



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“ESTUDIO COMPARATIVO DE EXTRACCIÓN Y MECANISMO DE
FRAGMENTACIÓN DE LA CAPSAICINA Y LA DIHIDROCAPSAICINA
PRESENTES EN EL CHILE (*Capsicum chinense*)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

P R E S E N T A

MARTHA JULIETA ROSAS BECERRIL

Asesor: Dr. René Miranda Ruvalcaba.

Co-asesores: Dr. Joel Omar Martínez
Dr. Francisco Javier Pérez Flores



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
 Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
 de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio comparativo de extracción y determinación del mecanismo de fragmentación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina presentes en el chile (*Capsicum chinense*).

Que presenta la pasante: Martha Julieta Rosas Becerri
 Con número de cuenta: 307156619 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura de Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Octubre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. René Miranda Ruvalcaba	
VOCAL	M.C. Brigida del Carmen Camacho Enríquez	
SECRETARIO	Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo	
1er. SUPLENTE	Dr. Benjamin Velasco Bejarano	
2do. SUPLENTE	M.C. Judith García Arellanes	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM

Por el gran apoyo brindado durante todo este tiempo y por proporcionarme las bases necesarias para terminar mis estudios.

A la FES-Cuautitlán

Por todas las oportunidades dadas, y por ayudarme a crecer tanto en el ámbito personal como en el profesional. Gracias por ayudarme a ser lo que soy.

Al Dr. René Miranda Ruvalcaba

Por permitirme desarrollarme en su laboratorio de investigación, por compartir sus vastos conocimientos conmigo y por su comprensión.

Al Dr. Joel Omar Martínez

Por la paciencia, y los conocimientos brindados, por ayudarme a desarrollarme mejor en el ámbito profesional y por el constante apoyo que me brindó mientras realizaba esta tesis, y por su ayuda fundamental en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Francisco Javier Pérez Flores

Por su apoyo durante este trabajo y por las facilidades otorgadas para realizar todos los estudios de espectrometría de masas aquí mostrados.

A todos los profesores que tuve el honor ser su alumna les agradezco por todos los conocimientos que me brindaron

Se agradece al Técnico Académico Draucin Jiménez Celi del taller de soplado de vidrio, por el apoyo proporcionado en la adquisición y reparación del material de vidrio empleado durante la experimentación.

DEDICATORIAS

A mi familia

Por confiar en mí y por ser el pilar que me sostiene, dándome la oportunidad de llegar hasta este punto. A mis padres gracias por ser el ejemplo de perseverancia que necesitaba, por el amor y el apoyo incondicional. Porque a pesar de los tropiezos que se pudieron presentar me ayudaron a salir adelante, por ello les dedico este trabajo. A mi hermana, por siempre reír conmigo.

A Alan

Por la constante motivación durante todo este tiempo, porque sin ella esto no sería lo que es. Porque sin tu apoyo hubiera sido más difícil llevar a cabo este trabajo. Por alentarme a ser mejor cada día. Por tu ayuda en el camino y por estar ahí.

A mis amigos

A todos mis amigos que conocí durante esta etapa de mi vida universitaria, con los que compartí momentos inolvidables, pero especialmente a Vane, Karlita y Cinthya, por estar conmigo siempre, nunca los olvidare. A los amigos que conocí antes y que a pesar de no verlos estaban ahí, Aline, Enrique, Ana, Areli, Nayeli, Pamela y a los que en este momento no mencione, sepan que estarán siempre en mi corazón.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	ii
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	iv
LISTA DE CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS	v
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	3
Extracción	3
Química Verde.....	4
Marcado isotópico	7
Capsaicina.....	12
Farmacología	14
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVOS	17
General.....	17
Particulares.....	17
METODOLOGÍA	18
Reactivos	18
Equipo	18
Método experimental	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
Extracción.....	22
Propuesta y validación de un patrón de fragmentación.....	29
Impacto electrónico	33
“Linked scan”.....	36
Alta resolución	44
Marcado isotópico	45
CONCLUSIONES	50
REFERENCIAS.....	51

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AcOEt	Acetato de etilo
APCIMS	Espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica
% ar	% de abundancia relativa
AR	Alta resolución
°C	Grados Celsius
CG	Cromatografía de gases
<i>Cpp</i>	Cromatografía de placa preparativa
Da	Daltons
DE	Desviación estándar
DMADP	Dimetilalildifosfato
EM	Espectrometría de masas
EtOH	Etanol
G	Gramos
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Hz	Hercios
IE	Impacto electrónico
IRC	Infrarrojo cercano
KHz	Kilohercios
LIC	Límite inferior de control
LSC	Límite superior de control
LS	Barridos entrelazados, por su nombre en inglés “linked scan”
MeOH- <i>d4</i>	Metanol deuterado
MeONa	Metóxido de sodio
MHz	Megahercios
Min	Minutos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
MO	Microondas

PEG	Polietilenglicol
Ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
US	Ultrasonido
V	Voltios
X	Promedio

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Marcado isotópico de bencensulfonilhidrazonas y tosilhidrazonas.	9
Figura 2. Mecanismo de fragmentación de Arteether en una solución enriquecida de deuterio....	10
Figura 3. Posibles mecanismos de reacción de la eliminación 1,4-conjugada.....	11
Figura 4. El chile en México	12
Figura 5. Capsaicinoides comunes.	14
Figura 6. Pomada comercial para el dolor a base de capsaicina.....	15
Figura 7. Estructuras de la capsaicina y la dihidrocapsaicina.....	22
Figura 8. Gráficos de control ($\pm 1DE$) obtenidos empleando equipo Soxhlet (a) y las tres diferentes formas de energía (irradiación de infrarrojo cercano (b), ultrasonido (c) e irradiación de microondas (d) empleando etanol como disolvente.	28
Figura 9. Mecanismo de fragmentación de la capsaicina previamente publicado en la literatura..	30
Figura 10. Mecanismo de fragmentación propuesto y validado en donde *AR y **LS.....	32
Figura 11. Fragmentos m/z 195 y m/z 137.....	37
Figura 12. Fragmentos m/z 195, m/z 152, m/z 137	38
Figura 13. Fragmentos m/z 137, m/z 122 y m/z 94	38
Figura 14. Estructuras de la capsaicina monodeuterada.	45
Figura 15. Fragmentación de las moléculas de capsaicina monodeuteradas.....	47
Figura 16. Fragmentos obtenidos de la capsaicina bideuterada	49

Tablas

Tabla 1. Porcentajes de 1 y 2 extraídos	23
Tabla 2. Porcentajes de extracción	27
Tabla 3. Datos para la elaboración de las gráficas de control.....	27
Tabla 4. Fragmentos de la capsaicina y la dihidrocapsaicina.....	33
Tabla 5. Iones hijo	36
Tabla 6. Principales fragmentos en 1 y 2.....	44

LISTA DE CROMATOGRAMAS Y ESPECTROS DE MASAS

Cromatogramas

Cromatograma 1. Cromatograma de gases de la extracción con equipo Soxhlet.	24
Cromatograma 2. Cromatograma de gases de la extracción con IRC.....	24
Cromatograma 3. Cromatograma de gases de la extracción con US.....	25
Cromatograma 4. Cromatograma de gases de la extracción con MO.	25
Cromatograma 5. Cromatograma de extracción de capsaicina con ultrasonido reportado en la literatura, en donde a) ácido palmítico, b) ácido linoléico, 1) capsaicina y 2) dihidrocapsaicina	26

Espectros de masas

Espectro 1. Espectro de masas de la capsaicina (IE, 70eV)	34
Espectro 2. Espectro de masas de la dihidrocapsaicina (IE, 70eV)	35
Espectro 3. "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 307.....	39
Espectro 4. "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 195.....	40
Espectro 5. "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 152.....	41
Espectro 6. "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 137.....	42
Espectro 7. "Linked scan" para el fragmento m/z 122.....	43
Espectro 7. Espectro de masas de la capsaicina monodeuterada (IE, 70eV).....	46
Espectro 8. Espectro de alta resolución de la capsaicina monodeuterada (DART)	48

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de múltiple uso para el hombre. Por su participación en los ciclos biológicos, las plantas son indispensables para la supervivencia del hombre. La información obtenida de la investigación de compuestos de origen vegetal ayuda a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que los producen y lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos.

Al respecto, para que la industria emplee estas materias primas, es necesario obtener una cantidad y/o concentración adecuada de éstas y en forma pura para que su acción sea más efectiva, para ello es necesario llevar a cabo diversos procedimientos para poder extraerlos con disolventes adecuados, los cuales se seleccionan de acuerdo a la solubilidad y estabilidad que poseen las sustancias de interés (Domínguez X. A., 1988).

Por otro lado, el marcaje isotópico es una técnica utilizada para realizar el seguimiento del paso de un isótopo o un átomo con una variación, a través de una reacción vía metabólica, celular y/o sintética. La sustancia se etiqueta/marca mediante la sustitución de átomos específicos por su isótopo y se deja entonces para someterse a la reacción, así la posición de los isótopos en los productos se mide para determinar la secuencia del átomo isotópico seguido en la reacción o vía metabólica de la célula.

En el marcado isotópico, hay varias maneras de detectar la presencia de los isótopos utilizados, a través de su masa, de su modo de vibración o mediante la desintegración radiactiva. Al respecto, la espectrometría de masas detecta la diferencia de la masa de un isótopo, mientras que la espectrofotometría de absorción de infrarrojo detecta la diferencia de modos de vibración de los isótopos y el decaimiento radiactivo se puede detectar a través de una cámara de ionización (Adamson, Martín, & Munné, 1979).

También, es importante resaltar que debido a la diversidad de cultivos que existen en México, es preciso buscar alternativas para aportar valor agregado a los frutos o plantas cultivadas en nuestro país. Los extractos naturales obtenidos a partir de estas fuentes tienen

numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia, textil, entre otras (Mukhopadhyay, 2000); al respecto y de manera particular el término capsicum es sinónimo de chile, paprika y pimienta dependiendo de la variedad y uso (Purgeglore, Brown, Green, & Robbins, 1981). La importancia de las diferentes variedades de chile como un componente de la dieta del pueblo mexicano es notoria por la gran área destinada a su cultivo y al alto consumo dentro del país, siendo los chiles más importantes en México el habanero, el serrano, el jalapeño, el poblano, el manzano, entre otros. Los ingredientes más activos del capsicum son conocidos como capsaicinoides y están compuestos de una parte de vanillilamida y una cadena de acilo (Mejia, Hudson, Gonzalez de Mejia, & Vazquez, 1988). Dentro de estos la capsaicina y la dihidrocapsaicina son los componentes principales de todos los capsaicinoides presentes en los chiles (casi el 90 %), éstos han sido caracterizados por diferentes técnicas analíticas: cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) (Peña-Alvarez, Alvarado, & Vera-Avila, 2012), cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (HPLC/APCIMS) y otros métodos. Sin embargo, el estudio del mecanismo de fragmentación de los capsaicinoides ha sido poco estudiado.

Al respecto, en este trabajo se presenta un patrón de fragmentación validado por: CG-EM por impacto electrónico (IE), barridos de iones entrelazados (BBIIEE) del inglés “Linked scan” (LS) y alta resolución (AR), además, de manera previa y complementaria también se informa de un estudio para extraer los compuestos de interés mediante el recurso de la Química Verde, esto al emplear fuentes de activación alternas.

ANTECEDENTES

Extracción

La vida del hombre está íntimamente unida a su ambiente, en particular a los vegetales, los cuales le proporcionan alimento, vestido, materiales de construcción, solaz estético, tanto visual como olfatorio, salud o muerte. Los vegetales, en diversas formas han sido factor decisivo en los fenómenos sociales y económicos determinantes de la evolución de la humanidad. Así, desde que el hombre existe, su gran preocupación ha sido la lucha por la supervivencia, por conseguir los remedios para curar sus males y alargar la vida. Con seguridad, el instinto llevó a los primeros hombres a buscar en la naturaleza no sólo los alimentos que necesitaban para subsistir, sino también a distinguir entre lo que era beneficioso y nocivo y encontrar, a su alrededor, aquello que pudiera curar o aliviar sus enfermedades. En un principio se utilizaban como medicamentos únicamente productos donados por la naturaleza, procedentes tanto de los reinos vivos –animal y vegetal- como del mineral. Un producto natural en términos amplios, es cualquier producto aislado de fuentes naturales vivas, ya sean bacterias, hongos, plantas o animales. Cualquier organismo viviente contiene en su estructura una gran cantidad de productos químicos, en su mayoría orgánicos. Como estos compuestos químicos son el resultado de la actividad metabólica suelen en ocasiones ser denominados metabolitos.

Los métodos generales de extracción de productos naturales, están asociados a ensayos sencillos que permiten la selección de extractos o fracciones, seguimiento de las mismas y, a partir de las fracciones activas, aislamiento e identificación de los principios. Los principios a extraer se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran “incrustadas” en la célula. Con el fin de facilitar la extracción, la planta es sometida a un troceado que destruye las estructuras que los contienen, mejorando así el rendimiento de la extracción. Los métodos de extracción empleados para llevar a cabo esta operación son:

- a) Maceración. El material vegetal está en contacto con un volumen dado de disolvente durante un periodo de tiempo determinado. El principal inconveniente es la incompleta extracción de los principios.
- b) Percolación. El disolvente fluye lentamente en contacto con el material vegetal. Su principal inconveniente es que se emplean y se acumulan grandes cantidades de disolvente.
- c) Digestión. Variante de la maceración donde el material vegetal se mantiene en contacto con el disolvente durante un periodo a una temperatura moderada (aproximadamente 50 °C).
- d) Infusión. Sobre la droga se añade agua hirviente.
- e) Decocción. Es empleada para principios activos que no sufran alteraciones con la temperatura; en este procedimiento se hierva el material vegetal en agua por espacio de 15 a 60 minutos, se enfría, se cuela y se añade suficiente agua fría a través de la droga hasta obtener el volumen deseado. Dependiendo de la consistencia de las partes a extraer, se darán tiempos de decocción más o menos largos.
- f) Soxhlet. El equipo Soxhlet se utiliza para realizar procesos sólido-líquido, Realizando un sinnúmero de extracciones de manera automática, el mismo solvente se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material (Villar del Fresno, 1999).

Química Verde

A pesar del gran éxito y a la importancia de la Química en nuestra sociedad, su imagen pública se ha visto deteriorada, debido al incremento de emisiones al ambiente y al miedo a que la química pueda influenciar negativamente en el equilibrio ecológico. Pero no es menos cierto que también participa activamente en la búsqueda de soluciones para los problemas ambientales. Por ello, en los últimos años ha surgido un enfoque cuyo objetivo consiste en prevenir o minimizar la contaminación desde su origen, lo cual corresponde a la filosofía de la Química Verde. En este contexto se trabaja para prevenir la formación de desechos contaminantes y propiciar la economía de tiempo y de recursos; mediante este protocolo muchos investigadores se han dado a la tarea de generar y emplear métodos no convencionales para llevar a cabo extracciones químicas. Ésta se rige por doce principios ya establecidos (Anastas & Warner, 1998):

Principios de la química verde

1. **Prevención:** es mejor prevenir la generación de un residuo, que tratarlo o eliminarlo después de haberlo generado.
2. **Economía atómica:** los métodos de síntesis deberán diseñarse de tal manera que se incorporen al máximo, en el producto final, todos los sustratos usados durante el proceso.
3. **Síntesis químicas menos peligrosas:** los métodos de síntesis deberán ser diseñados para utilizar y generar sustancias que presenten baja o nula toxicidad, tanto para el ser humano como para el ambiente.
4. **Diseño de químicos seguros:** los productos químicos se diseñarán de manera que mantengan su eficacia y baja toxicidad.
5. **Uso de disolventes seguros o auxiliares:** evitar el empleo de sustancias auxiliares como disolventes, reactivos de separación, etc., y en caso de que se empleen deberán ser lo más inocuos posible.
6. **Diseño de la eficiencia energética:** los requerimientos energéticos en un proceso químico se catalogan por su impacto económico y al medio ambiente, por lo tanto se sugiere llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente.
7. **Uso de materias primas renovables:** la materia prima debe ser preferiblemente renovable en lugar de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. **Reducir derivados:** evitar el uso de grupos de bloqueo, de protección-desprotección o la modificación temporal de los procesos físico-químicos, ya que su empleo requiere reactivos adicionales y genera residuos.
9. **Catálisis:** considerar el empleo de catalizadores, lo más selectivo posible, de preferencia de origen natural.
10. **Diseñar sustancias biodegradables:** los productos deberán ser diseñados de tal manera que al final de su vida útil no persistan en el ambiente.

11. **Análisis en tiempo real para prevenir la contaminación:** las metodologías analíticas necesarias serán desarrolladas en el momento del proceso, lo que permitirá un seguimiento y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.

12. **Químicos seguros para prevenir accidentes:** las sustancias y la forma de una sustancia usada en un proceso químico deberá ser elegida para reducir el riesgo de accidentes químicos incluyendo las emanaciones, explosiones e incendios.

Ahora bien, muchos procesos químicos emplean fuentes de energía provenientes de combustibles fósiles. En este sentido y para minimizar los requerimientos energéticos se han realizado varios intentos para hacer que la energía utilizada en sistemas químicos sea lo más eficiente posible. Se han investigado y adoptado nuevas posibilidades para utilizar nuevas formas de energía, llamadas formas de energía no clásicas, como: energía mecánica, sonicación, microondas e infrarrojo; para optimizar la duración y la cantidad de producto, así como evitar productos no deseados. A continuación se describe una breve definición de cada una de estas fuentes de energía.

- **Mecánica:** La mecanoquímica se basa en las transformaciones químicas inducidas mediante fuentes mecánicas como compresión, molienda o fricción. Esta energía generalmente desarrollada con un mortero y un pistilo o de manera mecánica empleando un horno planetario, generando nuevos materiales mejorando la eficiencia (Takacs, 2013).
- **Sonicación:** Ultrasonido, es una fuente de activación eficiente y amigable en síntesis química, ésta ha sido empleada por décadas con muy buenos resultados. Aquí, no solo se da un incremento de la energía, sino que además se lleva a la formación de especies químicas que inducen la formación de reacciones. La sonoquímica en sistemas heterogéneos es el resultado de la combinación de efectos tanto químicos como mecánicos de la cavitación (Doble & Kruthiventi, 2007).
- **Microondas:** Aquí se lleva a cabo un supercalentamiento por fricción y rotación por parte de las moléculas que poseen un momento dipolar bien definido. Por lo tanto, este

fenómeno dependerá de la capacidad que tenga el material, disolvente o reactivo, para absorber las microondas y convertirlas a calor (Kappe, 2004).

