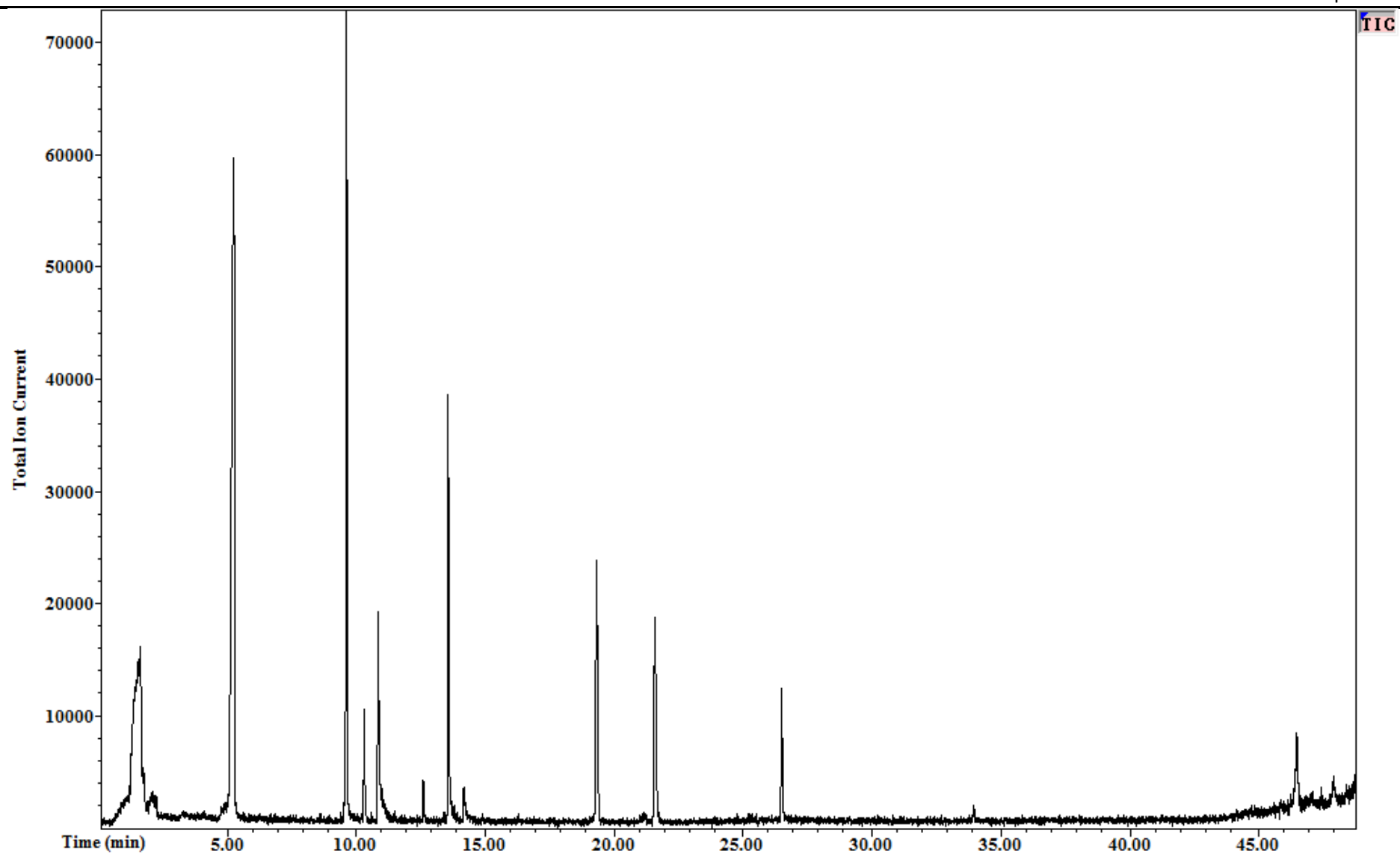


Figura 8. Cromatograma representativo de la Chilaca.

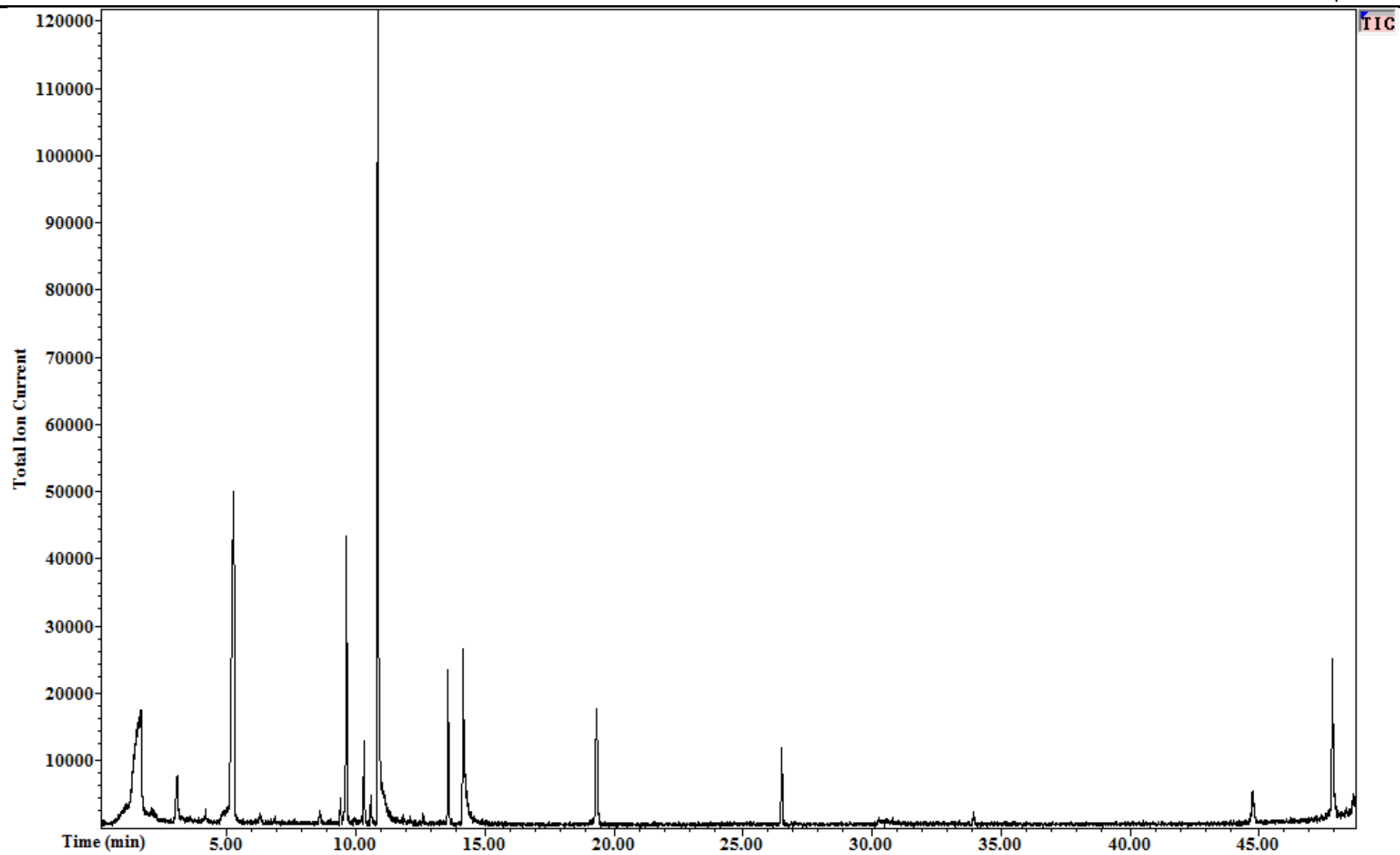


Figura 9. Cromatograma representativo del Pimiento verde.

