

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN  
DIFERENTES

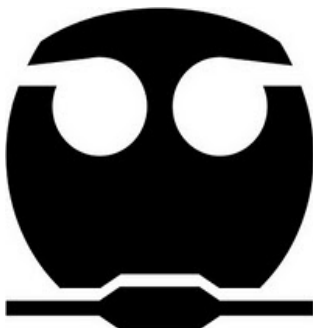
VARIETADES DE CHILES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

EDGAR POLO ISLAS FLORES



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: ERNESTINA CERVERA FLORES

**VOCAL:** Profesor: LUCIA CORNEJO BARRERA

**SECRETARIO:** Profesor: ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: PATRICIA SEVERIANO PEREZ

**2° SUPLENTE:** Profesor: GLORIA GARCIA RAMIREZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio 101 del Departamento de Química

Analítica de la División de estudios de Posgrado, Edificio "B" de la Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

**ASESOR DEL TEMA:** ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:** EDGAR POLO ISLAS FLORES

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente tesis es producto de un esfuerzo en el cual han participado muchas personas directa o indirectamente, apoyándome, dándome ánimos, valiosos consejos, acompañándome durante todo el proceso tanto en momentos difíciles como en los de felicidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme todo lo necesario para mi formación humana y profesional.

A toda mi familia, a la memoria de mi madre Aurora que a pesar de que físicamente ya no esta conmigo sigue estando muy presente en todo momento, a mi padre Hipólito por todo el apoyo que me brinda, a mis hermanas Dulce y Viridiana por estar siempre ahí cuando las necesito, a mi sobrina Frida por recordarme lo importante de no perder la capacidad de asombro y por irradiar y compartir la felicidad de un niño, a mi sobrina Sofía por que al verla percibo lo bonito que es la vida.

A la Dra. Araceli por el apoyo, confianza y paciencia que me brindo siempre, a la Mtra. Rocío por su valiosa enseñanza en el laboratorio y a todos mis compañeros del laboratorio que con ellos he aprendido muchas cosas no solo en cuestiones académicas sino en la vida en general.

A todos mis amigos los más cercanos y los que en determinado momento han aparecido de forma oportuna en mi vida: Alejandra, Daniel, Cecilia, Elisa, Fabián, Israel, Iván, Jesica, Juan Manuel, Karina, Karis, Lida, Miriam, Pablo, Raúl, Rodrigo, Susy, Yamilé.

A Jesica por compartir su tiempo y cariño conmigo en la ultima etapa de este proceso.

Al colegio de profesores de la Facultad de Química (CoCoCol) y la sección 024 de la AAPAUNAM por el apoyo económico brindado para la realización y presentación escrita por este trabajo de tesis al otorgarme la cátedra Fernando Orozco Díaz en el semestre 2010-II.

# ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 El chile.....</b>	<b>5</b>
2.1.1 Botánica .....	5
2.1.2 Morfología y Estructura .....	6
2.1.3 Composición química.....	7
2.1.4 Capsaicinoides .....	8
2.1.5 Usos .....	9
2.1.6 Chiles deshidratados.....	9
2.1.7 Chile chipotle.....	10
2.1.8 Chiles en salmuera, en escabeche y encurtidos .....	10
2.1.9 Salsas .....	11
2.1.10 Oleorresinas, aceites esenciales y pigmentos .....	11
<b>2.2 Lípidos.....</b>	<b>12</b>
2.2.1 Lípidos simples .....	13
2.2.1.1 Triacilgliceroles (TG) .....	13
2.2.1.2 Ácidos Grasos (AGs).....	14
2.2.1.3 Ocurrencia de los ácidos grasos en la naturaleza .....	15
2.2.2 Lípidos complejos .....	15
2.2.3 Función de los lípidos en las plantas .....	15
2.2.4 Papel de los lípidos en el sabor de los alimentos .....	16
2.2.5 Estudios previos sobre caracterización de lípidos y AGs en alimentos .....	16
2.2.6 Métodos de extracción de lípidos.....	18
<b>2.3 Extracción Asistida por Ultrasonido (EAUS).....</b>	<b>19</b>
2.3.4 Historia .....	19
2.3.5 Mecanismo de extracción .....	19

2.3.6	Equipo y procedimiento de extracción .....	20
2.4	Cromatografía gas-líquido (CGL) .....	21
2.5	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas .....	23
2.6	CG a alta temperatura .....	25
2.6.4	Columnas .....	25
2.6.5	Sistema de inyección .....	25
2.6.6	Inyección Cool On-Column (COC).....	26
3.	OBJETIVOS .....	28
3.1	Objetivo general .....	28
3.2	Objetivos particulares .....	28
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	29
4.1	Materiales y equipo .....	29
4.2	Reactivos .....	30
4.3	Estándares .....	30
4.4	Muestras.....	30
4.4.1	Acondicionamiento de las muestras.....	31
4.4.2	Cantidad de muestra analizada.....	31
4.5	Extracción de Lípidos .....	32
4.5.1	Extracción Asistida con Ultrasonido .....	32
4.5.2	Extracción Soxhlet.....	33
4.6	Derivatización de ácidos grasos .....	34
4.7	Análisis Cromatográfico .....	35
4.7.1	Condiciones Cromatográficas .....	35
4.7.2	Selección de estándares para la identificación de AGs por CG-FID 35	
4.7.3	Identificación de ácidos grasos.....	36
4.7.4	Cuantificación de AGs .....	37
4.8	Perfil de lípidos simples .....	37
4.8.1	Determinación de lípidos simples .....	37
4.8.2	Derivatización de lípidos simples.....	38
4.8.3	Condiciones cromatograficas para la identificación de lípidos simples.....	38
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39

<b>5.1</b>	<b>Extracción de ácidos grasos utilizando EAUS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2</b>	<b>Extracción de AGs utilizando extracción Soxhlet.....</b>	<b>40</b>
<b>5.3</b>	<b>Optimización del método de derivatización.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4</b>	<b>Identificación de AGs en chiles. ....</b>	<b>41</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Identificación de AGs por CG-FID .....</b>	<b>41</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Identificación de AGs por CG-EM .....</b>	<b>46</b>
<b>5.5</b>	<b>Cuantificación de AGs .....</b>	<b>49</b>
<b>5.6</b>	<b>COMPARACIÓN EAUS VS SOXHLET.....</b>	<b>53</b>
<b>5.7</b>	<b>Análisis estadístico para la comparación EAUS y Soxhlet .....</b>	<b>54</b>
<b>5.8</b>	<b>Perfil de Lípidos Simples.....</b>	<b>55</b>
<b>5.8.1</b>	<b>Extracción de lípidos simples .....</b>	<b>55</b>
<b>5.8.2</b>	<b>Identificación de lípidos simples .....</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>61</b>

## RESUMEN

Se caracterizó el perfil lipídico de 6 variedades de chiles (Habanero, Chipotle, Jalapeño, Piquín, Pasilla y Morrón), estos se seleccionaron por ser de los principalmente consumidos en México. Para la extracción del material lipídico se utilizó la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAUS). Posteriormente se determinaron los ácidos grasos (AGs) por cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) como esteres metílicos de ácidos grasos. También se realizó el perfil de lípidos simples identificándose AGs, Monoglicéridos (MG), Diglicéridos (DG) y Triglicéridos (TG) mediante un análisis por CG a alta temperatura. Se identificaron por CG-EM 28 AGs y se cuantificaron los mayoritarios por CG. Utilizando una curva de calibración para los AGs saturados (ácido hexadecanoico C<sub>16</sub>) y una para los AGs insaturados (ácido (Z, Z)-9,12-octadienoico C<sub>18:2</sub>). Los AGs mayoritarios fueron: palmítico (ácido hexadecanoico C<sub>16</sub>), palmitoleico (ácido (Z)-9-hexadecénico C<sub>16:1</sub>), esteárico (ácido octadecanoico C<sub>18</sub>), oleico (ácido cis-9-octadecenoico C<sub>18:1</sub>) y linoleico (ácido cis cis 9,12-octadienoico C<sub>18:2</sub>), en todas las muestras analizadas y como era de esperarse la concentración fue diferente para cada uno de ellos. Este procedimiento optimizado (EAUS) se comparó con el procedimiento tradicional de extracción Soxhlet, observándose mediante un análisis de varianza que entre ambos métodos no existe diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%, mostrando la EAUS ventajas como el mínimo uso de disolventes y corto tiempo de extracción.



## 1. INTRODUCCIÓN

El consumo de chile (*Capsicum*) representa una tradición alimentaria importante en la historia y cultura de México. Su consumo en sus múltiples formas data desde tiempos prehispánicos y actualmente está arraigado en todos los estratos socioeconómicos del país <sup>1</sup>. Es actualmente la especia más importante en la alimentación, debido a la gran variedad de formas, aromas, usos y colores que tiene. El chile, el jitomate, el cacao, la vainilla y la calabaza, son originarios de México y forman parte de los legados más importantes de Mesoamérica al mundo en cuanto a alimentación se refiere. De América, el chile fue llevado a Europa, Asia y África por los conquistadores españoles y portugueses, y se convirtió en un cultivo de uso mundial.

En México existen más de 40 variedades de chiles y destaca a nivel mundial por tener la mayor variabilidad genética de *Capsicum annum*, que ha dado origen a un gran número de variedades o tipos de chiles, entre los que destacan el Serrano, Jalapeño, Ancho, Pasilla, Guajillo y de Árbol. Sin embargo, ocupa el tercer lugar de la producción mundial de chiles frescos detrás de países como China y Turquía y el noveno lugar en producción de chiles secos detrás de países como India, China, Bangladesh, Perú, Pakistán, Etiopía, Vietnam y Myanmar <sup>2</sup>.

Datos del CONAPROCH establecen que tan sólo en 2005 se importaron a México 45 mil toneladas de chiles de China e India, cuando ese año en el País se produjeron 70 mil toneladas. A nivel nacional existen al menos 8 mil productores de chile de diferentes variedades, que en conjunto siembran una superficie de 155 mil hectáreas <sup>3</sup>.

Pese a la gran importancia económica y cultural que posee para los mexicanos el chile, aun no se ha desarrollado una cultura de preservación y mejoramiento de esta hortaliza y tampoco el interés por la investigación científica que permita caracterizar los componentes de cada especie.

Los lípidos se definen como un grupo heterogéneo de moléculas complejas que tienen como característica común el ser insolubles en agua y, por el contrario,

serlos en solventes orgánicos. En ellos se incluyen las grasas y como componente común en la estructura química de la mayoría de las grasas (lípidos) de los alimentos se encuentran los ácidos grasos, los cuales pueden ser de diversos tipos dependiendo de su estructura: saturados, monoinsaturados y poliinsaturados; estos componentes son intermediarios en muchos procesos biológicos, también se consideran como combustible metabólico; un gramo de grasa produce 9 kcal (altamente energéticas), suministran los ácidos grasos esenciales conocidos como omega 3 y 6; los ácidos grasos omega se encuentran dentro de los denominados como esenciales por la razón de que el propio cuerpo humano no los produce, específicamente el ácido linoleico (cis C<sub>18:2</sub>, ω6) y el ácido linolénico (cis C<sub>18:3</sub>, ω3), además de la necesidad de un aporte adecuado de estos ácidos grasos esenciales, abundantes en aceites vegetales, hay evidencias que sugieren que estos ácidos grasos podrían tener efectos fisiológicos benéficos específicamente a nivel cardiovascular, por tal motivo es necesario destacar el interés creciente de alcanzar una ingesta adecuada de los ácidos grasos poliinsaturados (serie ω), especialmente en las grandes ciudades en las que, entre otras peculiaridades, existe una elevada prevalencia de trastornos cardiovasculares y un consumo elevado de productos de origen animal los cuales contienen en su mayoría AGs saturados, también los lípidos son vehículo de vitaminas liposolubles; las vitaminas A, D, E y K son solubles en lípidos y solventes orgánicos, se encuentran en la dieta en pequeñas cantidades y requieren de los ácidos grasos para una eficiente absorción intestinal (forman complejos con las lipoproteínas en las membranas celulares). Los lípidos, influyen en la textura y acción como lubricantes, contribuyen positivamente a las características sensoriales de los alimentos y producen sensación de saciedad debido a su lenta absorción en el organismo <sup>4</sup>.

En los últimos años se han aplicado diferentes metodologías para la caracterización y cuantificación de lípidos en los alimentos tanto de origen vegetal como de animal, como ya se menciono los lípidos son la principal fuente de reserva energética, también contribuyen al sabor de los alimentos y es sabido que dependiendo de qué tipo de lípidos se ingieran estos repercutirán positiva o negativamente en el cuerpo humano. Las metodologías que se utilizan

principalmente se basan en extracciones liquido-liquido, por ejemplo los métodos Folch, Bligh and Diyer, los cuales gastan gran cantidad de disolvente, requieren de una relativa mayor cantidad de muestra y es necesario periodos largos de extracción lo cual implica mayor consumo de energía.

La importancia de disminuir la cantidad de disolventes y de otras sustancias químicas y la disminución de la cantidad de energía usada, es de suma importancia debido al impacto negativo medioambiental que tiene la generación de energía y la toxicidad de dichas sustancias químicas.

Por tales razones, el presente trabajo plantea el desarrollo y la optimización de una metodología para la detección y cuantificación de ácidos grasos así como una metodología para obtener el perfil de lípidos simples, utilizando la extracción asistida con ultrasonido (sonda) seguida de CG y CG-EM. La técnica propuesta tiene la característica de ser simple, rápida, requiere menor cantidad de muestra.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 El chile

En México se utiliza la palabra chile proveniente del náhuatl chilli para referirse a todo producto proveniente del género *Capsicum*, el nombre científico del género deriva del griego kapso (picar), todos los chiles pertenecen a este género. El género *Capsicum* comprende varias especies de plantas, emparentadas con el tomate, oriundas del Continente Americano <sup>5,6</sup>.

#### 2.1.1 Botánica

La clasificación de los chiles se basa principalmente en la forma de las flores, la genética, la bioquímica y la distribución geográfica. El género *Capsicum* incluye alrededor de 26 especies, de las cuales el hombre solamente utiliza 12, y solamente 5 han sido domesticadas y se cultivan de manera regular. Dichas especies son: *Capsicum annum*, (Figura 1), *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum furtescens* y *Capsicum pubescens*. La descripción taxonómica filogenética de los chiles está descrita como <sup>5,7</sup>:

División	Spermatophyta
Línea	Angiospermae
Clase	Dicotyledones
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>



**Figura 1.** Ejemplos de especies del genero *Capsicum*

### 2.1.2 Morfología y Estructura

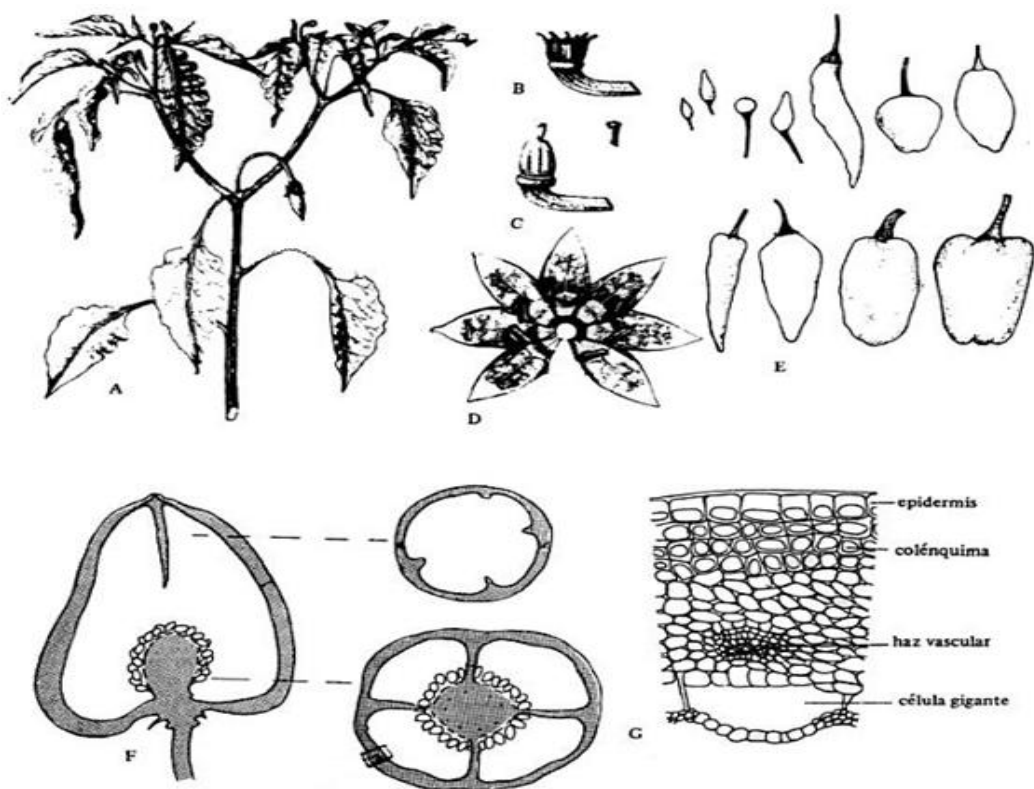
Las especies de *Capsicum* son angiosperma dicotiledónea de árboles o arbustos anuales. La planta, de tallo leñoso, forma normalmente un arbusto de hasta 1.5 m de altura; algunas variedades alcanzan tamaños superiores. Las flores son blancas o verdosas en la mayoría de las variedades, salvo en algunos casos en que se presentan flores de coloración violácea. Dichas flores son hermafroditas con dos o cuatro pistilos, en cuya base se encuentra el ovario conteniendo los óvulos, estos al ser fecundados producen semillas. Los óvulos están unidos a la placenta a través de un hilillo llamado funículo <sup>7</sup>.

El fruto es una baya de dos hasta cinco celdas; las paredes que las separan son incompletas y en la parte apical del fruto las celdas se comunican (Figura 2F). La pared del fruto o pericarpo (Figura 2G), incluye la epidermis compuesta por una capa de células isodiamétricas de paredes engrosada, y una zona de dos a cuatro capas de colénquima, que junto con la epidermis forma una cáscara fina pero resistente.

El mesocarpo es un tejido carnoso, de parénquima con cristales o cromatóforos amarillos o rojos; la banda exterior está constituida por células isodiamétricas, mientras que en la interior son alargadas en sentido radial, más grandes; entre ellas pasan haces vasculares muy finos. Entre la última capa del mesocarpo y el endocarpo se encuentran las llamadas “células gigantes”, más bien vesículas claras y prominentes, que dan el aspecto ondulado característico de la cara interior del fruto. El endocarpo se forma de una o pocas capas de células, mucho más pequeñas que las del mesocarpo, y de paredes más gruesas excepto en los puntos en que se adhiere al mesocarpo para formar las vesículas, en que las células son muy pequeñas y de paredes muy delgadas <sup>8</sup>.

El pericarpio es coriáceo; dependiendo de la madurez del fruto sus colores abarcan, según la especie, desde el blanco y el amarillo hasta el morado intenso, pasando por el naranja, el rojo brillante y lavanda. El color verde es señal de inmadurez, aunque muchas especies se consumen también de ese modo, El cuerpo del fruto presenta una superficie suave, frecuentemente asurcada y con

depresiones o rugosidad transversal <sup>7</sup>. Las semillas, de color amarillo paja, crecen en placentas centrales situadas en la base del fruto <sup>8</sup>.



**Figura 2.** *Capsicum* spp. A, tallo florífero de *C. baccatum*. B, C, D, cáliz, pistilo y corola abierto del mismo. E, frutos de diferentes cultivares de *C. annum*. F, corte longitudinal y transversal del fruto. G, estructura de la pared del fruto.

### 2.1.3 Composición química

El chile tiene un papel importante en la alimentación ya que proporciona vitaminas y minerales; es una buena fuente de proteínas, hidratos de carbono y minerales, así como de antioxidantes naturales, como flavonoides (quercetina, luteolina), ácidos fenólicos, carotenoides ( $\beta$  caroteno, capsantina, etc.), tocoferoles, vitamina A y vitamina C; contienen también una gran cantidad de compuestos aromáticos que forman parte del sabor global de los alimentos que los contienen <sup>9</sup>.