- Infrarrojo: En el espectro electromagnético, en área del infrarrojo está dividido en tres zonas: infrarrojo de onda corta o cercano, que va desde 0.76 a 2 μm ; de onda media o mediana, de 2 a 4 μm y onda larga o lejano, desde 4 a 1000 μm . Al respecto, las superficies de las sustancias expuestas a la irradiación absorben la energía infrarroja y entonces esta energía absorbida es convertida a calor en un tiempo de reacción muy corto. Cabe también mencionar que el infrarrojo cercano es el más utilizado (Noguez Córdova, y otros, 2011).

Marcado isotópico

La marcación isotópica es una técnica en la que se emplea un isótopo trazador o trazador isotópico para observar el movimiento de ciertos materiales en procesos químicos, biológicos o físicos, siendo los trazadores que pueden marcarse sustancias químicas, células o microorganismos.

Mucha información útil puede ser obtenida usando moléculas que han sido isotópicamente marcadas rastreando la ruta de la reacción de esta manera, pudiéndose seguir mediante espectrometría de masas (EM), espectrofotometría de absorción de infrarrojo (IR) o resonancia magnética nuclear (RMN). El deuterio, es el isótopo más común para llevar a cabo este tipo de rastreo dentro de un sistema, es utilizado para sustituir al hidrógeno empleando generalmente agua deuterada. Para detectar la presencia de isótopos marcados se debe tener en cuenta dos particularidades, la primera de ellas se encuentra en la diferencia de las masas de los compuestos y, la segunda, se observa en la forma de los modos vibracionales que la molécula pueda presentar.

En la técnica de marcado, generalmente no es necesario utilizar compuestos marcados en su totalidad; el material parcialmente marcado usualmente es suficiente. Además, es apropiado comentar, que en esta técnica se emplean isótopos no radiactivos; así, algunos de los isótopos más comunes son ^2H , ^{13}C , ^{15}N y, que además pueden ser producidos en disolventes

de RMN, aminoácidos, ácidos nucleicos, lípidos, metabolitos comunes y medios de cultivo de células.

A continuación se presentan algunos ejemplos tomados de la literatura primaria, en el primero de ellos se emplea el marcaje isotópico; en este sentido, Miranda y colaboradores (1990), llevaron a cabo el marcaje isotópico de diferentes bencensulfonilhidrazonas y tosilhidrazonas, compuestos empleados para determinar la concentración exacta de soluciones de reactivos de litio, confirmando que los protones aromáticos del grupo tosilato son más reactivos que aquellos en posición *orto* en el doble enlace carbono-nitrógeno, Figura 1.

Otro ejemplo adecuado es el presentado por Tao Chi y Baker (1993), quienes realizaron un estudio utilizando el intercambio deuterio-hidrógeno empleando la técnica de termoespray en espectrometría de masas para determinar el número de grupos funcionales químicamente intercambiables en los metabolitos de Arteether (Artemotil; droga semi-sintética anti malárica derivada del producto natural artemisinina, también conocida como qinghasou) y así extender el uso del intercambio para servir como ayuda en la elucidación de fragmentos de iones mediante este nuevo método.

También, se ha llevado a cabo la determinación del número de grupos funcionales intercambiables mediante la comparación del desplazamiento de las señales en los espectros tanto de las moléculas deuteradas así como de las que estaban contenidas en un sistema de disolventes regulares. Uno de los mecanismos de fragmentación determinados se muestra a continuación, Figura 2.

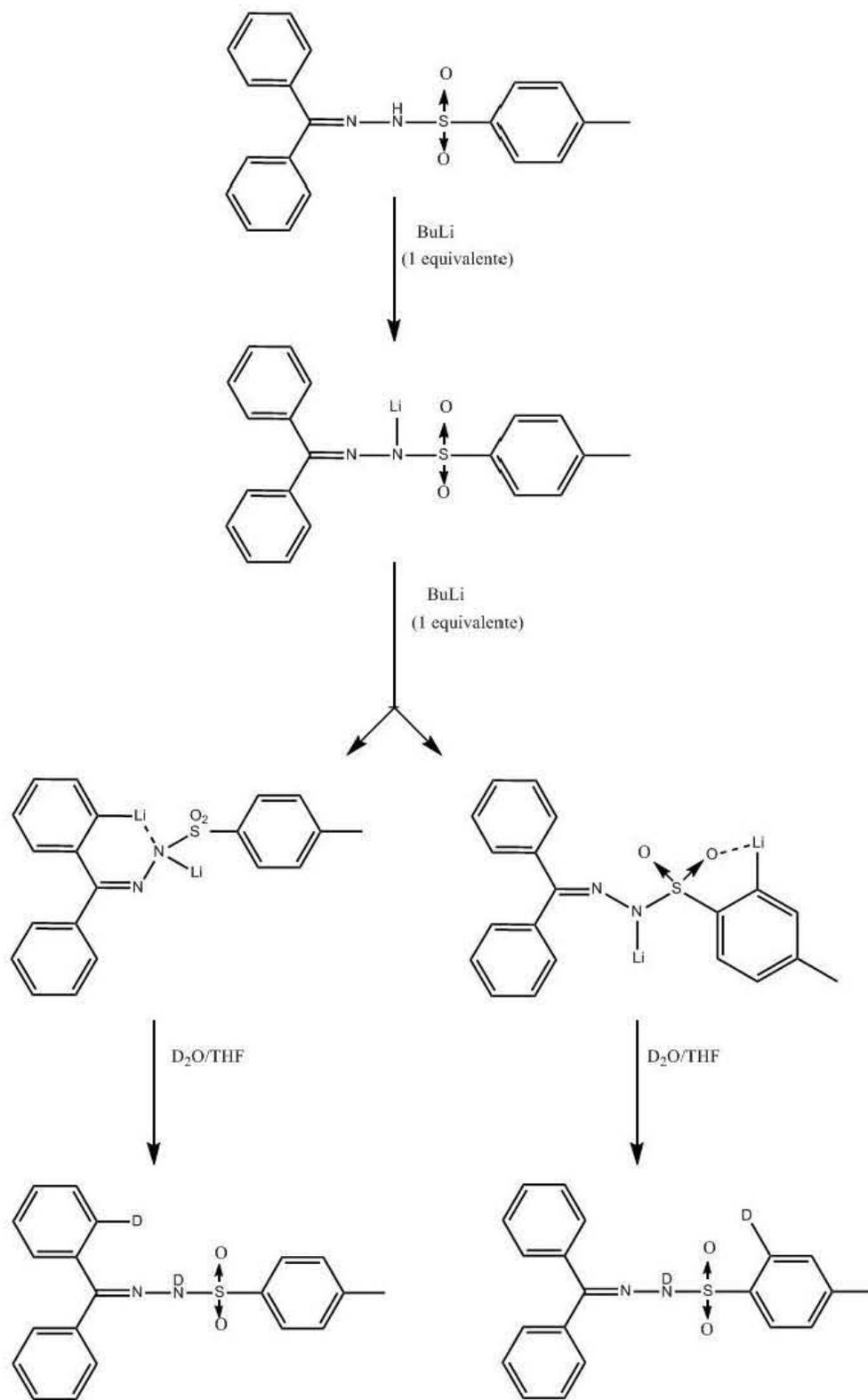


Figura 1. Marcado isotópico de bencensulfonilhidrazonas y tosilhidrazonas.
Fuente: Miranda, y otros, 1990

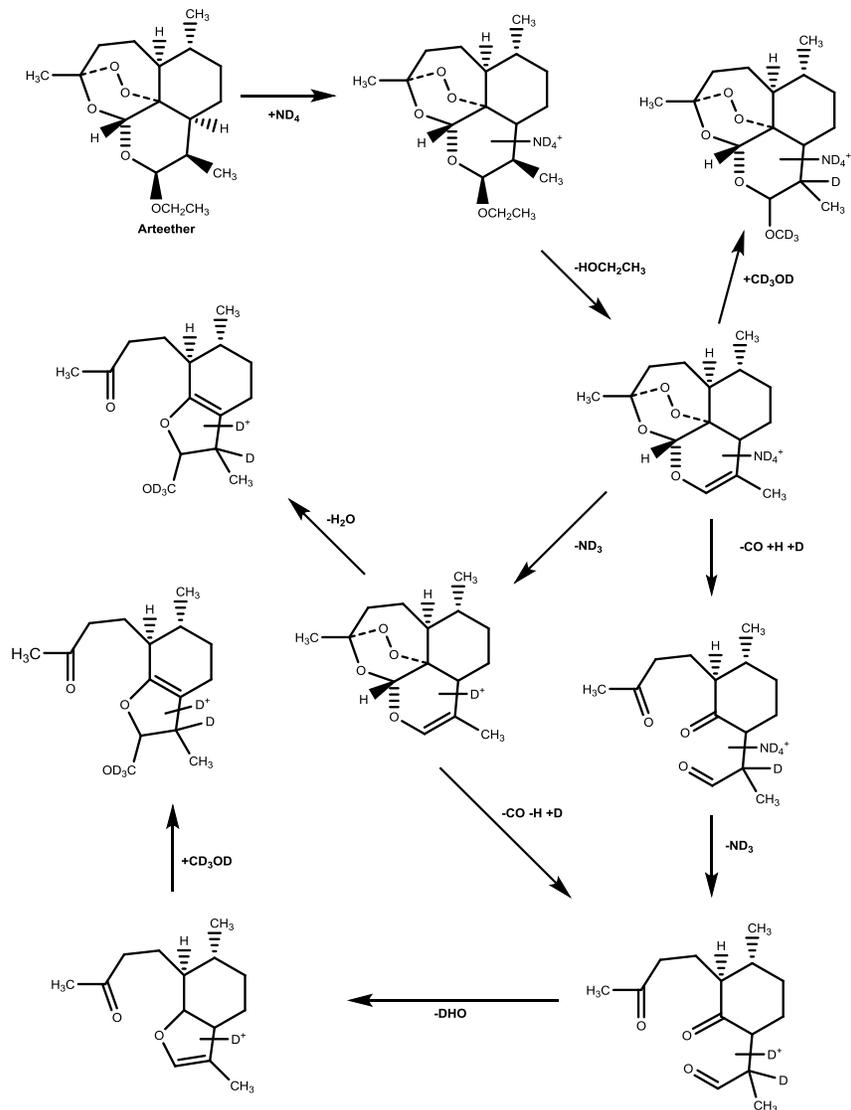


Figura 2. Mecanismo de fragmentación de Arteether en una solución enriquecida de deuterio.
Fuente: Tao Chi & Baker, 1993

Finalmente un ejemplo más, es el mostrado por Alleman y colaboradores (2012), dónde estudian el mecanismo de reacción de la eliminación 1,4-conjugada catalizada por la enzima terpeno sintasa. Al respecto, dependiendo del modo en que la eliminación de protón de los análogos de DMADP, se obtendrían distintos productos de isopreno deuterado que podrían ser distinguidos fácilmente mediante espectrometría de masas. La eliminación regioespecífica protón/deuterio daría como resultado un solo producto deuterado, que es consistente con un mecanismo de reacción concertado, mientras que una eliminación

protón/deuterio no regioespecífica resultaría en dos productos deuterados, consistente con un catión intermediario común de dimetilalilo que excluiría a un mecanismo concertado. El estudio realizado mediante la deuteración y el estudio con espectrometría de masas, apoya el mecanismo de reacción paso a paso mediante intermediarios catiónicos alílicos análogos al enlace enzimático. Figura 3.

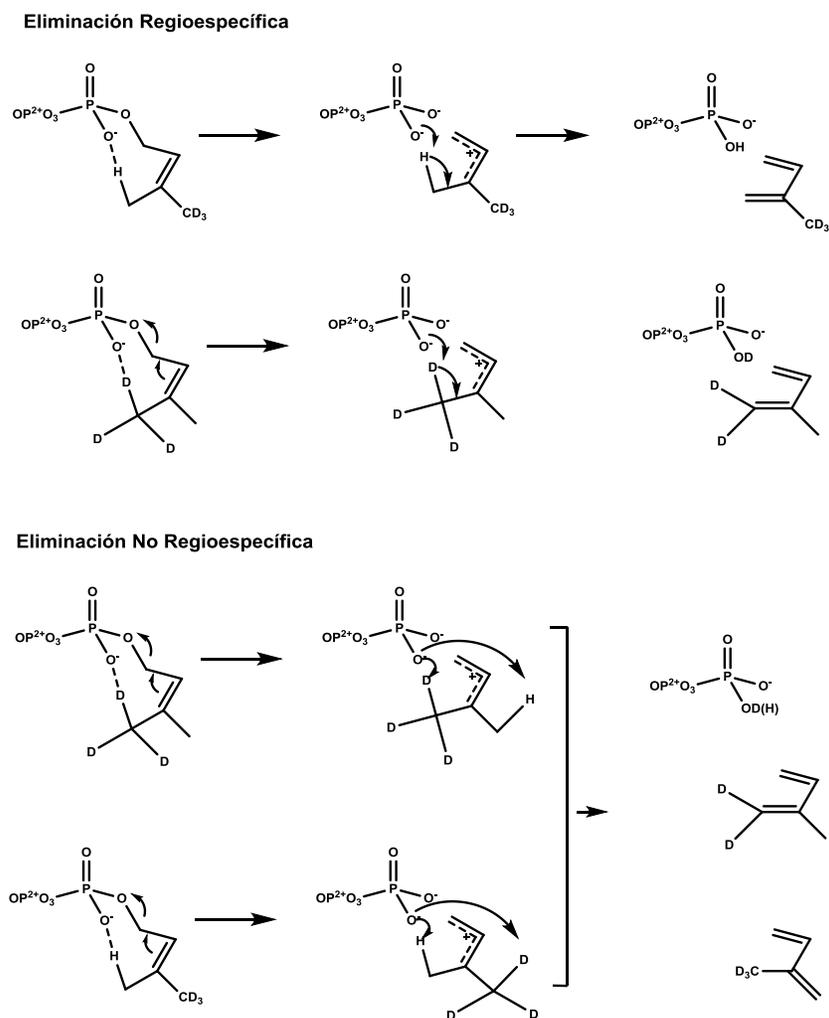


Figura 3. Posibles mecanismos de reacción de la eliminación 1,4-conjugada.
Fuente: Allemann, y otros, 2012

Capsaicina

El chile se ha convertido en uno de los principales condimentos a nivel mundial. Alrededor del 90 % de las variedades de chile son de origen mexicano. Al respecto, México se ubica entre los primeros países productores de esta hortaliza (Hernández, Ochoa, López, & García, 2009), Figura 4.



Figura 4. El chile en México

Fuente: Sagarpa, 2014

Los chiles son bien conocidos por ser fuentes de una gran cantidad de nutrientes, tales como vitamina C, compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides, incluyendo provitaminas A (De aguiar, y otros, 2013). El fruto es muy importante económicamente debido a la existencia de un número muy diverso de variedades de chile, además de que su consumo está relacionado a su sabor picante (Pino, Sauri-Duch, & Marbot, 2009).

El fuerte y especiado sabor de los chiles picantes, se atribuyen a la presencia de una familia de 16 alcaloides homólogos, a los que de manera genérica se les llama capsaicinoides.

Estos componentes se encuentran presentes únicamente en los frutos del género *Capsicum*, variando su concentración de una variedad a otra.

Los capsaicinoides están compuestos de una fracción vainillilamida y una cadena de acilo de 8 a 13 átomos de carbono. El contenido de capsaicinoides puede llegar a ser del 1 % en algunos chiles muy picantes, como el chile habanero en México (*Capsicum chinense*); aunque generalmente la concentración de estos va de 0.05 a 0.3 %. Los dos capsaicinodes mayoritarios presentes en la gran variedad de chiles son la capsaicina (*trans*-8-metil- *N*-vainillil-6-nonenamida) y la dihidrocapsaicina (8-metil-*N*-vainillilnonamida).

La capsaicina y la dihidrocapsaicina conforman aproximadamente el 90 % de los capsaicinoides del chile, sus moléculas únicamente difieren en la insaturación de la cadena hidrocarbonada. En adición a estos dos capsaicinoides, se encuentran otros capsaicinoides en menor cantidad, como lo son la nordihidrocapsaicina, norcapsacina, homocapsaicina, homodihidrocapsaicina, dinorcapsaicina, nordihidrocapsaicina y la dinordihidrocapsaicina, entre otros (Barbero, Palma, & Barroso, 2006), Figura 5.

Es apropiado mencionar que debido a que los átomos de nitrógeno de los capsaicinoides no forman parte del anillo heterocíclico, estos deben ser clasificados como protoalcaloides. Los capsaicinoides se encuentran en una mayor concentración en la placenta del fruto, estructura a la que se adhieren las semillas; no tienen olor ni sabor, son lipofílicos y estimulan los puntos receptores en la lengua y boca (Hernández, Ochoa, López, & García, 2009). La capsaicina fue cristalizada por primera vez en 1876 por Tresh, siendo su estructura molecular determinada por Nelson y Dawson en 1919.