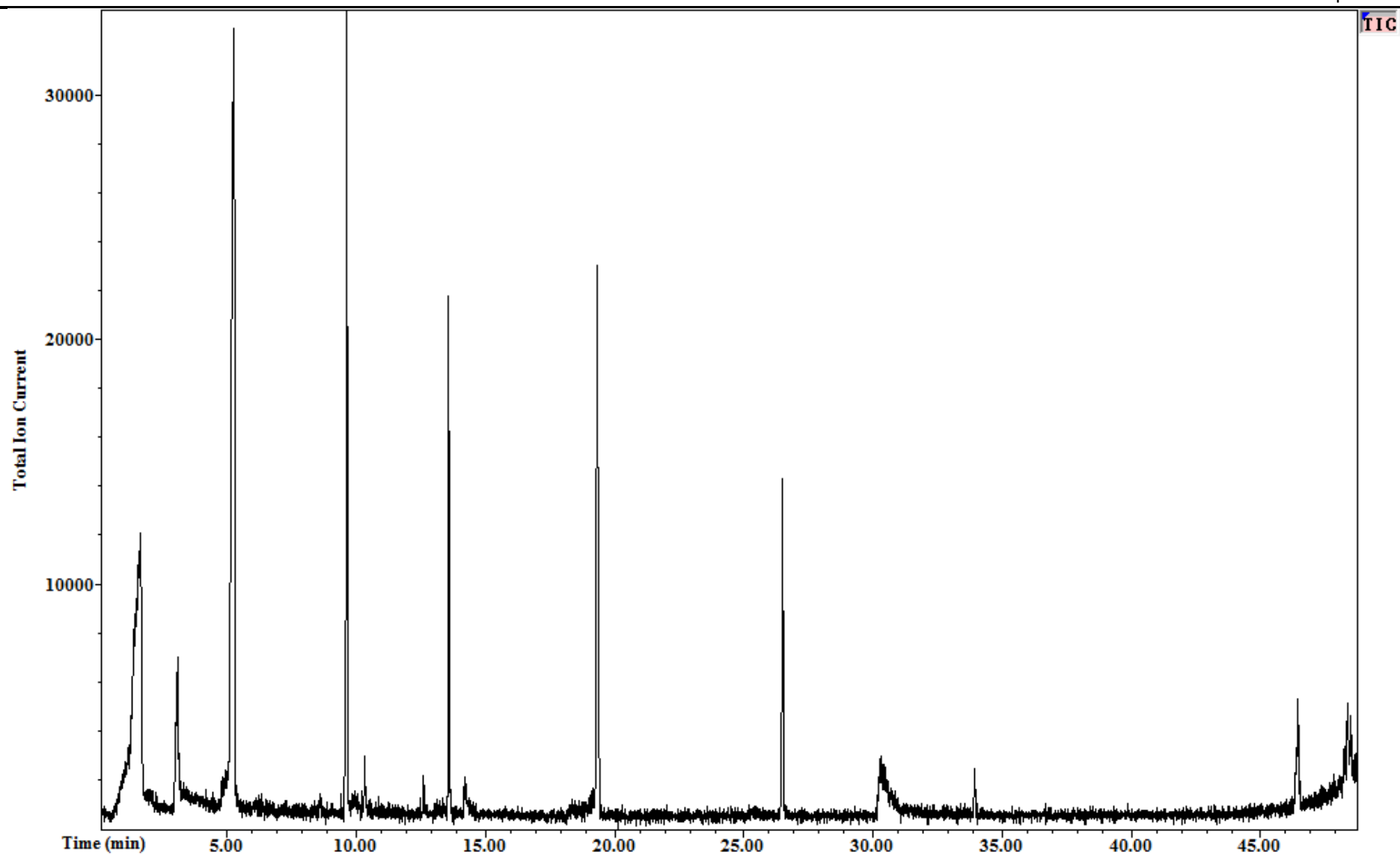


Figura 10. Cromatograma representativo del Pimiento rojo.

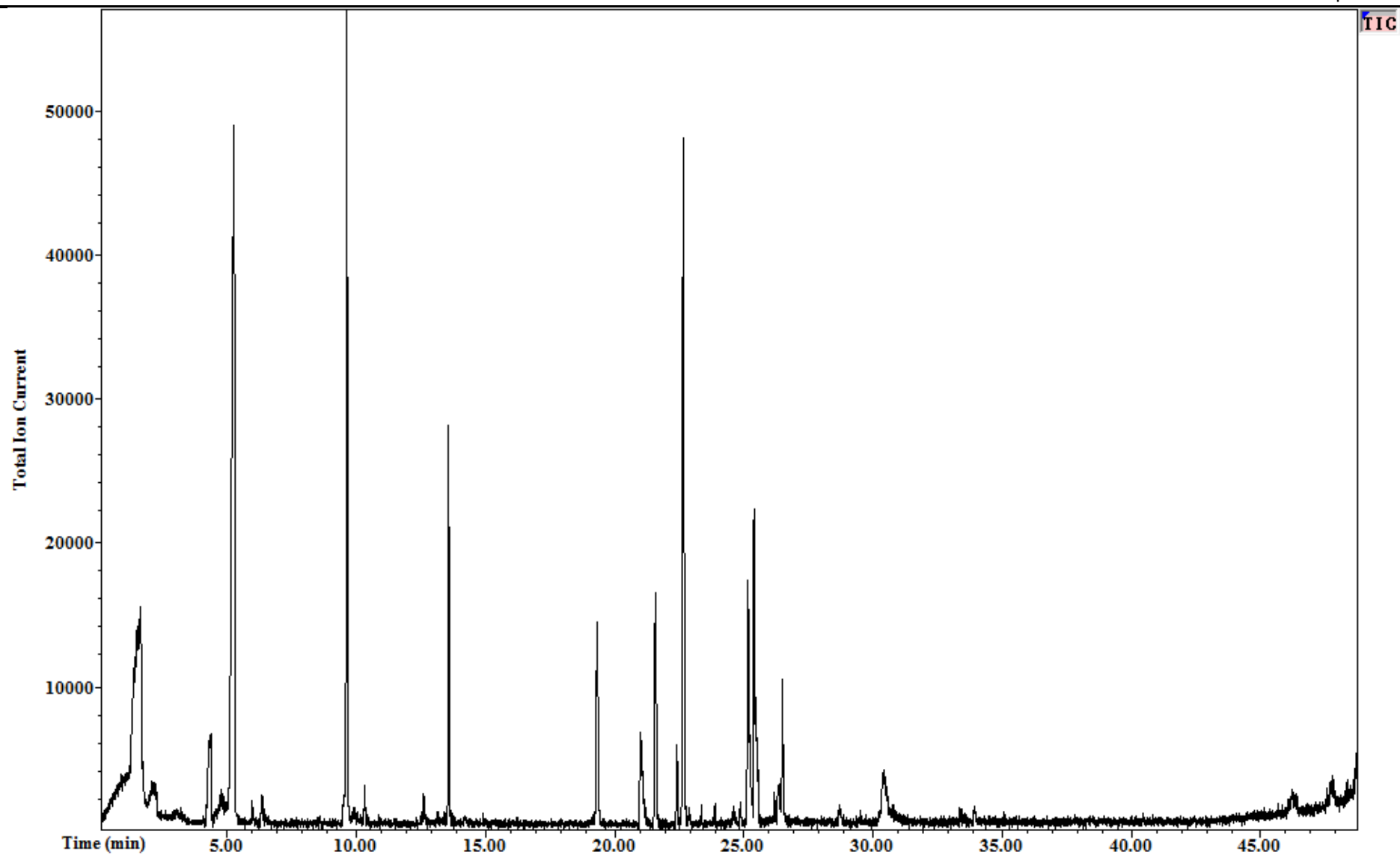


Figura 11. Cromatograma representativo del chile Manzano.

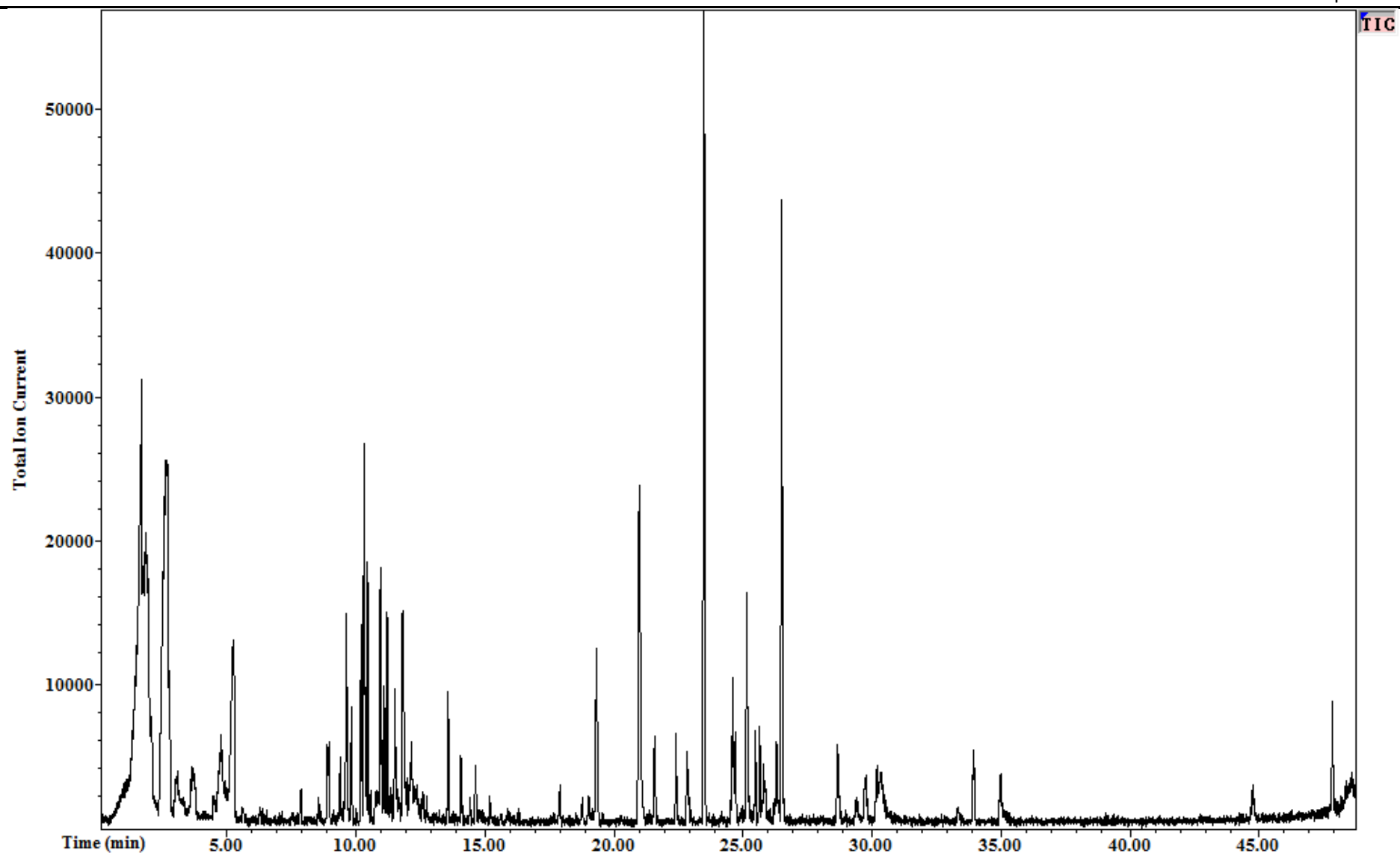


Figura 12. Cromatograma representativo del chile Catarina.