En la Tabla 1 se muestra el análisis bromatológico del pimiento verde, cabe señalar que la composición de otras variedades de chile pudieran ser diferentes <sup>7</sup>.

**Tabla 1.** Composición del pimiento verde (por 100g de porción comestible)

Componente	Contenido	Componente	Contenido
Humedad	85.3 (g)	Cloruro	15 (mg)
Proteínas	2.9 (g)	Fosforo	8 (mg)
Lípidos	0.6 (g)	Hierro	1.2 (mg)
Carbohidratos	3.0 (g)	Sodio	6.5 (mg)
Fibra	6.8 (g)	Potasio	217 (mg)
Minerales	1.0 (g)	Cobre	1.55 (mg)
Calcio	3.0 (mg)	Ácido ascórbico	111 (mg)
Magnesio	24 (mg)	Rivoflavina	0.39 (mg)

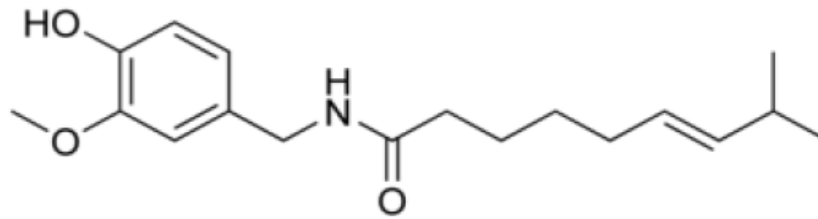
#### 2.1.4 Capsaicinoides

El sabor picante de los chiles pertenecientes al género *Capsicum* se debe a la presencia de un grupo de compuestos conocidos como capsaicinoides, los cuales se sintetizan y acumulan en el tejido placentario de los frutos. Los capsaicinoides son amidas formadas por la unión de una vainillilamina y un ácido graso.

El consumo del chile se debe principalmente al sabor picante, el cual es causado por la presencia de capsaicinoides. La concentración de este tipo de compuestos en las diferentes especies del género *Capsicum* puede variar desde un 0.003% hasta 1% en algunos casos como el chile Habanero, aunque generalmente las concentraciones que se encuentran están en un rango de 0.3% y 0.5%.

La variación de la concentración y tipo de compuestos capsaicinoides contenidos en un chile es el resultado de factores ambientales y genéticos. El contenido de capsaicinoides varía entre cultivares de la misma especie y entre los frutos de un mismo cultivar. La pungencia también está influenciada por las condiciones ambientales, humedad, temperatura, tipo de suelo, y nivel de fertilización. Los capsaicinoides son una mezcla de compuestos entre los cuales se destacan la

capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida) (Figura 3) y la dehidrocapsaicina que tiene una insaturación entre los carbonos <sup>6,7</sup>.



**Figura 3.** Estructura química de la capsaicina.

Estos dos compuestos generalmente representan más del 90% de la concentración total de capsaicinoides en los chiles <sup>10</sup>.

### 2.1.5 Usos

Los usos del chile son muy variados sin embargo, tiene una gran importancia en la industria alimentaria esto debido a sus distinguidas características de sabor, olor y color. Las industrias involucradas en el procesamiento de los chiles son muy diversas: deshidratación de chiles, elaboración de chile Chipotle, elaboración de chile en salmuera, en escabeche y encurtidos, elaboración de salsas, obtención de oleorresinas, aceites esenciales y pigmentos <sup>3</sup>.

### 2.1.6 Chiles deshidratados

La conservación de los alimentos por deshidratación es uno de los métodos más antiguos, el cual tuvo su origen en los campos de cultivo cuando se dejaban deshidratar de forma natural las cosechas de cereales, heno, y otros antes de su recolección o mientras permanecían en las cercanías de la zona de cultivo. El éxito de este procedimiento reside en que, además de proporcionar estabilidad microbiológica, debido a la reducción de la actividad del agua, y fisicoquímica, aporta otras ventajas derivadas de la reducción del peso, en relación con el transporte, manipulación y almacenamiento. Para conseguir esto, la transferencia de calor debe ser tal que se alcance el calor latente de evaporación y que se logre que el agua o el vapor de agua atraviesen el alimento y lo abandone. Las plantas deshidratadoras generalmente “maquillan” el secado del producto pesando a la



entrada el volumen de chile en verde. El chile se coloca en charolas de malla que a su vez son depositadas en carros metálicos para ser introducidos a los túneles de secado. Los túneles trabajan con un sistema de aire forzado caliente utilizando gas o diesel como combustible. El tiempo de secado depende del sistema y de la humedad de los chiles. El tiempo promedio de secado en la mayoría de los casos es de 4 horas por sección. Cada sección corresponde a una cantidad específica de carros que generalmente son 5 carros y que varía de acuerdo a la capacidad de secado de cada planta<sup>3</sup>.

### **2.1.7 Chile chipotle**

El chile chipotle es un chile seco y ahumado, de color café oscuro, textura arrugada, muy picoso, es uno de los chiles más picosos. Cuando fresco es el chile Jalapeño. Su nombre proviene del Náhuatl; Chilli, Chile y Poctli, humo, "Chile Ahumado". La técnica de ahumado data de la época Prehispánica. Con este chile se hacen salsas picantes y guisos que a veces llaman enchipotlados. Se venden secos en los mercados populares para hacerlos en escabeche o adobados, sin embargo la gran mayoría de los chiles en escabeche o adobados, se consumen de lata, y solo muy pocas personas los siguen haciendo en casa<sup>3</sup>.

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

El uso de la sal para la conservación de los alimentos está muy extendido, debido a que aporta sabor, ejerce un efecto conservador e influye en la textura y otras características de los encurtidos. La sal empleada debe de ser de buena calidad, es decir, debe presentar un bajo contenido en calcio, magnesio y hierro, un color blanco y debe encontrarse libre de bacterias halofíticas y materias extrañas. El salado y la salmuera son las principales aplicaciones de la sal en la preparación de los encurtidos y salsas. Los Jalapeños, los Serranos y los Chipotles son los chiles que más frecuentemente se conservan en escabeche. El escabeche es una salsa o adobo que se hace con aceite frito, vino o vinagre, hojas de laurel y otros ingredientes, para conservar y hacer sabrosos los chiles. Esta es la forma más común de chiles enlatados que se encuentran a la venta en el mercado. El chile es de las especies más comunes para encurtidos, tanto solo como para sazonar otros

vegetales, al ser sometidos a diversas transformaciones, tienen en común su aderezo con vinagre. Los chiles pueden someterse a fermentación ácido-láctica o bien no fermentarse. También pueden elaborarse numerosos tipos de encurtidos mediante adiciones de azúcares, especias, esencias y aromas, pero siempre con presencia de vinagre, pues es la característica fundamental del encurtido. Los encurtidos, independientemente de que se fermenten o no, pueden pasteurizarse para mejorar su conservación. El proceso de fabricación de encurtidos comprende dos fases: Fase de fermentación: tiene lugar la fermentación ácido-láctica de la materia prima debido a la flora microbiana presente de forma natural en los frutos. Esta fase va acompañada de una serie de operaciones previas preparatorias. Esta fase puede no realizarse, pasando de las operaciones previas a la fase siguiente. Fase de elaboración: a partir de la materia prima fermentada y conservada en salmuera o bien partiendo de productos en fresco son elaborados los distintos tipos de encurtidos <sup>3</sup>.

### **2.1.9 Salsas**

En México, el sector productivo de chiles de la Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias (CANAINCA) se encuentra en el tercer sitio en la producción con el 8% de la participación, sólo superado por las bebidas y las legumbres. Así mismo, junto con las salsas y condimentos, presentan en total un 10% de crecimiento, ubicándose en el segundo lugar de crecimiento de la mezcla total de la industria. El sector chiles de la industria generó una derrama económica en 2000, de 2,616 millones de pesos. El sector se compone por cinco segmentos: Serrano, Jalapeño, Chipotle, Morrón y otros chiles (Güeros, Largos, Pimientos, Poblanos, etc.). Las industrias salseras en todo el mundo han ido en aumento. Actualmente muchos países han empezado a elaborar salsas, en pequeñas compañías con sabores diversos <sup>3</sup>.

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

Sus usos industriales son cada vez mayores. El chile rojo en polvo, rico en capsantina (ingrediente que determina la cantidad de pigmento en un chile), se emplea en la avicultura como alimento para las gallinas, con objeto de obtener una

intensa coloración amarilla, muy apreciada, tanto en las yemas de los huevos como en la piel de los pollos. De los chiles deshidratados a su vez, se extrae una sustancia llamada oleorresina que se utiliza en la preparación de carnes frías y embutidos; como componente de pinturas marinas; como repelente en la agricultura y la ganadería menor, contra mamíferos depredadores; en la industria tabacalera, para mejorar el sabor de ciertas mezclas de tabaco; en la industria farmacéutica, como estimulante; en la industria cosmética, para la elaboración de champú y jabón, así como para producir pigmentos colorantes para lápices labiales y polvos faciales; en la fabricación de aerosoles defensivos; y en fin, hasta en la industria militar, donde se emplea en la fabricación del llamado pepper-gas <sup>3</sup>.

## 2.2 Lípidos

El término Lípido ha sido tradicionalmente usado para describir una amplia variedad de productos naturales incluidos los ácidos grasos (AGs) y sus derivados, esteroides, terpenos, carotenoides y ácidos biliares, los cuales tienen en común su solubilidad en disolventes orgánicos como el dietil éter, hexano, benceno, cloroformo y metanol. Una definición más específica, es preferible, pero aún no se ha acordado a nivel internacional, y el término es hoy en día con frecuencia restringida a los ácidos grasos y sus derivados de origen natural (ésteres o amidas) y compuestos estrechamente relacionados biosintéticamente a los ácidos grasos. Las principales clases de lípidos consisten en fragmentos de AGs (ácidos carboxílicos alifáticos de cadena larga) unidos mediante un enlace éster a un alcohol, principalmente el alcohol trihidrico, glicerol, o por enlaces amidas a bases de cadena larga (“esfingosinas” o “bases esfingonizadas”). También, pueden contener ácido fosfórico, bases orgánicas, azúcares y más compuestos complejos que pueden ser liberados mediante varios procedimientos hidrolíticos. Los lípidos pueden ser subdivididos en dos grandes clases – “lípidos simples”, los cuales pueden ser hidrolizados para dar uno o dos diferentes tipos de productos por mol, y los “lípidos complejos”, los cuales contienen tres o más productos de la hidrólisis por mol <sup>11</sup>.

### 2.2.1 Lípidos simples

Los lípidos simples contienen únicamente AGs y componentes del alcohol. El alcohol es usualmente glicerol pero puede también ser una cadena larga de alcohol o un esteroil. Son también conocidos los ésteres tiolicos de C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>, pero raramente encontrados en cantidades no mayores a trazas. Son también clasificados como lípidos simples a los AGs sin esterificar o libres, los cuales están presentes en pequeñas cantidades en la mayoría de los tejidos animales y de plantas, y los esteroides libres, el más abundante de estos es el colesterol <sup>11</sup>.

#### 2.2.1.1 Triacilgliceroles (TG)

Los acilgliceroles son ésteres de ácidos grasos simples del triol conocido como glicerina. Los acilgliceroles más comunes son los triacilgliceroles (triacilglicerina), en los que los tres grupos –OH de la glicerina han sido esterificados por ácidos grasos, saturados o insaturados. A los TG generalmente se les denomina grasa si se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente. La mayor parte de los TG derivados de los mamíferos son grasas. A pesar de que estas grasas son sólidas a temperatura ambiente, la temperatura del cuerpo de los animales hace que las grasas se encuentren en un estado fluido, permitiendo su distribución en el cuerpo. En las plantas y en los animales de sangre fría, los TG generalmente son aceites líquidos, en lugar de grasas. Las grasas y los aceites generalmente se utilizan para almacenar energía a largo plazo en las plantas y los animales. Las grasas son un recurso más eficiente, para almacenar energía a largo plazo, que los hidratos de carbono, porque el metabolismo de un gramo de grasa libera alrededor de dos veces más de energía que un gramo de azúcar o de almidón. Un adulto con una media de 70 Kg almacena alrededor de 1000 Kcal de energía disponible como glucógeno (0.2 Kg), y alrededor de 140 000 Kcal de energía a largo plazo en forma de grasa (15 Kg): ¡suficiente para mantener sus necesidades metabólicas durante tres meses!<sup>12</sup>. Los AGs de los TG comunes son ácidos carboxílicos lineales y largos, entre 12 y 20 átomos de carbono. La mayoría de los ácidos grasos contienen números pares de átomos de carbono, porque éstos se biosintetizan a partir de subunidades de acetilo (AcetilCoA)(de dos carbonos).

Algunos de los ácidos grasos comunes tienen cadenas de carbono saturadas, mientras que otros tienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono <sup>11</sup>.

### 2.2.1.2 Ácidos Grasos (AGs)

Los ácidos grasos son compuestos que constan de una cadena hidrocarbonada lineal generalmente sólo con un grupo carboxilo terminal, pueden ser completamente saturados o contener de uno hasta seis dobles enlaces, cuya configuración generalmente es *cis* ó *Z*. Existen diferentes nomenclaturas para identificar a los ácidos grasos, en la Tabla 2 se presentan algunos ejemplos con la fórmula, nombre sistemático, nombre común y designación corta, en esta última el primer número corresponde al número de carbonos de la cadena y el segundo al número de insaturaciones, la posición del doble enlace se indica entre paréntesis <sup>14</sup>.

**Tabla 2.** Fórmula y diferentes nombres de algunos ácidos grasos

Fórmula	Nombre sistemático	Nombre trivial	Designación corta
$\text{CH}_2(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	Decanoico	Cáprico	$\text{C}_{10:0}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Dodecanoico	Láurico	$\text{C}_{12}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	Tridecanoico	No tiene	$\text{C}_{13}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Tetradecanoico	Mirístico	$\text{C}_{14}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	Pentadecanoico	No tiene	$\text{C}_{15}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	Hexadecanoico	Palmítico	$\text{C}_{16}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Cis-9-hexadecanoico	Palmitoléico	$\text{C}_{16:1}$ [7]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$	Heptadecanoico	Margárico	$\text{C}_{17}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Octadecanoico	Estearico	$\text{C}_{18}$
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis-9-octadecanoico	Oleico	$\text{C}_{18:1}$ [9]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_2(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis,cis-9,12-octadecadienoico	Linoleico	$\text{C}_{18:2}$ [9,12]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienoico	Linolénico	$\text{C}_{18:3}$ [9,12,14]
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Eicosanóico	Araquídico	$\text{C}_{20}$

### 2.2.1.3 Ocurrencia de los ácidos grasos en la naturaleza

Los ácidos grasos más comunes de origen animal y vegetal contienen un número par de átomos de carbono (de 4 a 24), se ha observado que los provenientes de animales son estructuralmente más simples que los de origen vegetal ya que estos últimos pueden contener mayor variedad de grupos funcionales como enlaces acetilénicos y etilénicos conjugados, grupos alénicos, ciclopropanos, ciclopropenos, ciclopentenos, epóxidos, hidróxidos, cetonas, furanos y dobles enlaces con configuración *trans* ó *E*. En ambos reinos los más comunes son el palmítico (C<sub>16:0</sub>), palmitoleico (C<sub>16:1</sub> [9]), esteárico (C<sub>18</sub>), oleico (C<sub>18:1</sub> [9]), linoleico (C<sub>18:2</sub> [9,12]) y linolenico (C<sub>18:3</sub> [9, 12,15]). Los ácidos grasos con número de carbonos impar, como ya se mencionó, son muy raros en la naturaleza, sin embargo, se han llegado a encontrar en muy pocas plantas, en peces, algas y bacterias <sup>13</sup>.

### 2.2.2 Lípidos complejos

Los lípidos complejos se pueden subdividir en tres clases principales: glicerofosfolípidos (también conocidos como “fosfogliceridos”), los cuales al ser hidrolizados producen glicerol, ácidos grasos, fosfato inorgánico y bases orgánicas o compuestos polihidroxicos; glicofosfolípidos (aveces llamados “glicosildigliceridos”), los cuales al ser hidrolizados producen glicerol, ácidos grasos e hidratos de carbono; esfingolípidos, los cuales contienen una base de cadena larga, ácidos grasos y fosfato inorgánico, hidratos de carbono y otros compuestos orgánicos complejos <sup>11</sup>.

### 2.2.3 Función de los lípidos en las plantas

Los lípidos cumplen diversas funciones en las plantas, entre las que destacan la formación de membranas y la reserva de energía. Los glicéridos, esfingolípidos y esteroides son los principales componentes estructurales de las membranas, los triacilgliceroides sirven como reservas de carbono y energía ya que existen en ambientes anhidridos en los cuales no pueden permanecer los hidratos de carbono. Algunos ácidos grasos libres están implicados en la regulación de procesos celulares como el tetradecanoico y hexadecanoico que se emplean en reacciones de acilación para modificación de proteínas. Los ácidos grasos

contenidos en aceites esenciales y en resinas sirven como compuestos de defensa<sup>12</sup>. Los contenidos principales de ácidos grasos en la mayoría de las grasas y aceites vegetales son moléculas lineales saturadas con un número de carbonos de entre 12 y 22 y las moléculas no saturadas lineales con un número de carbonos de 18 y el número de dobles enlaces que van desde uno hasta tres<sup>13</sup>.

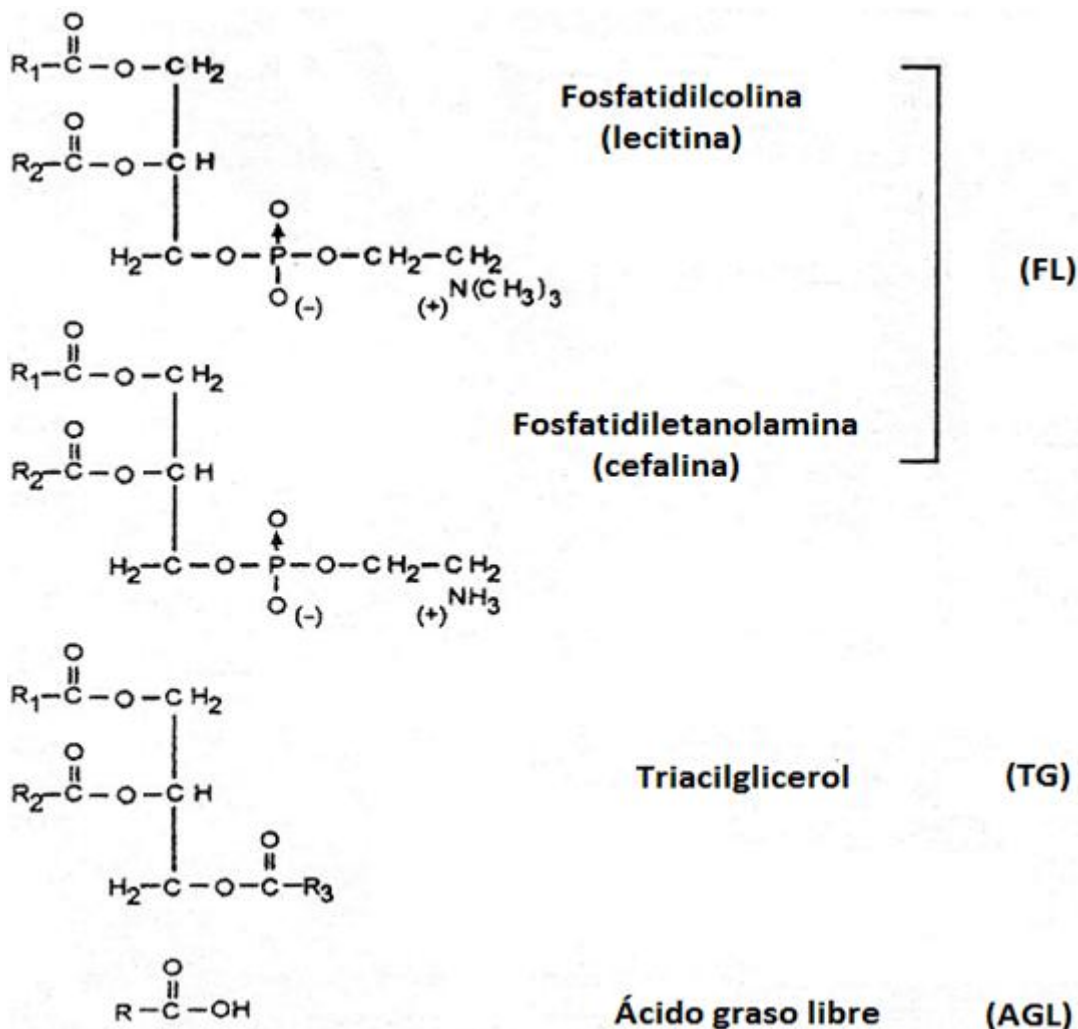
Con los años, el perfil de ácidos grasos de la diversidad de muestras biológicas (es decir, nutricionales y biomédicos) ha cobrado una importancia tremenda en cuanto a la comprensión de la relación entre los lípidos de la dieta y el desarrollo de enfermedades como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares<sup>15</sup>.