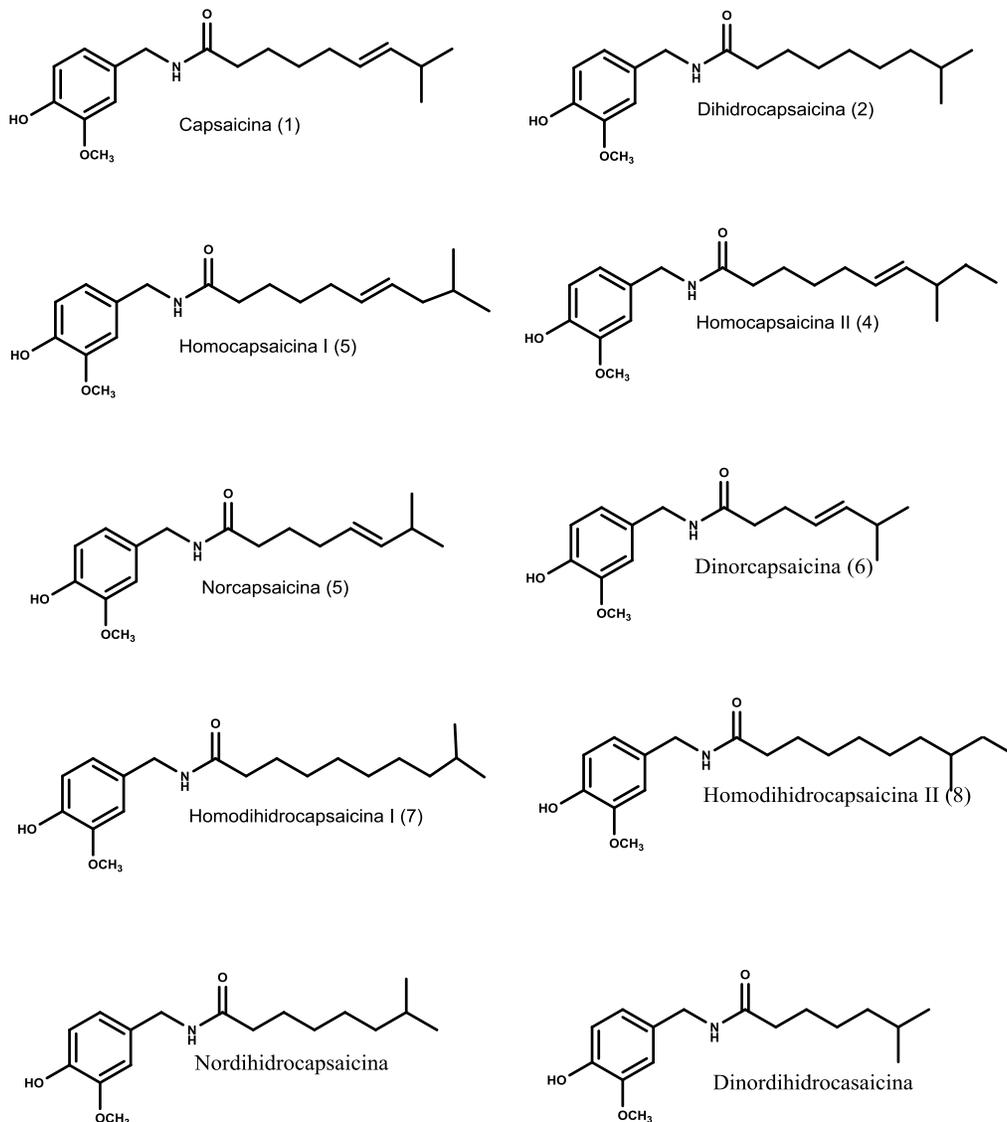


Figura 5. Capsaicinoides comunes.

Farmacología

A la capsaicina se le han atribuido efectos farmacológicos desde la antigüedad, pero no es sino hasta los últimos 20 años que se han hecho extensas investigaciones para determinar aplicaciones específicas, incluyendo algunas en el tracto gastrointestinal, pérdida de peso y analgésicas.

La capsaicina y sus análogos son usados en cremas tópicas y parches para tratar síndromes con dolor crónico tales como neuralgia post-herpética, dolor musculoesquelético, neuropatía diabética, osteoartritis y artritis reumatoide, Figura 6. También ha sido empleado, para tratar dolor producido por erupciones, psoriasis, mastectomía y desórdenes de la vejiga.

Debido a su estructura fenólica, los capsaicinoides también tienen una fuerte actividad antioxidante (Reyes-Escogido, Gonzalez-Mondragón, & Vazquez-Tzompantzi, 2011).



Figura 6. Pomada comercial para el dolor a base de capsaicina

Los capsaicinoides poseen una gran variedad de propiedades biológicas que pueden afectar la salud humana. Estas incluyen actividades antimicrobianas contra bacterias patogénicas incluyendo *Bacilli*, *Clostridia*, *Salmonellae* y *Helicobacter*; actividad antioxidativa y potenciales efectos anticancerígenos (Kozukue, y otros, 2005).

HIPÓTESIS

Se tiene conocimiento de que los métodos de extracción empleando fuentes alternas (MO, US, IRC) con relación al tratamiento térmico clásico (mantilla-Soxhlet) han venido en aumento, también se sabe que existe muy poca información sobre la extracción de capsaicinoides del chile habanero empleando fuentes alternas. Además, se conoce que el marcaje isotópico es fundamental en la determinación de la posición y del paso de un isótopo a través de una reacción. Al respecto, es conocido que el etiquetado isotópico se puede detectar por diferentes técnicas espectroscópicas, entre ellas la espectrometría de masas. De esta forma, si se plantea un estudio comparativo entre tres fuentes alternas de extracción, se generará un método para llevar a cabo la extracción de los metabolitos de interés en un mayor porcentaje y, asimismo, si se lleva a cabo el marcado isotópico con deuterio de los compuestos extraídos, capsaicina y dihidrocapsaicina, y en complemento se emplean experimentos adecuados propios de la espectrometría de masas impacto electrónico (IE), barrido de iones entrelazados (“LS”) y alta resolución (AR), se podrá establecer de manera inequívoca el mecanismo de fragmentación de las moléculas en estudio.

OBJETIVOS

General

Llevar a cabo la extracción de capsaicina y dihidrocapsaicina empleando fuentes alternas como las irradiaciones de microondas (MO), infrarrojo cercano (IRC) y ultrasonido (US), para posteriormente sobre estas moléculas realizar un marcaje isotópico para generar un estudio mediante espectrometría de masas, a efecto de establecer el mecanismo de fragmentación para las moléculas en estudio.

Particulares

- Llevar a cabo el secado y el molido del chile habanero.
- Realizar la extracción de capsaicina y dihidrocapsaicina, empleando diferentes fuentes alternas de activación.
- Determinar las mejores condiciones de extracción (temperatura y tiempo).
- Determinar mediante CG-EM que método de extracción es el más adecuado.
- Aislar y purificar las moléculas objetivo.
- Realizar un marcado isotópico sobre las moléculas aisladas.
- Establecer el mecanismo de fragmentación empleando espectrometría de masas.
- Confirmar mediante diversos estudios de espectrometría de masas (IE, “LS” y AR) el patrón de fragmentación propuesto.

METODOLOGÍA

Reactivos

Los reactivos utilizados: muestra de chile habanero (*Capsicum chinense*) se obtuvo previamente triturado y tratado de chile habanero puro molido, Industria Agrícola Maya S.A. de C.V., Mérida, Yucatán; el etanol absoluto utilizado para la extracción de los capsaicinoides se obtuvo del método que indica la literatura (Domínguez X. A., 1982). Los disolventes *n*-hexano y AcOEt son grado reactivo por lo que se utilizaron sin tratamiento alguno. Para el aislamiento y purificación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina se empleó la técnica de cromatografía en placa preparativa (*cpp*) usando gel de sílice, Merck 60 con tamaño de poro de 0.063 mm (malla 230 ASTM) como fase estacionaria y como eluyente el sistema *n*-hexano/AcOEt (50:50). El revelado de éstas se llevó a cabo por diferentes métodos: luz ultravioleta, con una lámpara UVP (UVLS-24), vapores de yodo y con solución de sulfato cérico. Para el marcado isotópico se utilizó MeONa preparado de acuerdo a la literatura (1959); el MeOH-*d*4 y el agua deuterada se adquirieron comercialmente.

Equipo

Para las extracciones se empleó un reactor de microondas (digestión y extracción) de la marca Millestone Ethos One SK-10. Para la irradiación de infrarrojo cercano se usó un equipo comercial “Flavor Time[®]” modelo AOT-F902 (1350 W/110 V/120 V-60 Hz|220 V/240 V-60 Hz) (Noguez Córdova, y otros, 2011). Para llevar a cabo la irradiación con ultrasonido se usó un baño de ultrasonido Transonic 460/H Elma ultrasound bath (35 KHz). Los cromatogramas se adquirieron empleando un Cromatógrafo de Gases de la marca Agilent Technologies (modelo 6890N) acoplado a un espectrómetro de masas JMS GC Mate II. Los cromatogramas se obtuvieron empleando una columna 30 m x 0.32 mm 0.25 micrones, con una temperatura inicial de 40 °C por un minuto, y posteriormente ocho grados por minuto hasta 310 °C la que se mantuvo por seis minutos. Los estudios de

“linked scan” y alta resolución se obtuvieron utilizando un espectrómetro de masas MStation MJS-700 JEOL, con potencial de ionización de 70 eV. . Los datos de alta resolución en tiempo real se obtuvieron empleando un espectrómetro JEOL AccuTOF DART (Direct Analysis in Real Time). Las medidas empleando el experimento DART se llevaron a cabo con PEG (polietilenglicol) 400 como referencia interna a 6000 de resolución, con triple helio en estado triplete como gas ionizante a 350 °C. En la primer entrada la temperatura y el voltaje fueron de 120 °C y 15 V, respectivamente, el voltaje de la segunda entrada fue de 5 V.

Método experimental

Para la extracción, con equipo Soxhlet, se colocaron 10g de chile habanero molido, se adicionaron 250 mL de EtOH absoluto y se llevó a reflujo por 3h, una vez concluido el tiempo de extracción se filtró a vacío para separar el chile habanero, el disolvente se secó a presión reducida y se determinó la presencia y el porcentaje de extracción de la capsaicina y la dihidrocapsaicina mediante el análisis CG/EM.

Posteriormente se realizaron múltiples extracciones con tres fuentes de energía, dos de estas basadas en ondas electromagnéticas: microondas (MO), infrarrojo cercano (IRC); y la tercera por ondas mecánicas: ultrasonido (US). En cada una de éstas se realizaron tres diferentes métodos para llevar a cabo la extracción, las cuales se describen a continuación.

Para las dos fuentes de energía de ondas electromagnéticas (MO, IRC):

- a) En el primer método se irradió 1 g de muestra de chile habanero en ausencia de disolvente, una vez concluido el tiempo de irradiación se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 30 mL de disolvente (EtOH), se filtró y se secó a presión reducida.
- b) En el segundo proceso, a 1 g de muestra se le agregaron 30 mL de disolvente, los cuales se irradiaron con las dos fuentes de energía, concluido el tiempo de irradiación se filtró y se secó a presión reducida.

c) En el tercer método, se irradió 1 g de muestra en ausencia de disolvente una vez concluido el tiempo de irradiación se adicionaron 30 mL de disolvente y se irradió nuevamente, concluido el tiempo de irradiación se filtró y se secó a presión reducida.

Para las extracciones con una fuente de energía de ondas mecánicas:

a) En el primer método se sometió a ultrasonido, 1 g de muestra de chile habanero en ausencia de disolvente, una vez concluido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 30 mL de disolvente (EtOH), se filtró y se secó a presión reducida.

b) En el segundo proceso, a 1 g de muestra se le agregaron 30 mL de disolvente, concluido el tiempo de exposición, se filtró y se secó a presión reducida.

c) En el tercer método, se utilizó 1 g de muestra en ausencia de disolvente una vez concluido el tiempo se adicionaron 30 mL de disolvente y llevo a ultrasonido nuevamente, concluido el tiempo se filtró y se secó a presión reducida.

Las condiciones para cada una de las fuentes alternas utilizadas fueron las siguientes:

- MO: Para llevar a cabo este proceso se empleó la siguiente rampa de calentamiento: irradiar por 1 minuto a 65 °C, a 100 watts de potencia, agitación al 70 %, posteriormente se irradió por 5 minutos a temperatura constante bajo las mismas condiciones.
- IRC: Para este método se realizaron tres extracciones, todas a 75 °C, en el caso particular del proceso b) se irradió tres veces a 5 min dando un tiempo de reposo de 5 min entre cada irradiación y para el proceso c) al adicionar el disolvente se irradió tres veces a 5 min dando un tiempo de reposo de 5 min entre cada irradiación, todo con agitación constante para evitar la proyección del disolvente.
- US: En este método también se hicieron tres extracciones, a 65 °C, por 70 minutos.

Una vez concluidas todas las extracciones, los extractos obtenidos se llevaron para su estudio mediante CG-EM. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación de las mezclas de reacción mediante la técnica de *ccp* para obtener los compuestos de interés.

Para llevar a cabo el marcaje isotópico de las moléculas en estudio, éste se realizó bajo la siguiente metodología: se colocaron 70 mg de la mezcla capsaicina-dihidrocapsaicina en un matraz bola de 50 mL, se adicionaron 10 mg de MeONa y 10 mL de MeOH-*d*₄, con agitación constante a reflujo por 3 días.

La reacción fue monitoreada por CG-EM mediante IE; posteriormente, por “LS” y finalmente por AR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción

Los productos naturales tienen una gran variedad de aplicaciones en diferentes sectores de la industria (como la farmacéutica, la cosmética, alimenticia, etc.); por lo cual el estudio de los diferentes métodos de extracción de estos se ha hecho importante. De esta manera, y bajo los principios de la Química Verde, se llevaron a cabo diversas extracciones obteniendo algunos beneficios ambientales como reducir la cantidad de disolventes utilizados, así como el empleo de diferentes fuentes alternas de energía como irradiaciones de infrarrojo cercano, de microondas y mediante ultrasonido. A continuación, se presentan las estructuras de la capsaicina (1) y la dihidrocapsaicina (2) para tener una mayor objetividad.

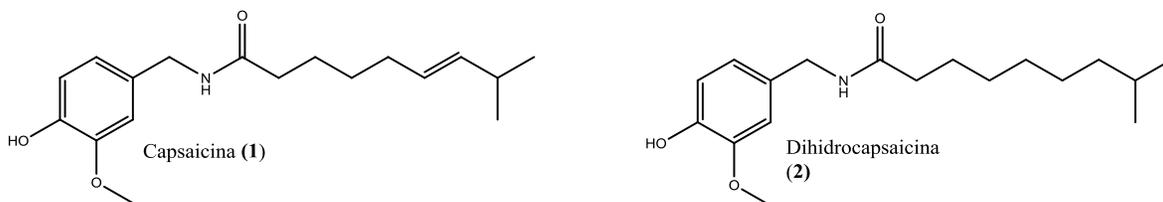


Figura 7. Estructuras de la capsaicina y la dihidrocapsaicina

Al respecto, en los estudios mediante cromatografía de gases, como se observa en el Cromatograma 1, el proceso de extracción mediante equipo Soxhlet extrae diversos componentes y otros capsaicinoides (nordihidrocapsaicina, nonilvanillilamida, dodecilvanillilamida y homocapsaicina), en consecuencia se extrajo un menor porcentaje de capsaicinoides de interés, 43.69 y porcentaje del 11.61 de 1 con respecto a 2, Tabla 1. Al emplear las fuentes de activación no convencionales, el proceso es mucho más selectivo, se extrae en mayor proporción los compuestos de interés y, las impurezas mostradas por el proceso Soxhlet son minimizadas en forma considerable, cabe resaltar que la extracción de otros capsaicinoides se presenta en una menor proporción, de tal forma, que casi son imperceptibles en los cromatogramas obtenidos; al respecto, se presenta un mayor porcentaje de capsaicina en relación a la dihidrocapsaicina, los porcentajes se pueden

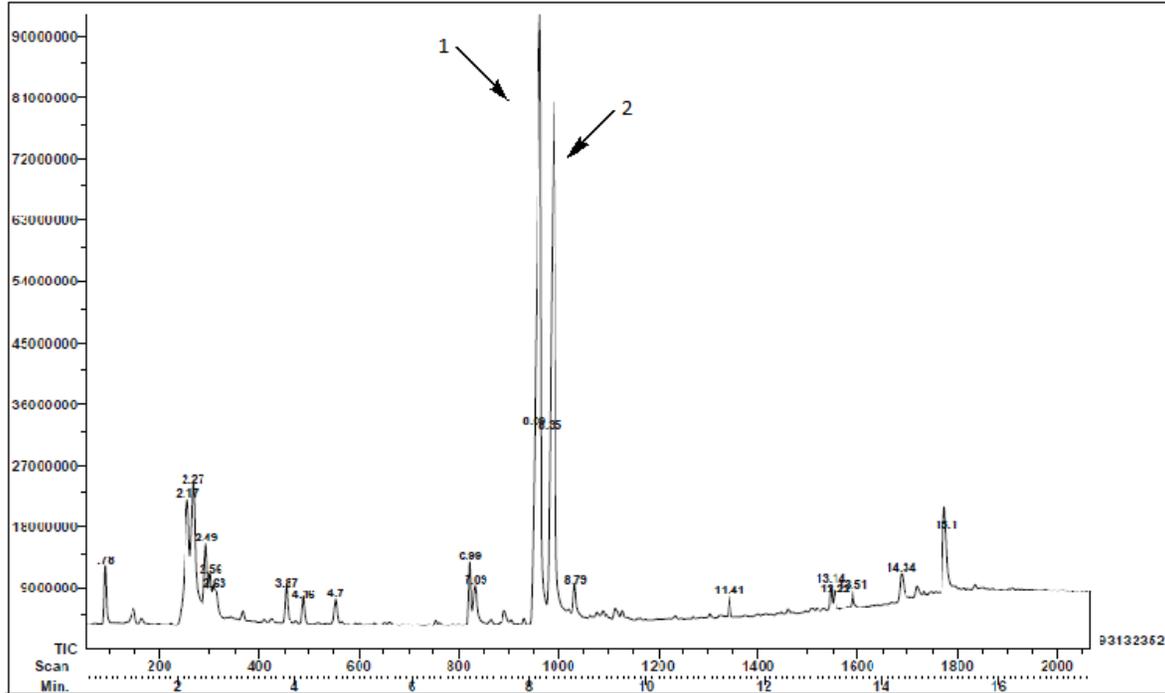
apreciar en la Tabla 1. Al emplear IRC, el mayor porcentaje de **1** y **2** se presentó al llevar a cabo la extracción empleando el método c) Tabla 1, en donde se obtiene la mayor cantidad de los capsaicinoides objetivo y mayor porcentaje de **1** que de **2**, 18.63 %, Cromatograma 2. Con relación a la extracción asistida con ultrasonido se puede observar que la mayor cantidad de extracción se presenta al irradiar en seco, método a) Tabla 1; sin embargo, aquí es necesario comentar que el mayor porcentaje de extracción de **1** se presenta al emplear el método c) Tabla 1 con un 19.19 %, Cromatograma 3. Finalmente, para la extracción empleando irradiaciones de microondas, en la Tabla 1 método a), se observa que se presenta la mayor extracción de capsaicinoides, pero el mayor porcentaje de **1** se obtiene al emplear el método b) con un 22.43 %, Cromatograma 4.