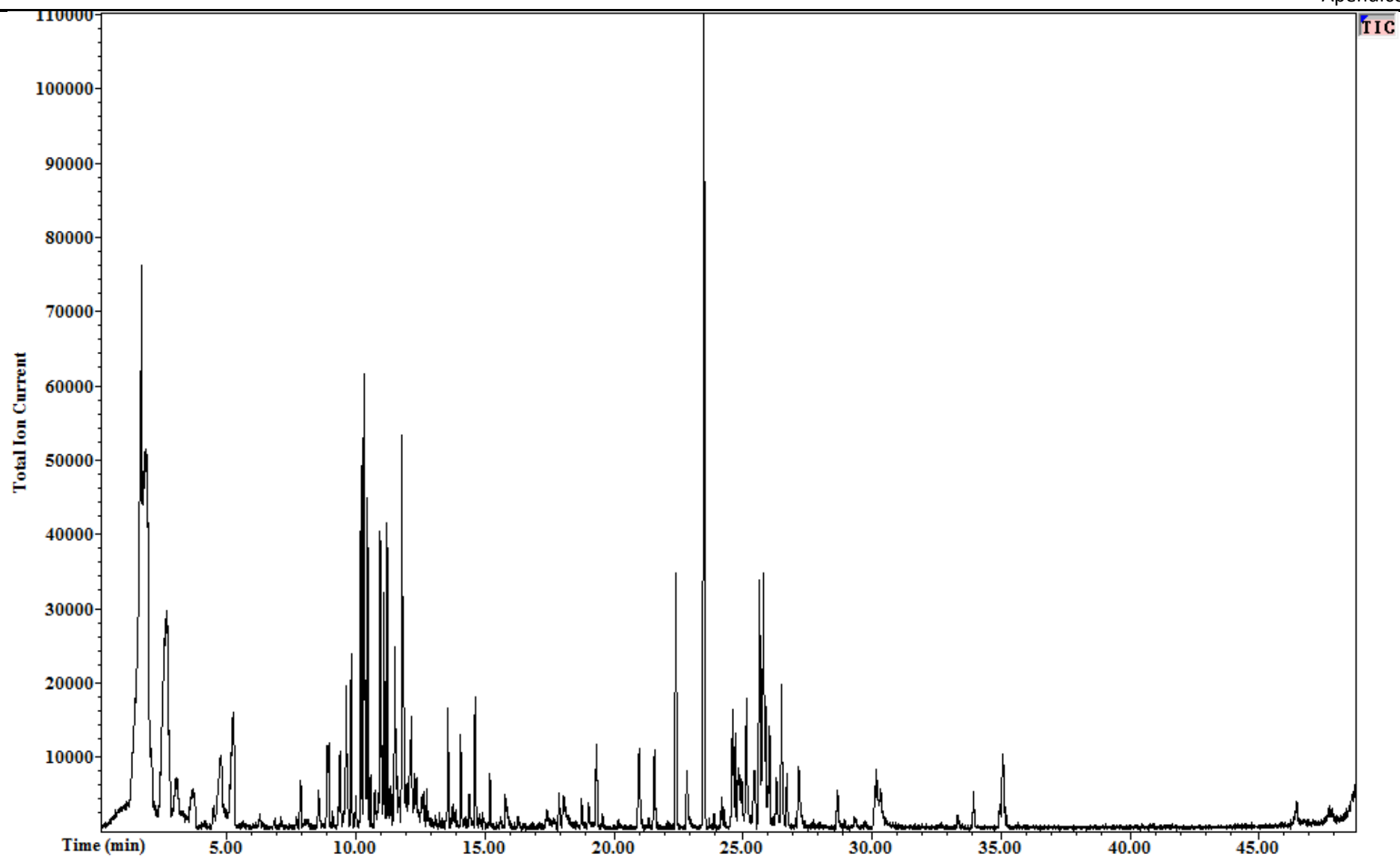


Figura 13. Cromatograma representativo del chile Cascabel.

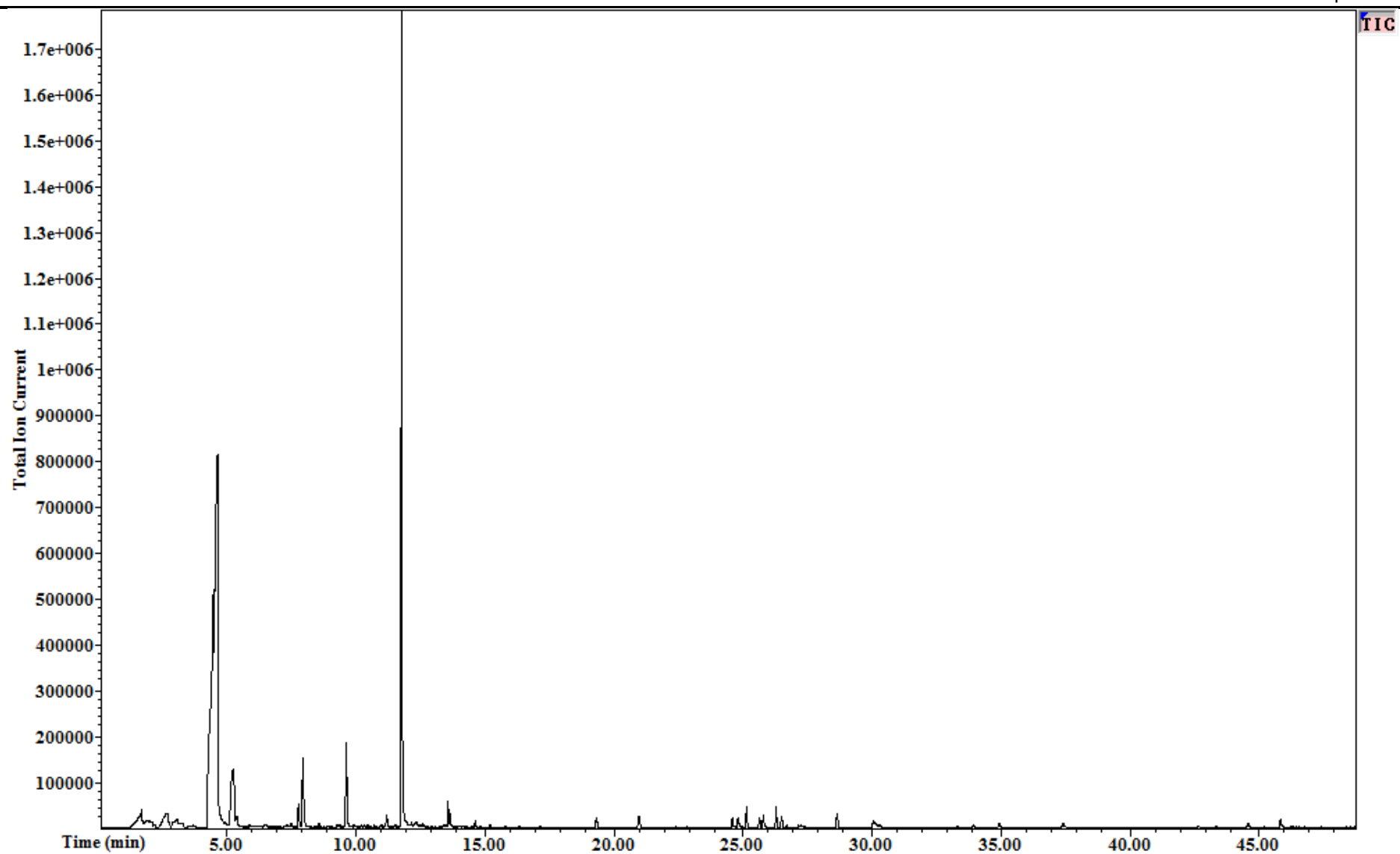


Figura 14. Cromatograma representativo del chile Chipotle.