#### **2.2.4 Papel de los lípidos en el sabor de los alimentos**

Los lípidos grupo heterogéneo dentro del cual se encuentran los ácidos grasos, influyen en la textura y acción como lubricantes, contribuyen positivamente a las características sensoriales de los alimentos y producen sensación de saciedad debido a su lenta absorción en el organismo<sup>16</sup>.

#### **2.2.5 Estudios previos sobre caracterización de lípidos y ácidos grasos en alimentos**

Casi todos los alimentos contienen “grasa”, término vagamente definido como el material que es soluble en casi todos los distintos solventes orgánicos como el hexano, éter dietílico, o cloroformo. La mayor clase de lípidos encontrados en alimentos se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Lípidos principales que se encuentran en los alimentos

La característica distintiva de los lípidos en los alimentos es la presencia universal de ácidos grasos de mediana y larga cadena de carbonos (C<sub>14</sub>-C<sub>22</sub>). Las cadenas hidrocarbonadas de estos ácidos grasos son el principal factor en la solubilidad ya mencionada.

La nomenclatura de los AGs es un poco confusa. Los nutriólogos deben distinguir los AGs C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub> y C<sub>12</sub> de los AGs comunes C<sub>16</sub> y C<sub>18</sub> llamando a los primeros los de “cadena corta” y a los segundos de “cadena larga”. Los primeros son fácilmente digeridos, y en la absorción pasan directamente al hígado a través de la vena porta, mientras que los segundos tienden a transferirse a la linfa en los quilomicrones.



Otros grupos de AGs de longitud de cadena muy corta ( $C_1$ - $C_6$ ) fueron históricamente llamados los ácidos grasos volátiles (VFAs por sus siglas en inglés volatile fatty acids), principalmente porque pueden ser destilados a presión atmosférica. Básicamente, también estos AGs son bastante solubles en agua, mientras que los AGs  $C_8$  y de cadena más larga se hacen progresivamente menos hidrosolubles <sup>17</sup>.

### **2.2.6 Métodos de extracción de lípidos**

La mayoría de los disolventes orgánicos ya mencionados disuelven acilgliceroles y ácidos grasos libres (Figura 4). La dificultad en la extracción total de lípidos es doble: (1) Algunos de los disolventes son inmiscibles con el agua y (2) algunos son disolventes pobres para los lípidos polares (la mayoría fosfolípidos). Los triacilgliceroles normalmente se encuentran en el tejido graso, o también pueden existir en forma de adipocitos (células adiposas) diseminados dentro del tejido muscular. Una muy pequeña fracción se encuentra en las membranas de las células biliares, de los cuales la mayoría son fosfolípidos.

El metanol es un pobre disolvente para los triacilgliceroles pero es completamente miscible en agua en todas las proporciones. Por lo tanto esto puede servir para despojar el agua hidratante y dejar al cloroformo, por ejemplo, para disolver los fosfolípidos. Esta es la base del famoso método de Folch et al. (1957) un sistema de disolventes 2:1 cloroformo-metanol, la cual se convirtió en la unidad base de la extracción de lípidos para bioquímicos. El agua en el sistema causa que el cloroformo se separe limpiamente, con los componentes del metanol reteniendo el agua y suprimiendo las emulsiones. El método original incluye procedimientos extensos para remover el material no lipídico que probablemente son ignorados por la mayoría de la gente que cita el método.

Similarmente, la utilización de una monobase basada en las proporciones exactas de cloroformo, metanol y agua ha sido desarrollado por Bligh and Dyer tiende a ser anulada por conveniencia, y hay cientos de artículos científicos publicados anualmente en donde la extracción de varias muestras es realizada con "cloroformo-metanol 2:1" con poca atención en las proporciones, relaciones y contenido de agua variable <sup>17</sup>.

## **2.3 Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU)**

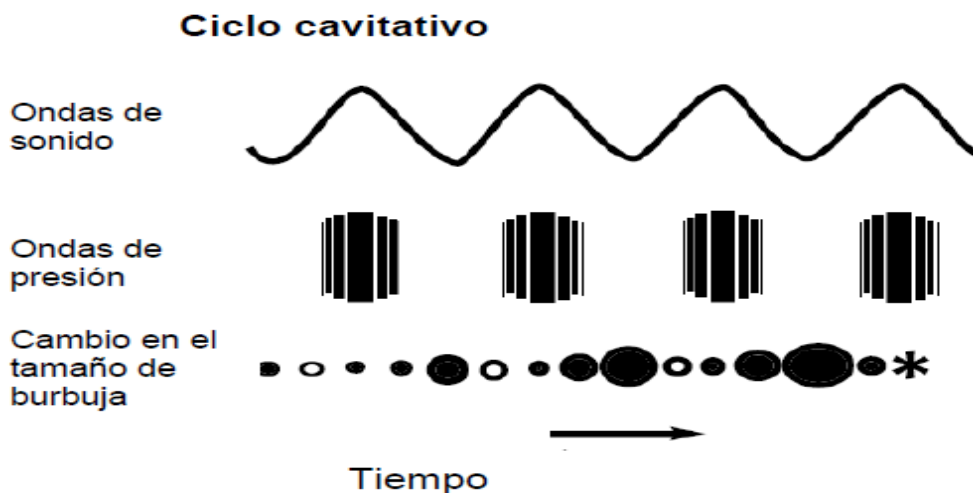
Un método que se ha utilizado recientemente para la extracción de compuestos provenientes de especies vegetales es la extracción asistida por ultrasonido, la cual resulta muy atractiva por su simplicidad, corto tiempo de extracción, reducción en la temperatura y el uso de una menor cantidad de disolvente, lo cual resulta muy útil en la extracción de compuestos termolábiles o compuestos poco estables.

### **2.3.4 Historia**

Uno de los primeros reportes que citan el empleo de ultrasonido para la extracción de compuestos de origen vegetal data de 1952 y consiste en la extracción en medio acuoso de un compuesto vegetal. Se encontró que la eficacia de la extracción era comparable a la realizada por calentamiento a temperatura de ebullición<sup>20,21</sup>.

### **2.3.5 Mecanismo de extracción**

La extracción asistida por ultrasonido está basada en el empleo de energía derivada del ultrasonido, que son ondas con frecuencias mayores a 20 kHz las cuales facilitan la extracción de analitos de matrices sólidas usando un disolvente orgánico. La eficiencia de la extracción se atribuye al fenómeno de “cavitación” que se produce en el disolvente por el paso de ondas ultrasónicas. Las fluctuaciones en la presión producidas por las ondas causan la formación de miles de burbujas microscópicas en el disolvente, las cuales implotan creando una gran cantidad de ondas de choque, generando presión y temperaturas extremas en el sitio de la implosión (Figura 7)<sup>22</sup>.



**Figura 7.** Ciclo cavitativo

El ultrasonido provoca también un efecto mecánico durante la extracción, permitiendo una mayor penetración del disolvente en la matriz de la muestra, esto incrementa la superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida. Lo anterior en conjunto con un mayor rompimiento celular, debido al efecto cavitativo, incrementa el contenido de los componentes intracelulares en el medio de extracción. En algunos casos el incremento de la temperatura durante la extracción asistida con ultrasonido puede aumentar la eficiencia de la extracción. Los tejidos vegetales están rodeados por paredes; el mecanismo de extracción consiste en dos fenómenos físicos, el primero es la difusión del disolvente a través de las paredes celulares, y el segundo es la ruptura de las paredes y la liberación de los compuestos hacia el medio. Algunas células vegetales almacenan el contenido lipídico en glándulas externas, cuya pared es muy delgada y por lo tanto es muy fácilmente destruida por el efecto de sonicación. Esto explica el porque la extracción del contenido lipídico utilizando ultrasonido resulta altamente eficiente <sup>20,21,22</sup>.

### 2.3.6 Equipo y procedimiento de extracción

El equipo que generalmente se usa para hacer la extracción asistida por ultrasonido es un baño ultrasónico, cuya potencia varía de los 100 a los 600 W. Por otra parte los procesadores ultrasónicos o sondas ultrasónicas tienen un mayor rango de aplicación, así como una mayor eficiencia.

Los procesadores ultrasónicos consisten de tres componentes principales: Una fuente de energía, un convertidor y una punta. La fuente de energía se encarga de convertir el voltaje de 50/60 Hz en energía eléctrica de alta frecuencia (20 kHz), posteriormente el convertidor transforma la energía eléctrica en energía mecánica, en forma de pequeñas vibraciones. Estas vibraciones son transmitidas hacia el líquido a través de la punta. Las puntas con un diámetro pequeño producen una cavitación de gran intensidad pero enfocada solamente al volumen cercano. Por otra parte, las puntas con diámetro mayor producen una cavitación menor, pero pueden procesar un volumen mayor. Las puntas están hechas de titanio por sus propiedades acústicas, su resistencia a la corrosión, baja toxicidad y resistencia a la erosión por cavitación.

Los procesadores también tienen una aplicación industrial, en cuyo caso se utilizan procesadores de 500 a 750 Watts, que pueden manejar volúmenes de hasta 10 litros. Para volúmenes no mayores a 150 mL se recomienda el uso de procesadores de 100-130 Watts.

El procedimiento para realizar la extracción asistida con ultrasonido es bastante sencillo. La matriz que contiene el analito de interés se coloca en un vaso con el disolvente adecuado. Se puede colocar en una parrilla para controlar la temperatura y se introduce la punta del sonicador en el recipiente. Se controla la amplitud y el tiempo de sonicación. Una vez que se ha separado el material lipídico del resto de la matriz alimentaria se lleva a cabo un proceso cromatográfico para separar los capsaicinoides del resto de los lípidos. Se han reportado diferentes técnicas para llevar a cabo la separación, entre las que destacan la oficial que consiste en una separación usando cromatografía de líquidos utilizando diferentes detectores. Se utiliza también recientemente la cromatografía de gases con diferentes detectores e incluso acoplada a espectrometría de masas <sup>10</sup>.

#### **2.4 Cromatografía gas-líquido (CGL)**

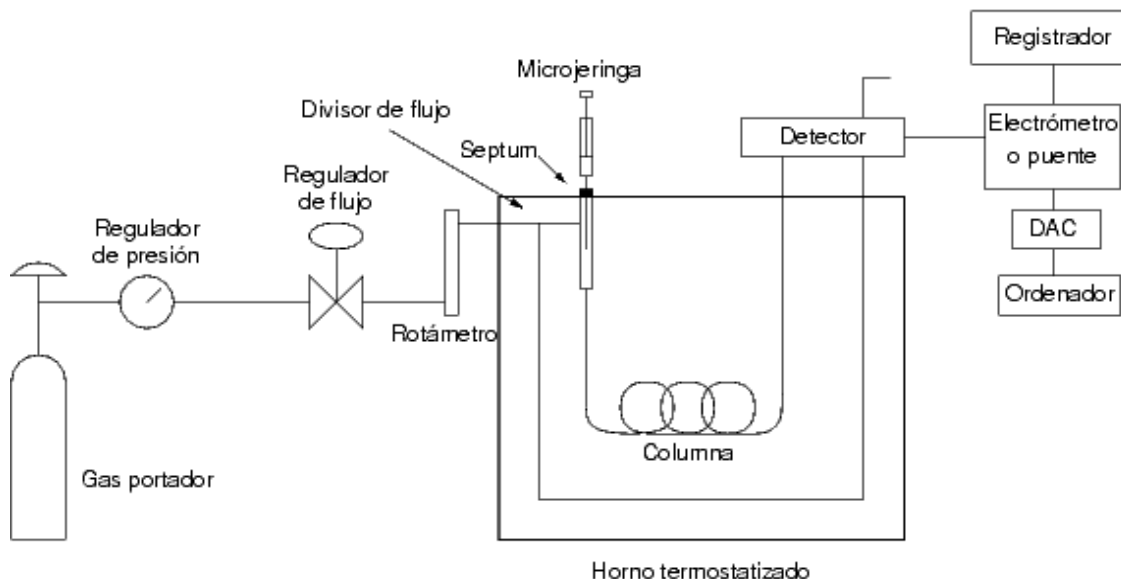
La CGL consiste en la separación de compuestos volatilizados de una muestra, al ser arrastrados por una corriente de gas inerte (fase móvil) a través de una capa de líquido no volátil (fase estacionaria) inmovilizada sobre un soporte sólido, normalmente formado por pequeñas partículas y empaquetado en una columna, en

la Figura 5 se muestra el diagrama general de CG. Las características de los compuestos que determinan su separación son su volatilidad relativa y su solubilidad en la fase estacionaria. Las muestras suelen inyectarse disueltas en un disolvente orgánico volátil (1-5  $\mu\text{L}$ ) directamente en la columna precalentada a una temperatura suficiente para producir una volatilización instantánea del disolvente con sus solutos. El flujo de gas portador arrastra el vapor de las sustancias más volátiles a través de la fase estacionaria y por tanto se desplazan por la columna. Las sustancias menos volátiles se retienen en mayor o en menor grado en la fase estacionaria y por tanto se desplazan por la columna a diferente velocidad y eluyen en tiempos diferentes.

Las fases estacionarias pertenecen generalmente a dos grupos: polares y apolares. La selección apropiada de la fase estacionaria asegura la resolución eficiente de mezclas de compuestos. Las ventajas de unas fases sobre otras dependen del tipo de análisis que se desee realizar.

El tiempo que un soluto tarda en eluir de una columna de CGL es altamente dependiente de la temperatura. Esto conlleva que las columnas para CGL se coloquen en un horno termostatzado, capaz de controlar la temperatura con una precisión de 0,05-0,01  $^{\circ}\text{C}$ . El aumento en la velocidad de elución de los solutos puede conseguirse mediante aumentos de temperatura del horno controlados cuidadosamente (normalmente por programación). El uso de un gradiente de temperatura puede ayudar a conseguir con éxito la separación completa por CGL en un mínimo de tiempo.

El Detector de Ionización de Llama (FID por sus siglas en ingles Flame Ionization Detector) es el detector más usado. Consiste en dos electrodos de platino montados atravesando una llama de hidrógeno y aire. El gas portador que sale de la columna se introduce en la llama y las moléculas ionizadas en la llama generan una corriente a través de los electrodos. Este dispositivo puede detectar moléculas orgánicas con un límite de detección de  $10^{-9}$  moles y la respuesta es lineal <sup>17</sup>.



**Figura 5.** Diagrama general de un cromatógrafo de gases

## 2.5 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas

La Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas es una de las técnicas acopladas más utilizadas para el análisis de mezclas complejas. La gran ventaja de este acoplamiento reside en la forma como se complementan ambas técnicas, la Cromatografía de Gases se emplea para separar los componentes de una mezcla basada en sus diferentes afinidades por la fase estacionaria en la columna, por otra parte la Espectrometría de Masas se emplea para detectar y cuantificar las especies que eluyen de la columna además de proveer información definitiva sobre la identidad de los compuestos <sup>18</sup>.

La Cromatografía de Gases se utiliza básicamente en muestras volátiles generalmente de peso molecular bajo (en caso de no ser completamente volátiles se pueden derivatizar) y no es adecuada para muestras termolábiles. Una de las desventajas de la Cromatografía de Gases es que no se puede confirmar la identidad o estructura de los analitos utilizando un detector convencional. Los tiempos de retención de los analitos están relacionados con los coeficientes de partición, dicho tiempo es característico pero no único o específico para cada compuesto <sup>18,19</sup>.

La Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (EM) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación molecular, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula, el cual se puede interpretar ó relacionar con una biblioteca de espectros.
- Cuantitividad que permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad. Habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt.
- Universalidad y especificidad.
- Es una técnica rápida. Se puede obtener un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorear para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.
- Dentro de espectrofotómetro de masas se procede a la ionización de la muestra. El sistema de ionización más frecuente es el de ionización electrónica que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, generalmente 70 eV, capaz de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas <sup>18</sup>.

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares ( $M^+$ ) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema detector mediante un analizador másico. En el caso más simple, se utiliza un cuadrupolo analizador. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria de una computadora para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder

a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen. Generalmente la comparación se realiza contra la biblioteca del NIST (National Institute of Standard and Technology). La cuantificación es usualmente obtenida relacionando la respuesta del compuesto en comparación con la obtenida en un estándar de concentración conocida <sup>18,19</sup>.

## **2.6 CG a alta temperatura**

La Cromatografía de Gases Capilar a Alta Temperatura (HT-GC), es una técnica cromatográfica que opera en el intervalo aproximado de 325-430 °C y que se emplea para analizar compuestos térmicamente estables a esas temperaturas. Instrumentalmente esta técnica requiere columnas y detectores que soporten temperaturas a las cuales opera (325-430°C), y un sistema de inyección no discriminativo <sup>23</sup>. En los siguientes puntos se presenta una breve descripción de los componentes más importantes de este sistema.

### **2.6.4 Columnas**

Las columnas para HT-GC son construidas con materiales inertes como acero inoxidable, níquel y borosilicato, pero las más empleadas por su estabilidad son las de sílice fundida recubiertas de poliamida que se fabrica actualmente es térmicamente estable a temperaturas superiores a 400°C <sup>23</sup>.

### **2.6.5 Sistema de inyección**

Una desventaja de las técnicas de inyección más empleadas en GC (split/splitless), es la transferencia de los analitos de una zona de inyección (inyector) a una cámara donde primero son evaporados y posteriormente transportados (por el gas acarreador) a la columna capilar que se encuentra en el horno. De esta manera la concentración inicial de algunos analitos no entra completamente a la columna. Otra desventaja se presenta cuando se requiere analizar solutos que volatilizan a temperaturas a temperaturas muy elevadas, ya que el inyector tiene que alcanzar también altas temperaturas ocasionando la degradación de algunos analitos y produciendo a su vez, discriminación.



La técnica HT-GC requiere que la muestra sea introducida en la columna sin alteraciones, sin discriminación y sin que el procedimiento de inyección contribuya al ensanchamiento del pico <sup>24</sup>.