Tabla 1. Porcentajes de 1 y 2 extraídos

Método	Porcentaje (tiempo de retención en min)		Porcentaje Total	Diferencia de Porcentaje de extracción	Relación ($r_{1/2}$)
	Capsaicina	Dihidrocapsaicina			
Soxhlet					
reflujo	24.38 (8.09)	19.31 (8.35)	43.69	11.61	1.263
IRC					
a)	45.11 (28.77)	32.38 (28.98)	77.49	16.43	1.393
b)	38.49 (28.82)	27.05 (29.03)	65.54	17.45	1.423
c)	52.10 (28.73)	35.74 (28.94)	87.84	18.63	1.458
US					
a)	45.52 (28.78)	32.66 (28.99)	78.18	16.45	1.394
b)	39.74 (28.77)	28.06 (28.97)	67.80	17.23	1.416
c)	45.36 (28.72)	30.76 (28.93)	76.12	19.19	1.475
MO					
a)	54.83 (28.70)	37.37 (28.90)	92.10	18.96	1.467
b)	56.22 (28.70)	35.62 (28.91)	91.84	22.43	1.578
c)	42.09 (28.70)	30.16 (28.91)	72.25	16.51	1.396

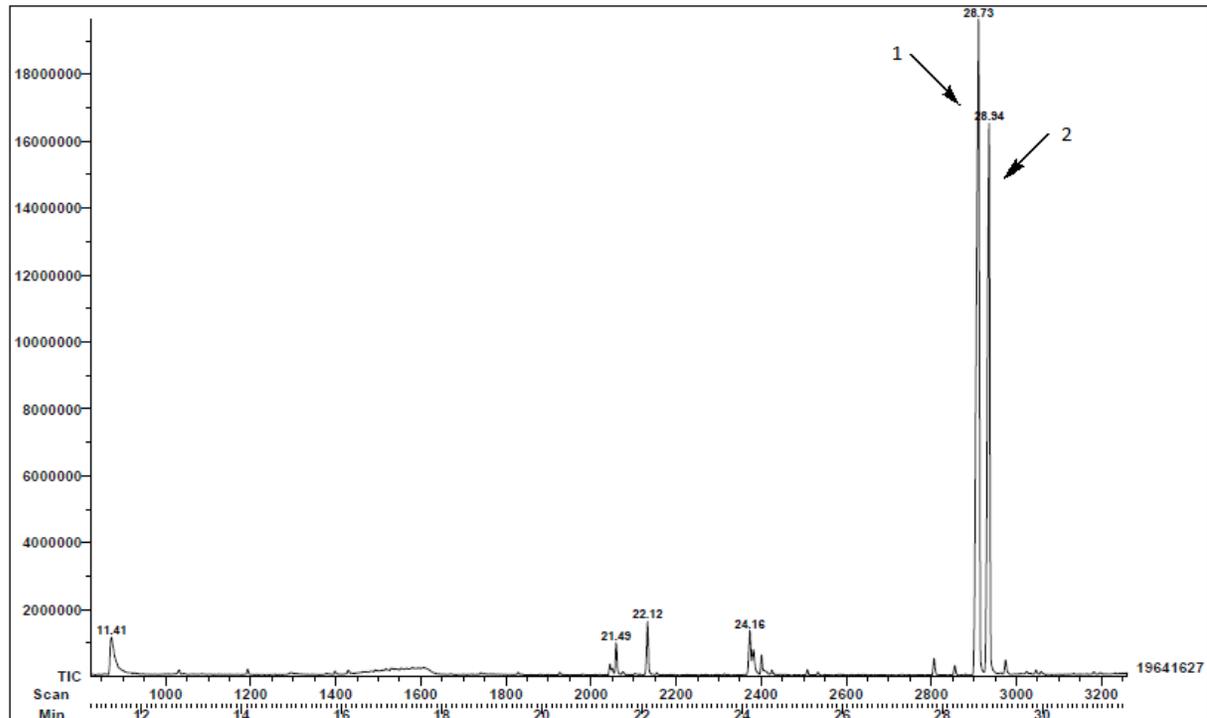
IRC: infrarrojo cercano, US: ultrasonido, MO: microondas

Soxhlet



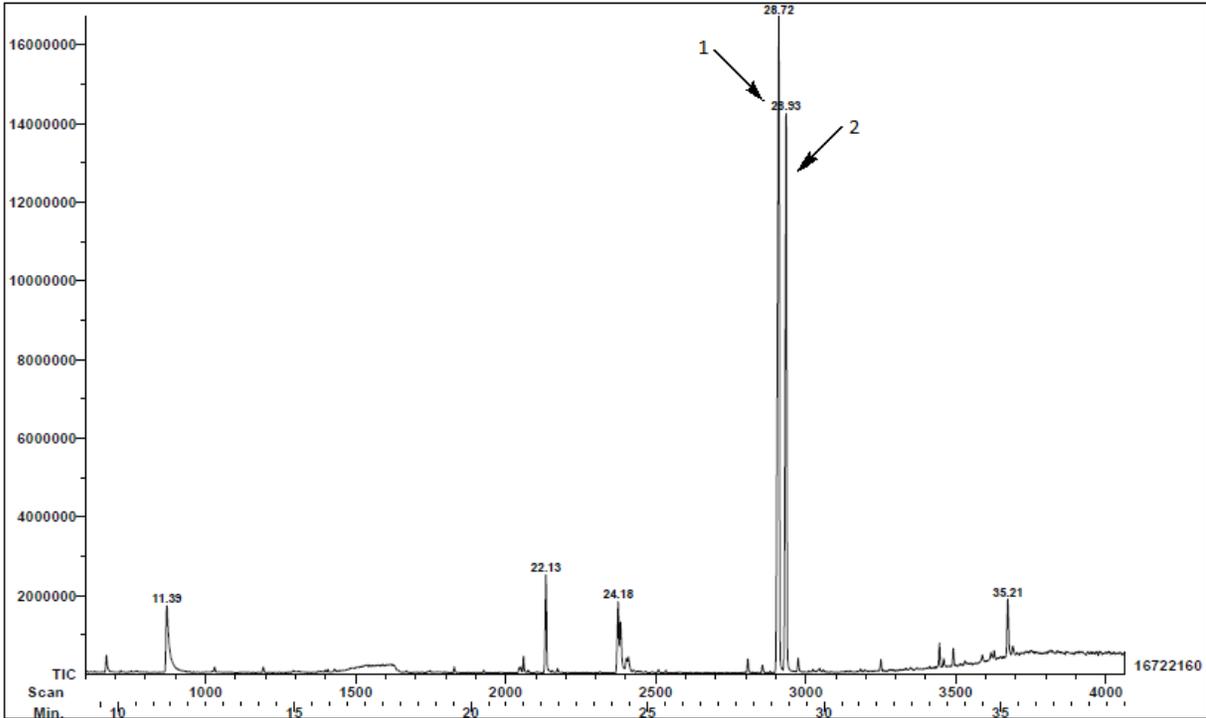
Cromatograma 1. Cromatograma de gases de la extracción con equipo Soxhlet. (Realizado con una rampa de 20°C por minuto)

Método C con IRC



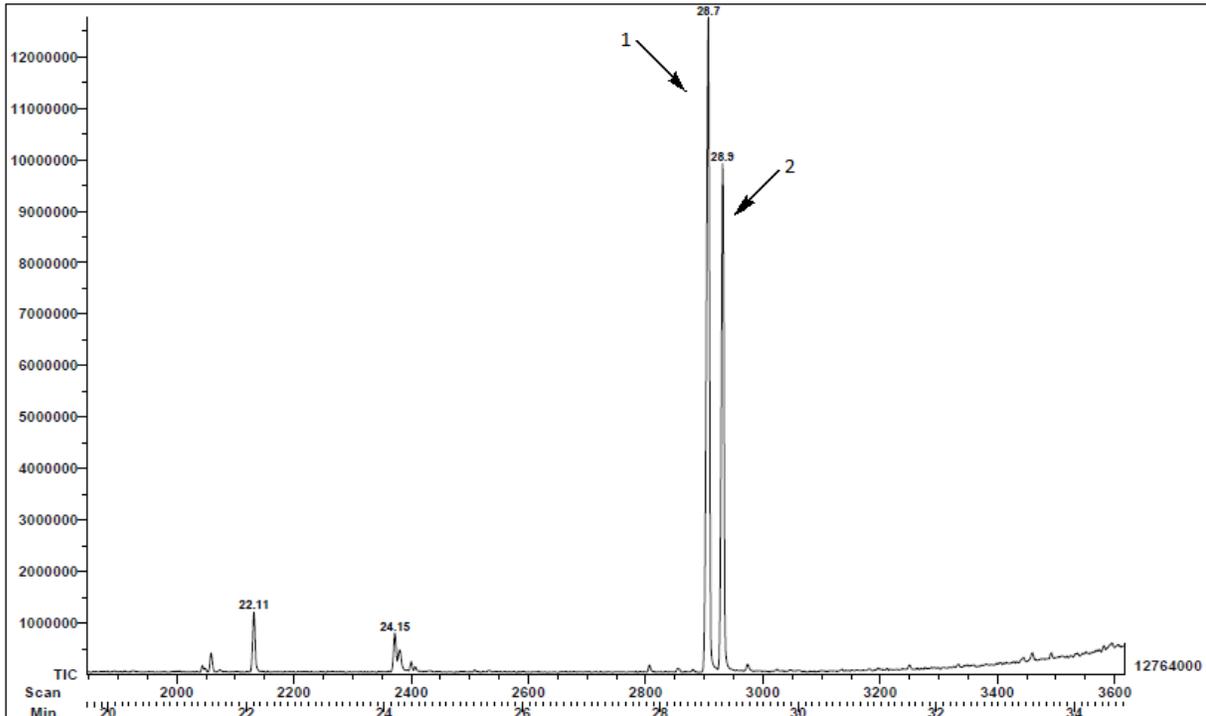
Cromatograma 2. Cromatograma de gases de la extracción con IRC. (Realizado con una rampa de 8°C por minuto)

Método C con US



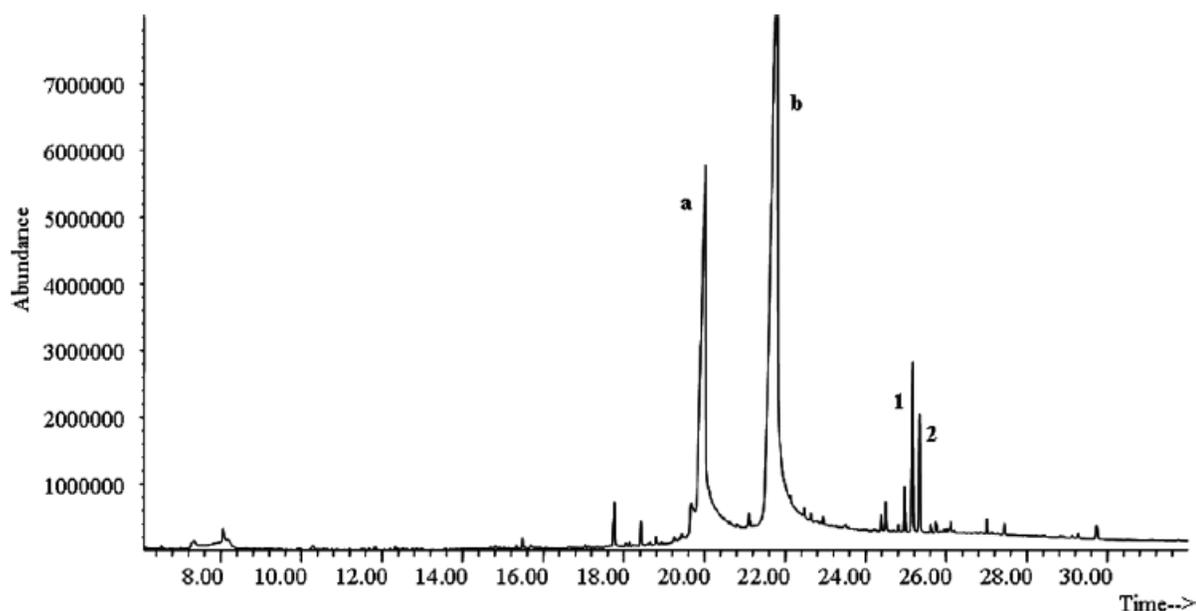
Cromatograma 3. Cromatograma de gases de la extracción con US. (Realizado con una rampa de 8°C por minuto)

Método B con MO



Cromatograma 4. Cromatograma de gases de la extracción con MO. (Realizado con una rampa de 8°C por minuto)

También es apropiado comentar, que el proceso aquí presentado empleando US en comparación con el único método reportado por Peña Álvarez y colaboradores (2012), presenta una menor cantidad de compuestos de interés extraídos, de esta forma, se muestra que el ácido palmítico y el ácido linoléico son los compuestos de mayor proporción, Cromatograma 5, bajo las condiciones ahí reportadas. Asimismo, es necesario resaltar que no existe algún trabajo de extracción sobre el chile habanero que se haya llevado a cabo por microondas e infrarrojo cercano.



*Cromatograma 5. Cromatograma de extracción de capsaicina con ultrasonido reportado en la literatura, en donde a) ácido palmítico, b) ácido linoléico, 1) capsaicina y 2) dihidrocapsaicina
Fuente: Peña-Alvarez, Alvarado, & Vera-Avila, 2012*

Teniendo en cuenta los resultados previos y para estandarizar los procesos de extracción, se llevaron a cabo cinco repeticiones independientes. Al respecto en la Tabla 2, se confinan los diferentes porcentajes de extracción para cada repetición, con estos datos se realizaron los gráficos de control para cada proceso.

Tabla 2. Porcentajes de extracción

Fuente de energía	Repetición				
	1	2	3	4	5
Soxhlet	24.38	20.53	21.79	22.01	24.12
IRC	52.10	50.20	51.30	50.70	51.90
US	45.36	44.92	45.49	44.78	45.10
MO	56.22	55.05	53.47	56.67	53.33

En la Tabla 3 se pueden observar los datos proporcionados por el programa estadístico Statgraphics, mediante el cual se obtuvieron los valores para el límite de control inferior (LIC), el límite de control superior (LCS) y el promedio (X), con estos datos fue posible generar los gráficos respectivos, en donde no se dejaron observaciones excluidas y se llevó a cabo con un nivel de confianza del 95 % con ± 1 desviación estándar (DE).

Tabla 3. Datos para la elaboración de las gráficas de control.

Fuente de energía	Gráficos de control			
	PROMEDIO (x)	LSC	LIC	DE
Soxhlet	22.57	24.21	20.92	1.65
IRC	51.24	52.30	50.18	1.06
US	45.10	45.52	44.68	0.42
MO	54.95	57.01	52.89	2.06

Al respecto, los gráficos de control nos permiten determinar si el proceso que se está llevando a cabo se encuentra controlado, mediante el supuesto de que provienen de una distribución normal. Es decir, si para este trabajo de tesis el empleo de las fuentes de energía alterna es adecuada o no. Para ello es importante establecer dos hipótesis, las cuales se enuncian a continuación:

H_0 : El proceso se encuentra bajo control estadístico.

H_1 : El proceso no se encuentra bajo control estadístico.

Así, en la Figura 8a y Tabla 3, se puede observar que en el proceso Soxhlet se tiene una media (X) de 22.566 y una desviación estándar (DE) de 1.64894, aquí se presentan dos

puntos fuera de los límites del proceso, LSC = 24.2149 y LIC = 20.9171 con un nivel de confianza del 95 %, por lo tanto este proceso es no controlado. Para el caso de IRC, Figura 8b y Tabla 3, se tiene una $\bar{X} = 51.24$ y una $DE = 1.06383$, en el gráfico se aprecia que todos los puntos están dentro de los límites del proceso, LSC = 52.3038 y LIC = 50.1762 con un nivel de confianza del 95 %, el proceso se declara controlado. Al emplear US, Figura 8c y Tabla 3, se presentan los siguientes parámetros: $\bar{X} = 45.102$, $DE = 0.421099$, LSC = 45.5132 y LIC = 44.6809 con un nivel de confianza del 95 %, en el gráfico se observa que no hay ningún punto fuera de los límites por lo tanto el proceso es controlado. Finalmente, el proceso mediante MO presenta valores para \bar{X} de 54.948 y DE de 2.05895, Todos los puntos están dentro de los límites del proceso, LSC = 57.007 y LIC = 52.889 con un nivel de confianza del 95 %, entonces el proceso se declara que está en control.

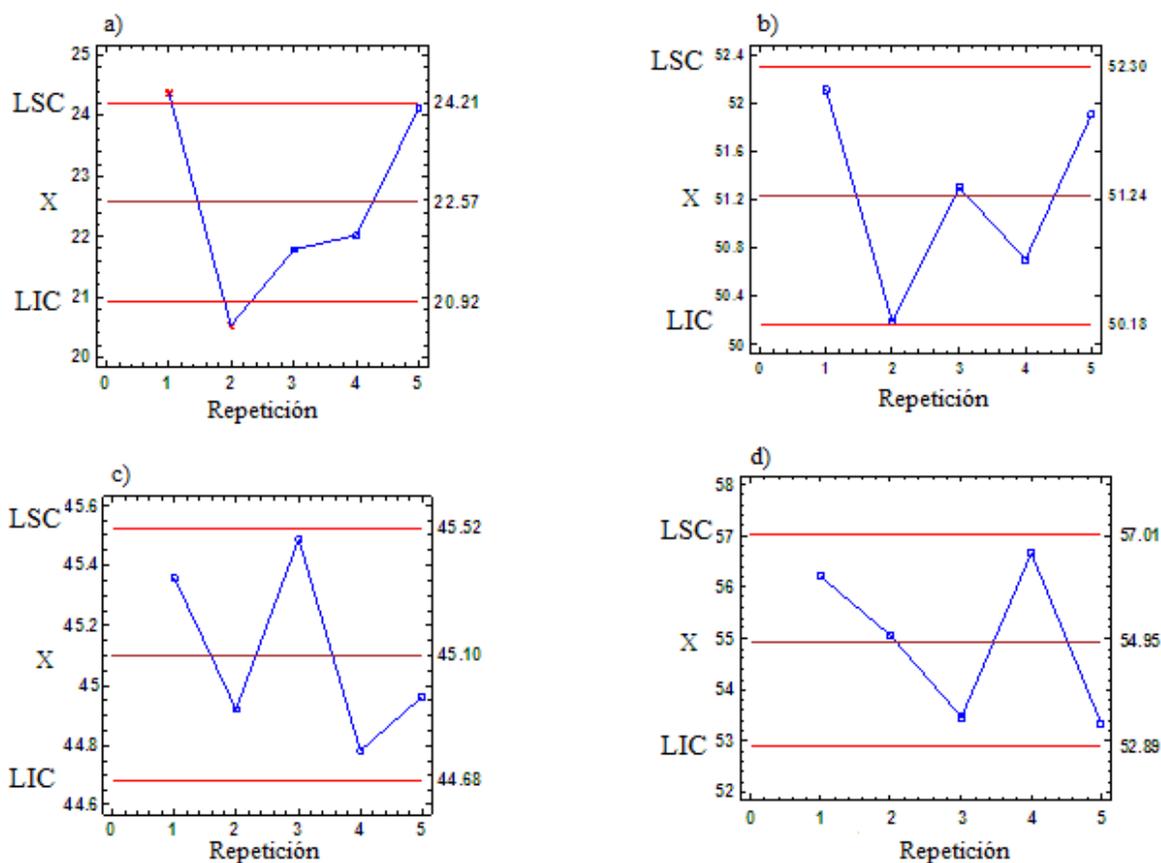


Figura 8. Gráficos de control ($\pm 1DE$) obtenidos empleando equipo Soxhlet (a) y las tres diferentes formas de energía (irradiación de infrarrojo cercano (b), ultrasonido (c) e irradiación de microondas (d) empleando etanol como disolvente.