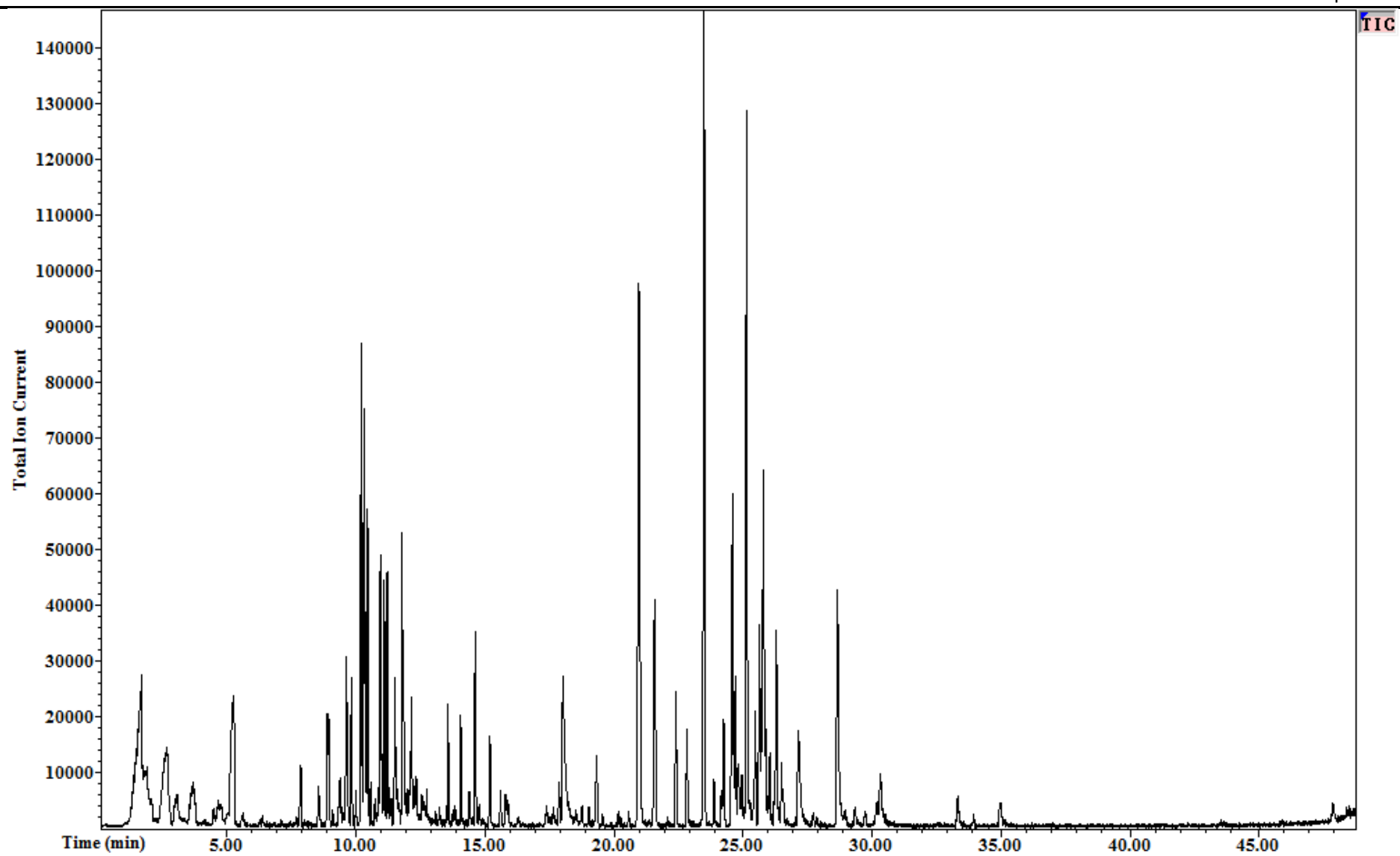


Figura 15. Cromatograma representativo del chile Puya.

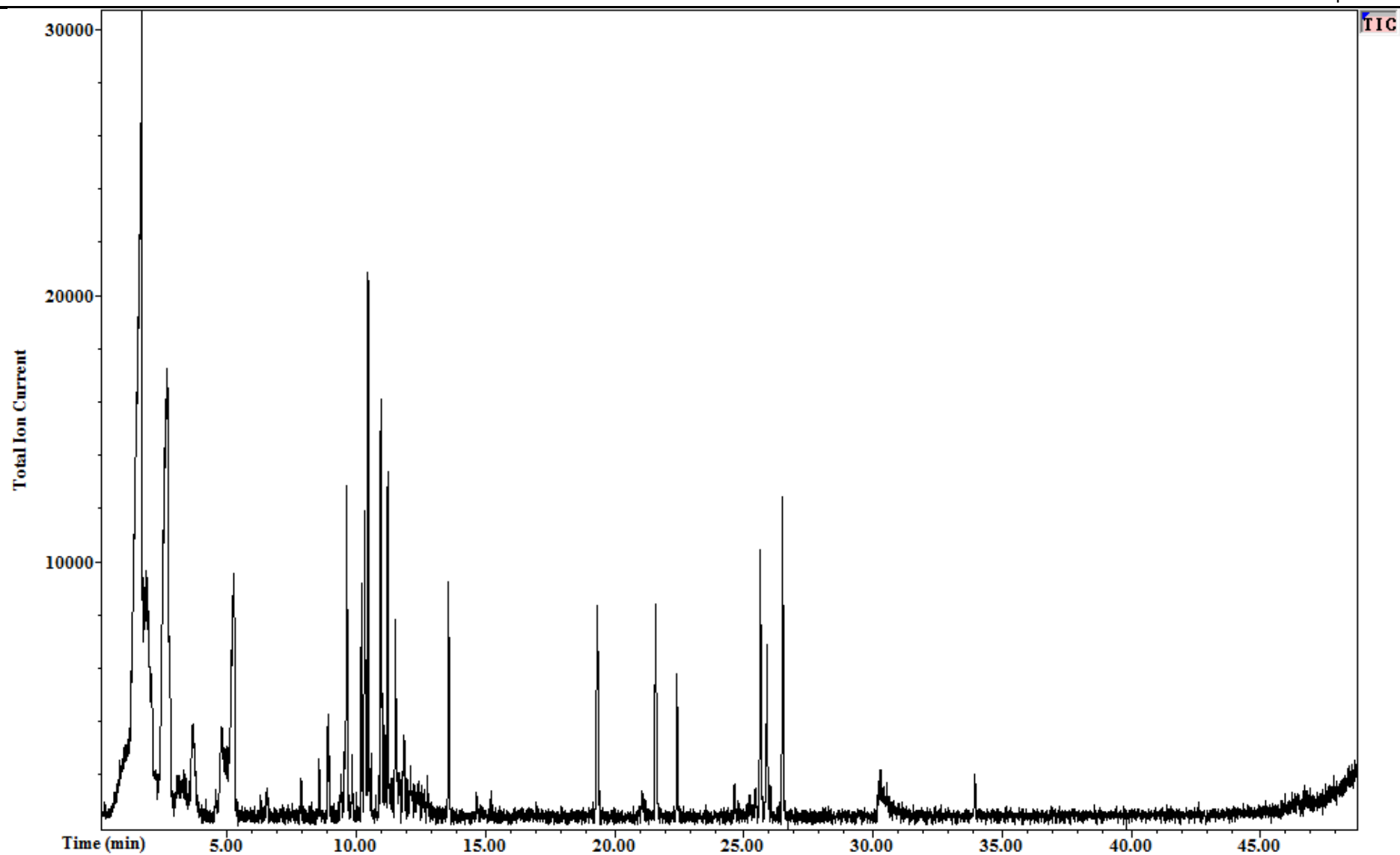


Figura 16. Cromatograma representativo del chile Guajillo.