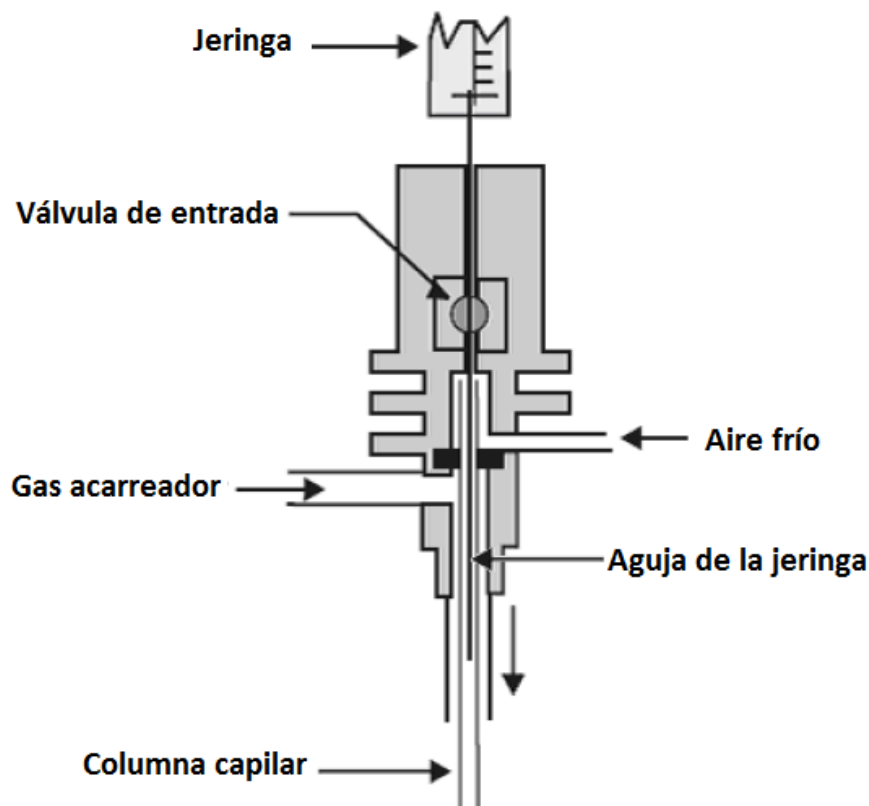
Existen dos técnicas de inyección que cumplen estos requisitos: Cool On-Column (COC) y Temperatura de Evaporación Programada (Programmed Temperature Vaporizing, PTV). La inyección Cool O-Column es la más empleada para trabajar con HT-G <sup>23</sup>.

### **2.6.6 Inyección Cool On-Column (COC)**

El termino “inyección on-column” se refiere a la colocación directa de la muestra líquida dentro de la columna. En este tipo de inyección todos los dispositivos externos a la columna con los que la muestra pueda tener contacto son evitados. La zona de inyección, es decir, el interior de la cabeza de la columna, es calentada dentro del horno por lo tanto no hay un paso de evaporación previo a una temperatura superior a la de la columna. Por esta razón la técnica es conocida como “Cool On-Column” <sup>25</sup>.

El puerto de inyección en COC permanece a temperatura ambiente gracias a un flujo de aire frío producido comúnmente por un ventilador. Un restrictor y una válvula rotatoria permiten la entrada de la jeringa a la columna mientras se mantiene la presión del gas acarreador en la cabeza de la columna. El sistema de enfriamiento asegura la transferencia de la muestra líquida de la jeringa a la columna <sup>23</sup>. La Figura 6 muestra un esquema con los principales elementos de un inyector Cool On-Column.

La colocación de la muestra dentro de la columna se logra gracias a jeringas con agujas extremadamente finas (agujas de 0.3 mm d.i. para columnas de 0.32 mm d.i. y 0.2 mm d.i. para columnas de 0.25 mm d.i.), las hay de acero inoxidable o de sílice fundida. La longitud de las agujas debe ser adaptada al inyector usado ya que debe pasar a través de el y alcanzar poco milímetros del interior de la columna <sup>26</sup>.



**Figura 6.** Inyector Cool On-Column

Con esta técnica de inyección es común utilizar precolumnas desactivadas (no recubiertas o delgadamente cubiertas) conocidas como *retention gap*. Los *retention gap* sirven para evitar pérdida de la resolución y divisiones en los picos provocadas por la partición inicial de la muestra en vapor y microgotas de líquido. La longitud y tipo de desactivación del *retention gap*, depende del volumen inyectado y la polaridad del disolvente. La regla general es 1 m de *retention gap* por  $\mu\text{L}$  inyectado <sup>26</sup>.

Como se puede apreciar el inyector *Cool On-Column* elimina la discriminación de la muestra, dado que la muestra líquida es introducida dentro de la columna fría; los analitos no sufren alteraciones ya que no son expuestos a tensión térmica (el proceso cromatográfico comienza a relativamente bajas temperaturas) y proporciona resultados exactos y precisos <sup>26</sup>.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Identificar y cuantificar los ácidos grasos de diferentes variedades de chiles para contribuir a la caracterización química de estas hortalizas.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Desarrollar y optimizar una metodología para la determinación de ácidos grasos, por extracción con sonda ultrasónica seguido de Cromatografía de Gases (EAUS-CG).
- Aplicar la metodología desarrollada para identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en las principales variedades de chiles de consumo en México.
- Comparar la Extracción Asistida por Ultrasonido (sonda) con la extracción Soxhlet debido a que es el método por excelencia de extracción exhaustiva.

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los materiales, equipo, reactivos y el desarrollo experimental de este trabajo se detallan a continuación.

### 4.1 Materiales y equipo

- Balanza analítica Sartorius modelo CP124S.
- Jeringas Hamilton de vidrio de 10, 50, 100, 150, 500  $\mu$ L.
- Material de vidrio Pyrex: matraces aforados de 1, 2, 5, 10, y 25 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 mL tipo A. Probetas de 25 y 50 mL. Vasos de precipitado de 10, 50, y 100 mL.
- Equipo de Extracción Soxhlet.
- Viales de vidrio con tapón horadado de polipropileno y septa de teflón.
- Papel filtro Whatman No. 4
- Parrilla con agitador magnético Cole-Parmer, modelo 04644.-Series.
- Procesador ultrasónico (Cole Parmer Ultrasonic Processor 100 Watts).
- Rotavapor (Rotavapor-R Buchi)
- Viales de reacción de vidrio con tapón horadado de polipropileno y septa de teflón.
- Jeringa Hamilton de vidrio de 500  $\mu$ L.
- Material de vidrio Pyrex: Pipeta volumétrica de 1mL tipo A., matraces aforados de 1 mL. ,
- Papel filtro Whatman No.1
- Embudo de vidrio

## 4.2 Reactivos

Alcohol etílico absoluto anhidro (99.9% de pureza), diclorometano (99.8% de pureza J.T Baker, México), hexano (EMD grado HPLC, 98.5% hecho en EUA).

HCl (J.T.Baker 36.5-38%, hecho en México), MeOH (J.T.Baker, 99.9%), trifluoruro de boro en metanol (Sigma-Aldrich, 14% (USA),  $\text{NaHCO}_3$  Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida BSTFA REGIS USA, 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano HMDS (98%) Aldrich Chemical Company (USA), piridina (GR) Backer (Xalostoc Edo. México), cloruro de sodio (99.5%), 1-butanol (99.7%).

## 4.3 Estándares

Estándares de los AGs marca NU-CHEK PREP (pureza >99 %), INC: tridecanoico ( $\text{C}_{13}$ ), ácido dodecanoico ( $\text{C}_{12}$ ), ácido hexadecanoico ( $\text{C}_{16}$ ), ácido 9-hexadecenoico ( $\text{C}_{16:1}$ ), ácido octadecanoico ( $\text{C}_{18}$ ), ácido 9-octadecenoico ( $\text{C}_{18:1}$ ), ácido cis,cis-9,12-octadecadienoico ( $\text{C}_{18:2}$ ), ácido  $\gamma$ -linolénico (ácido cis,cis,cis-6,9,12-octadecatrienoico) ( $\text{C}_{18:3}$ ).

Estándares de los esteres metílicos de los ácidos grasos (EMAGs) marca Sigma (pureza 99% GC).

Las disoluciones estándar de cada ácido graso se prepararon por separado pesando aproximadamente 10 mg de cada uno y posteriormente aforando a 5 mL con hexano.

## 4.4 Muestras

Se analizaron seis variedades de chiles. Estos fueron adquiridos a granel en diferentes centros comerciales y mercados populares. Las características y lugar de adquisición se enlistan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Muestras de chile analizadas

Chile	Tipo de chile	Lugar de compra	Marca
Chipotle	Seco	Central de abasto	Granel
Habanero	Fresco	Mercado local	Granel
Jalapeño	Fresco	Mercado local	Granel
Morrón	Fresco	Mercado local	Granel
Pasilla	Seco	Central de abasto	Granel
Piquín	Seco	Merced	Granel

#### 4.4.1 Acondicionamiento de las muestras

El procedimiento para obtener muestras homogéneas fue diferente de acuerdo al tipo de chile. En el caso de los chiles secos, éstos se limpiaron, se les retiraron las semillas, los cabos y se trocearon. La molienda se realizó utilizando una jarra de carburo de tungsteno en la cual se colocó la muestra y los balines para posteriormente introducirse al molino, Después de 10 minutos de molienda, la muestra se retiró de la jarra de carburo de tungsteno y se almacenó en bolsas de plástico cerradas herméticamente.

Los chiles frescos de igual forma se limpiaron, se les retiraron las semillas, los cabos y fueron picados para posteriormente liofilizarlos. La liofilización se llevó a cabo empleando nitrógeno líquido y un liofilizador Heto Drywinner. Una vez que se obtienen los chiles secos, se molieron bajo las mismas condiciones que los chiles secos.

#### 4.4.2 Cantidad de muestra analizada

Cada uno de los dos métodos de extracción requirió una cantidad diferente de muestra para el análisis. La cantidad de muestra necesaria para la extracción por el método de EAUS, se determinó en un trabajo previo para la extracción de

capsaicinoides; de la misma forma la cantidad de muestra requerida para la extracción por Soxhlet <sup>10</sup>.

#### **4.5 Extracción de Lípidos**

La extracción de lípidos ó grasas de muestras alimentarias generalmente se realiza mediante métodos tradicionales de extracción entre los que se encuentran la extracción Soxhlet, la cual presenta ciertas desventajas dentro de las que destacan el alto consumo de disolventes y el tiempo de extracción ya que es un método de extracción exhaustivo.

Hoy en día se busca que los procedimientos de análisis presenten ventajas sobre los ya existentes principalmente en que se reduzca el tiempo de análisis y disminuir, si no es que eliminar el uso de disolventes.

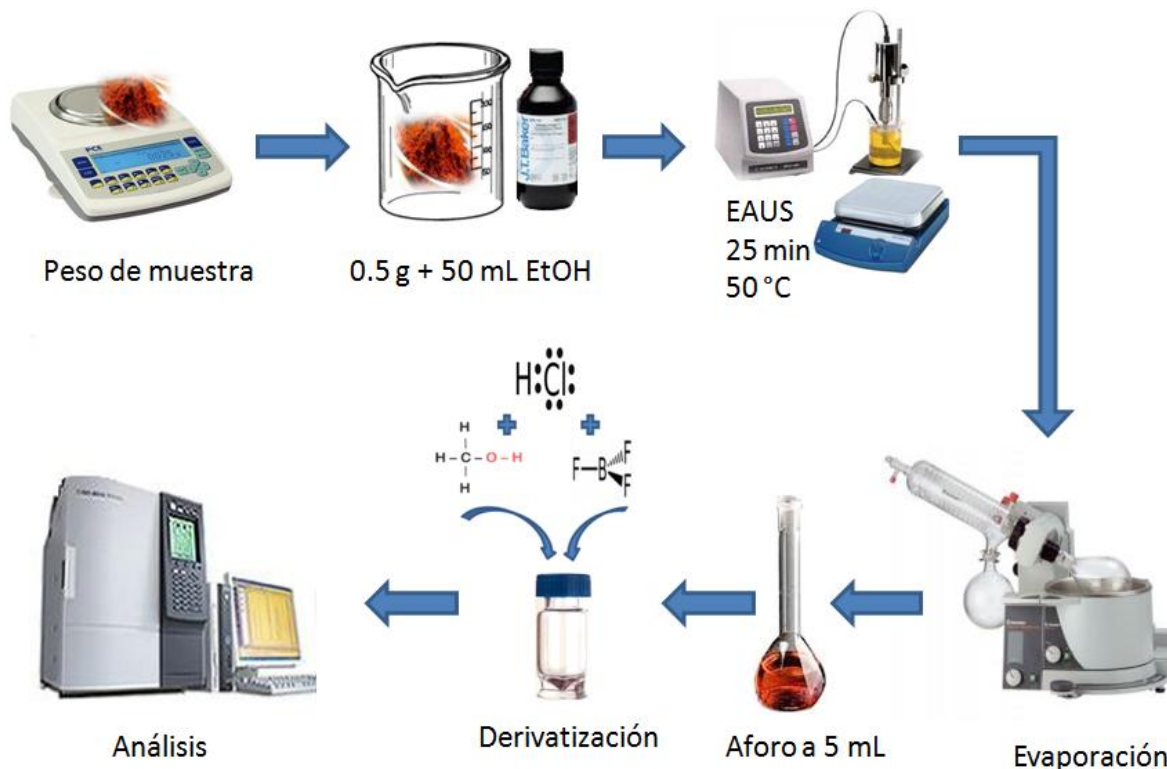
Entre las técnicas recientes de extracción que se reportan en la literatura esta la extracción con fluidos supercríticos, la extracción con líquidos presurizados, el uso de microondas, la extracción con sonda ultrasónica, por mencionar algunos y se eligen dependiendo del tipo de matriz y de los analitos a extraer.

Los AGs forman parte del material lipídico de los chiles; por tal motivo es necesario realizar una extracción de dichos analitos para su posterior análisis por cromatografía de gases. La cantidad de ácidos grasos entre diferentes variedades de chiles es muy variable. Para su extracción y concentración se utilizaron dos diferente técnicas: Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS) y Extracción por Soxhlet.

##### **4.5.1 Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS)**

Para realizar la EAUS se utilizó un procesador ultrasónico de 100 Watts con una sonda estándar de titanio con longitud de 138 mm. Se peso 0.25 g de muestra y se colocó en un vaso de precipitados de 100 mL, se adicionó 50 mL de etanol. La extracción se realizó introduciendo la sonda dentro del vaso que contiene la muestra de chile disuelta en el disolvente, de manera que ésta se encuentre en medio y lo más cercana al fondo del vaso, durante 25 min, con una potencia del 60%, a una temperatura de 50 °C, para controlar la temperatura, el vaso se colocó

en un baño de agua calentado con parrilla; el extracto se filtró para eliminar los componentes insolubles y posteriormente se evaporó a sequedad utilizando un rotavapor. Se redisolvió en una mezcla 25:1 de diclorometano-etanol, llevando a un volumen de 5 mL (Figura 8).



**Figura 8. Proceso de Extracción Asistida por Ultrasonido**

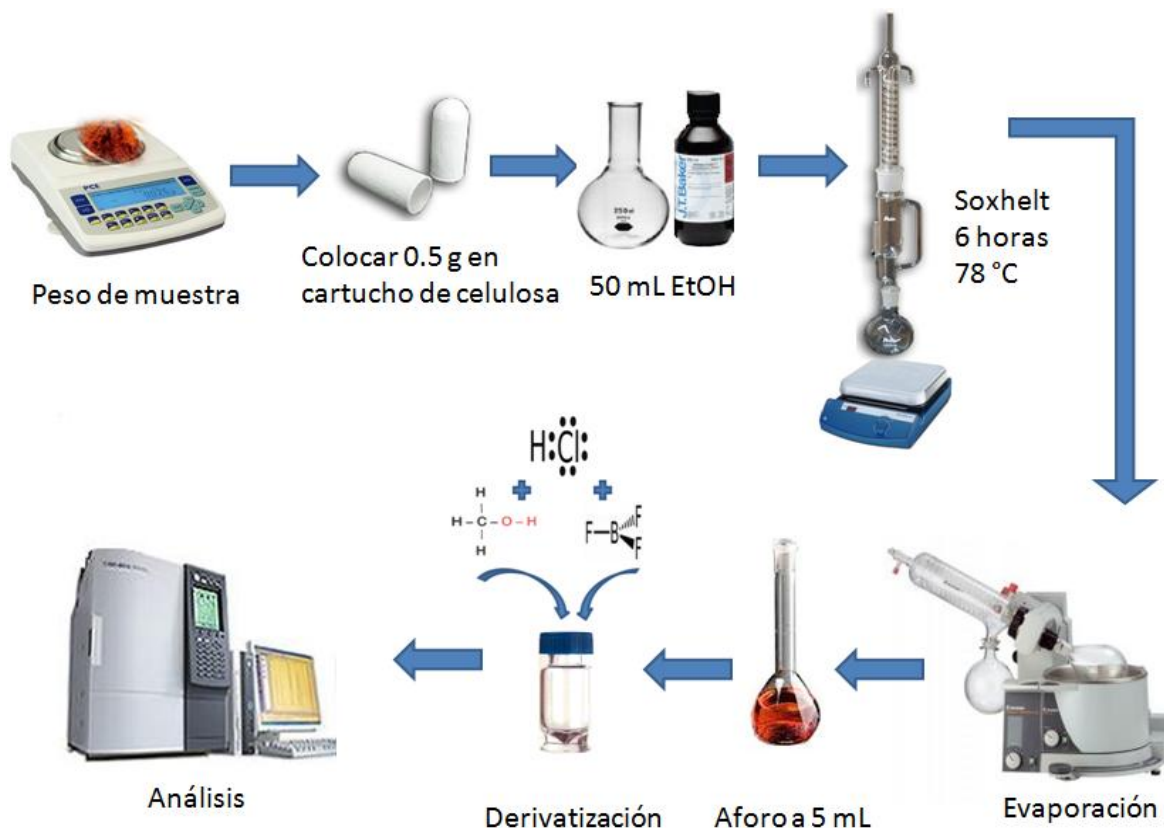
#### 4.5.2 Extracción Soxhlet

El método oficial de la AOAC más utilizado para el análisis de ácidos grasos en alimentos corresponde a la extracción por Soxhlet, por lo que se analizaron con esta técnica de extracción los mismos chiles analizados por EAUS; para comparar ambas técnicas y determinar de esta forma si existía diferencia entre ambas técnicas.

La extracción se realizó utilizando aproximadamente 500 mg de chili utilizando 50 mL de etanol como disolvente, calentando a 78 °C durante 6 horas de reflujo. El extracto se filtró para eliminar los componentes insolubles y se evaporó a sequedad



utilizando un rotavapor. Se redisolvió en una mezcla 25:1 de diclorometano-etanol, llevándolo a un volumen de 5 mL. (Figura 9).



**Figura 9. Proceso de extracción Soxhlet**

#### 4.6 Derivatización de ácidos grasos

En Cromatografía de gases es necesario derivatizar algunos compuestos, principalmente los que tienen grupos funcionales polares con el fin de mejorar su volatilidad, su estabilidad térmica y en algunos casos la sensibilidad en la detección, siendo este el caso de los AGs.

La esterificación de los AGs previo al análisis cromatográfico es la forma más común de la determinación por lo que se procedió a la optimización de la derivatización de los AGs partiendo de estándares de los AGs. Se prepararon mezclas de AGs (a diferentes concentraciones) y se esterificaron utilizando HCl/MeOH al 10 % y  $\text{BF}_3/\text{MeOH}$  al 15 % (como catalizador) variando la cantidad de reactivos hasta su optimización. Se seleccionaron las siguientes condiciones: 250  $\mu\text{L}$  de una mezcla estándar de AGs aproximadamente a una concentración de 200

ppm ó 250 µL del extracto de chile; 500 µL de HCl/MeOH 10%, 1 mL de BF<sub>3</sub>/MeOH al 15 %, a una temperatura de reacción de 80 °C durante 1 h; con estas condiciones se derivatizaron las muestras de chiles, adicionando el AG C<sub>13:0</sub> como estándar interno (EI). Terminada la hora de calentamiento se procedió a extraer los esteres metílicos formados utilizando hexano: se adicionaron 2 mL de hexano al vial de reacción que contenía la fase acuosa donde se encontraban los EMAGs formados, se extrajo la fase orgánica y se deposita en otro vial, este procedimiento se repitió 2 veces más, se adicionó a la fase orgánica separada NaHCO<sub>3</sub> para neutralizar la disolución ya que se utilizó HCl/MeOH y para que la columna cromatografica no se dañe es necesario que la muestra que se inyecta este neutra, posteriormente se lavo dos veces con 4 mL de agua, se filtro utilizando papel filtro waltman del numero 1 agregando sulfato de sodio anhidro sobre el embudo de filtración para secar la muestra. Finalmente se aforó a 1 mL bajo el flujo de nitrógeno, quedando la muestra preparada para su posterior inyección al CG.