Teniendo en cuenta estos resultados, se puede decir que los procesos aquí ensayados son una buena estrategia verde para llevar a cabo la extracción de los metabolitos de interés al ofrecer una mayor extracción en menores tiempos.

Propuesta y validación de un patrón de fragmentación

La necesidad del presente estudio, propuesta de un mecanismo de fragmentación validado, para la capsaicina y la dihidrocapsaicina tiene su origen en el trabajo previamente publicado por Schweiggert y otros (2006), donde se hace una propuesta Figura 9, fundamentada por la técnica de “electrospray”, al respecto, se propone que la fragmentación se produce principalmente vía la cadena alílica, es decir, que primeramente a partir del M^{+} (**a**) pierde el anillo aromático para generar el ion (**b**) m/z 182, a partir de **b** la formación del pico **c** m/z 153 por pérdida de 29 Da, a su vez, también se sugiere la formación del fragmento **d** m/z 170, a partir del ion molecular del cual se genera también **c** vía su tautómero **d'**; un aspecto importante de señalar dentro de este patrón de fragmentación es el pico **e** de relación m/z 137, para el cual los autores proponen un fragmento con esqueleto base de un ciclohexadieno sustituido con un metileno, un grupo metoxilo y un grupo hidroxilo, perdiéndose la aromaticidad del anillo original. Al respecto, es de alta importancia resaltar que este fragmento contradice las bases de la Espectrometría de Masas, ya que está informado que se generan fragmentos más estables (Watson & Sparkman, 2008), (De Hoffmann & Stroobant, 2001).

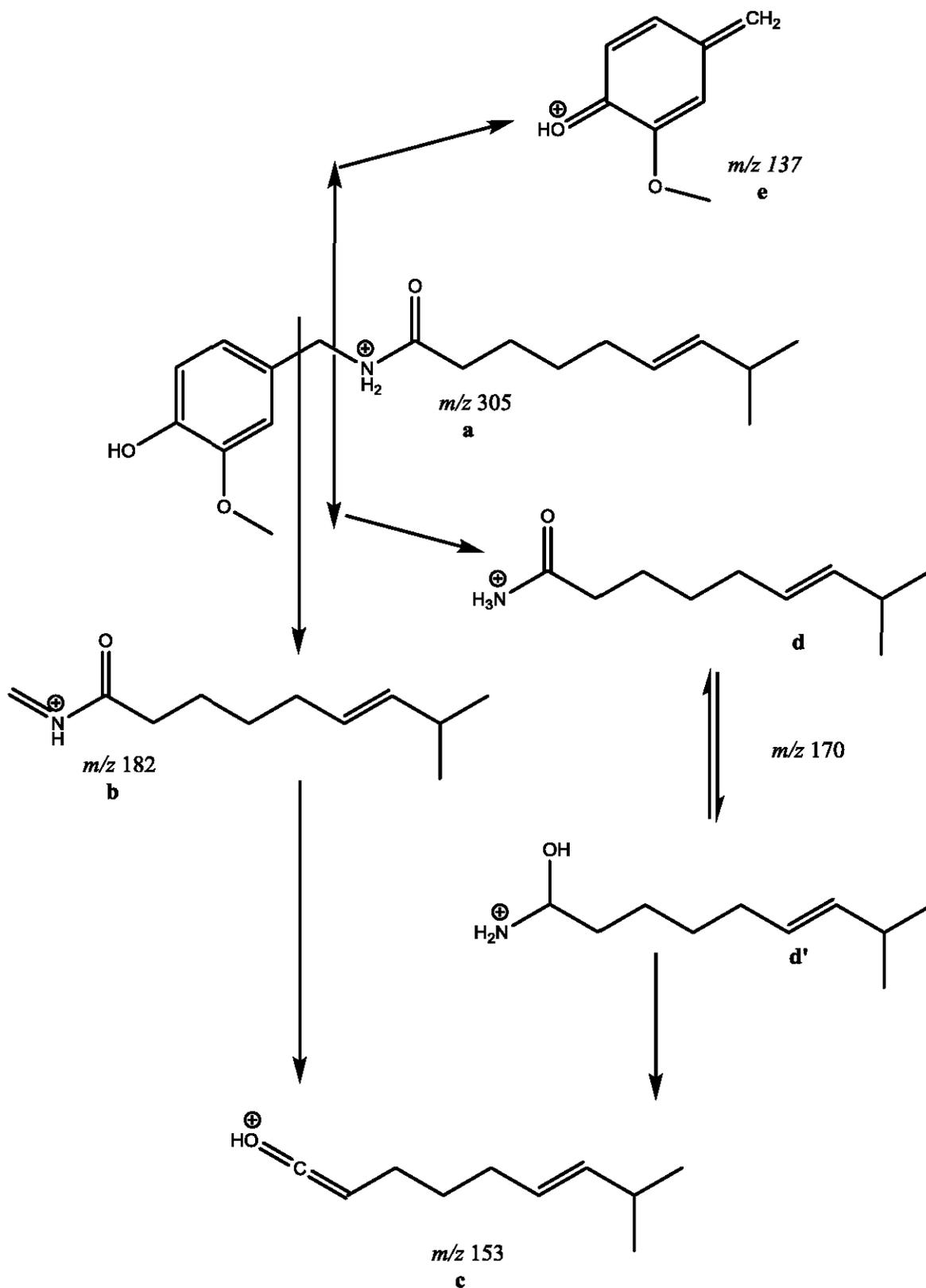


Figura 9. Mecanismo de fragmentación de la capsaicina previamente publicado en la literatura.
Fuente: Schweiggert, Carle, & Schieber, 2006

Teniendo como antecedente principal, la propuesta **no validada** del patrón de fragmentación anteriormente mencionado (*vide supra*), en complemento de una revisión exhaustiva en la literatura (“Science Finder”), se detecta que no existe un estudio adecuado para establecer de forma validada un patrón de fragmentación de las dos moléculas objetivo; en consecuencia se presentó como interesante e inclusive se puede decir como obligada estudiar, proponer y validar un patrón de fragmentación para las compuesto de interés. Lo anterior, objetivo primordial de este trabajo de tesis se describe gráficamente Figura 10, y se discute haciendo uso de diversas herramientas (“LS”, AR, marcado isotópico) propias de la espectrometría de masas.

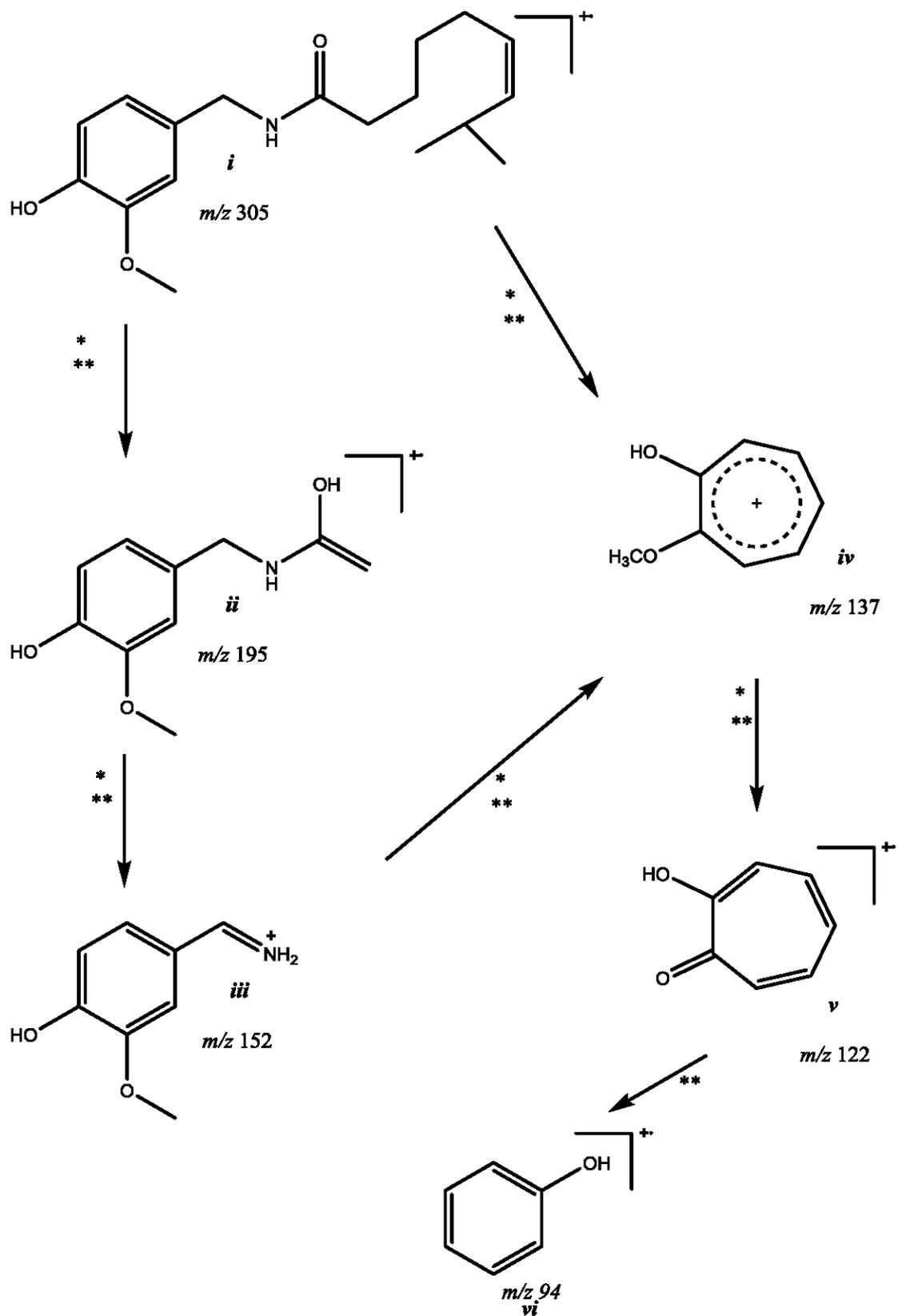


Figura 10. Mecanismo de fragmentación propuesto y validado en donde *AR y **LS.

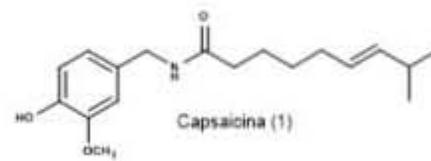
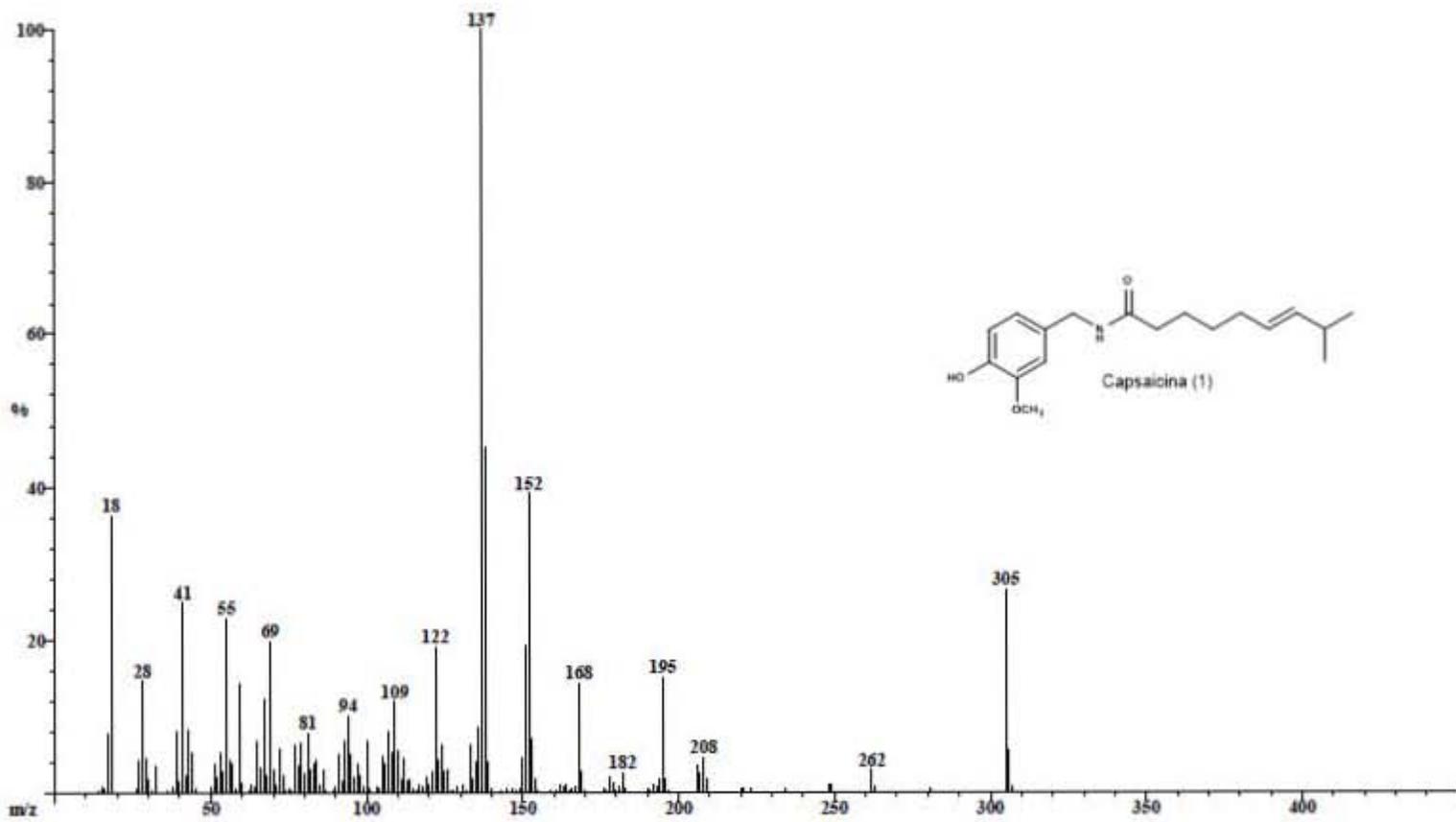
Impacto electrónico

Con los datos obtenidos mediante los estudios de CG-EMIE, fueron identificadas la capsaicina y la dihidrocapsaicina; al respecto, en los Espectros 1 y 2, se observan los iones moleculares esperados de **1** y **2**, (**i**) m/z 305 (16) y (**i'**) m/z 307 (14), de manera correspondiente, además es importante resaltar, que estos compuestos presentan una fragmentación común la cual se describe a continuación: el ion **ii**, m/z 195 [M-110]⁺ o **ii'** [M'-112]⁺, ion **iii**, m/z 152 [M-153]⁺ o **iii'** [M'-155]⁺, m/z 137 (100) ion **iv** [M-168]⁺ o ion **iv'** [M'-170]⁺, asimismo el fragmento **v**, m/z 122 [M-183]⁺ o **v'** [M'-185]⁺, y finalmente, m/z 94 **vi-vi'** [122-CO], Tabla 4.

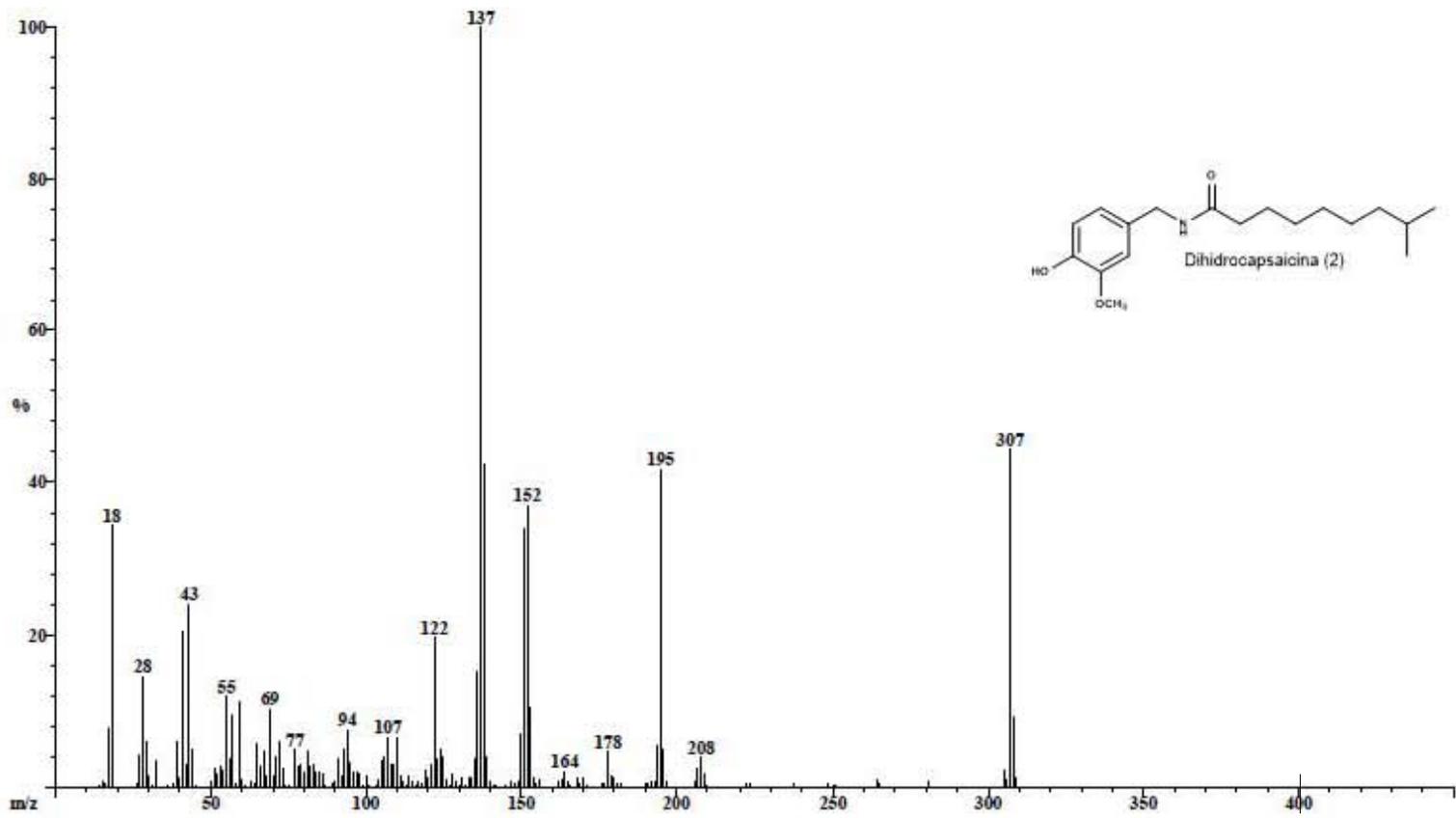
Tabla 4. Fragmentos de la capsaicina y la dihidrocapsaicina.