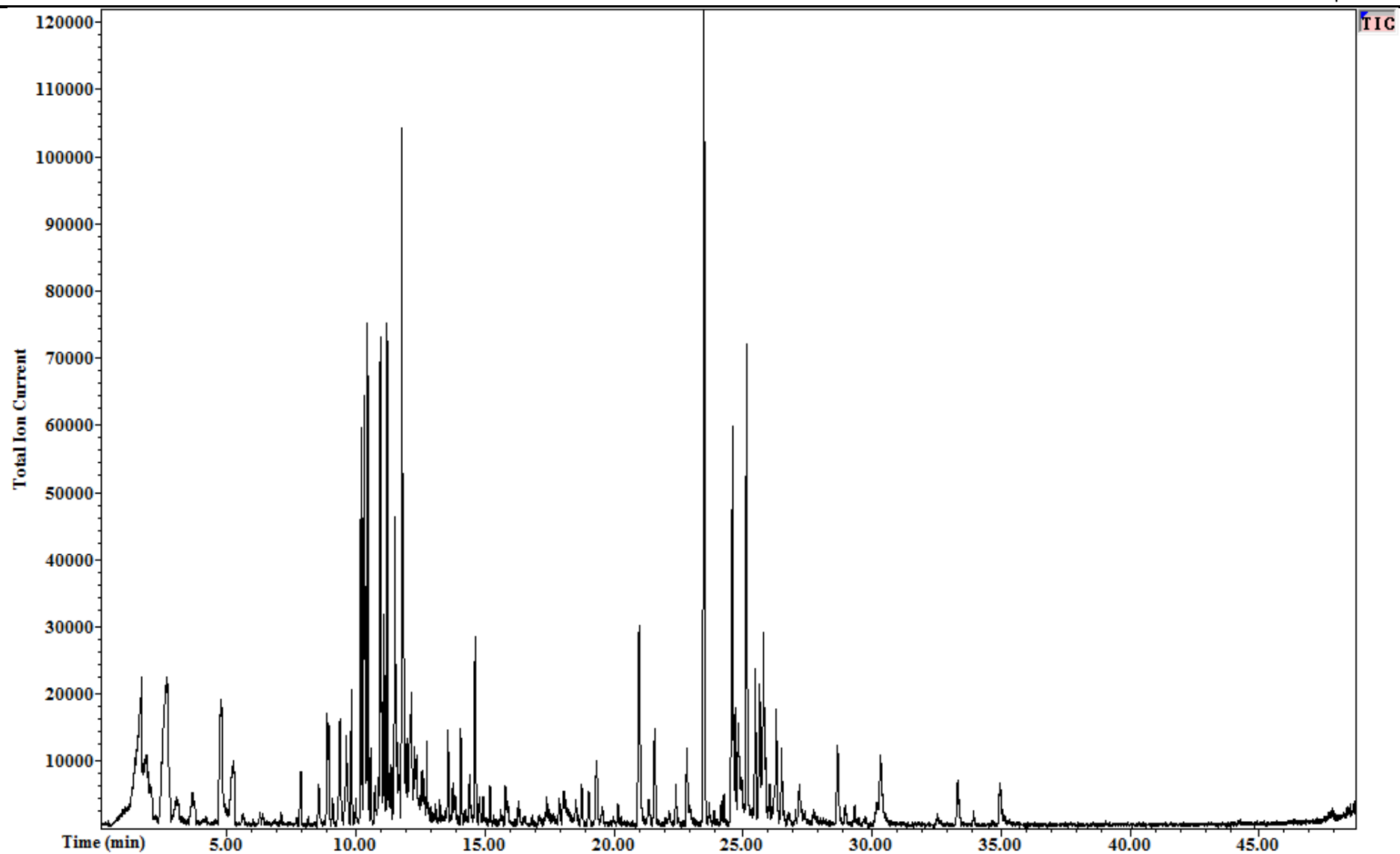


Figura 17. Cromatograma representativo del chile Canica.

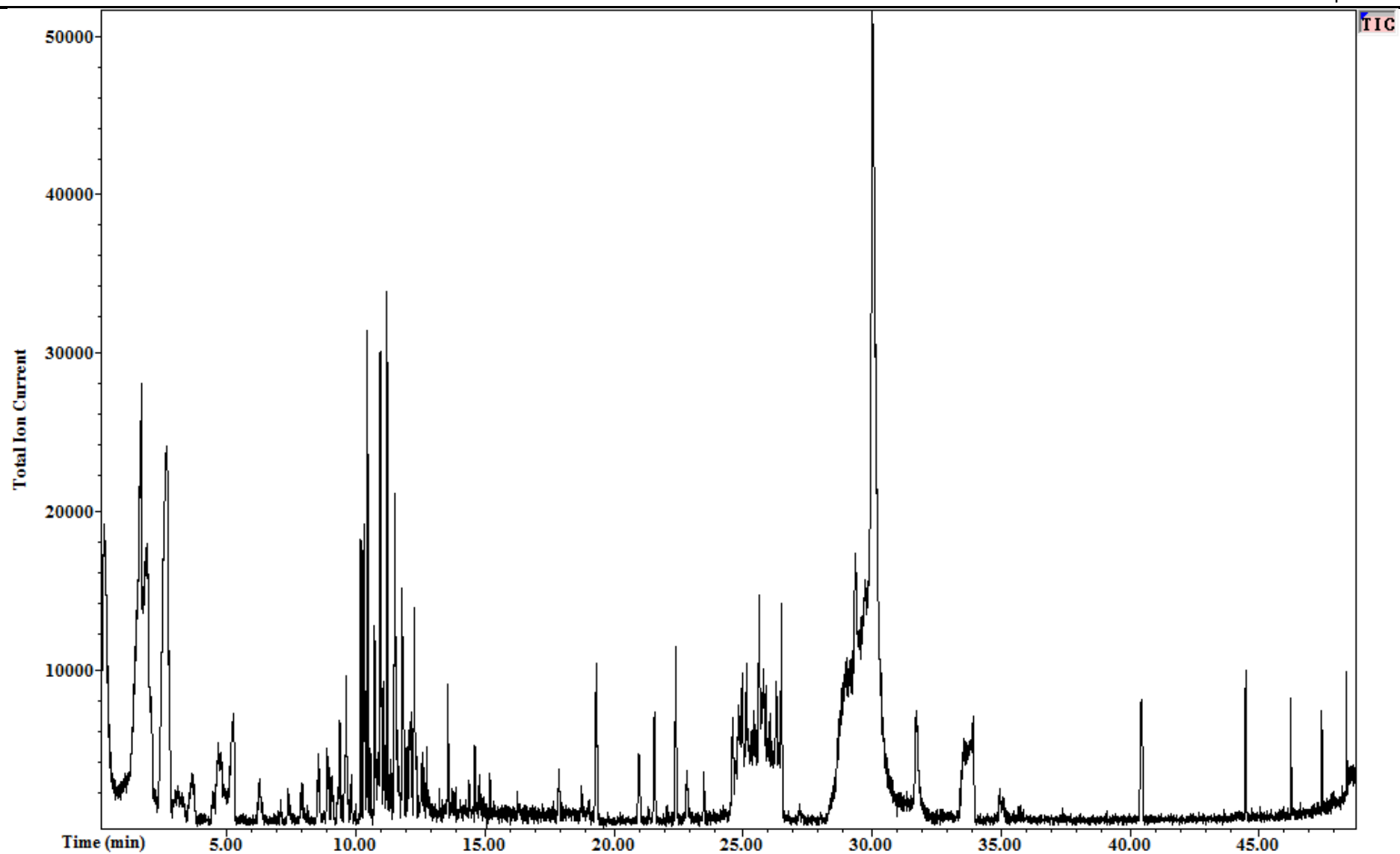


Figura 18. Cromatograma representativo del chile Mulato.

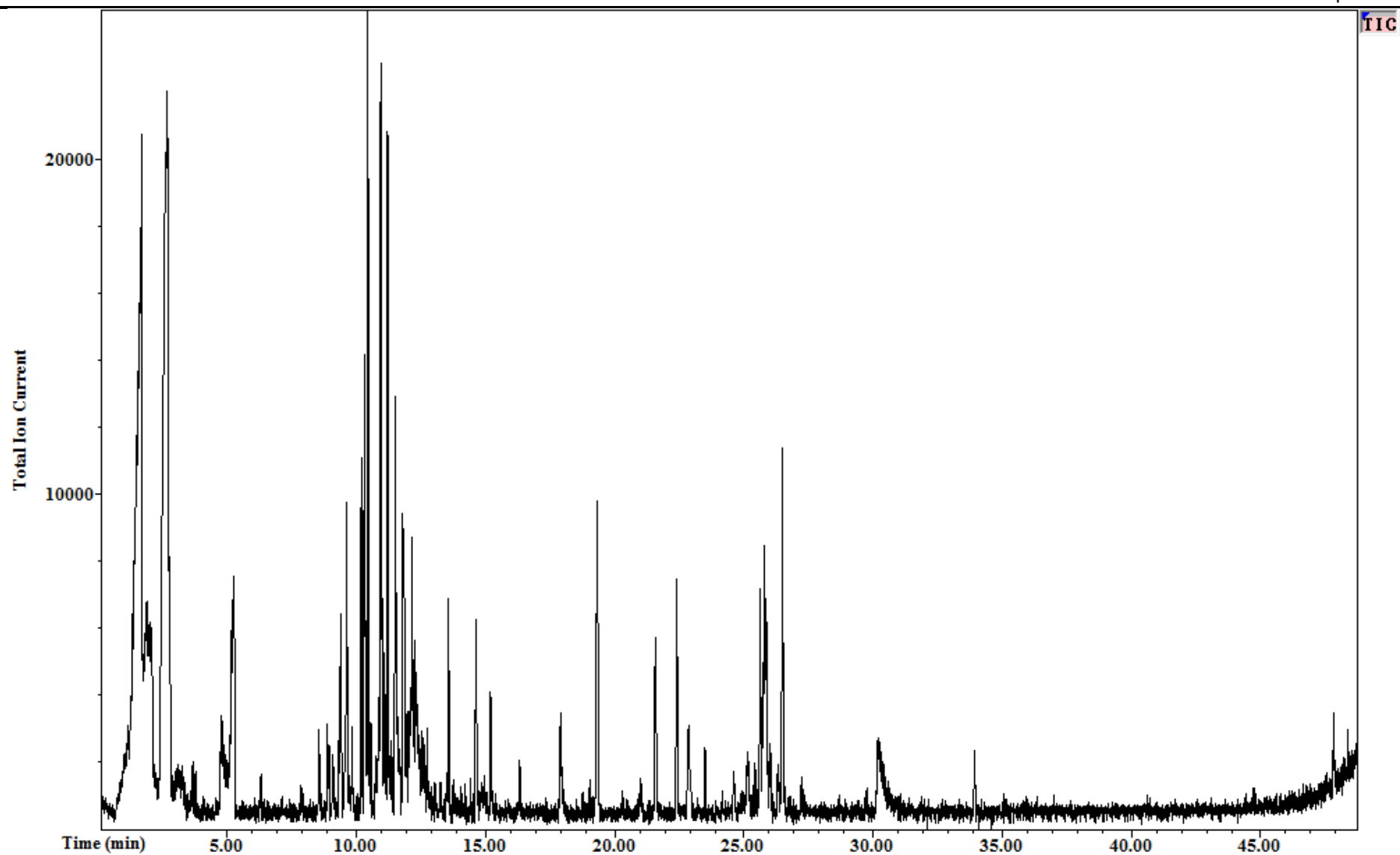


Figura 19. Cromatograma representativo del chile Ancho.