#### **4.7 Análisis Cromatográfico**

##### **4.7.1 Condiciones Cromatográficas**

Cromatógrafo de Gases (Shimadzu GC-2014) con inyector Split/Splitless y columna capilar ZB-Wax (100% polietilenglicol) de 30 m de longitud x 250 µm de diámetro interno x 0.25 µm de grosor de película (Zebron Phenomenex, USA). Gas acarreador Hidrógeno, flujo 1 mL/min. Temperatura del inyector 240 °C. Temperatura del detector 250 °C, en modo Splitless por 1 minuto. Programa de temperatura: Temperatura inicial 40°C durante 1 minuto, posteriormente un incremento de 10 °C/min hasta alcanzar 240 °C durante 10 minutos.

##### **4.7.2 Selección de estándares para la identificación de AGs por CG-FID**

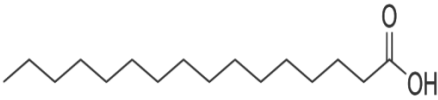
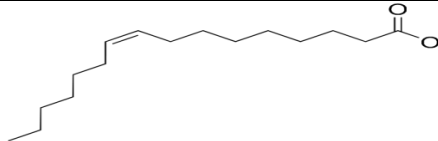
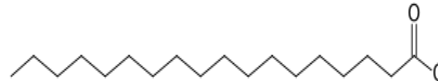
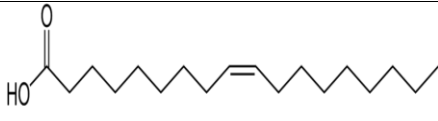

Para la identificación de los AGs en las muestras de chiles por CG, primero se estableció qué AGs eran los que probablemente se encontraban en las muestras, en base a la literatura se sabe cuales se encuentran principalmente en vegetales y en general en los seres vivos superiores (AGs con un número par de carbonos), pero principalmente se establecieron debido a que en un estudio previo<sup>10</sup> se identificaron el ácido láurico (ácido dodecanoico C<sub>12:0</sub>), ácido mirístico

(ácidotetradecanoico  $C_{14:0}$ ), ácido palmítico (ácido hexadecanoico  $C_{16:0}$ ), ácido esteárico (ácido octadecanoico  $C_{18:0}$ ), ácido oleico (ácido cis-9-octadecenoico  $C_{18:1}$ ), ácido linoleico (ácido (Z,Z)-9,12-octadienoico  $C_{18:2}$ ), ácido linolénico (ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico  $C_{18:3}$ ), por lo que se procedió a determinar los tiempos de retención de los estándares de los EMAGs (debido a que se identificaron los AGs como EMAGs) y también se identificó el EMAG  $C_{13}$  que se utilizó como EI.

#### 4.7.3 Identificación de ácidos grasos

La identificación de AGs se realizó comparando los tiempos de retención de los esteres metílicos obtenidos después de la esterificación de las muestras con los tiempos de retención de los esteres metílicos de estándares, mediante CG utilizando un detector de ionización de flama (FID); esto se realizó para los 5 AGs mayoritarios: palmítico (ácido hexadecanoico  $C_{16}$ ), palmitoleico (ácido delta (Z)-9-hexadecénico) ( $C_{16:1}$ ), esteárico (ácido octadecanoico  $C_{18}$ ), oleico (ácido (Z)-9-octadecenoico  $C_{18:1}$ ) y linoleico (ácido (Z,Z)-9,12-octadienoico  $C_{18:2}$ ). En la Tabla 5 se muestran los ácidos grasos que se identificaron de esta manera.

**Tabla 5.** Ácidos grasos mayoritarios

Ácido graso	Estructura química	P.M (uma)
Palmítico ( $C_{16}$ )		256,4
Palmitoleico ( $C_{16:1}$ )		254.408
Esteárico ( $C_{18}$ )		284,48
Oleico ( $C_{18:1}$ )		282
Linoleico ( $C_{18:2}$ )		280

**P.M. = Peso Molecular**

También se identificaron los AGs utilizando CG-EM, mediante la base de datos de la biblioteca del sistema acoplado CG-EM. Se utilizaron los mismos extractos realizados mediante EAUS y de igual forma se identificaron como esteres metílicos de los ácidos grasos.

#### 4.7.4 Cuantificación de AGs

Para determinar el rango de concentración de las curvas patrón, se calculó de forma preliminar las concentraciones de los ácidos grasos en las 6 diferentes variedades de chiles en estudio; adicionando un estándar interno (EI) a las muestras ( $C_{13}$ ) a una concentración de 200 ppm y comparando las áreas del EI con las áreas correspondientes a los ácidos grasos identificados. Debido a que son 5 ácidos grasos distintos los que se querían cuantificar se realizaron las curvas patrón utilizando solo dos compuestos para de esta forma no realizar para cada compuesto una curva, ya que los AGs presentes en los chiles son saturados e insaturados, se utilizó una curva de calibración del  $C_{16}$  con 8 puntos de concentración en un intervalo de 2.0-143 ppm para cuantificar a los ácidos grasos saturados ( $C_{16}$  y  $C_{18}$ ) y se utilizó dos curvas de calibración del  $C_{18:2}$  con 6 puntos de concentración cada una en un intervalo de 2.0-100 ppm y de 100-400 ppm para cuantificar a los ácidos grasos insaturados ( $C_{16:1}$ ,  $C_{18:1}$  y  $C_{18:2}$ ), debido a que son muy parecidos estructuralmente estos compuestos presentan una respuesta cromatográfica muy parecida y es por eso que es posible utilizar estos compuestos para cuantificar los distintos ácidos grasos presentes en las muestras.

#### 4.8.1 Determinación de lípidos simples

Se colocó 1 ml del extracto lipídico, obtenido en la sección 4.2.1 (EAUS) y en la sección 4.2.2 (Soxhlet), en un vial de reacción de 5 mL y se evaporó el disolvente bajo corriente de nitrógeno, se adicionaron 2 mL de agua destilada, 1 mL de disolución saturada de cloruro de sodio y 2 mL de butanol al 10% en hexano, la mezcla se agitó durante 1 min. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio, se decantó a un vial de reacción y se concentró a 0.5 mL bajo corriente de nitrógeno para su posterior derivatización.

### **4.8.2 Derivatización de lípidos simples**

A la disolución obtenida en el punto anterior se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de BSTFA, 100  $\mu\text{L}$  de HMDS y 50  $\mu\text{L}$  de piridina, se colocó en un horno a 80°C durante 60 min. Después de enfriar a temperatura ambiente se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al CG.

### **4.8.3 Condiciones cromatograficas para la identificación de lípidos simples**

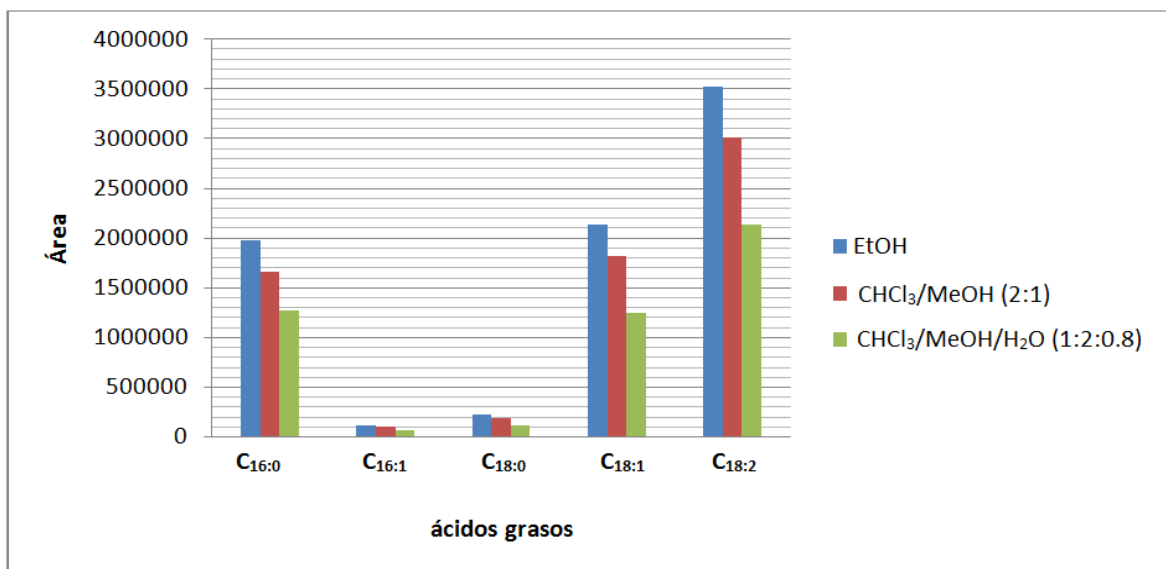
Cromatógrafo de gases con un detector de ionización de flama (Hewlett Packard 5890 Serie II), con sistema de inyección Cool On-Column y control electrónico de presión. Columna capilar de sílice fundida para alta temperatura (temperatura máxima 400-430°C) (ZB-1HT: 5% fenil, 95 % polidimetilsiloxano, 15 m x 0.25 mm x 0.10  $\mu\text{m}$ , Zebron Phenomenex, USA). Se empleó hidrógeno como gas acarreador.

Programa de temperatura: Temperatura inicial 45°C 1.5 min, 20 °C/min hasta 250°C, para incrementarse después a 10 °C/min hasta 380°C durante 10.25 min. Temperatura del detector 380°C, el puerto de inyección permaneció con la función Oven Track on (3°C por encima de la temperatura del horno). Gas acarreador: hidrógeno, flujo constante de 2.44 mL/min.

## 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 Extracción de ácidos grasos utilizando Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS)

En un estudio previo de identificación y cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina en chiles, se observó en los espectros de masas de distintos chiles la presencia de diferentes compuestos entre ellos diferentes AGs, por lo cual se planteó la realización del presente trabajo de identificación y cuantificación de estos AGs, se observaron en los espectros de masas varios AGs y algunos de estos resultaron ser los compuestos mayoritarios, es por esta razón que se utilizaron las mismas condiciones de extracción, además de que los capsaicinoides se encuentran dentro del material lipídico por lo tanto las condiciones óptimas encontradas en el citado trabajo para la extracción de capsaicina y dehidrocapsaicina son también aplicables para la extracción del material lipídico. Por tales razones el disolvente utilizado fue el EtOH sin embargo, en los métodos de Folch y Bligh and Dyer se utilizan mezclas de disolventes para la extracción del material lipídico, siendo la mezcla de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1) para el método de Folch y la mezcla de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:2:0.8) para el método de Bligh and Dyer, dado que estos métodos son los más utilizados para la extracción del material lipídico en alimentos se decidió realizar un experimento en el cual se extrajeron los AGs del chile Piquín mediante EAUS utilizando las mezclas de disolventes  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1) y  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:2:0.8) para ser comparadas con el EtOH propuesto, como se puede ver en la Figura 9 no se encontró diferencia significativa en la extracción de AGs entre estas mezclas de disolventes y el EtOH utilizado.



**Figura 10.** Efecto del disolvente en la extracción de AGs por EAUS

### 5.2 Extracción de AGs utilizando extracción Soxhlet

El método Soxhlet, como ya se menciona, es un método de extracción exhaustiva y los ácidos grasos en estudio son de carácter polar, debido al grupo carboxilo que contienen sin embargo, esta polaridad disminuye conforme aumenta la longitud de la cadena de átomos de carbono. El etanol es un disolvente relativamente polar, por lo cual se puede utilizar para extraer los AGs además de que también disuelve a los lípidos neutros como los acilglicérols. El tiempo de extracción es importante que sea el mismo en todas las extracciones de las distintas muestras y repeticiones para que se obtenga un aceptable coeficiente de variación, además se tiene que controlar el tiempo a partir de que comienza a ebullición el disolvente; otro punto importante es cuando se evapora el disolvente y queda un residuo de color en las paredes del matraz de bola el cual no es soluble cuando se redisuelve el extracto, aunque fuera agitado bien con el disolvente CHCl<sub>2</sub>/EtOH 25:1 este material colorido persistía en las paredes del matraz. Debido a los buenos coeficientes de varianza que se obtuvieron se infiere que el material colorido persistente no contenía material lipídico de otra forma hubiera variado mucho la cantidad extraída en cada extracción realizada.

### 5.3 Optimización del método de derivatización

Fue necesario realizar una optimización de la reacción para que esta se llevara a cabo de forma cuantitativa, se probaron diferentes volúmenes de HCl/MeOH y BF<sub>3</sub>/MeOH, así como también diferentes volúmenes del extracto de la muestra para que de esta forma se llevara a cabo una completa derivatización de los ácidos grasos que contenía la muestra. La temperatura que se estableció para la derivatización fue de 80 °C durante 1.0 hr y estos parámetros no se variaron y se utilizaron en todos los análisis. Posteriormente se realizó la extracción de los esteres metílicos de los ácidos grasos con hexano. Durante la extracción liquido-liquido se utilizaron pipetas Pasteur teniendo la precaución de que no hubiera perdidas durante este proceso.

### 5.4 Identificación de AGs en chiles

#### 5.4.1 Identificación de AGs por CG-FID

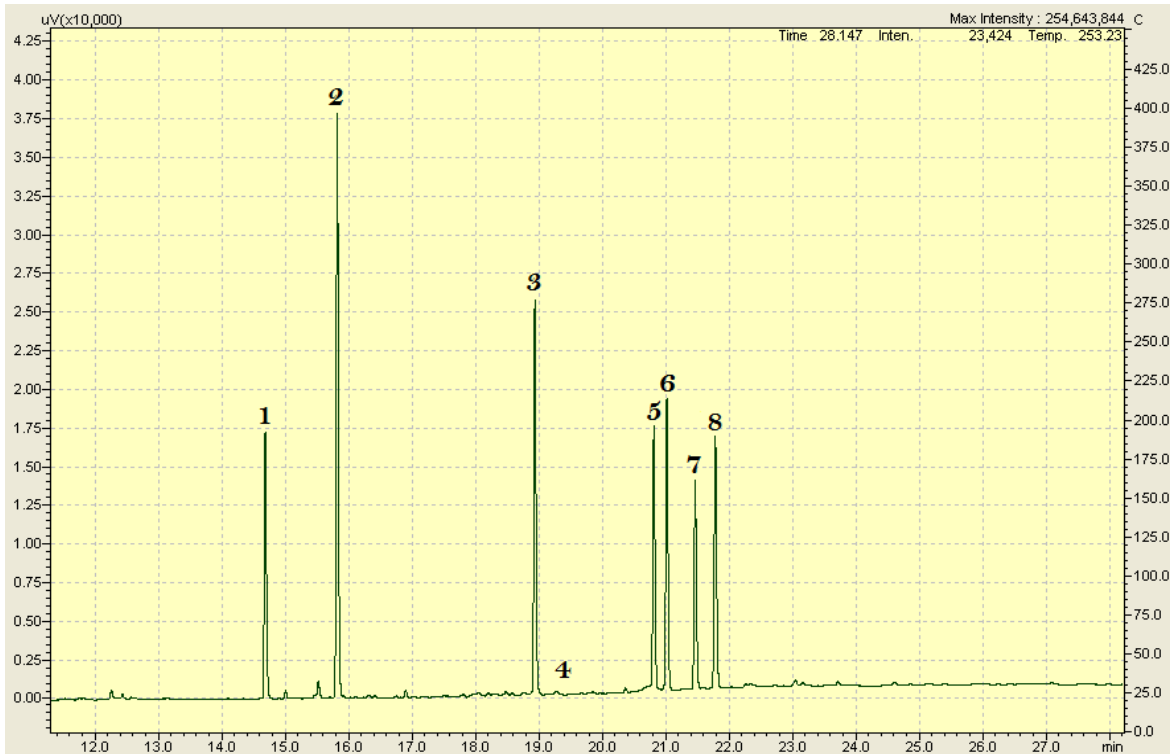
Se prepararon mezclas estándar de los esteres metílicos de los ácido grasos (EMAG), y los tiempos de retención que se obtuvieron se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Tiempos de retención de los esteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG)

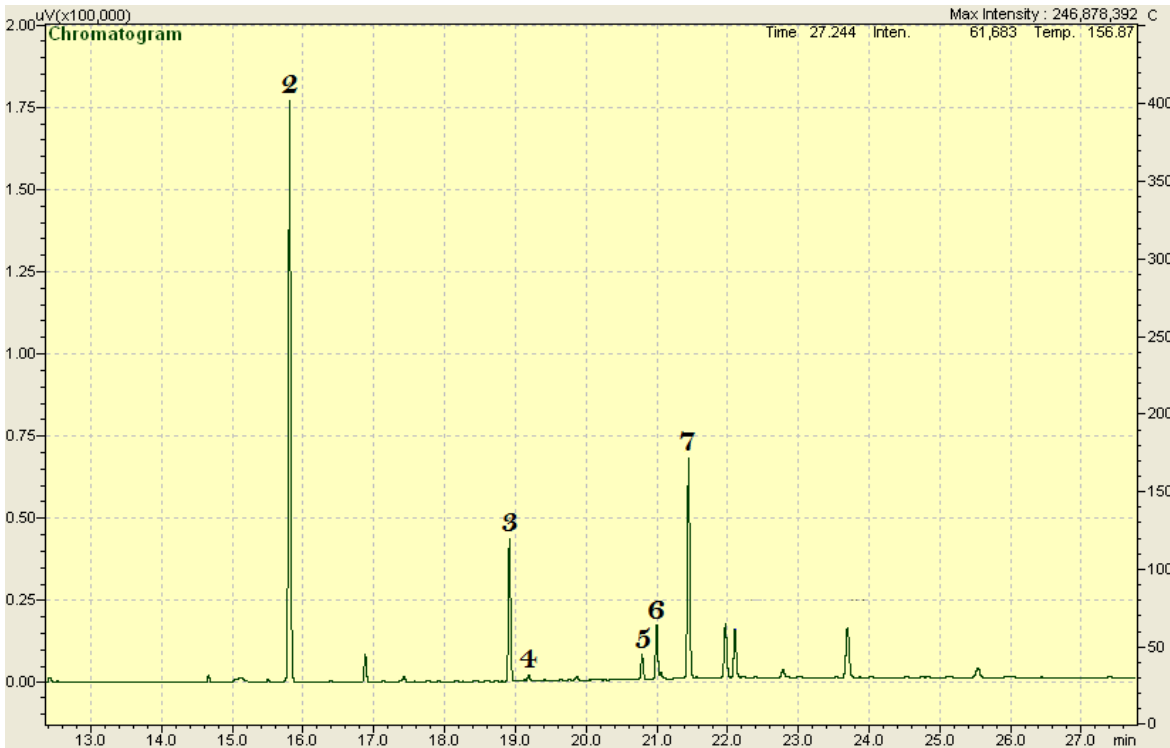
EMAG	TR (min)
C <sub>12</sub>	14.687
C <sub>13</sub>	15.828
C <sub>16</sub>	18.940
C <sub>16:1</sub>	19.2
C <sub>18</sub>	20.814
C <sub>18:1</sub>	21.018
C <sub>18:2</sub>	21.463
C <sub>18:3</sub>	21.782

En la Figura 11 se muestra el cromatograma correspondiente a la mezcla estándar de esteres metílicos de ácidos grasos, y de la Figura 12 a la 14 los esteres metílicos de los ácidos grasos identificados en los distintos chiles estudiados.