	M⁺ (%) i/i'	ii (%)	iii (%)	iv (%)	v (%)	vi (%)
Capsaicina	305 (16)	195 (6)	152 (11)	137 (100)	122 (5)	94
Dihidrocapsaicina	307 (24)	195 (21)	152 (12)	137 (100)	122 (5)	94

Espectro 1. Espectro de masas de la capsaicina (IE, 70eV)



Espectro 2. Espectro de masas de la dihidrocapsaicina (IE, 70eV)



“Linked scan”

Para validar las rutas establecidas, en el patrón de fragmentación descrito en la Figura 10, en una primera etapa se realizaron los estudios de “linked scans” (Figuras 3-6) de cada uno de los fragmentos significativos (*i/i'*-*vi/vi'*); los resultados correspondientes se presentan de manera resumida en la Tabla 5.

Tabla 5. Iones hijo

<i>m/z</i>	Iones hijo/ <i>m/z</i>
305/307 (i/ii')	195 (ii/ii'), 137 (iv/iv')
195	152(iii')
152	137 (iv/iv')
137	122(v/v')
122	94 (vi/vi')

Como puede observarse, teniendo como referente a la dihidrocapsaicina, del fragmento de relación *m/z* 307 se producen los picos con relaciones *m/z* 195 y *m/z* 137; al respecto, la formación del ión *ii'* se explica adecuadamente por, la vía de, un rearrreglo de McLafferty, mientras que *iv'* se manifiesta como un ion tropylium, generado mediante una escisión bencílica- α al nitrógeno y la subsecuente transposición, congruente con una pérdida de 168 Da (Figura 11).

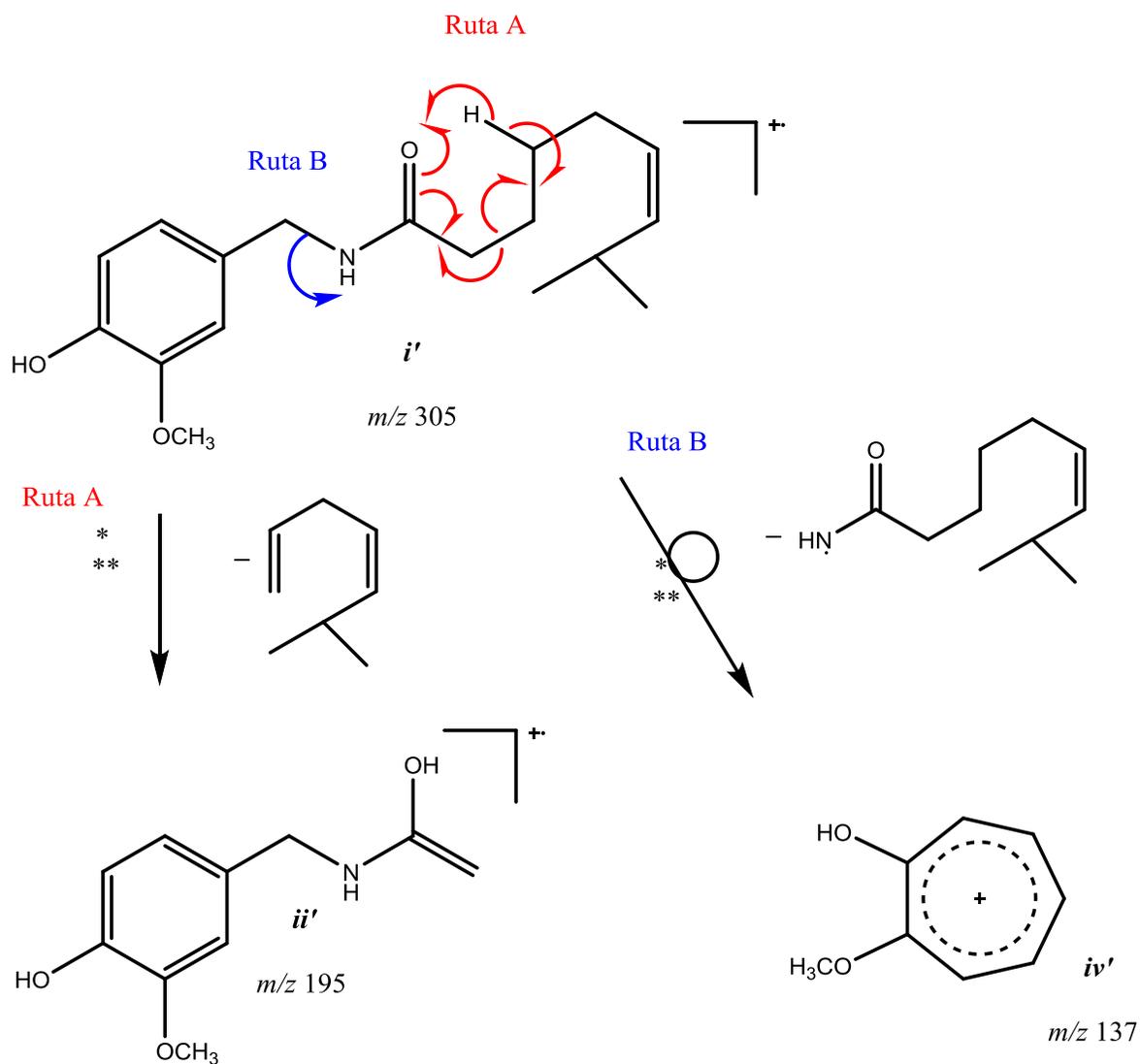


Figura 11. Fragmentos m/z 195 y m/z 137

El resultado del respectivo “linked scan” de ii' es indicativo del origen del pico iii' , lo cual se explica por una ruptura α al nitrógeno con la respectiva pérdida del sistema enólico; a su vez, del correspondiente “linked scan” de iii' se evidencia también la formación del fragmento iv' , implicando la pérdida de amoniaco y una subsecuente transposición (Figura 12).

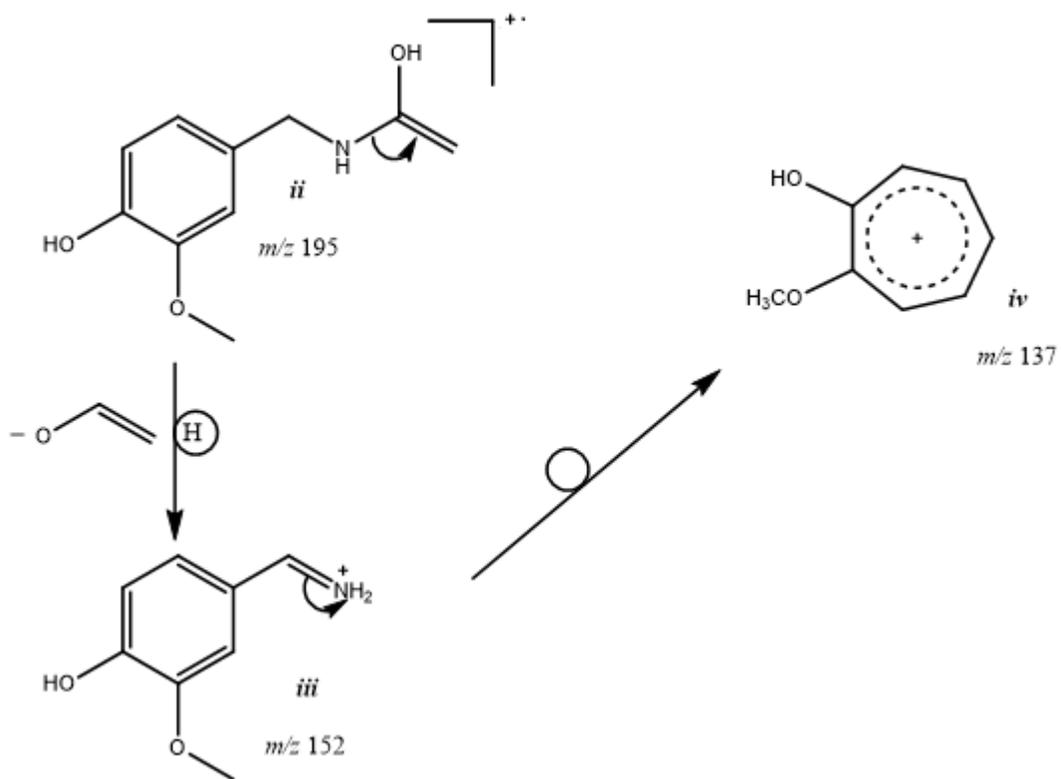


Figura 12. Fragmentos m/z 195, m/z 152, m/z 137

Finalmente de los correspondientes estudios de “linked scans” de iv' y v' se dan a conocer y valida la producción consecutiva de los iones vi' y m/z 94 (Figura 13).

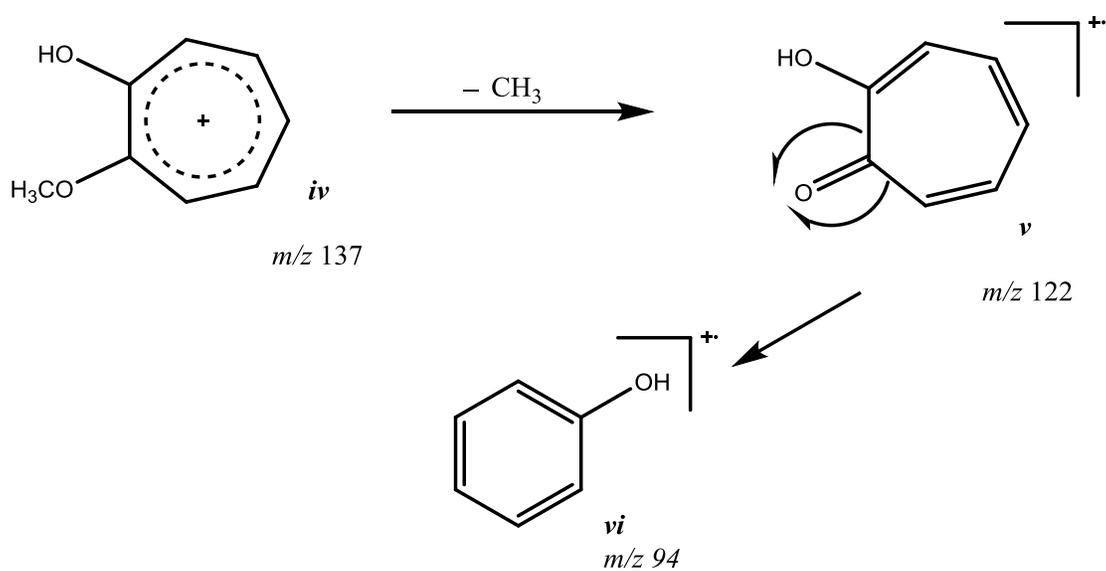
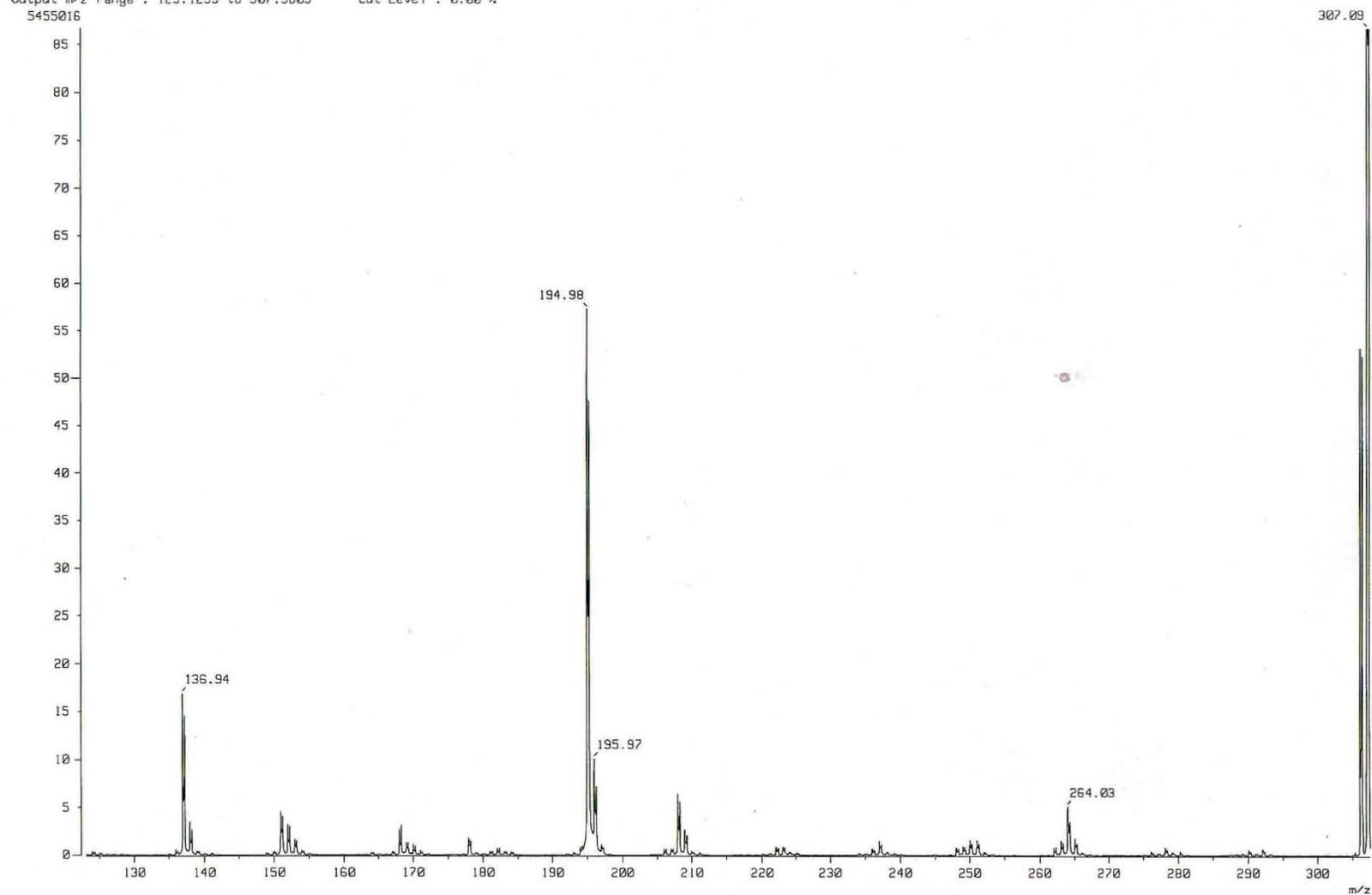


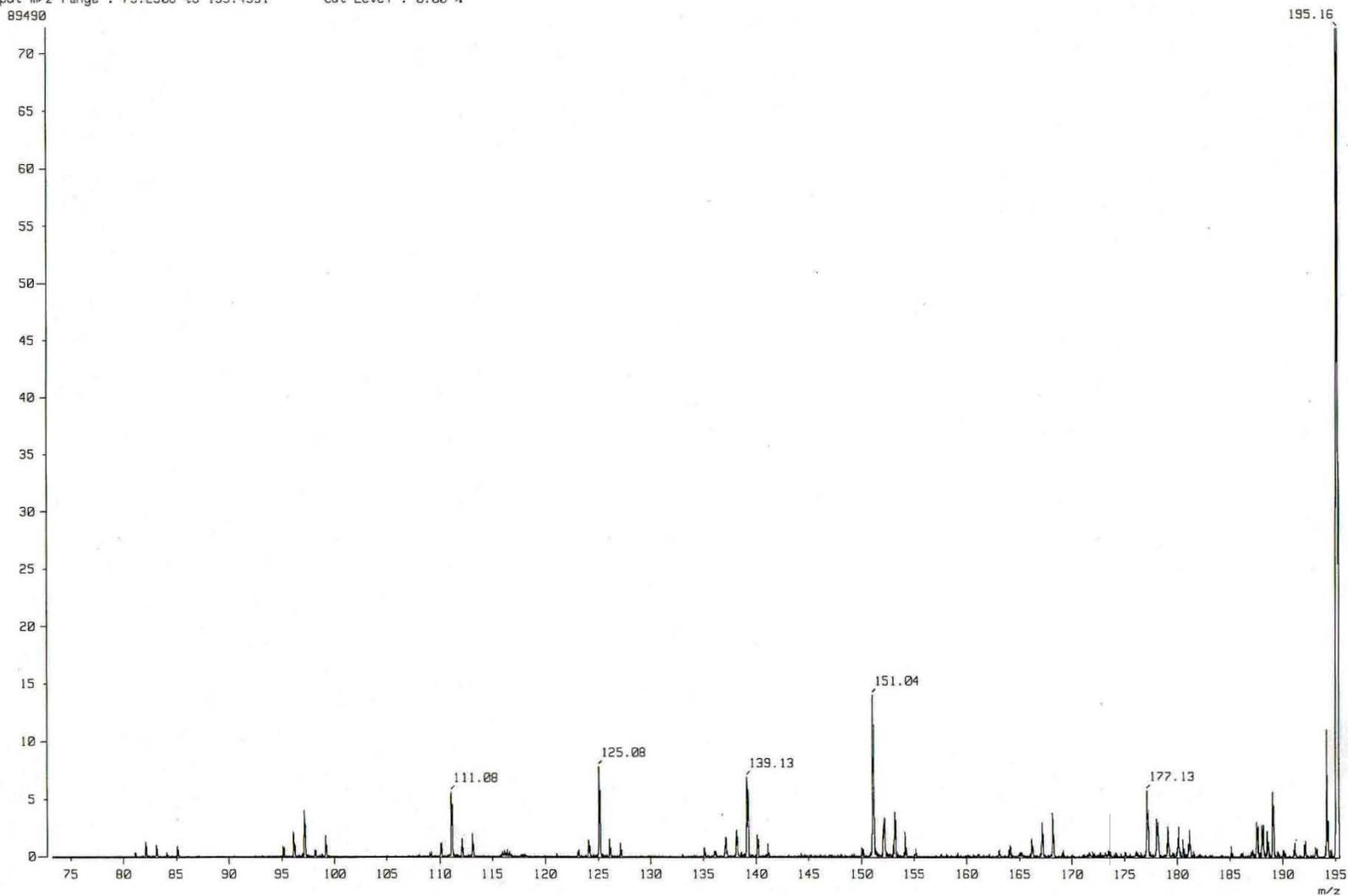
Figura 13. Fragmentos m/z 137, m/z 122 y m/z 94

Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Product (m/z 307.00, 1st FFR, FC: 0.00kV)
RT : 1.25 min Scan# : (6,11)
BP : m/z 307.0056 Int. : 100.00
Output m/z range : 123.1239 to 307.5009 Cut Level : 0.00 %
5455016

Espectro 3: "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 307.