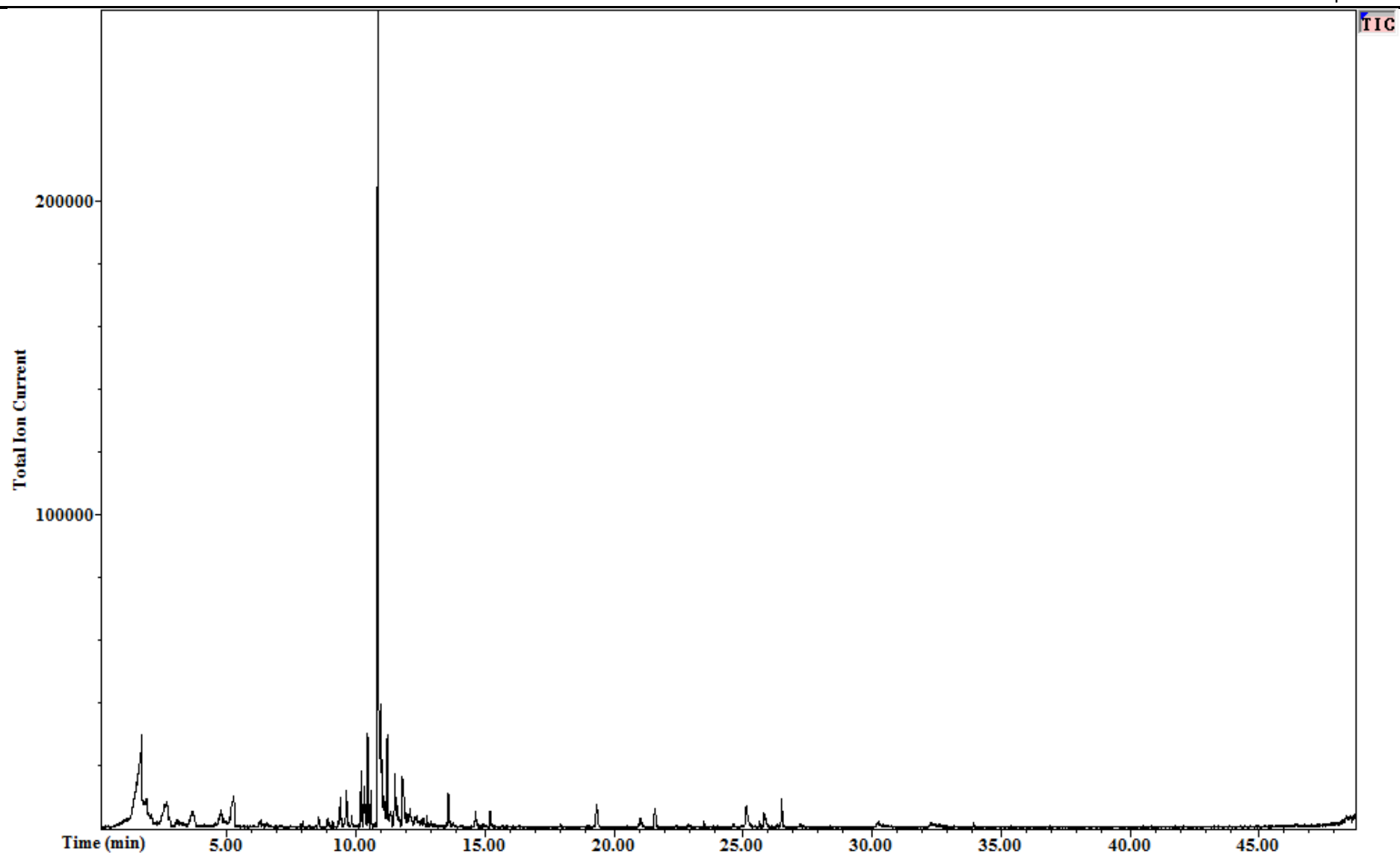


Figura 20. Cromatograma representativo del chile Pasilla.

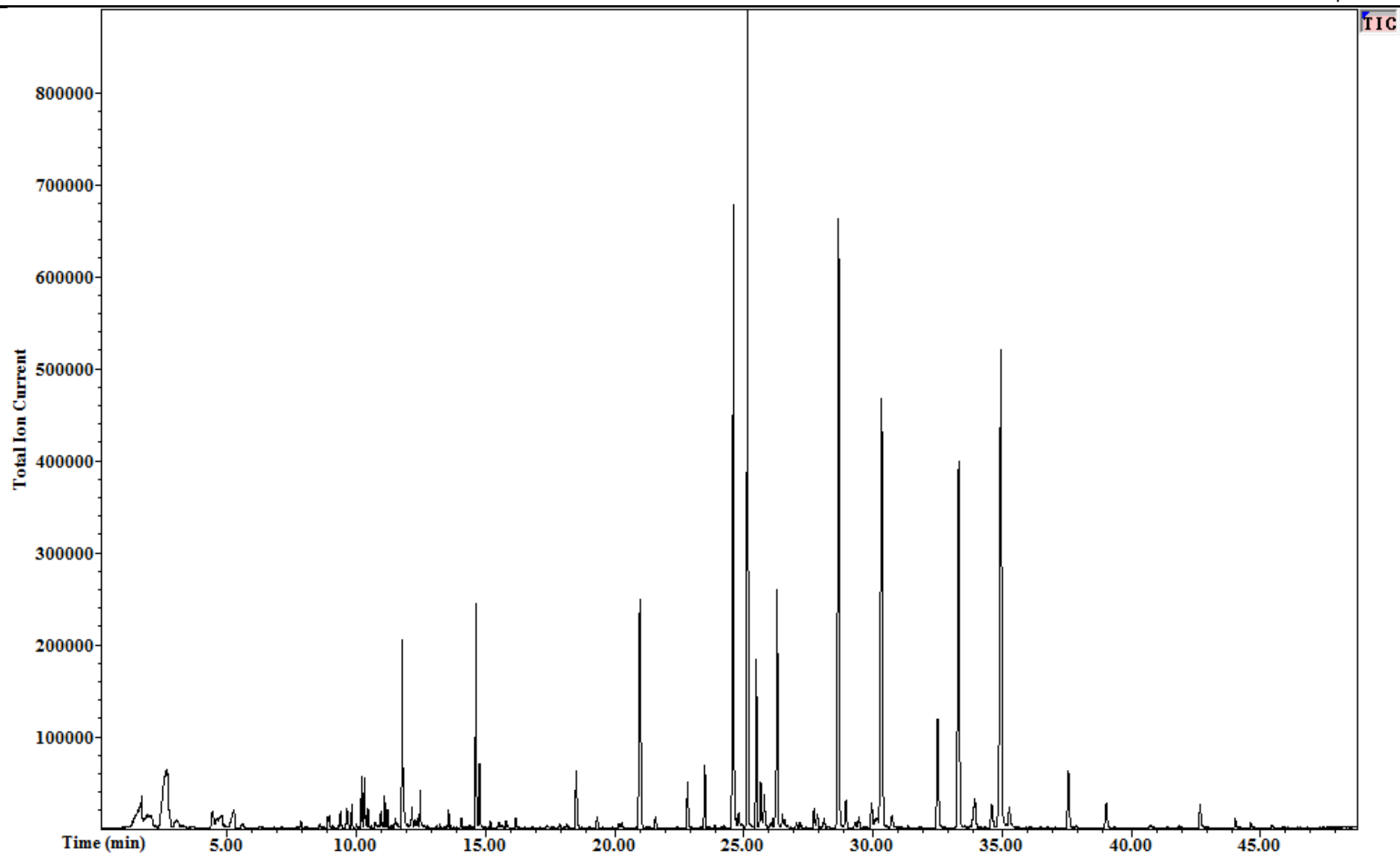


Figura 21. Cromatograma representativo del chile Mora.