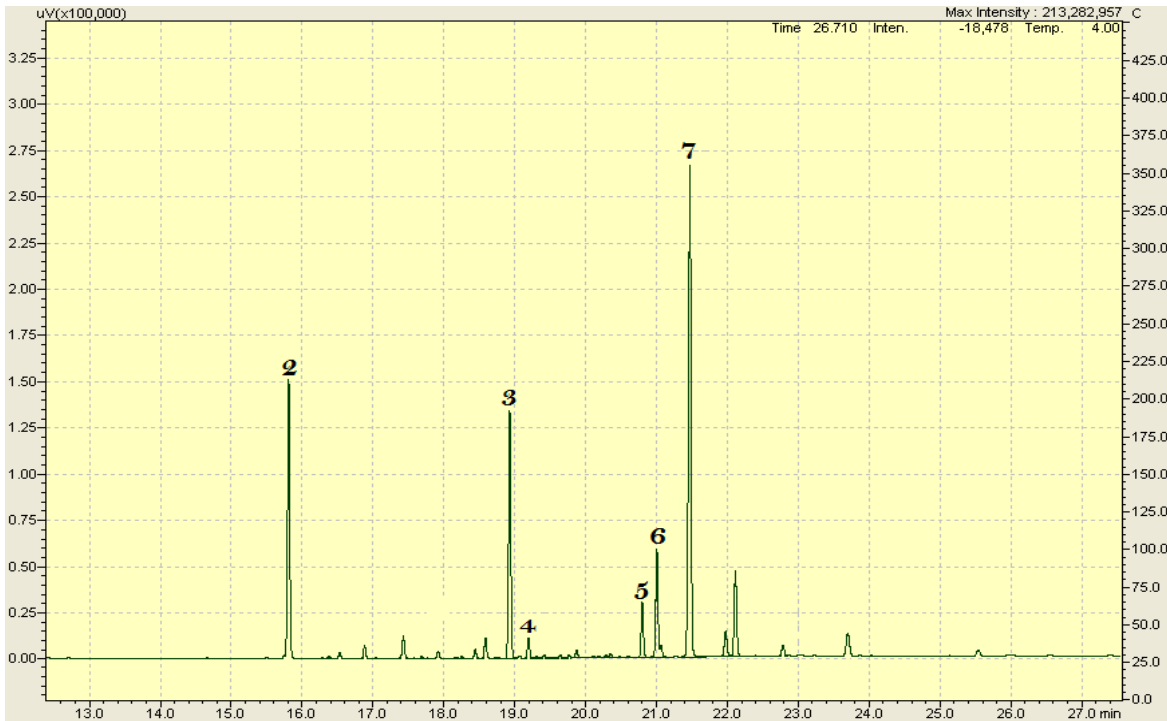




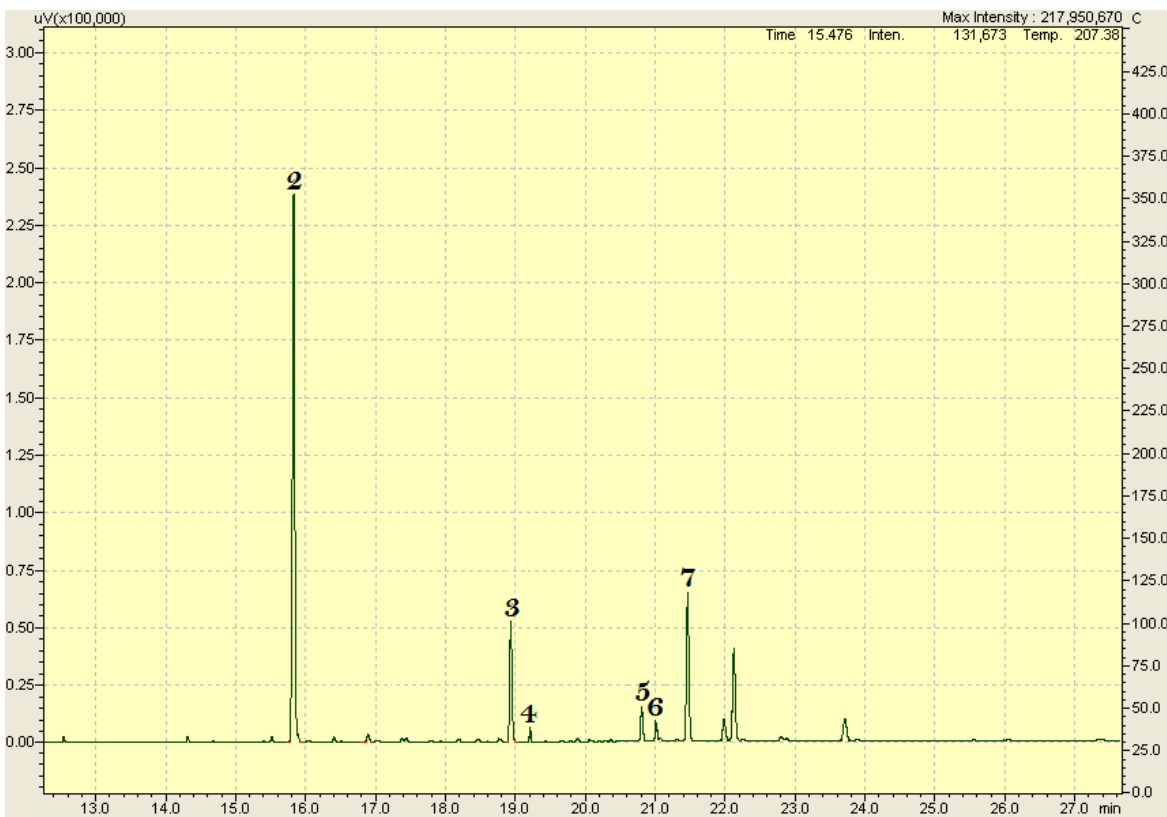
**Figura 11.** Cromatograma obtenido de una mezcla estándar de ácidos grasos como ésteres metílicos: 1.  $\text{C}_{12}$ , 2.  $\text{C}_{13}$ , 3.  $\text{C}_{16}$ , 4.  $\text{C}_{16:1}$ , 5.  $\text{C}_{18}$ , 6.  $\text{C}_{18:1}$ , 7.  $\text{C}_{18:2}$ , 8.  $\text{C}_{18:3}$



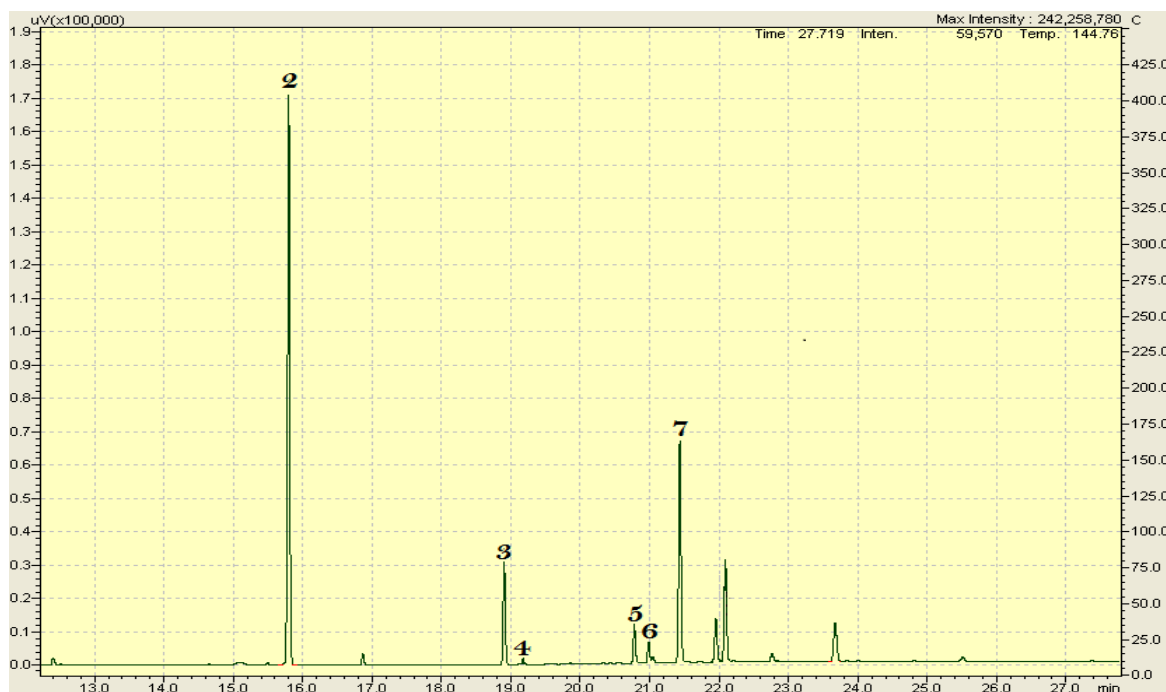
**Figura 12.** Cromatograma del análisis de AGs del chile Chipotle: Identificación de los picos cromatográficos como en la Figura 11



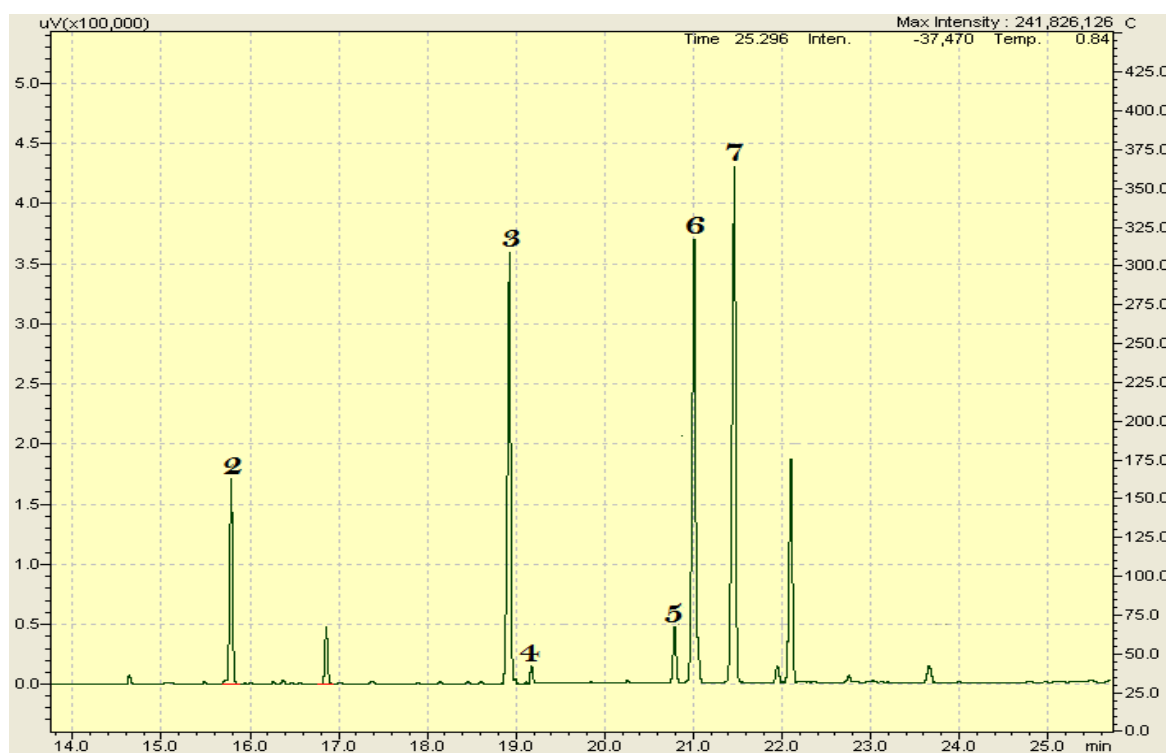
**Figura 13.** Cromatograma del análisis de AGs del chile Habanero. Identificación de los picos cromatográficos como en la Figura 11



**Figura 14.** Cromatograma del análisis de AGs del chile Jalapeño. Identificación de los picos cromatográficos como en la Figura 11



**Figura 15.** Cromatograma del análisis de AGs del Chile Morrón. Identificación de los picos cromatográficos como en la Figura 11



**Figura 16.** Cromatograma del análisis de AGs del Chile Pasilla. Identificación de los picos cromatográficos como en la Figura 11



**Figura 17.** Cromatograma del análisis de AGs del Chile Piquín. Identificación de los picos cromatográficos como en la Figura 11

Los tiempos de retención obtenidos de las muestras (Figuras 12-17) se compararon con los tiempos de retención de los estándares y de esta forma se identificaron los ácidos grasos presentes en las muestras de Chile. En total se analizaron 6 Chile: Chipotle, Habanero, Jalapeño, Morrón, Pasilla y Piquín. En la Tabla 6 se muestran los 5 ácidos grasos mayoritarios que se identificaron como EMAG en las muestras analizadas. Sin embargo, el pico a los 22.2 min (que aparece en todas las muestras) podría ser un isómero del  $C_{18:3}$ . Se puede observar que están presentes los ácidos grasos: palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2); cabe mencionar que aunque no se analizó un estándar del ácido graso palmitoleico (16:1) para identificarlo por su tiempo de retención en las muestras se infirió que corresponde a la señal con un tiempo de retención de 19.2 min debido a la secuencia de elución de los compuestos, que va desde los ácidos grasos de cadena más corta a los de cadena más larga, y eluyen primero los AGs saturados y después los insaturados, este orden de elución corresponde a una columna capilar de carácter polar.

**Tabla 7.** Ácidos grasos mayoritarios (AG) identificados en las muestras analizadas

Chile	Ácidos Grasos				
	C <sub>16:0</sub>	C <sub>16:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
Chipotle	x	x	x	x	x
Habanero	x	x	x	x	x
Jalapeño	x	x	x	x	x
Morrón	x	x	x	x	x
Pasilla	x	x	x	x	x
Piquín	x	x	x	x	x

**X AG identificado**

#### 5.4.2 Identificación de AGs por CG-EM

Se analizaron las 6 diferentes variedades de chiles por CG-EM, se identificaron en total 28 AGs, incluyendo los ácidos grasos identificados por CG-FID, se detectaron mayor número de AGs debido a que CG-EM es más sensible que CG-FID.

Se utilizaron los mismos extractos lipídicos obtenidos por Soxhlet y se derivatizaron de la misma forma anteriormente mencionada (apartado 4.3) y se inyectó 1 µL al sistema acoplado CG-EM.

En la Tabla 8 se presentan los AGs identificados por CG-EM. En todos los chiles se identificaron los AGs: C<sub>16</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:2</sub>, siendo estos los mayoritarios, también se identificaron en todos los chiles aunque en menor cantidad los AGs: C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>18:3</sub>, y C<sub>20</sub>.

El C<sub>10</sub> se encuentra en todos los chiles excepto en el Jalapeño y en el chile Pasilla, se sabe que el chile Chipotle es la misma variedad que el chile Jalapeño lo único que varía es el proceso de ahumado y cocido que se le da al chile Chipotle, por lo tanto se esperaría que el C<sub>10</sub> se encontrara también en el chile Jalapeño ya que si se encontró en el chile Chipotle, habría que analizar más muestras para saber con certeza si este AG se encuentra o no en el Jalapeño.

También se puede observar que se encuentran presentes AGs con un número impar en su cadena de átomos de carbono ( $C_{7:2}$ ,  $C_{15}$  y  $C_{21}$ ), estos ácidos grasos no se encuentran comúnmente en vegetales debido a que se sintetizan por unidades de Acetil-CoA la cual proporciona dos átomos de carbono provenientes del grupo acetilo, los AGs con número impar en su cadena es más común encontrarlos en bacterias<sup>11,13</sup>, por lo tanto la presencia de estos AGs podría ser probablemente debido a la contaminación por alguno de estos microorganismos.

Se tiene la presencia de isómeros constitucionales y de estereoisómeros, los isómeros constitucionales difieren en la conectividad de sus átomos o en la presencia de dobles o triples enlaces siendo este el caso de los ácidos grasos monoinsaturados ( $C_{18:1}$ ) que se encontraron como el AG 8-octadecenoico, 9-octadecenoico, 10-octadecenoico y 11-octadecenoico; así como los ácidos grasos poliinsaturados ( $C_{18:2}$ ) como el 8,11-octadecadienoico, (E,E) 9,12-octadecadienoico, (Z,Z) 9,12-octadecadienoico, 10,13-octadecadienoico y 12,15-octadecadienoico, siendo los AGs (E,E) 9,12-octadecadienoico, (Z,Z) 9,12-octadecadienoico estereoisómeros, la única diferencia es la orientación de sus átomos en el espacio, también denotados en vez de (Z,Z) como cis y en vez de (E,E) como trans; y por último AGs poliinsaturados ( $C_{18:3}$ ) como el AG 6,9,12-octadecatrienoico y el 9,12,15-octadecatrienoico.

De los 28 AGs identificados en los chiles analizados cabe resaltar la importancia de los AGs esenciales como el 9-octadecenoico (oleico), (Z,Z)-9,12-octadecadienoico (linoleico) y (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico (linolénico); se observa que el ácido linoleico está en mayor proporción que el ácido linolénico, estudios recientes han encontrado que niveles excesivos de omega-6 comparado con omega-3, incrementan el riesgo de producir problemas de salud en el organismo<sup>15</sup>.

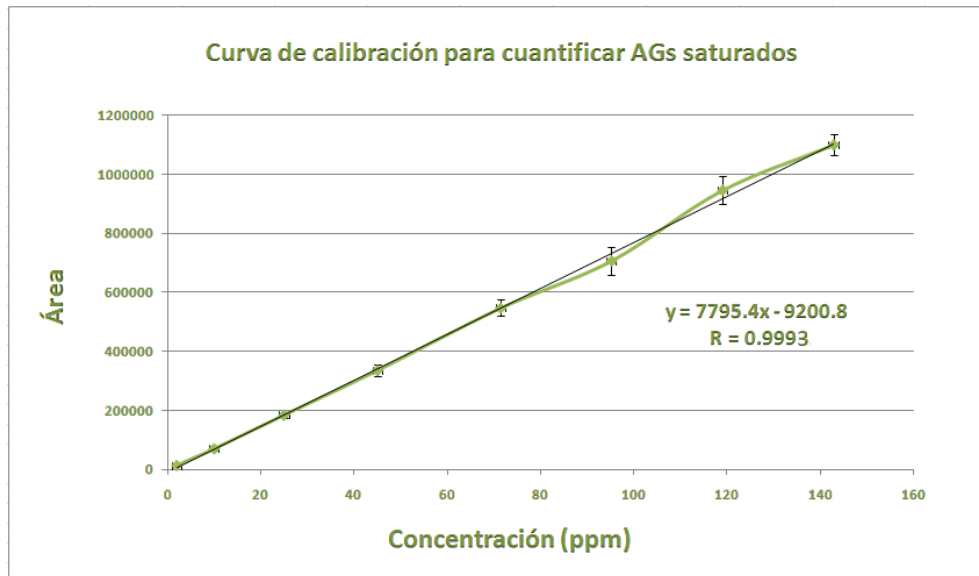
Si se descarta a los AGs con número impar en la cadena de carbonos por suponer que provienen de contaminaciones por microorganismos se tiene aproximadamente 14 AGs presentes en cada Chile se puede decir que estos vegetales contienen una aceptable cantidad de ácidos grasos sin embargo, comparado con otros productos sobre todo los productos cárnicos, no contienen cantidades que se pudieran considerar perjudiciales por consumirse en exceso.