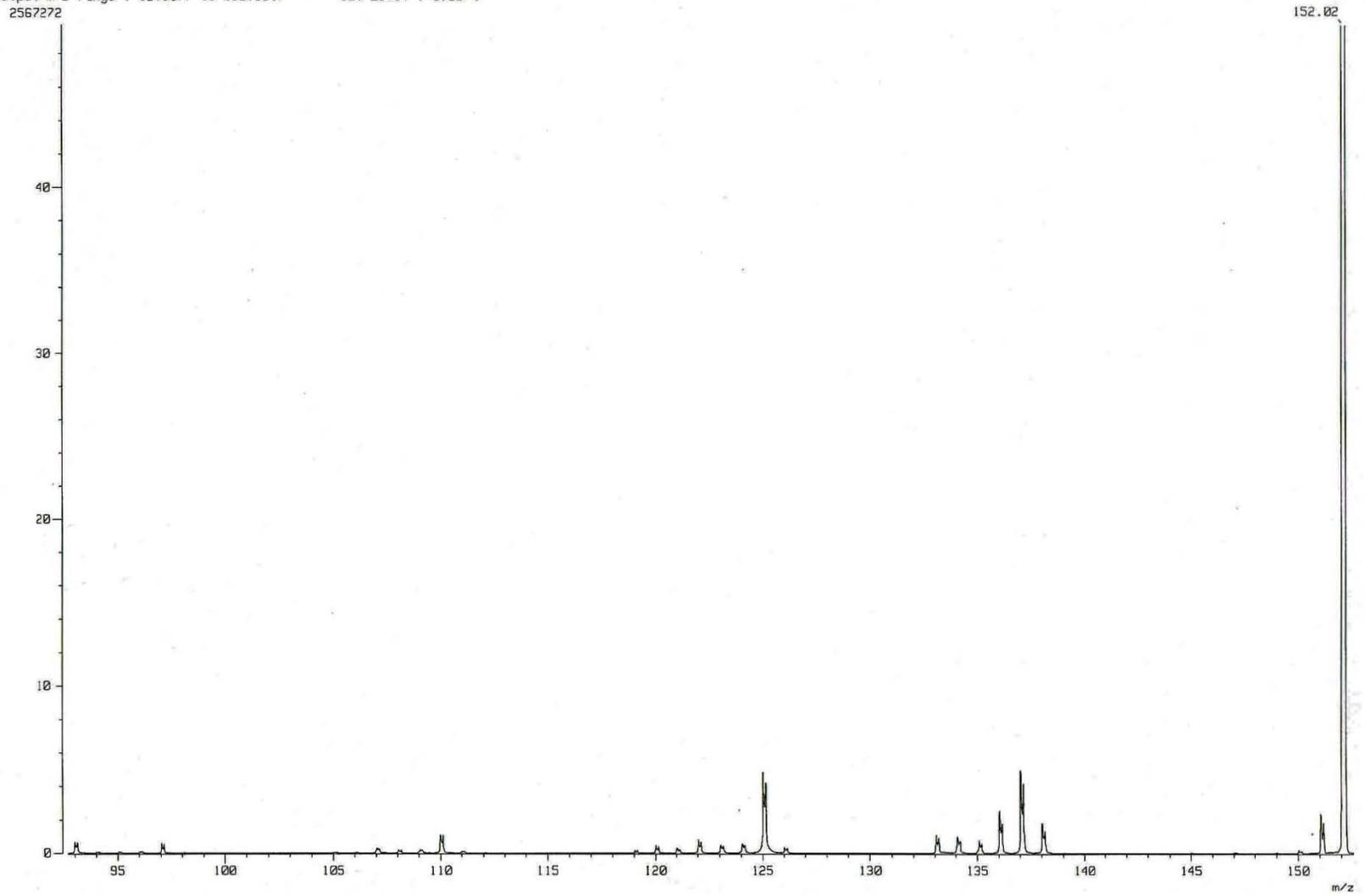
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Product (m/z 195.00, 1st FFR, FC: 0.00kV)
RT : 0.84 min Scan# : (3,9)
BP : m/z 195.1633 Int. : 1.69
Output m/z range : 73.2508 to 195.4331 Cut Level : 0.00 %



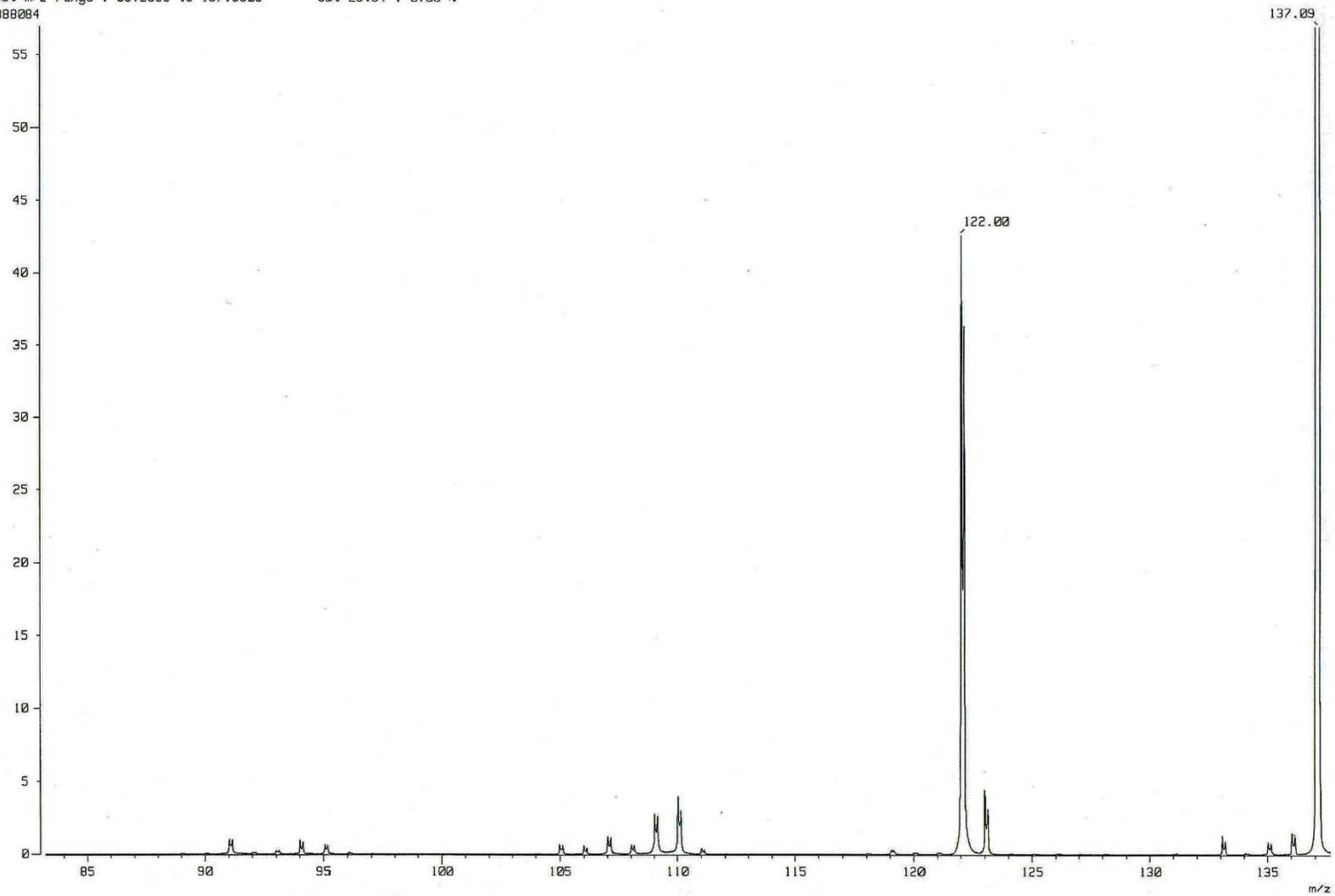
Espectro 4. "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 195

Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Product (m/z 152.00, 1st FFR, FC: 0.00kV)
RT : 0.34 min Scan# : (1,5)
BP : m/z 152.0212 Int. : 98.50
Output m/z range : 92.6877 to 152.5817 Cut Level : 0.00 %
2567272

Espectro 5: "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 152

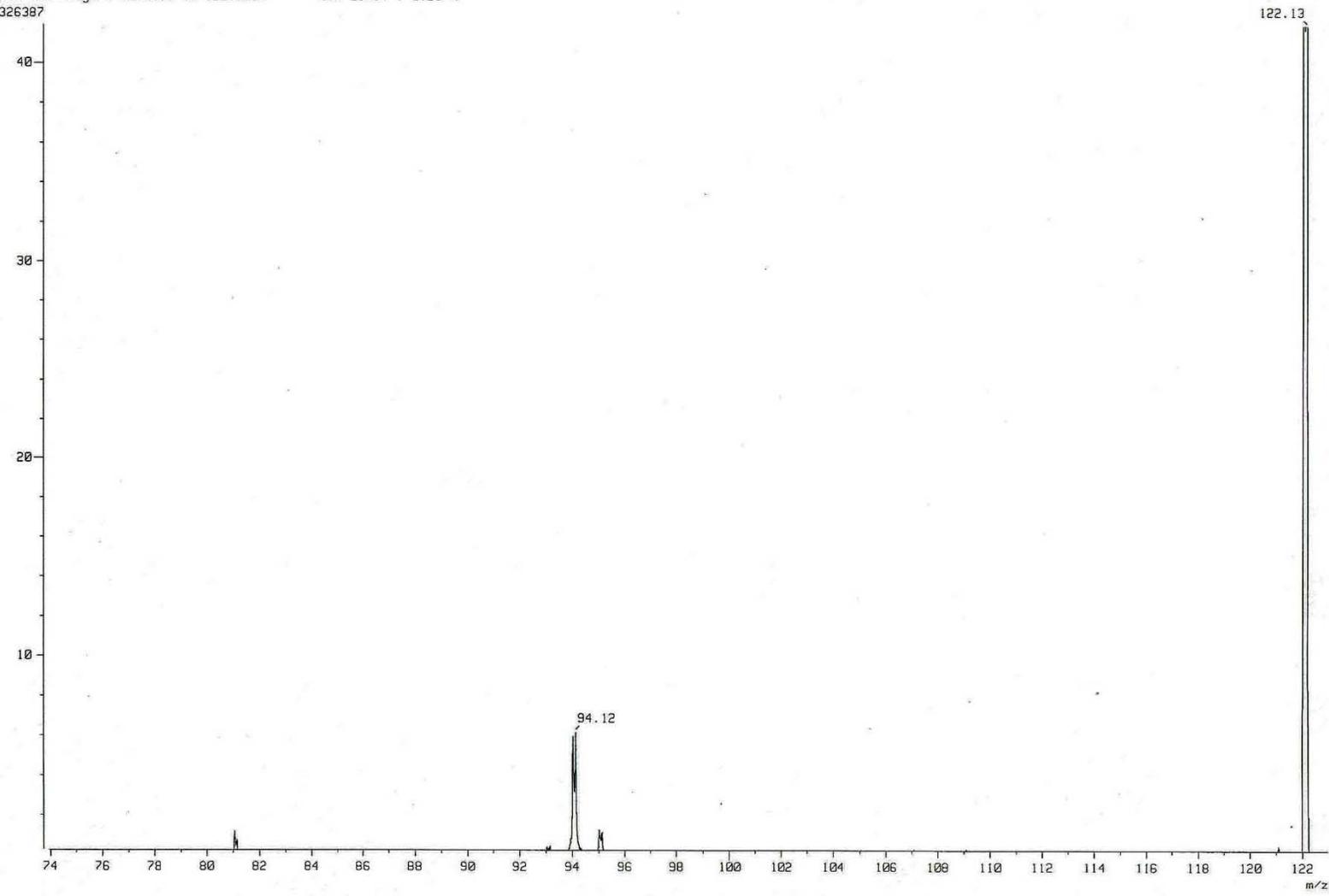


Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Product (m/z 137.00, 1st FFR, FC: 0.00kV)
RT : 1.25 min Scan# : (7,10)
BP : m/z 137.0943 Int. : 100.00
Output m/z range : 83.2366 to 137.6606 Cut Level : 0.00 %
2388084



Espectro 6. "Linked scan" para el fragmento de relación m/z 137

Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Product (m/z 122.00, 1st FFR, FC: 0.00kV)
RT : 1.92 min Scan# : (11,14)
BP : m/z 122.0130 Int. : 18.57
Output m/z range : 73.9331 to 122.9684 Cut Level : 0.29 %
326387



Espectro 7. "Linked scan" para el fragmento m/z 122.

Alta resolución

A efecto de acentuar más la validación de patrón de fragmentación propuesto que presenta tanto la capsaicina como la dihidrocapsaicina, se llevó a cabo en forma complementaria un estudio de alta resolución para cada fragmento de interés; en ese contexto, es apropiado comentar que las mediciones se encuentran dentro del intervalo permitido de error ± 10 ppm. Al respecto los datos correspondientes se encuentran confinados en la Tabla 6 en el cual se puede observar que la composición elemental, a manera de ejemplo, para el fragmento de 137 Da presenta una masa molecular exacta calculada de 137.0603 Da y una masa molecular exacta experimental de 137.0602 Da, con un error de -0.8 ppm, consistente para una composición elemental de $C_8H_9O_2$. En forma análoga al estudio antes realizado se validó la composición elemental y además se estableció como congruente la estructura del resto de los fragmentos **ii-v**.

Ion	Masa exacta experimental (Da, % ar)	Masa exacta calculada (Da)	Error (ppm)	Insaturaciones	Composición elemental
i	307.2164 (12.1)	307.2147	+5.4	5.0	$C_{18}H_{29}O_3N$
i	305.2006 (14.3)	305.1991	+5.0	6.0	$C_{18}H_{27}O_3N$
ii	195.0903 (8.3)	195.0895	+3.8	5.0	$C_{10}H_{13}O_3N$
iii	152.0715 (12)	152.0712	+2.2	4.5	$C_8H_{10}O_2N$
iv	137.0602 (100)	137.0603	-0.8	4.5	$C_8H_9O_2$
v	122.0369 (3.2)	122.0368	+1.3	5.0	$C_7H_6O_2$

% ar: porcentaje de abundancia relativa

Tabla 6. Principales fragmentos en 1 y 2

Marcado isotópico

Como ya se ha mencionado el etiquetado mediante isotopos es una forma muy útil de determinar mecanismos tanto de reacción como de fragmentación. En este caso se pudo aplicar esta metodología, puesto que la molécula en cuestión posee dos hidrógenos ácidos que pueden ser intercambiados por deuterio. Al realizar el marcado isotópico en la capsaicina, Figura 14, se pudo complementar la validación del mecanismo de fragmentación propuesto en este trabajo, Figura 10.