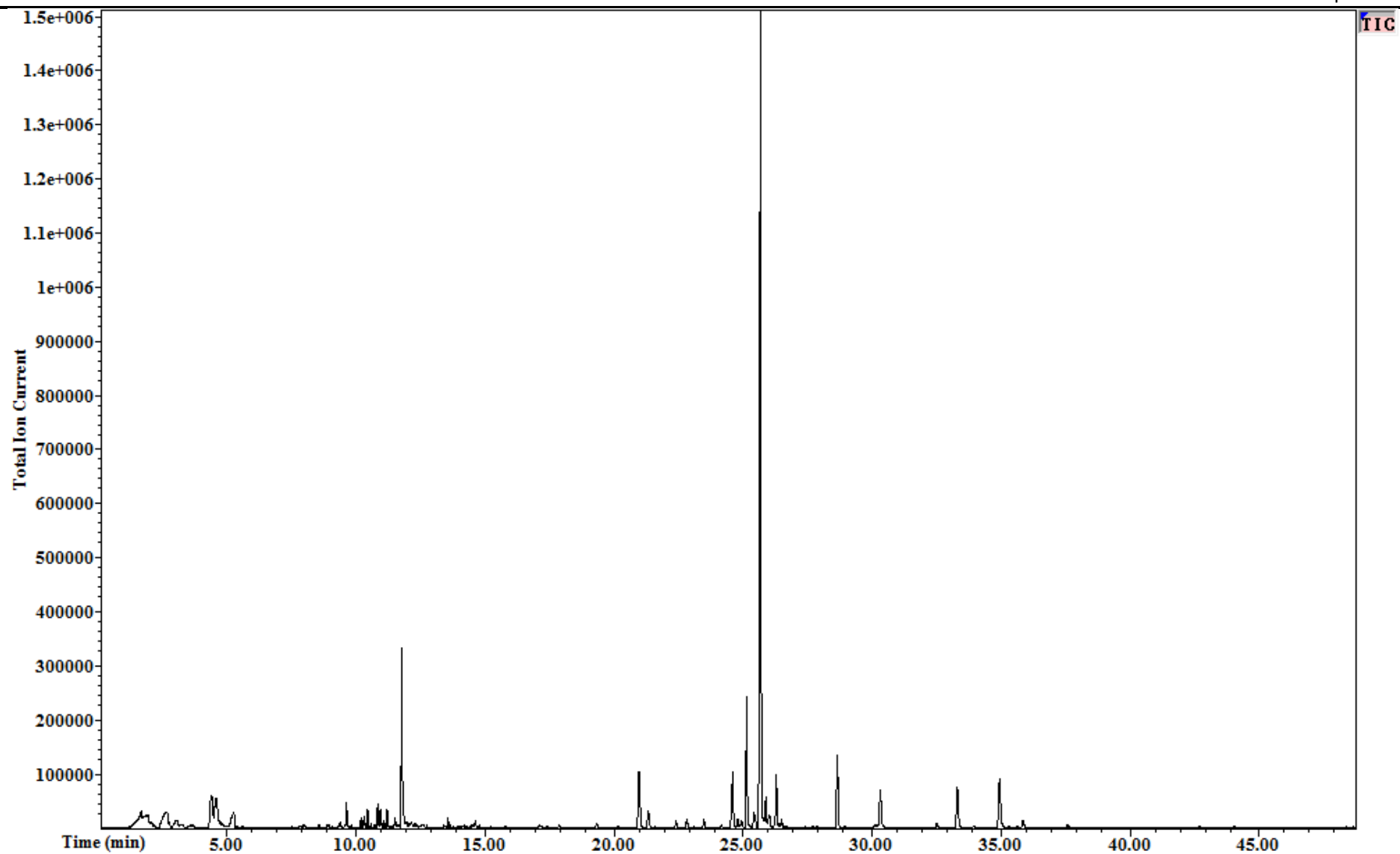


Figura 22. Cromatograma representativo del chile Morita.

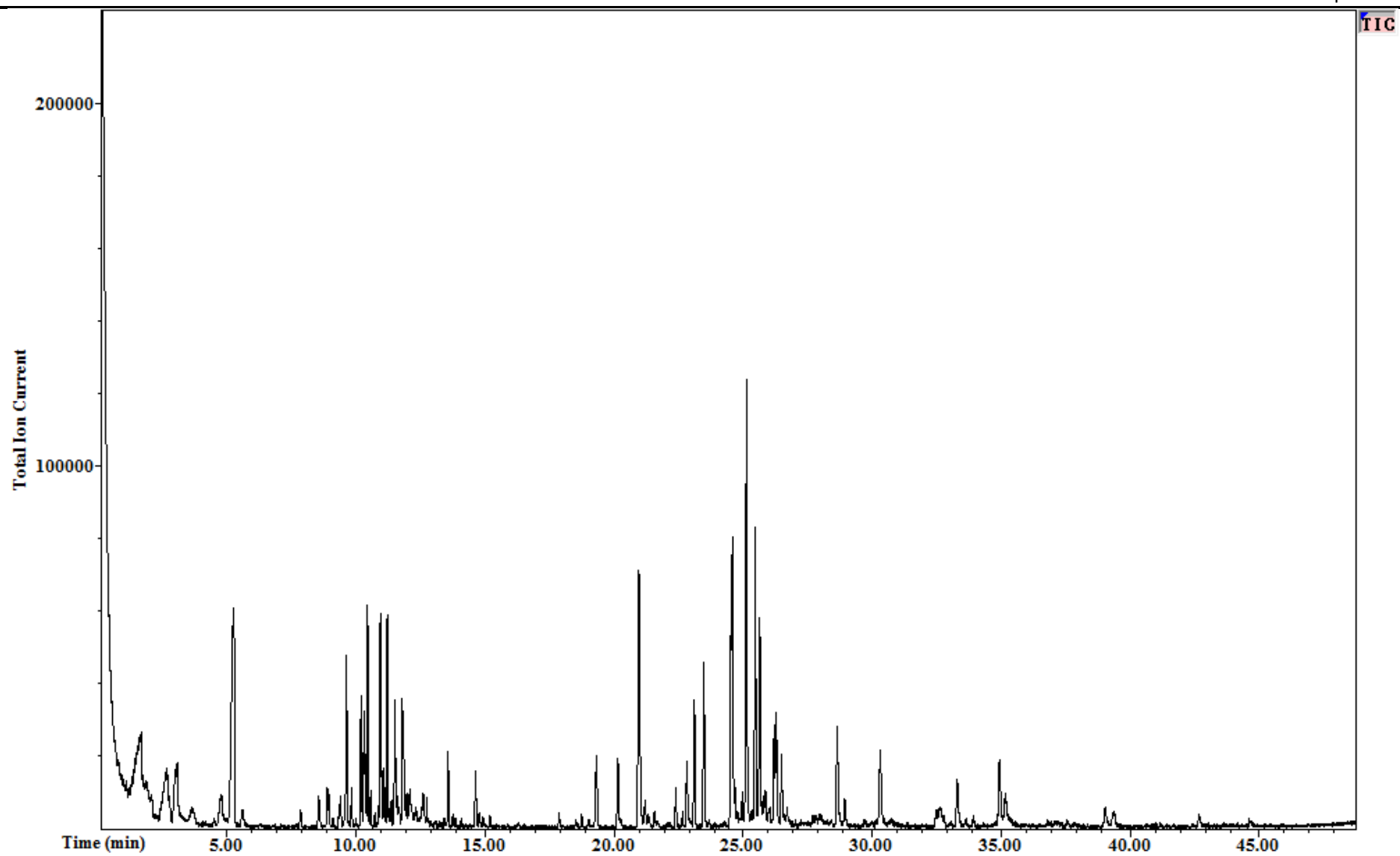


Figura 23. Cromatograma representativo del chile de Árbol seco.