**Tabla 8.** Ácidos grasos identificados mediante CG-EM

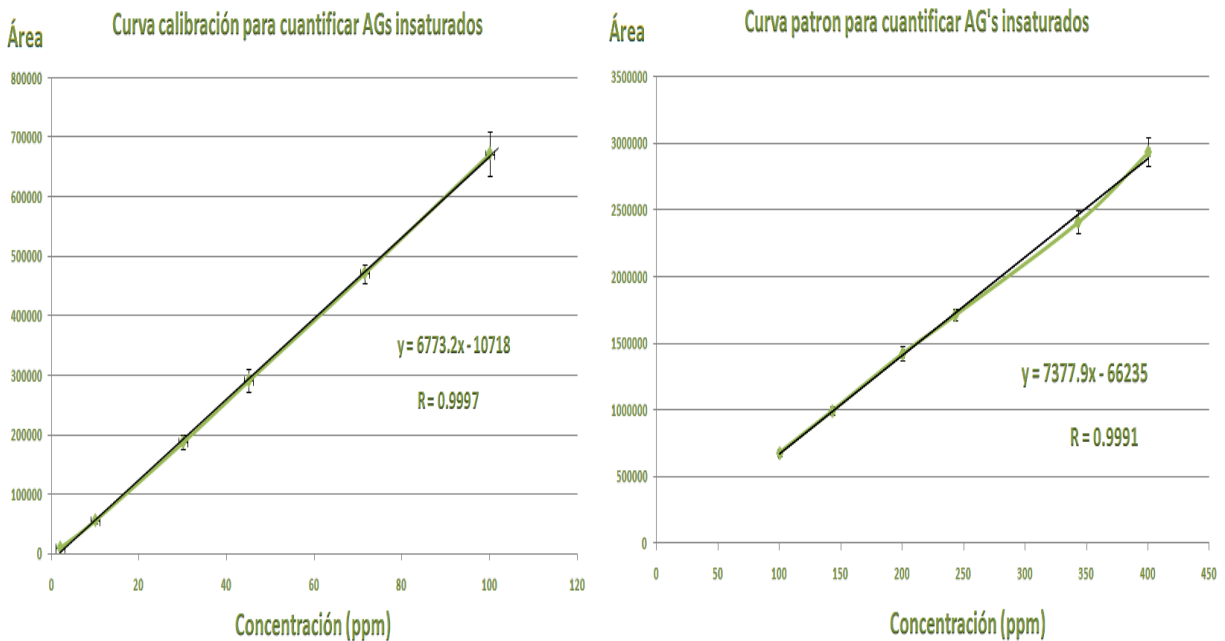
	TR (min)	Ácido graso	Chipote	Habanero	Jalapeño	Morrón	Pasilla	Piquín
1	10.51	decanoico (10:0)	x	x		x		x
2	10.6	4-decenoico (10:1)	x					x
3	13.33	dodecanoico (12:0)	x	x	x	x	x	x
4	14.32	hepta-2,4-dienoico (7:2)	x					
5	15.17	11-tetradecenoico (14:1)		x				
6	15.51	tetradecanoico (14:0)	x	x	x	x	x	x
7	16.05	pentadecanoico (15:0)	x	x				x
8	17.57	hexadecanoico (16:0)	x	x	x	x	x	x
9	17.78	9-hexadecenoico (16:1)	x	x	x	x	x	x
10	18.32	9,12-hexadecadienoico (16:2)						x
11	18.45	heptadecanoico (17:0)		x	x			x
12	19.37	octadecanoico (18:0)	x	x	x	x	x	x
13	19.529	8-octadecenoico (18:1)				x		
14	19.57	9-octadecenoico (18:1)	x	x	x	x	x	x
15	19.6	10-octadecenoico (18:1)	x	x	x			
16	19.65	11-octadecenoico (18:1)					x	
17	19.81	8,11-octadecadienoico (18:2)					x	
18	19.99	(Z,Z)-9,12-octadecadienoico (18:2)	x	x	x	x	x	x
19	20.05	ácido (E,E)-9,12-octadecadienoico (18:2)				x		x
20	20.52	(Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico (18:3)	x	x	x	x	x	x
21	21.05	eicosanoico (20:0)	x	x	x	x	x	x
22	21.77	12,15-octadecadienoico (18:2)				x		
23	21.79	10,13-octadecadienoico (18:2)			x			
24	21.93	heneicosanoico (21:0)			x	x		
25	22.97	behenico (22:0)	x	x	x	x		x
26	23.29	6,9,12-octadecatrienoico (18:3)						x
27	24.23	tricosanoico (23:0)	x	x		x		
28	25.80	tetracosanoico (24:0)	x	x		x		
		<b>Ácidos grasos totales</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>11</b>	<b>17</b>

### 5.5 Cuantificación de AGs

Se realizaron 3 curvas patrón de diferentes rangos de concentración para la cuantificación de los ácidos grasos (Figuras 5-7). La linealidad de las tres curvas patrón realizadas es aceptable obteniendo  $r > 0.999$  y  $CV < 10\%$  (Figuras 18 y 19).



**Figura 18.** Curva de calibración AGs saturados ( $C_{16:0}$ ,  $n=3$ )



**Figura 19.** Curva de calibración AGs insaturados  $C_{18:2}$ . A: (2-100ppm,  $n=6$ )

B: (100-400ppm,  $n=6$ )



La cuantificación de los AGs utilizando extracción Soxhlet y EAUS se realizó con las mismas curvas.

En la Tabla 9 se muestran los valores de la cuantificación de los ácidos grasos mayoritarios por EAUS y Soxhlet y en las Figuras 20-22 se muestra una comparación de ambas extracciones en forma gráfica de los chiles en estudio.

La mayor concentración de AGs se presentó en el chile Piquín siguiéndole en orden decreciente el Pasilla, Habanero, Morrón y Jalapeño; sin embargo la concentración de cada uno de ellos es ligeramente diferente en cada chile, se observa que en todos los chiles el AG que se encuentra en mayor cantidad es el linoleico ( $C_{18:2}$ ), y el que se encuentra en menor cantidad es el AG palmitoleico ( $C_{16:1}$ ); el chile Chipotle y el Habanero tienen el mismo perfil de AGs con el siguiente orden de concentración de AGs:  $C_{18:2} > C_{16} > C_{18:1} > C_{18} > C_{16:1}$ , el chile Jalapeño y el chile Morrón tienen el mismo perfil de AGs con el siguiente orden de concentración:  $C_{18:2} > C_{16} > C_{18} > C_{18:1} > C_{16:1}$ , y el par de chiles restantes que son el chile Pasilla y chile Piquín tienen de igual forma el mismo perfil de AGs con el siguiente orden de concentración:  $C_{18:2} > C_{18:1} > C_{16} > C_{18} > C_{16:1}$ .

**Tabla 9.** Concentración de ácidos grasos presentes en las muestras de chile expresada en mg AG/g de chile (n=3). %CV.- Coeficiente de variación.

	Chipotle				Habanero				Jalapeño			
	EAUS		Soxhlet		EAUS		Soxhlet		EAUS		Soxhlet	
AG	mgAG/g chile	% CV	mgAG/g chile	% CV	mgAG/g chile	% CV	mgAG/g chile	% CV	mgAG/g chile	% CV	mgAG/g chile	% CV
C <sub>16</sub>	1.007±0.043	4.3	1.35±0.126	9.4	2.866±0.106	3.7	3.111±0.208	6.7	1.223±0.035	2.8	1.379±0.105	7.6
C <sub>16:1</sub>	0.16± 0.01	6.4	0.131±0.004	3.1	0.358±0.059	16.4	0.374±0.015	4.0	0.145±0.012	8.5	0.098±0.012	12.3
C <sub>18</sub>	0.266±0.011	4.1	0.269±0.026	9.6	0.724±0.012	1.6	0.722±0.03	4.2	0.369±0.014	3.8	0.405±0.030	7.4
C <sub>18:1</sub>	0.559±0.026	4.7	0.563±0.05	8.9	1.565±0.035	2.2	1.579±0.121	7.7	0.258±0.012	4.8	0.234±0.029	12.2
C <sub>18:2</sub>	1.926±0.058	3.0	2.247±0.281	12.5	7.499±0.2	2.7	7.708±0.512	6.6	1.871±0.058	3.1	2.588±0.3	11.6

**Tabla 9. (Continuación)** Concentración de ácidos grasos presentes en las muestras de chile expresada en mg AG/g de chile (n=3). %CV.- Coeficiente de variación.

	Morrón				Pasilla				Piquín			
	EAUS		Soxhlet		EAUS		Soxhlet		EAUS		Soxhlet	
AG	mg AG/g chile	%CV	mg AG/g chile	%CV	mg AG/g chile	%CV	mg AG/g chile	%CV	mg AG/g chile	%CV	mg AG/g chile	%CV
C <sub>16</sub>	0.766±0.045	5.9	1.257±0.224	17.8	9.830±0.606	6.2	10.054±0.172	2.3	14.633±0.326	2.2	19.455±2.012	10.3
C <sub>16:1</sub>	0.153±0.014	9.0	0.108±0.013	12.1	0.535±0.035	6.5	0.483±0.012	3.1	1.149±0.025	2.2	1.410±0.146	10.4
C <sub>18</sub>	0.338±0.01	2.9	0.477±0.061	12.8	1.352±0.118	8.7	1.325±0.038	3.8	1.857±0.013	0.7	2.499±0.341	13.6
C <sub>18:1</sub>	0.284±0.011	3.9	0.335±0.032	9.7	12.553±0.052	0.4	11.829±0.312	3.6	16.558±0.113	0.7	21.747±2.305	10.6
C <sub>18:2</sub>	1.934±0.099	5.1	3.286±0.5	15.2	14.692±0.266	1.8	14.118±0.336	3.3	35.247±0.833	2.4	47.496±6.304	13.3

### 5.6 COMPARACIÓN EAUS VS SOXHLET

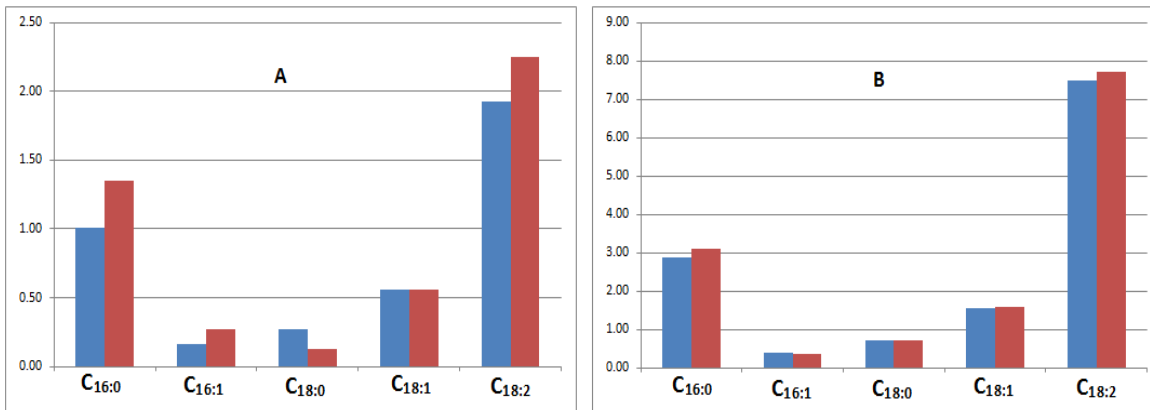


Figura 20. Comparación entre EAUS y Soxhlet (mg AG/g de Chile). A: Chile Chipotle B: Chile Habanero.

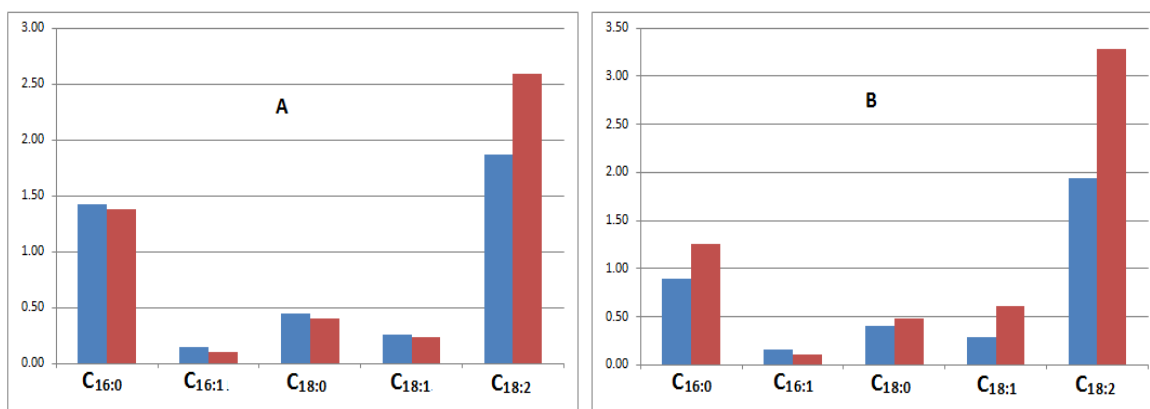


Figura 21. Comparación entre EAUS y Soxhlet (mg AG/g de Chile). A: Chile Jalapeño B: Chile Morrón.

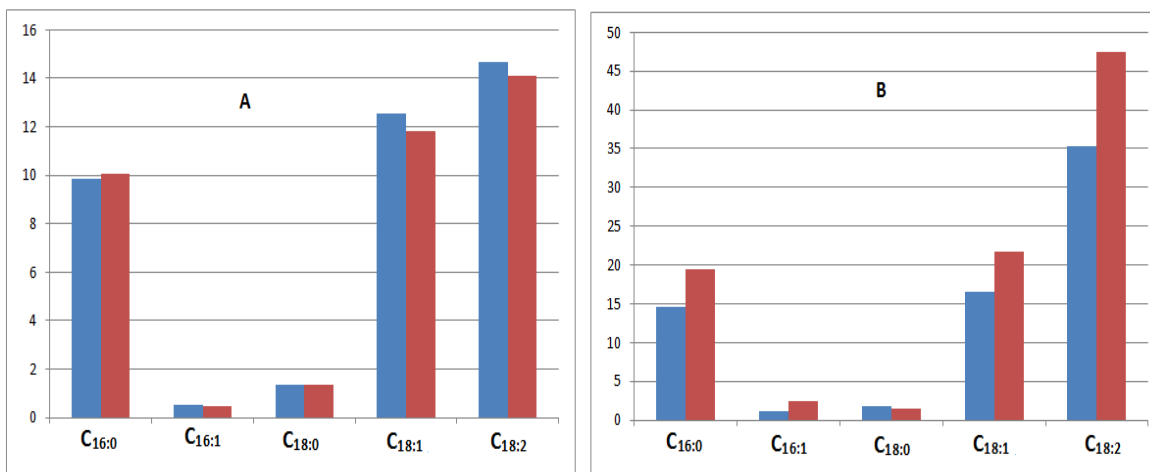


Figura 22. Comparación entre EAUS y Soxhlet (mg AG/g de Chile). A: Chile Pasilla B: Chile Piquín

### 5.7 Análisis estadístico para la comparación EAUS y Soxhlet

En las graficas de barras donde se compara la cantidad extraída de AGs por ambos métodos para cada variedad de chile (Figuras 17-19), se puede observar que el método de extracción Soxhlet extrae ligeramente mayor cantidad de ácidos grasos; sin embargo se realizó un análisis de varianza para poder determinar si existe una diferencia significativa entre ambos métodos de extracción. En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos. Observando estos datos se pueden apreciar los efectos principales que son: el método de extracción y los chiles analizados.

Hipótesis nula;  $H_0$ = Existe diferencia significativa

Hipótesis alterna;  $H_1$ = No hay diferencia significativa

Si F de tablas es menor que F calculada la Hipótesis nula se acepta, si F de tablas es mayor que la F calculada la Hipótesis alterna se acepta.

**Tabla 10.** Análisis de varianza para la concentración de ácidos grasos

Fuente de la variación	gl	SC	CM	F
Método de Extracción	1	41.09871671	41.09871671	1.353
Chiles	5	9819.02379	1963.804	61.869
Error	5	160.396838	32.0793	
Total	11	10020.5193		

comparativo para el caso de las técnicas de extracción

Nivel de significancia	Tabla F (tablas)	Comparativo	Valor F calculado	$H_0$
0.05	3.266	>	1.353	Se rechaza

comparativo para el caso de los chiles

Nivel de significancia	Tabla F (tablas)	Comparativo	Valor F calculado	$H_0$
0.05	1.925	<	61.86912042	Se acepta

Mediante este análisis de varianza se observa que en el efecto método de extracción el valor de  $F$  de tablas es mayor que el valor de  $F$  calculada por lo tanto se rechaza la hipótesis nula lo que indica que no existe diferencia significativa entre ambos métodos de extracción con un nivel de confianza del 95%, en cuanto al segundo efecto estudiado el valor de  $F$  de tablas resultó ser mayor que el valor de  $F$  calculada indicando que existe diferencia significativa en la concentración de ácidos grasos presente en los chiles.

Por lo tanto se concluye que no existe diferencia significativa entre la EAUS y la extracción Soxhlet con un nivel de significancia del 95%.

## **5.8 Perfil de Lípidos Simples**

### **5.8.1 Extracción de lípidos simples**

Debido a que en este trabajo se analizaron los ácidos grasos libres presentes en los chiles, es decir no se realizó una hidrólisis alcalina de los acilgliceroles para liberar todos los AGs, se realizó un perfil de los lípidos simples para saber de manera cualitativa en que proporciones se encuentran estos acilgliceroles.

Selección de parámetros para la extracción de lípidos simples

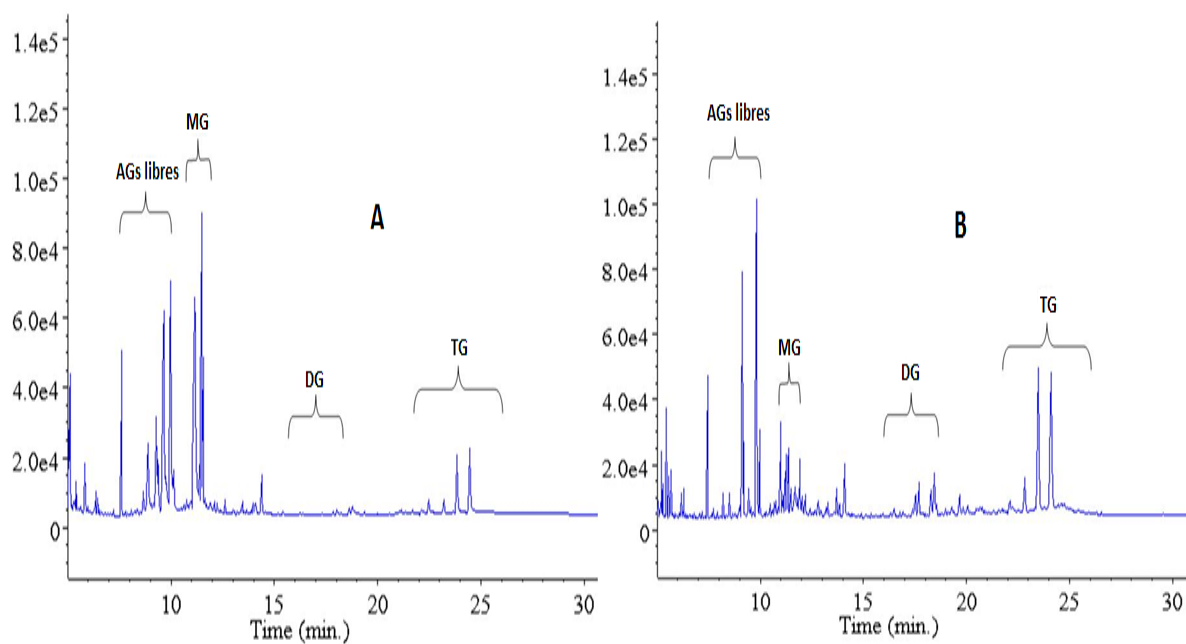
Debido a que los ácidos grasos libres y los acilgliceroles forman parte del material lipídico, se tomaron los mismos extractos realizados para la determinación y cuantificación de ácidos grasos, para realizar el perfil de ácidos grasos.

### **5.8.2 Identificación de lípidos simples**

Se realizaron los silanizados de los lípidos simples y se analizaron por CG a alta temperatura.