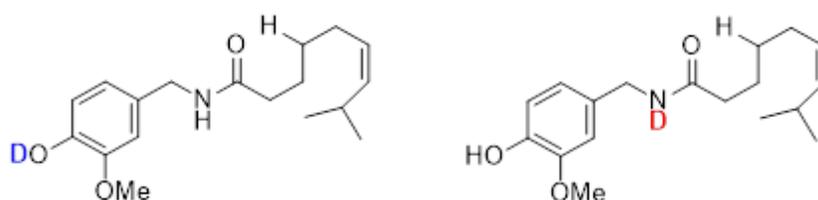
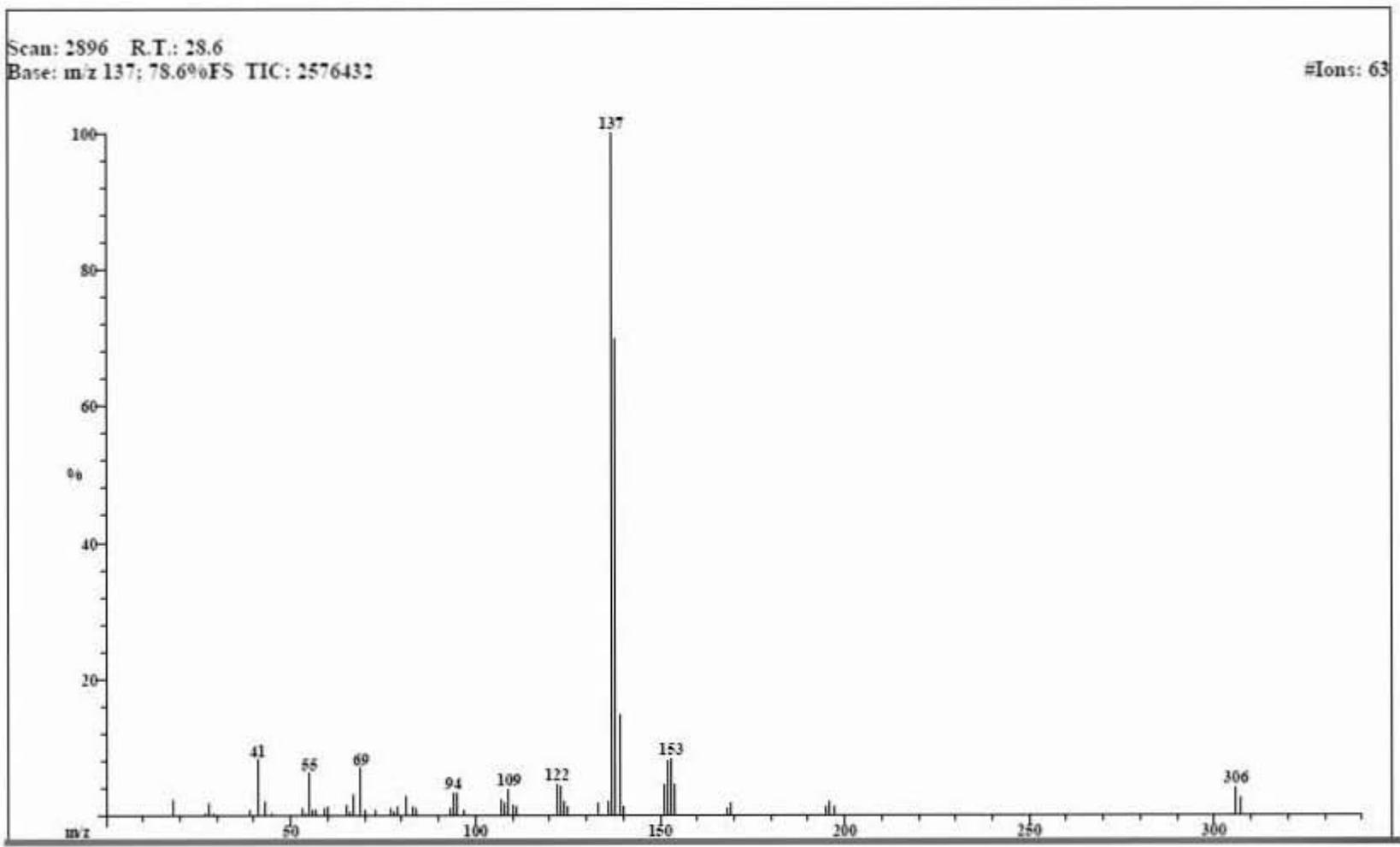


Figura 14. Estructuras de la capsaicina monodeuterada.

Al respecto, y de acuerdo al Espectro 7 por un lado se logra intercambiar un deuterio de manera principal ($\approx 66\%$), distribuido tanto en el grupo OH (fenólico) como en el grupo NH (amídico), es decir se genera una mezcla de capsaicinas monodeuteradas y bideuterada. La monodeuteración, se refleja mediante el nuevo ion molecular, m/z 306, indicativo de una unidad más debido inequívocamente a la incorporación de un átomo de deuterio; ello con respecto al ion molecular original de m/z 305. Como consecuencia de lo anterior la fragmentación conduce a la formación de los picos m/z 137 y m/z 138; es decir, si el deuterio se incorporó en el átomo de nitrógeno el pico base corresponde a m/z 137, porque el deuterio no se agregó en el anillo aromático; en consecuencia surgen de forma complementaria los fragmentos deuterados m/z 196 y m/z 153. En cambio si el deuterio se unió al oxígeno del oxhidrilo en el anillo aromático, el fragmento correspondiente al ion molecular es el de m/z 138, debido a una unidad de masa más del deuterio. Los comentarios anteriormente vertidos se presentan de manera resumida en la Figura 15, los cuales en forma suplementaria se validan mediante el dato de alta resolución vertido en la Espectro 8.

Espectro 8. Espectro de masas de la capsicina monodeuterada (IE, 70eV)



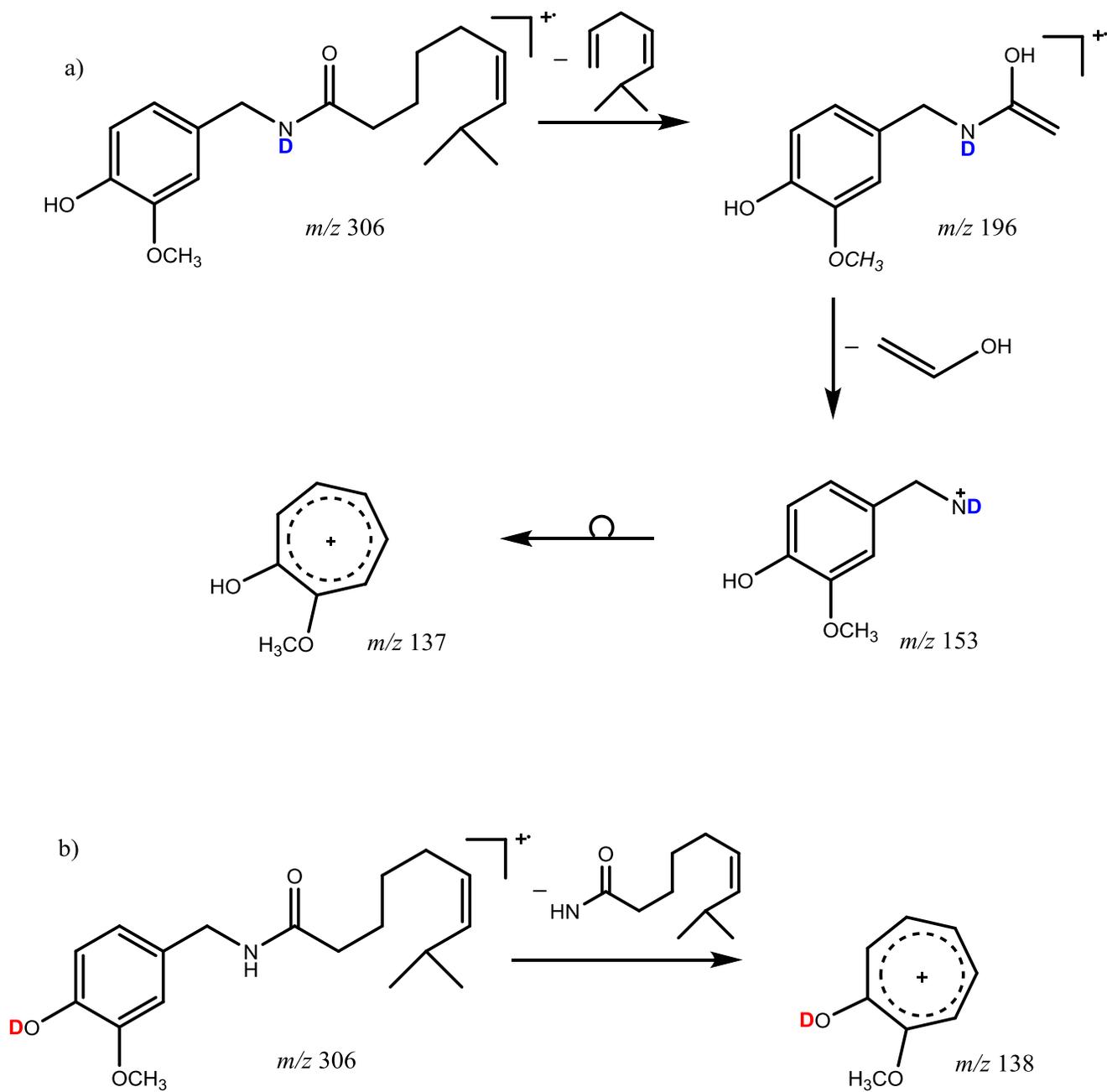
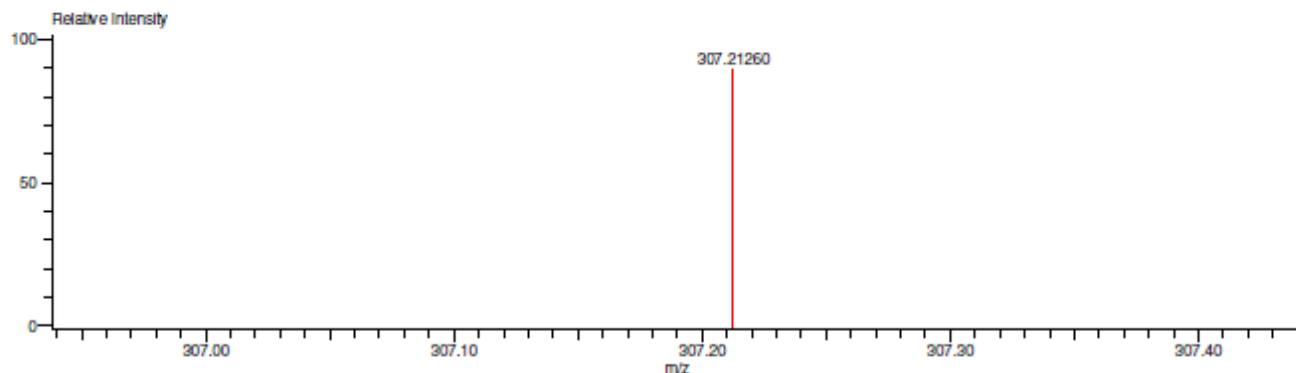


Figura 15. Fragmentación de las moléculas de capsaicina monodeuteradas.

Charge number:1
Tolerance:2.00(mmu)
Element:¹²C:0 .. 56, ¹H:0 .. 120, ²H:0 .. 2, ¹⁴N:0 .. 2, ¹⁶O:0 .. 4

Unsaturation Number:0.0 .. 10.0 (Fraction:.5)



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Possible Formula	Unsaturation Number
307.21260	44459.96	307.21319	-0.59	¹² C ₁₈ ¹ H ₂₇ ² H ₁ ¹⁴ N ₁ ¹⁶ O ₃	5.5

Espectro 9. Espectro de alta resolución de la capsaicina monodeuterada (DART)

En cuanto a la capsaicina bideuterada ($\approx 33\%$), esta se refleja mediante el respectivo ion molecular m/z 307, con el cual se fundamentan los fragmentos m/z 197 y m/z 154 además m/z 138, esto último de acuerdo a lo presentado en la figura 16, información congruente con el mecanismo de fragmentación propuesto (figura 10).

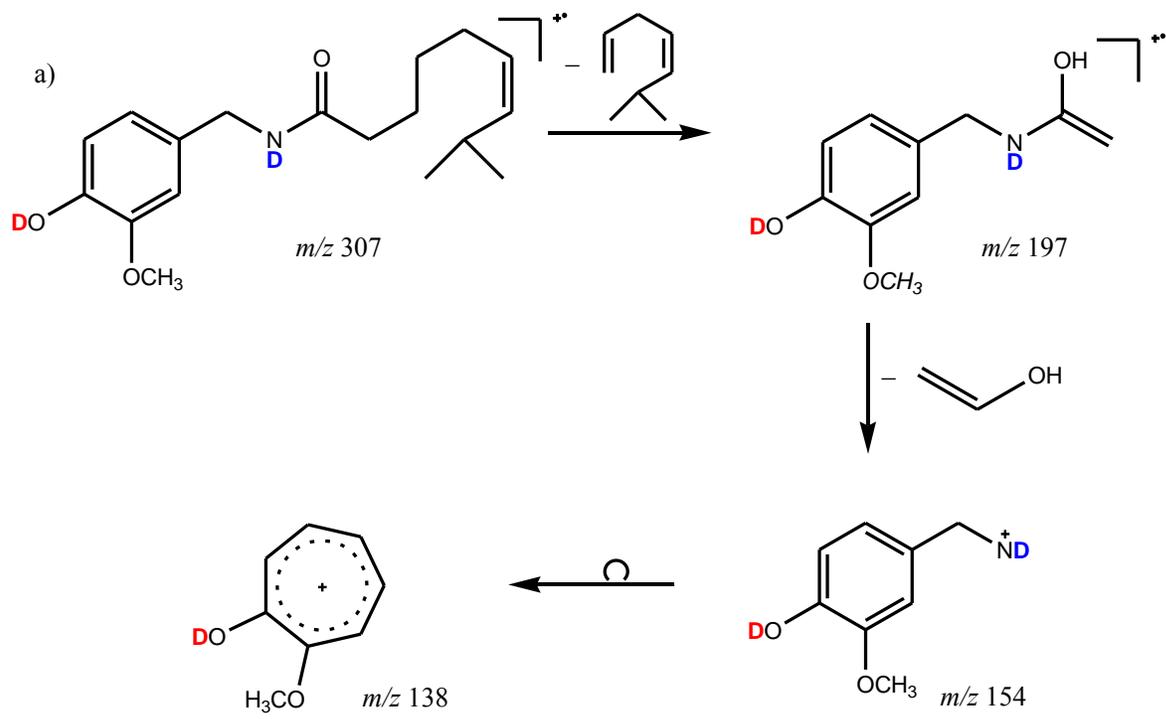


Figura 16. Fragmentos obtenidos de la capsaicina bideuterada

CONCLUSIONES

En primer lugar, resalta que tanto los objetivos propuestos como la hipótesis planteada, fueron cumplidos satisfactoriamente.

Respecto a las extracciones con las diferentes fuentes de energía, se obtuvieron las moléculas deseadas reduciendo tiempos y uso de disolventes. Además de que al compararlas con la realizada con el método tradicional de Soxhlet éstas lograron ser más eficaces.

Con relación al Protocolo de la química verde, y en referencia a las extracciones, se incidió adecuadamente en los principios 5 y 6: uso de disolventes o auxiliares seguros y diseño de la eficiencia energética, respectivamente.

En el mismo contexto de las extracciones, se lograron mejorar los resultados previamente publicados mediante el empleo del ultrasonido. Además es importante resaltar que se lograron mejores resultados de extracción, recurriendo al uso de irradiación infrarroja-media, de la cual no existe información previa.

Finalmente, respecto a la determinación de un nuevo mecanismo de fragmentación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina, tema principal de esta tesis, es importante comentar que se logró la validación de éste, utilizando distintas metodologías propias de la espectrometría de masas: impacto electrónico, alta resolución, “*linked scan*” y marcado isotópico.

Con lo cual se demuestra que el mecanismo de fragmentación que se encontraba previamente en la literatura no posee fundamentos por lo tanto, no está validado. Así, con esta propuesta validada se contribuye al acervo de patrones de fragmentación de la espectrometría de masas.

REFERENCIAS

- (1959). *Organic Synthesis Collective*, 49.
- (1963). *Organic Synthesis Collective*, 649.
- Adamson, A. W., Martín, G., & Munné, A. (1979). *Química Física*. Barcelona: Reverté.
- Allemann, K., R., Faraldos, J. A., González, V., Li, A., Yu, F., . . . Christianson, D. W. (2012). Probing the mechanism of 1,4-conjugate elimination reactions catalyzed by terpene synthases. *Journal of American Chemistry Society*, 20844-20848.
- Anastas, P. T., & Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York: Oxford University Press.
- Barbero, G. F., Palma, M., & Barroso, C. G. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 227-233.
- De aguiar, A. C., Sales, L. P., Countinho, J. P., Barbero, G. F., Godoy, H. T., & Martínez, J. (2013). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Capsicum Peppers: Global Yield and Capsaicinoid Content. *The journal of supercritical fluids*, 210-216.
- De Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2001). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- Doble, M., & Kruthiventi, A. K. (2007). *Green Chemistry and Engeineering*. Burlington: Academic Press.
- Domínguez, X. A. (1982). *Experimentos en química orgánica*. D.F.: Limusa.
- Domínguez, X. A. (1988). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. D.F.: Limusa.
- Gannett, P. M., Nagel, D. L., Reilly, P. J., Lawson, T., Sharpe, J., & Toth, B. (1988). The capsaicinoids: their separation, synthesis and mutagenicity. *Journal of Organic Chemistry*, 1064-1071.
- Hernández, J., Ochoa, A. A., López, E., & García, H. S. (2009). Capsaicinoids extraction during osmotic dehydration of Habanero chili pepper in brine. *Journal of Food*, 127-134.
- Kappe, C. O. (2004). Controlled microwave heating in modern synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 6250-6284.
- Kozukue, N., Han, J.-S., Kozukue, E., Lee, S.-J., Kim, J.-A., Lee, K.-R., . . . Friedman, M. (2005). Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Foods Chemistry*, 9172-9181.

- Mejia, L. A., Hudson, E., Gonzalez de Mejia, E., & Vazquez, F. (1988). Carotenoid content and vitamin A activity of some common cultivars of mexican peppers (*Capsicum annum*) as determined by HPLC. *Journal of Food Science*, 1440-1443.
- Miranda, R., Hernández, A., Angeles, E., Cabrera, A., Salmón, M., & Joshep-Nathan, P. (1990). Indicators for alkyl lithium assay. Nuclear magnetic resonance evidence for the dianion of benzophenonetosylhydrazone. *Analyst*, 1483-1485.
- Mukhopadhyay, M. (2000). *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. New York: CRC Press.
- Noguez Córdova, M., Flores Ramírez, C., Velasco Bejarano, B., Arroyo Razo, G. A., J., P. F., Carranza Tellez, V., & Miranda Ruvalcaba, R. (2011). Shortwave electric infrared the facts. *International Journal of Molecular Sciences*, 8575.
- Peña-Alvarez, A., Alvarado, L. A., & Vera-Avila, L. E. (2012). Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in hot peppers by ultrasound assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Instrumentation Science and Technology*, 429-440.
- Pino, J., Sauri-Duch, E., & Marbot, R. (2009). Changes in volatile compounds of Habanero chili pepper (*Capsicum Chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. *Food Chemistry*, 394-398.
- Purseglove, J. N., Brown, E. G., Green, C. L., & Robbins, S. R. (1981). Spices. En *Spices Vol. 1* (págs. 331-340). London and New York: Longman.
- Reyes-Escogido, M. d., Gonzalez-Mondragón, E. G., & Vazquez-Tzompantzi, E. (2011). Chemical and pharmacological aspects of capsaicin. *Molecules*, 1253-1270.
- Sagarpa. (10 de Septiembre de 2014). Obtenido de <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/infografias/Paginas/ChileMexicano.aspx>
- Takacs, L. (2013). The historical development of mechanochemistry. *Chemical Society Reviews*, 7649-7659.
- Tao Chi, H., & Baker, J. K. (1993). Use of deuterium-hydrogen exchange to characterize the fragmentation pathways of arteether and its metabolites in a thermospray mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 12-17.
- Villar del Fresno, A. M. (1999). *Farmacognosia General*. Síntesis.
- Watson, J., & Sparkman, O. (2008). *Introduction To Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.