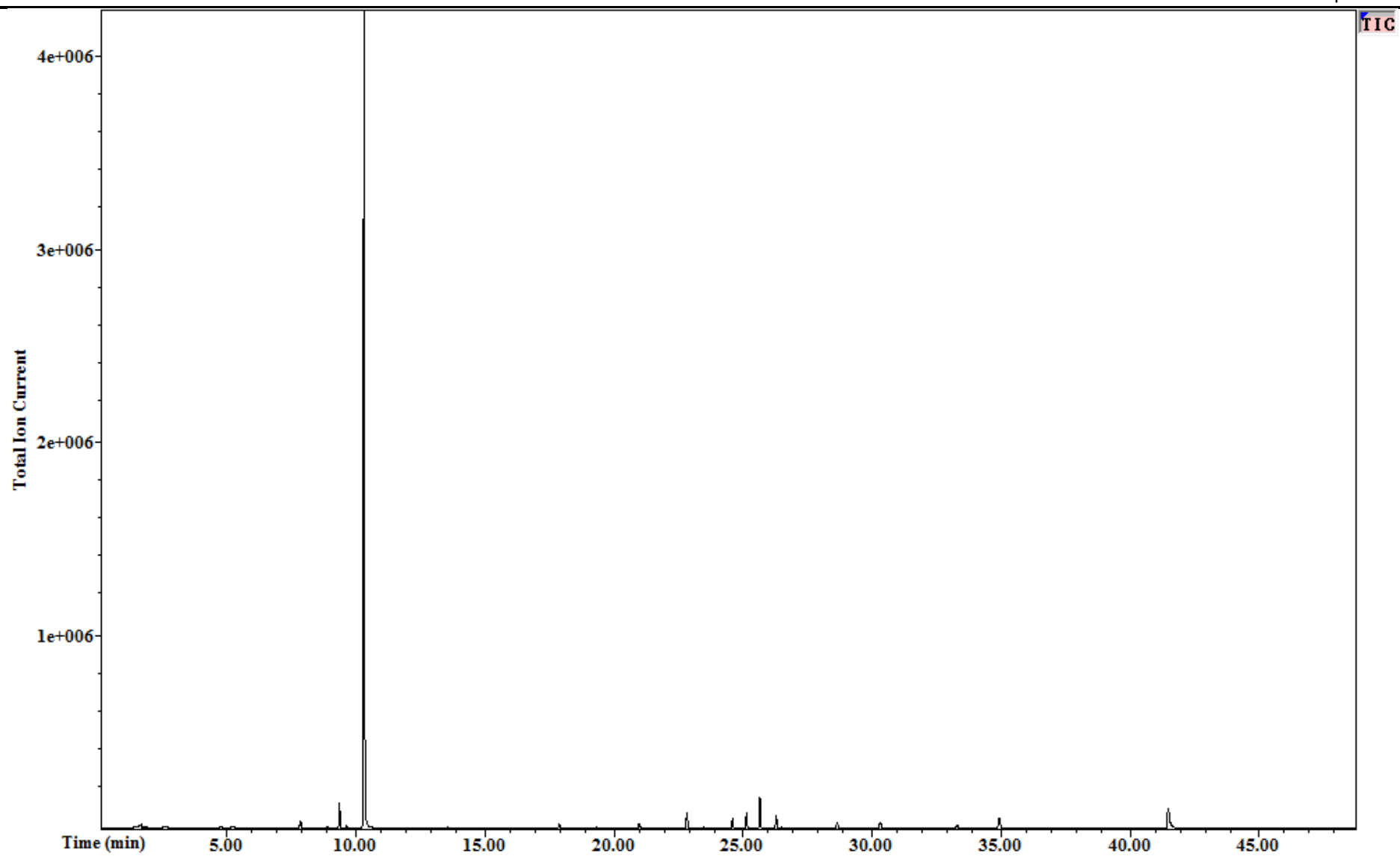


Figura 24. Cromatograma representativo del chile Piquín seco.

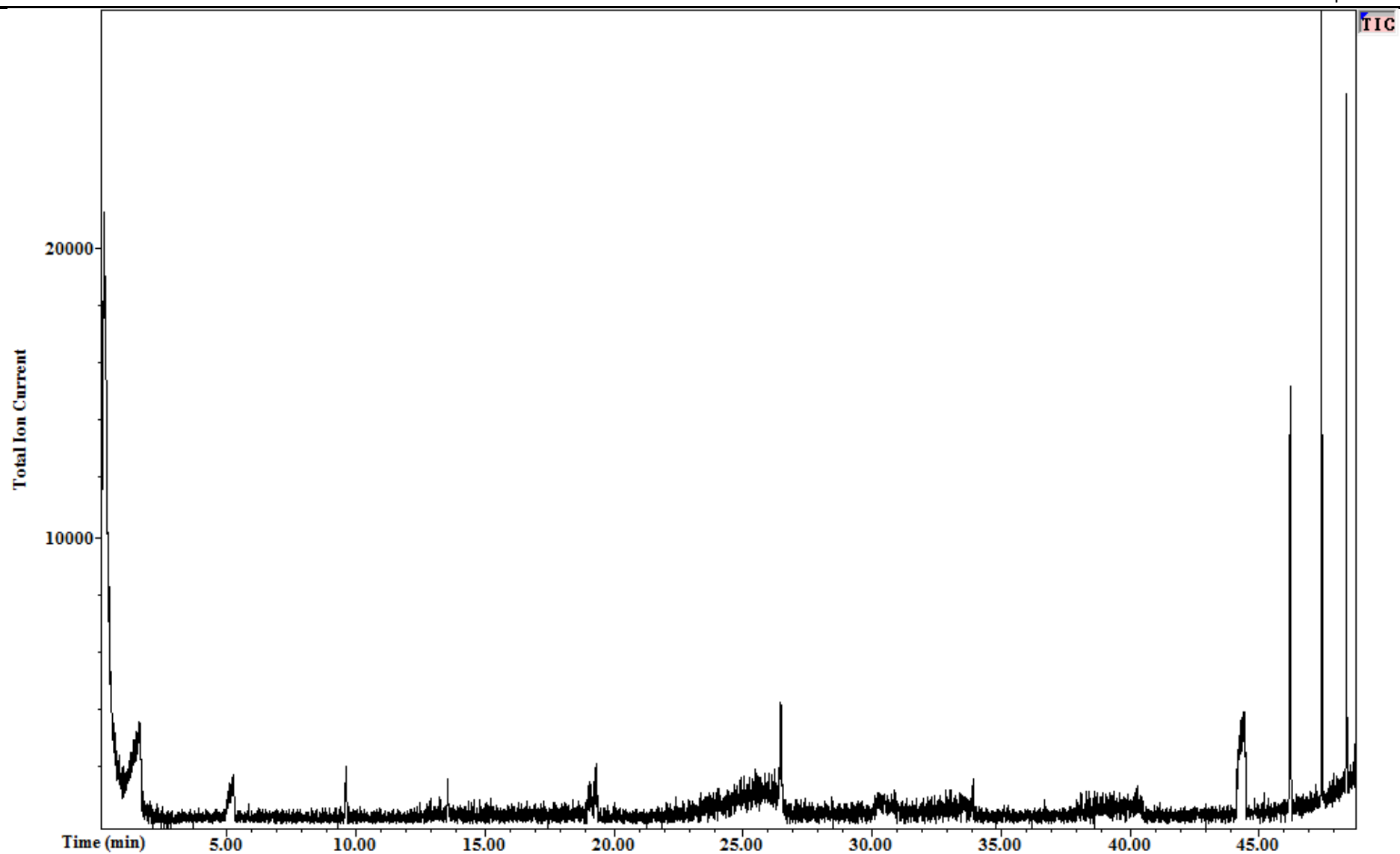


Figura 25. Cromatograma representativo correspondiente al blanco de fibra.

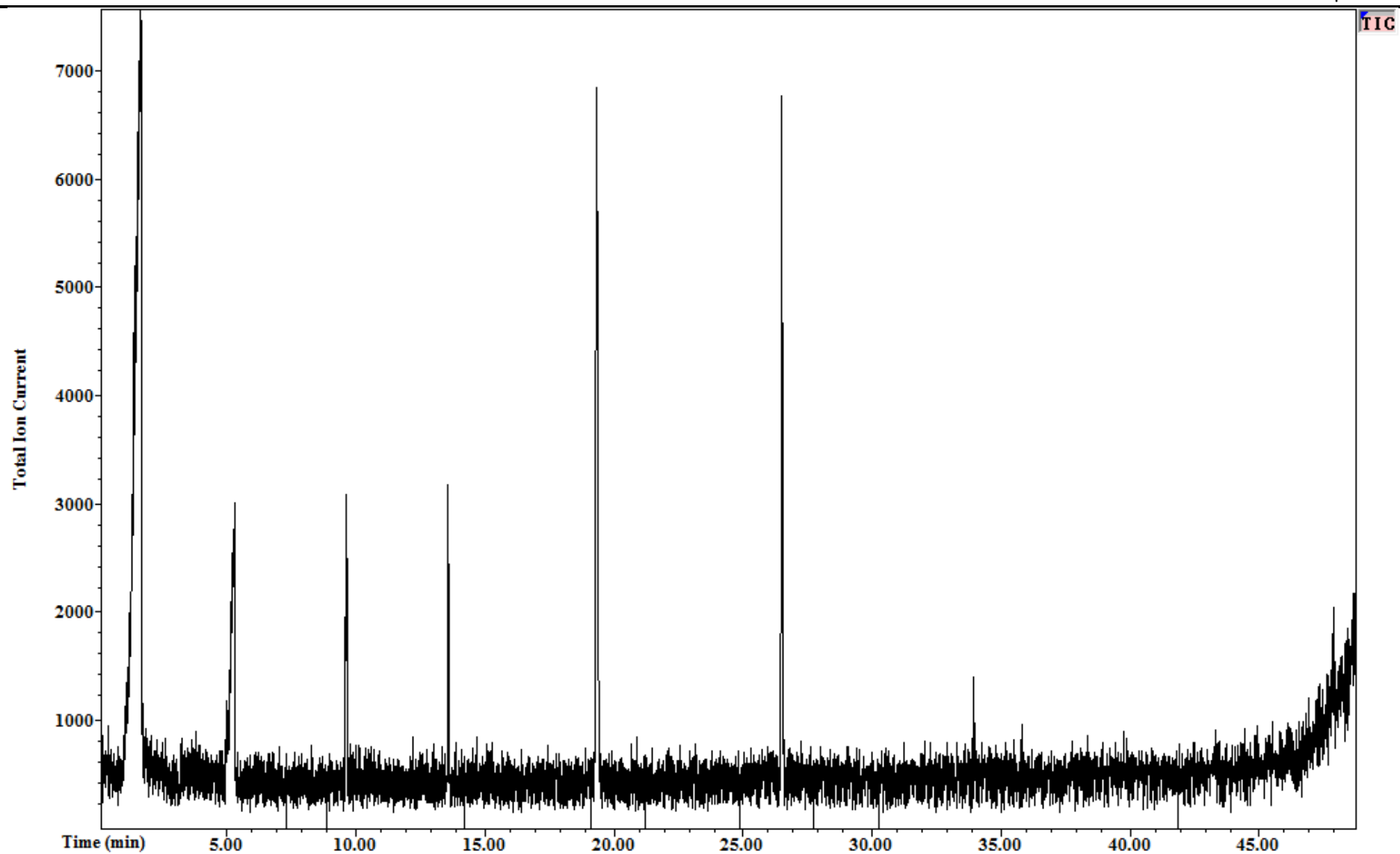


Figura 26. Cromatograma representativo correspondiente al blanco de fibra + vial.