**Tabla 11.** Intervalos de tr (min) para estándares de AG libres y acilgliceroles

Compuesto	Intervalos de TR (min)
AG libres	7.6-10.0
Mono glicéridos	11.0-12.0
Di glicéridos	16.0-18.5
Tri glicéridos	21.9-26.0

**Figura 23.** Cromatograma correspondiente al chile Chipotle. A: (EAUS) y B: (Soxhlet)

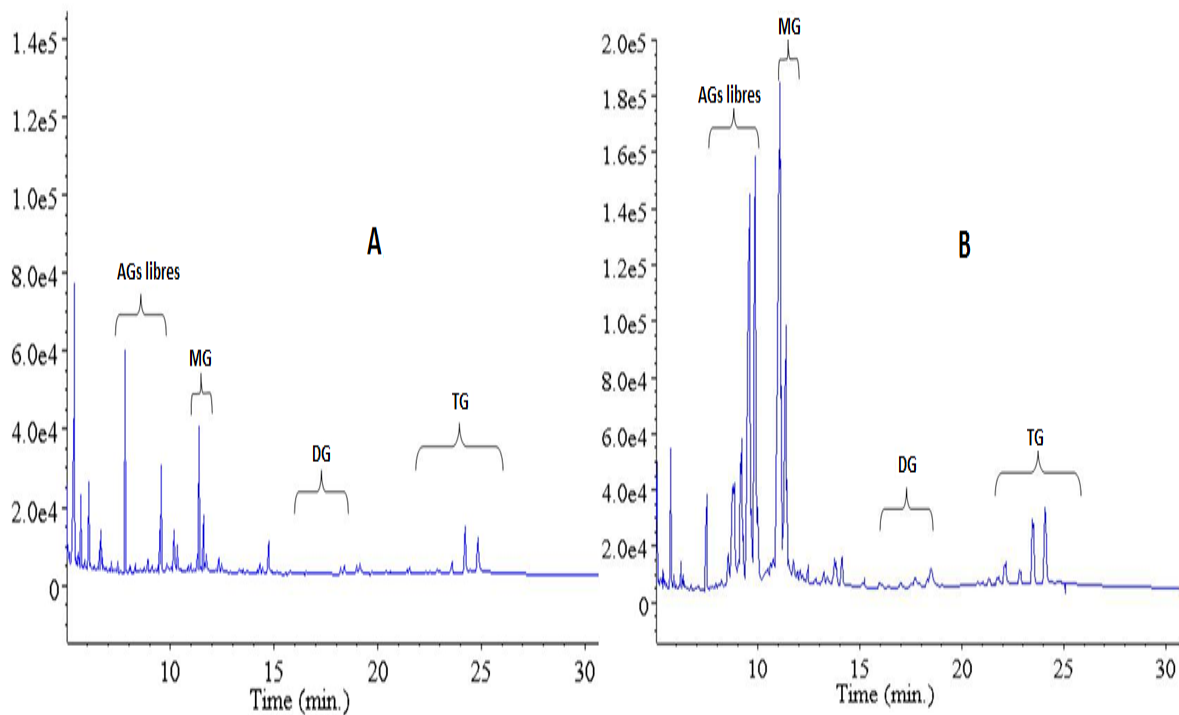


Figura 24. Cromatograma correspondiente al chile Habanero. A: (EAUS) y B (Soxhlet)

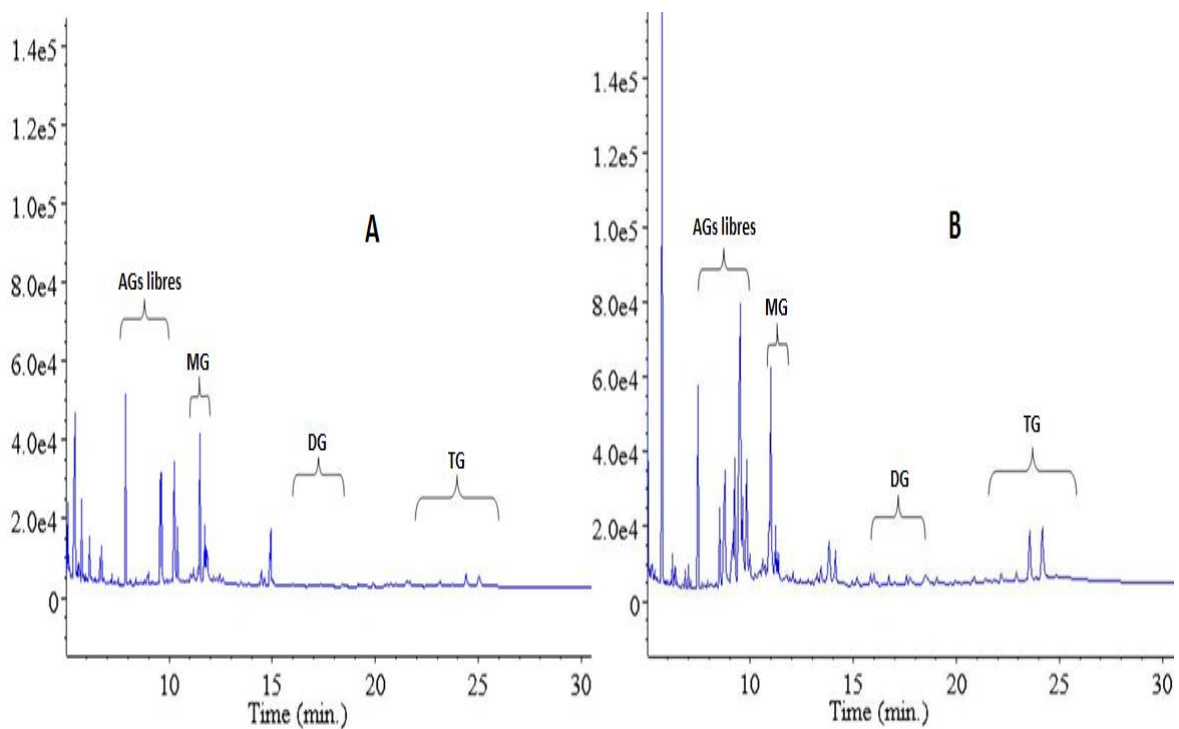
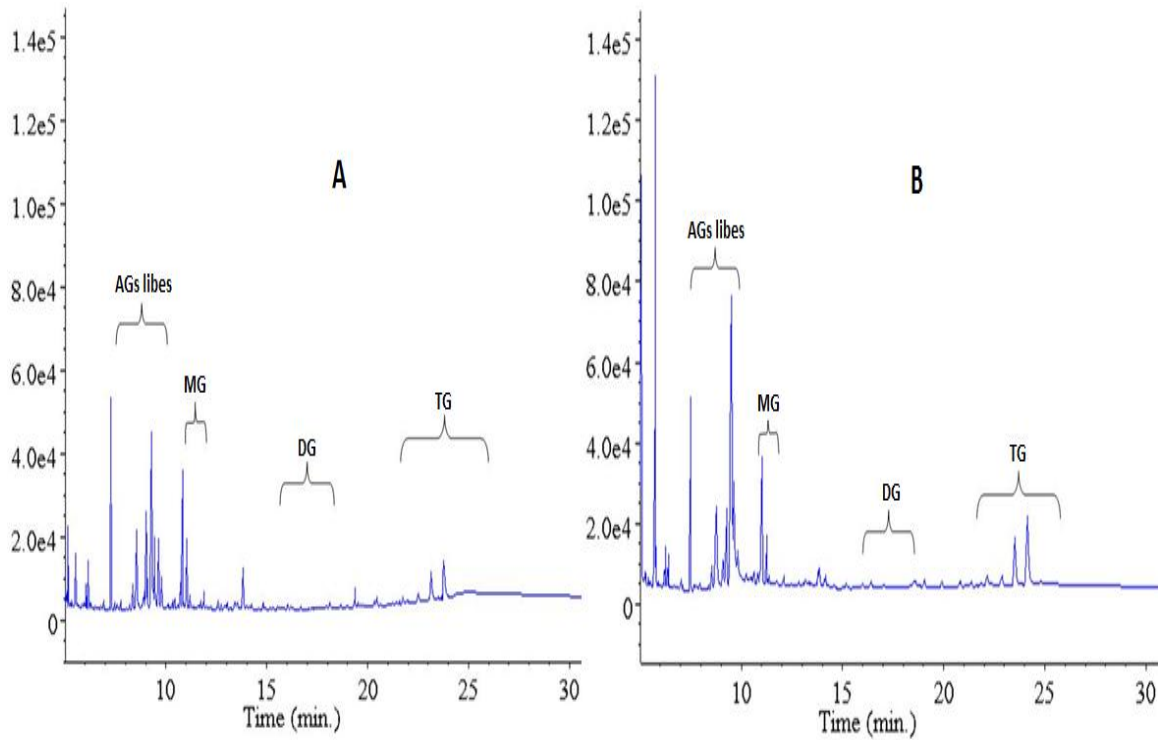
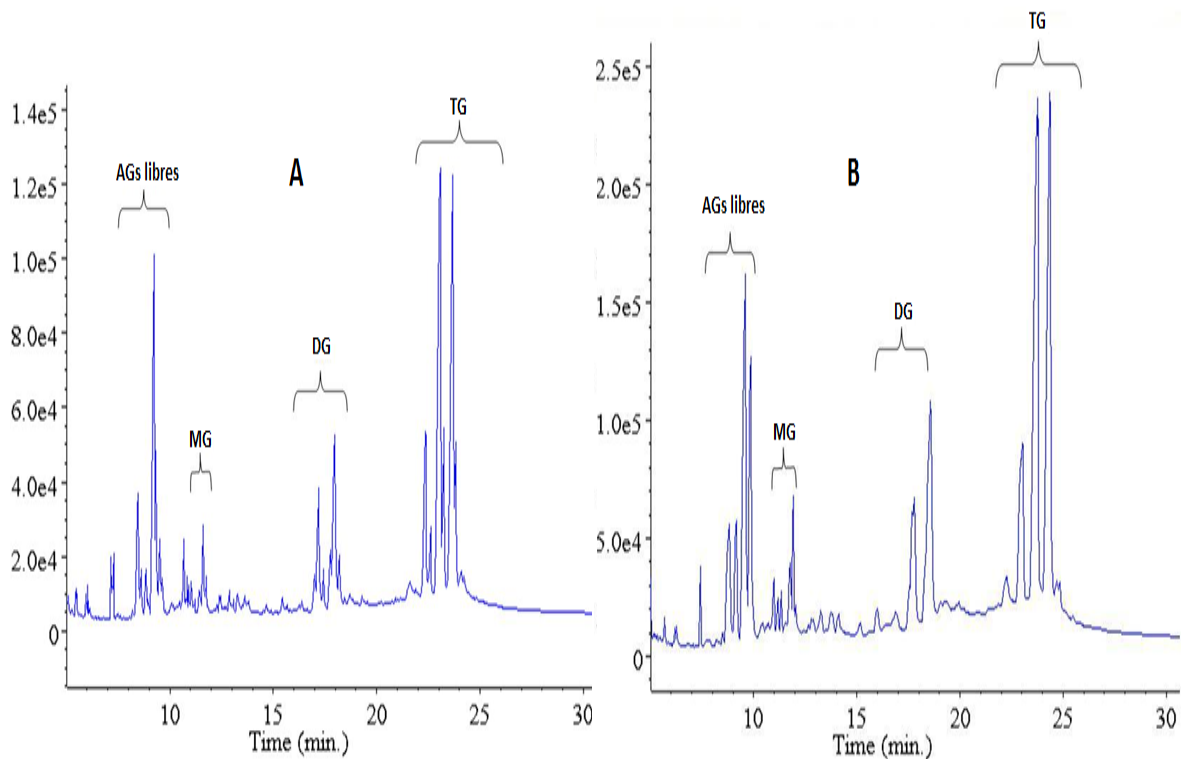


Figura 25. Cromatograma correspondiente al chile Jalapeño. A: (EAUS) y B: (Soxhlet)

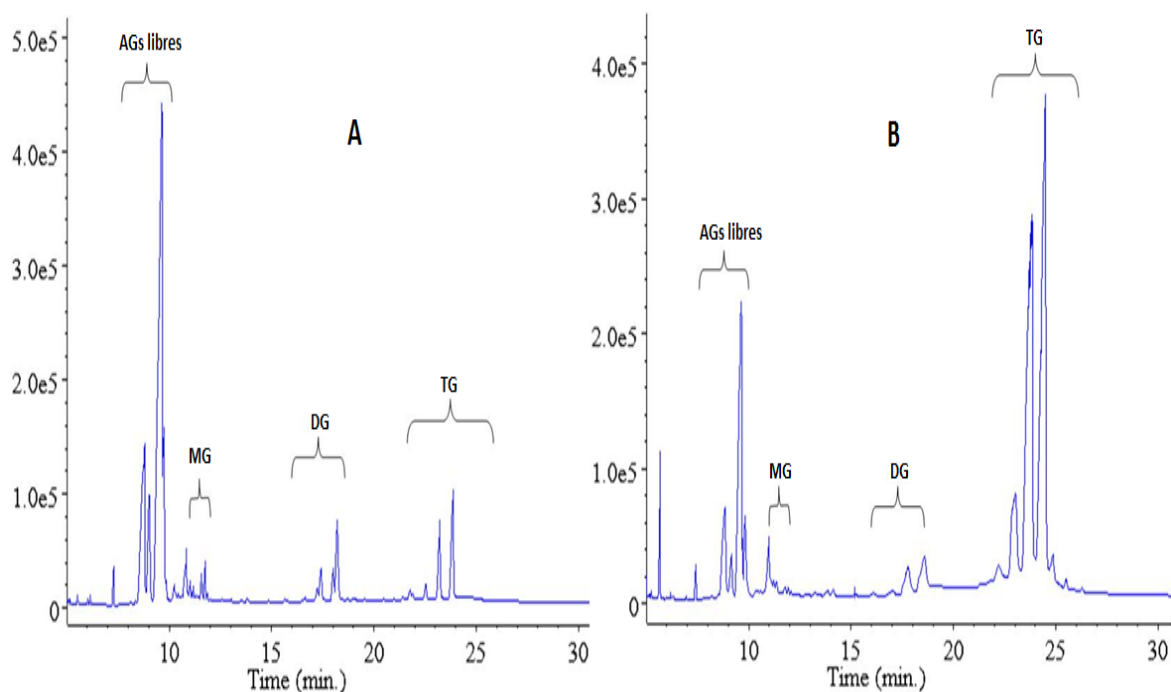




**Figura 26.** Cromatograma correspondiente al Chile Morrón. A: (EAUS) y B (Soxhlet)



**Figura 27.** Cromatograma correspondiente al Chile Pasilla. A: (EAUS) B: (Soxhlet)



**Figura 28.** Cromatograma correspondiente al chile Piquín. A: (EAUS) y (Soxhlet)

Se puede observar que el chile que presentó mayor cantidad de TG fue el chile Piquín, le sigue en orden decreciente de concentración: Pasilla > Habanero > Chipotle > Jalapeño > Morrón; como se pudo ver en la sección 5.5 los chiles que presentan mayor contenido de AGs son el chile Piquín y el chile Pasilla coincidiendo en su mayor cantidad de TG, por lo tanto puede existir un fenómeno de hidrólisis parcial de los TG durante la derivatización (medio ácido) y por tal motivo es que en estos chiles se observa un alto contenido de ácidos grasos libres, el perfil realizado de los AGs libres mediante esta técnica es bastante similar al perfil de los AGs realizado mediante la técnica donde se formaron los esteres metílicos Piquín > Pasilla > Habanero > Morrón > Jalapeño > Chipotle, en cuanto a los DG solo se encontraron en 3 chiles: Chipotle, Habanero y Jalapeño.

## 6. CONCLUSIONES

1. Se desarrollo y optimizó una metodología utilizando Extracción Asistida por Ultrasonido seguida de Cromatografía de Gases y Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas para la identificación y cuantificación de ácidos grasos en chiles.
2. La metodología desarrollada para la extracción de ácidos grasos resulto simple, rápida y con relativamente pocos pasos para realizar la extracción, requiere una menor cantidad de muestra y menor tiempo de extracción en comparación con la metodología de extracción por Soxhlet.
3. La Extracción Asistida por Ultrasonido (EAUS) no presentó diferencia significativa con el método de extracción Soxhlet con un nivel de confianza del 95% por lo tanto, se propone el empleo del la EAUS para la extracción del material lipídico en chiles, debido a las ventajas ya mencionadas que este método ofrece en comparación con el método Soxhlet que es el más comúnmente utilizado.
4. En todos los chiles analizados se observó que los ácidos que se encuentran en mayor proporción son el C<sub>16</sub> y C<sub>18:2</sub>, y de los 6 chiles analizados el chile Pasilla y el chile Piquín son los que tienen una mayor concentración de ácidos grasos.
5. Se identificaron un total de 28 AGs en los chiles analizados, siendo el C<sub>16</sub>, C<sub>16:1</sub> [9], C<sub>18</sub>, C<sub>18:1</sub> [6], C<sub>18:2</sub> [6,9] y C<sub>18:3</sub> [6,9,12] los mayoritarios y en un intervalo de concentración de 0.145 a 35.247 mg AG/g de chile.
6. Se obtuvo el perfil de lípidos simples utilizando CG-HT, observándose la presencia de MG, DG y TG.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Laura Carolina Pedraza Robles y Alma Alicia Gómez Gómez “Análisis exploratorio del mercado y la comercialización de Chile Piquín (c. annuum, var. aviculare dierb.) en México” Tecsisotecatl Vol. 1 Número 5, diciembre 2008 Artículo en línea disponible en <http://www.eumed.net/rev/tecsistecat1/n5/prgg.htm/>: Internet; accesado el 24 de Noviembre de 2009)
2. FAO Statics División, Estadísticas de Producción de Chile Fresco y Seco, FAOSTAT, 2007 (<http://faostat.fao.org>)
3. Consejo Nacional de Productores de Chile (CONAPROCH) Antecedentes [en línea, disponible en <http://www.conaproch.org/cp.htm>: Internet; accesado el 18 de Agosto de 2009)
4. Clotilde Vázquez Martínez, Ana Isabel Cos Blanco, Consuelo López Nomdedeu., Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico, Ediciones Díaz de Santos, 2<sup>da</sup> edición, Buenos Aires, Argentina, pp.13-15, 2005
5. López Riquelme, G., Chilli, la esencia del Nuevo Mundo, Ciencias, 69:66-75, 2003.
6. Salinas C., J., Efecto de la aplicación de enzimas peroxidasa exógenas sobre el contenido de carotenoides y capsaicinoides en harina de Chile. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM. pp. 5-8, 2004
7. Hundal, S., Dhall, R., Breeding for Hybrid Hot Pepper, Journal of New Seeds, Vol. 6, No. 2/3, pp.3174, 2004
8. Jorge León. , Botánica de los cultivos tropicales, 3<sup>era</sup> edición, San José, Costa Rica, pp. 332-333, 2000
9. Rosa A., Deiana M., Casu V., (1999) “Antioxidant activity of Capsaicinoids”, Journal of Agricultural and Food Chemistry”, 50:7386-7401
10. Alvarado, S., L. (2010) “Determinación de capsaicina y dihidrocapsaicina en chiles por extracción asistida con ultrasonido seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas” Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM
11. Christie W.W., Lipid analysis. Pergamon Press, 2<sup>a</sup> ed., Great Britain, 1987

12. L. Wade., Química Orgánica, 5ª edición, Ed. Prentice-Hall Hispanoamericana, pp , 2004
13. Buchanan B. B., Gruissem W. and Jones R. L., Biochemistry and molecular biology of plants, 1ª ed., American Society of Plants Physiologists, U.S.A, 2000
14. Shu-Hui Chen., Kwan-Cheng Chen., Hsiang-Mei Lien., Determination of fatty acids in vegetable oil by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A, 849 (1999) 357–369
15. Lawrence Akoto., René J.J. Vreuls., Hubertus Irth., Roel Pel., Frans Stellaard., Fatty acid profiling of raw human plasma and whole blood using direct thermal desorption combined with gas chromatography–mass spectrometry., Journal of Chromatography A, 1186 (2008) 365–371
16. Fennema O., Química de los Alimentos, Acribia 2ª edición, Zaragoza, España, pp. 270, 1995
17. Robert G. Ackman., Application of Gas-Liquid Chromatography to Lipid Separation and Analysis: Qualitative and Quantitative Analysis., Fatty Acids in Foods and Their Health Implications., pp. 47-55
18. Skoog D.A., Holler F.J., Mieman T.A., (2001) “Principios de Análisis instrumental” Mc Graw Hill 5ª edición Madrid
19. Mc Nair H.M., Miller J.M., (1998) “Basic Gas Chromatography” Editorial John Wiley y Sons Inc., New York
20. Vinature M. (2001) “An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs”. Ultrasonics Sonochemistry 8: 303-313
21. Boonkird S., Phisalaphong C., Phisalaphong S. (2008) “Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from Capsicum frutescens on a lab- and pilot-plant scale”. Ultrasonics Sonochemistry 15:1075-1079
22. Barbero, G. f., Liqid, A., Palma, M., Barroso, C. (2008) “Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reverse phase monolithic column”. Food Chemistry, 107
23. Peña A. A., High Temperature Capillar Gas Chromatography (HT-CGC). Tesis Doctoral, Gante, Bélgica, 1993
24. Sandra P., Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography. Heidelberg, Vol. I, New York, 1985

25. Grob K., On-Column injection in capillary gas chromatography. Heidelberg, 2<sup>a</sup> ed., H. Buch, 1991
26. Lopez M. A., "Identificación de carbohidratos y Lípidos de pseudobulbos de orquídeas mexicanas utilizadas en el arte plumaria" Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM