



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

HIDRÓLISIS DE CAPSAICINOIDES EXTRAÍDOS POR DIOXIDO DE CARBONO  
SUPERCRÍTICO DE HARINA DE CHILE GUAJILLO CATALIZADA POR LIPASA B DE  
*Candida antarctica* (CALB)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Q.A. RODOLFO ALEJANDRO LANDA RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL  
DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA  
[Facultad de Química, UNAM Ciudad universitaria](#)

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTORIAL  
DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO  
[Facultad de Química, UNAM Ciudad universitaria](#)  
DR. FRANCISCO TERÁN RUIZ  
[Facultad de Química, UNAM Ciudad universitaria](#)

Ciudad Universitaria, Abril 2020.



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.

---

## RESUMEN

La catálisis enzimática en medios no convencionales ha aportado una alternativa en la síntesis de compuestos en medios no polares, con líneas de investigación en el comportamiento de los biocatalizadores y en la búsqueda de procesos más refinados y limpios. En el presente trabajo hemos indagado en los factores que afectan la hidrólisis enzimática de los capsaicinoides por la lipasa B de *Candida antarctica* en dióxido de carbono en estado supercrítico (CO<sub>2</sub>SC). El principal interés en el uso del CO<sub>2</sub>SC para la industria farmacéutica y de alimentos radica en eliminar el factor de riesgo de los disolventes orgánicos residuales en el producto terminado, por ello se cataloga como una tecnología limpia. En este estudio se hace la extracción de los compuestos no polares y polaridad media contenidos en el chile guajillo con el fin de obtener un colorante rojizo-amarillento, de interés principal es el grupo de los capsaicinoides, indeseables por su pungencia al tacto y al gusto. Como resultado el estudio se basa en la hidrólisis enzimática de los capsaicinoides extraídos en CO<sub>2</sub>SC para eliminar la pungencia del extracto final.

Los resultados presentados en este trabajo se basan en la interpretación del efecto de la actividad de agua ( $a_w$ ) sobre el biocatalizador y la extracción de carotenoides y capsaicinoides de la matriz del chile guajillo.

El  $a_w$  es el factor de estudio en la conversión de los capsaicinoides en CO<sub>2</sub>SC usando el biocatalizador Novozyme 435, donde se pudieron diferenciar tres zonas a lo largo de la escala del  $a_w$ . La región 1 pertenece a el  $a_w$  menor a 0.3, la región 2 entre 0.3 y 0.8 y región 3 mayor a 0.8. En la Región 1 el principal fenómeno descrito es por la adhesión de los carotenoides y xantofilas al soporte del biocatalizador. En la región 2 el cambio de la actividad acuosa es constante en la conversión de capsaicinoides a lo largo de esta región. En la región 3 la cantidad de agua en multicapas sobre el soporte del biocatalizador no permiten la difusión del solvente al interior.

Concluimos que la conversión de los capsaicinoides en CO<sub>2</sub>SC por la Novozyme 435, se ve afectado por el  $a_w$  del biocatalizador y por la presencia de carotenoides y capsaxantinas en el medio. También la extracción de los capsaicinoides y colorantes se ven afectados por el  $a_w$  en la harina de chile.

---

---

## Contenido

RESUMEN .....	2
I. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 Fluidos Supercríticos.....	5
1.2 Reacciones enzimáticas en dióxido de carbono en fluido supercrítico .....	7
1.3 Lipasa B. de <i>Candida antarctica</i> .....	9
1.4 Reacción de hidrólisis de capsaicina por CALB .....	10
1.5 Capsaicinoides .....	11
1.6 La materia prima: chile guajillo puya ( <i>Capsicum annuum longenses.</i> ) .....	12
II. ANTECEDENTES .....	14
2.1 Extracción de capsaicina y $\beta$ -caroteno del chile guajillo con CO <sub>2</sub> supercrítico .....	14
III. HIPÓTESIS .....	16
IV. OBJETIVO GENERAL .....	16
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
V. METODOLOGÍA.....	17
5.1 Preparación de la muestra de harina de chile guajillo puya.....	17
5.2 Análisis proximal de la muestra:.....	17
5.3 Almacenamiento de muestra de harina de chile guajillo puya.....	17
5.4 Método de cromatografía de capa fina (TLC) para identificación de capsaicinoides y vainillilamina .....	18
5.5 Obtención de oleoresina por dióxido de carbono en estado supercrítico.....	18
5.6 Hidrólisis enzimática en condiciones supercríticas .....	18
5.6 Análisis de los productos de reacción por cromatografía de líquidos. ....	19
5.8 Ajuste de $a_w$ de muestra y biocatalizador con soluciones sobresaturadas.....	19
5.9 Estrategia experimental .....	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	21
6.1 Espectros de absorción de UV-visible.....	22
6.2 Identificación y cuantificación de capsaicinoides y vainillilamina por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).....	26
6.3 Composición de los capsaicinoides totales en la muestra de harina de chile guajillo puya. ....	27
Controles de extracción.....	27
6.4 Resultados iniciales de la reacción de hidrólisis de capsaicinoides por CALB en fluido supercrítico.....	29
6.5 Efecto de la actividad acuosa en la reacción sobre capsaicinoides en CO <sub>2</sub> SC.....	30
6.5.1 Hidrólisis de capsaicinoides en actividades acuosas menores de 0.30 (región 1) .....	34

---

---

Efecto del $a_w$ sobre la extracción y solubilización en los capsaicinoides provenientes de harina de chile y de la oleoresina.....	35
6.5.2 Comportamiento de hidrólisis a actividades acuosas entre valores de 0.30 a 0.80.(Región 2).....	39
6.5.3 Comportamiento de hidrólisis a actividades acuosas mayores al valor de 0.80.(Región 3).....	39
VII. CONCLUSIONES .....	41
Bibliografía .....	42
Indice de Figuras .....	45
Indice de tablas .....	46

---

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Fluidos Supercríticos

En la década de los 70's y 80's ocurrió un crecimiento acelerado en el desarrollo y la investigación sobre las propiedades de los fluidos supercríticos por procesos industriales muy exitosos. Como ha sido el fraccionamiento de los componentes ligeros de los asfaltos obtenidos de la destilación del petróleo crudo, o la descafeinización del café, donde ambos procesos es necesario usar disolventes no polares perjudiciales a la salud y al medio ambiente.

Un fluido supercrítico es aquel compuesto que se encuentra por arriba de su presión y temperatura crítica donde el gas y el líquido coexisten. La figura 1 es el diagrama de fases del CO<sub>2</sub> donde enfatizamos que por arriba de los 31.1°C y 73.8 bares se encuentra el estado supercrítico para el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>SC).

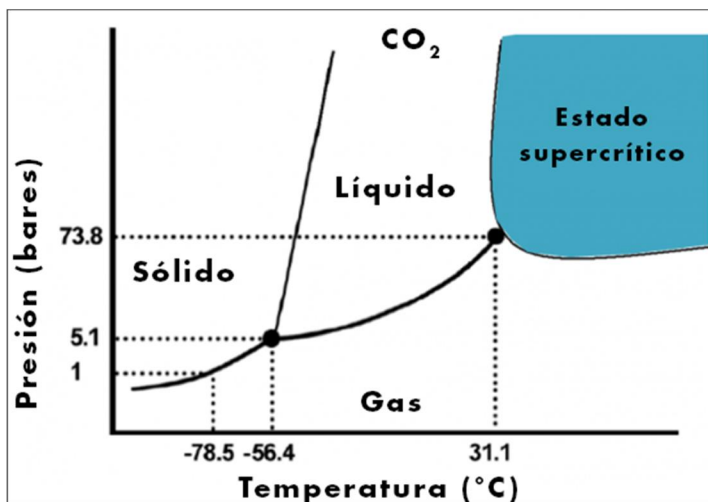


FIGURA 1. DIAGRAMA DE FASES DEL DIOXIDO DE CARBONO, ADAPTADA DE TAYLOR (1996).

Los fluidos supercríticos han sido estudiados y usados en la industria por las siguientes razones:

- Rápida disolución de solutos principalmente no polares. Poder disolvente
  - La densidad es cercana a la de los líquidos
  - La viscosidad es baja, cercana a la de los gases
  - La difusividad es alta, cercana a la de los gases
- 
- La velocidad de las reacciones se incrementa por efecto del disolvente en condiciones críticas como lo indica Taylor (1996), Las condiciones del fluido supercrítico cambian drásticamente por causa del

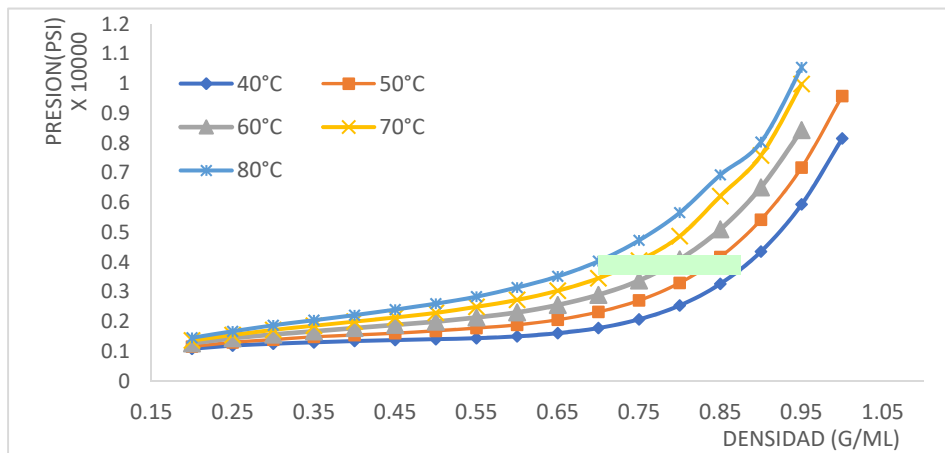
cambio en la temperatura. Por ejemplo las reacciones de esterificación de compuestos no polares.(Matsuda, Harada, & Nakamura, 2005)

Es de particular interés el caso del dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>SC), ya que ha sido usado como disolvente principalmente en la industria de alimentos y farmacéutica por ser inerte, no tóxico y no inflamable, además de poseer una adecuada capacidad de solubilización de sustancias hidrofóbicas.(Sato *et al.*, 1999)

El CO<sub>2</sub> supercrítico representa interés tecnológico debido a:

- Un ligero cambio en la relación temperatura/presión significa un cambio significativo en la densidad del fluido como lo muestra la figura 2. En el recuadro verde, se puede observar el intervalo de densidades en donde hay una separación altamente efectiva de los componentes.
- El producto final estará libre de disolventes, de manera que es más seguro para la ingesta, así mismo conveniente para el medio ambiente.
- El CO<sub>2</sub> puede ser reutilizado, lo que significa que el costo de operación se reduce.
- El CO<sub>2</sub> es un disolvente químicamente inerte, inactivo y poco reactivo, aunque puede formar carbamatos en presencia de nucleófilos fuertes.

Dadas sus características químicas, las condiciones operacionales para la Industria de alimentos y en la industria farmacéutica son relativamente bajas en términos de presión y temperatura para reacciones enzimáticas. Un inconveniente actual es el costo del equipo o maquinaria ya que deben de tener características de seguridad confiables por las altas presiones que pudieran ser requeridas.



**FIGURA 2. ISOTERMAS DE DENSIDAD DE FLUIDO SUPERCRTICO DE CO<sub>2</sub> EN FUNCIÓN DE LA PRESIÓN. ADAPTADA DE PERRY ET AL., (2007), CUADRO VERDE INDICA ÁREA DE EXTRACCIÓN ÓPTIMA PARA COMPUESTOS HIDROFÓBICOS.**

El parámetro de solubilidad del CO<sub>2</sub>SC se relaciona directamente con la densidad del fluido. De esta forma pueden compararse la capacidad solvatante del fluido supercrítico con disolventes comunes, como se aprecia en la tabla 1.

**TABLA 1. COMPARACIÓN RELATIVA DE SOLVATACIÓN (EXTRACCIÓN) ENTRE DISOLVENTES Y CO<sub>2</sub>SC A DIFERENTES DENSIDADES**

Disolvente	Densidad de CO <sub>2</sub> SC (g/ml)		
	1.23	0.9	0.6
Benceno, Cloroformo, Acetato de Etilo, Acetona	Sí es comparable	No es comparable	No es comparable
Ciclohexano, Tetracloruro de Carbono, Tolueno	Sí es comparable	Sí es comparable	No es comparable
Éter etílico, Pentano	Sí es comparable	No es comparable	Sí es comparable
Adaptado de (Rizvi, 1994)			

## 1.2 Reacciones enzimáticas en dióxido de carbono en fluido supercrítico

Las reacciones enzimáticas en fluidos supercríticos han sido estudiadas con gran interés por las ventajas que estas presentan:

- El CO<sub>2</sub> es económico, abundante, no tóxico, no inflamable y químicamente inerte.
- El CO<sub>2</sub>SC cambia a el estado gas por la despresurización recuperando fácilmente los productos de la reacción y las enzimas separadas de la fase y reusadas.
- La velocidad de transferencia de masa aumenta debido a la baja viscosidad y la alta difusibilidad del CO<sub>2</sub> presurizado.
- El CO<sub>2</sub> líquido y supercrítico tiene propiedades hidrofóbicas. Su polaridad es menor a la del hexano. Por lo tanto, la solubilidad de los sustratos hidrófobos es alta.
- La catálisis de una amplia variedad de reacciones químicas que no son factibles en disolventes acuosos debido al equilibrio termodinámico desfavorable, como la esterificación por hidrolasas y la carboxilación por descarboxilasa, es posible en CO<sub>2</sub> presurizado.
- También se pueden eliminar las reacciones secundarias dependientes del agua.



- 
- La partición de sustratos y productos en el sistema de dos fases que consiste en CO<sub>2</sub> presurizado y una capa acuosa, se utilizan para mejorar los rendimientos y eliminar las inhibiciones de enzimas por sustratos y productos.
  - La termoestabilidad de los biocatalizadores, en un sistema solvente casi anhidro, se puede mejorar, dependiendo del tipo de enzimas.
  - El control de la quimio, regio y estereoselectividad se promueven con la capacidad de ajuste de las propiedades del solvente mediante la manipulación de la temperatura y la presión.

Sin embargo, este tipo de sistemas también pueden presentar desventajas tales como:

- Inactivación de las enzimas, dependiendo del tipo.
- Es necesario un aparato de alta presión, por lo que el rendimiento espacio-tiempo debe ser alto.
- La transferencia de masa entre las fases para sistemas bifásicos es limitada. En los sistemas bifásicos que consisten en agua y CO<sub>2</sub>, las enzimas son solubles en la fase acuosa, mientras que los sustratos y productos están más disueltos en la fase de CO<sub>2</sub>.

Existe particular atención a las esterificaciones enzimáticas ya que estas se aceleran en el fluido supercrítico, como en el caso de ácidos grasos de grasa de leche y etanol con lipasas en CO<sub>2</sub> SC, que tardan aproximadamente 1 h, mientras que en disolventes orgánicos (etanol) se requiere de 120 h para llegar al mismo nivel de conversión del 30%. (Škerget & Knez, 1997). Donde resulta interesante que el efecto de la temperatura no es importante cuando la presión del sistema se ubica por arriba de los 30 MPa (4351.13 psi) en las reacciones de acidólisis de los triacilglicéridos. (Kobata *et al.*, 1999), de esta manera las esterificaciones a temperaturas convenientes se modifican para buscar el resultado de la reacción y modificar la presión sin efecto secundario.

Se han reportado reacciones enzimáticas con lipasas en medio continuo para la interesterificación de trioleína con ácido esteárico; para así obtener 1 estearil 2,3 dioleil glicerol y/o 1,3 diestearil 2 oleil glicerol y/o 1,2 dioleil glicerol y/o 2 oleil glicerol y ácido oleico, ya que la lipasa es regioespecífica hacia la posición 1 y 3, únicamente. En estos sistemas las condiciones de trabajo óptimas varían entre 40°C y 70°C con una presión entre 20MPa – 30MPa y un tiempo de residencia entre 15 y 100 s. Como en todas las reacciones en medios no acuosos, es de suma importancia que la microcantidad de agua sea entre 2-20mM. (Matsuda *et al.*, 2005; Škerget & Knez, 1997). La concentración de agua, en sistemas enzimáticos en fluidos supercríticos, a tiempos cortos de reacción tiene que ser relativamente alta (12mM) mientras que a tiempos largos de reacción es preferible mantener una baja concentración de agua (4mM; Matsuda *et al.*, 2005). El agua en las esterificaciones son parte de los productos, donde el equilibrio se invierte de acuerdo con la concentración de agua en el medio, pero el agua es necesaria para mantener la flexibilidad de la enzima para hacer la función catalítica.

Otro ejemplo de la importancia de las reacciones enzimáticas en medios no acuosos y su contribución a la selectividad de la reacción en función del medio, es el caso de la reacción de síntesis del alcohol isoamílico con un donador acilo (acetato, ácido acético, acetoacetato y ácido acético anhidro) donde se observó que de las

lipasas Lipozyme RMIM<sup>®</sup> y Novozyme 435<sup>®</sup>. Esta última presentó mejor conversión independiente del donador de acilos empleado, dicha enzima se encontraba inmovilizada e hidratada con el 1-2% de agua, no se requirió añadir agua para activarla. Se trabajó a 15 MPa y 40°C en CO<sub>2</sub> SC con una producción del 97% en acetato de isoamilo (Calvo, Romero, Alba, Ortiz, & Gutiérrez, 2002).

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB) es una enzima muy usada por el incremento de la flexibilidad de la estructura en el sitio catalítico que se traduce en una alta actividad (Hoang & Matsuda, 2017; Matsuda *et al.*, 2005), la CALB ha sido la más usada por su estabilidad en el medio de reacción. La secuencia de aminoácidos de CALB que se une al alcohol contiene un denominado "bolsillo estereoselectivo" (definido por Thr42, Ser47 y Trp104), que le da a la enzima una alta selectividad de sustrato hacia varios alcoholes secundarios, esta es una ventaja para definir la enantioselectividad en función de la presión y temperatura del fluido supercrítico. (Matsuda *et al.*, 2005)

### 1.3 Lipasa B. de *Candida antarctica*

La lipasa B de *Candida antarctica* (**E.C. 3.1.1.3**) (**Triacilglicerol hidrolasa**) tiene la capacidad de catalizar reacciones de transesterificación, alcoholisis, aminólisis, glicerólisis y síntesis de ésteres de ácidos grasos y amidas en medios acuosos y no polares. (Duarte, Castillo, Bárzana, & López-Munguía, 2000; Kobata *et al.*, 1999; Liu, Chen, & Yan, 2013; Secundo & Carrea, 2002).

La estructura primaria de esta lipasa está compuesta por 317 aminoácidos y el sitio activo está formado por 3 aminoácidos; Ser105, Asp187, His224.

En la figura 3 se muestra la estructura de la lipasa B representada en forma de caricaturas o listones (ribbons), en color rojo se muestra la estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice y en amarillo, la  $\beta$ -plegada; en azul se encuentra la triada catalítica.

(la ilustración de la enzima fue obtenida de "protein data bank" <https://www.rcsb.org/>. Código PDB 4K6G.

Esta enzima se encuentra disponible comercialmente con el nombre de Novozym 435<sup>®</sup>, la cual se describe como Lipasa B de *Candida antarctica*, inmovilizada en una resina acrílica hidrofóbica. Con una actividad regularmente de 10,000 PLU/g, (PLU = unidades de propil laurato, que corresponden a 1  $\mu$ mol de laurato de propilo por minuto en condiciones estándares), un pH óptimo de reacción entre 5 y 9, temperatura óptima entre 30 a 60°C. (Novozymes Biopharma DK A/S, 2014) Por lo consiguiente en este trabajo nos referiremos a la Novozyme 435<sup>®</sup> como Lipasa B o CALB.



FIGURA 3. REPRESENTACION DE LIPASA CALB EN AZUL RESIDUOS DE AMINOACIDOS DEL SITIO ACTIVO, ROJO ZONA DE ESTRUCTURA SECUNDARIA ALFAHELICE, AMARILLO ESTRUCTURA SECUNDARIA BETA PLEGADA ADAPTADA DEL PROTEIN DATA BANK. CÓDIGO PDB 4K6G.

## 1.4 Reacción de hidrólisis de capsaicina por CALB

La reacción de hidrólisis de los capsaicinoides se realiza sobre el grupo funcional de la amida, dejando como productos la vainillilamina y el ácido 8-metil-6-*trans* nonenóico (Figura 4). Dicha hidrólisis se probó por varias enzimas entre ellas proteasas y lipasas en medio acuoso y se observó que CALB (Novozyme 435) fue la que presentó mayor porcentaje de conversión con un 30%, seguido por la Esterasa Diversa 001 con un 8% y lipasa F con 1%.

A su vez, CALB B que presentó mayor actividad, fue probada en diferentes disolventes presentando mayor conversión en medio acuoso en 24 h. Sin embargo, también fueron probados otros medios menos polares como fue el caso de cloroformo/agua y no se observó reacción alguna.

La reacción se realizó a diferentes concentraciones de capsaicina mostrando un comportamiento típico de Michaelis-Menten, mediante una isoterma de saturación se determinó una  $K_m$  de 1.4 mM para capsaicina con una actividad específica de 22.5 nmol h<sup>-1</sup> por mg de enzima inmovilizada.

La enzima por arriba de los 70°C se inactiva rápidamente, pero su velocidad inicial es tres veces mayor que a 45°C. La reacción fue monitoreada por 84 h, donde a las 24 h la reacción llega al 50% y después de 72h llega al 70%, el máximo de conversión encontrada en este reporte (Duarte *et al.*, 2000).

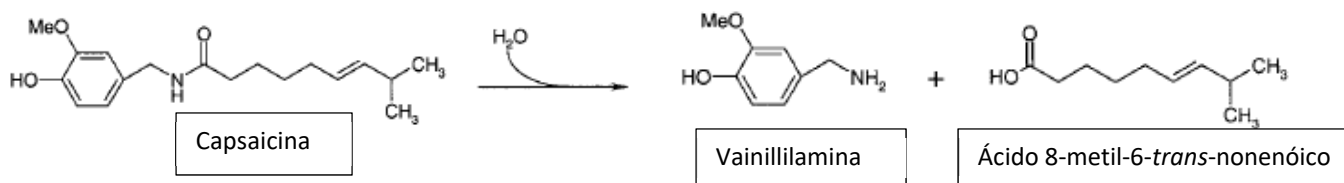


FIGURA 4. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE LA CAPSAICINA, PRODUCTOS VAINILLILAMINA Y ACIDO 8-METIL-6-TRANS-NO-NENOICO. ADAPTADO DE DUARTE *ET AL.*,(2000).

## 1.5 Capsaicinoides

En los frutos del género *Capsicum* las moléculas responsables de la pungencia son la capsaicina y la Dihidro-capsaicina, También se presentan otras especies como la norcapsaicina, la nordihidrocapsaicina, la homocapsaicina, la homodihidrocapsaicina que son menor importancia, pero muy distribuidas en el género *Capsicum*.

La capsaicina y la hidrocapsaicina representan entre el 80-90% de los compuestos que proporcionan la pungencia del chile. Los porcentajes de los compuestos que producen pungencia en diferentes especies de *Capsicum* se presentan en la siguiente tabla 2. Un dato relevante es que no se recomienda la cuantificación de capsaicinoides para la caracterización taxonómica, por su variación relacionado a factores relacionado a la cosecha, la misma distribución subcelular y la influencia del ambiente (Kirschbaum-Titze *et al*, 2002).

TABLA 2. DISTRIBUCIÓN DE CAPSAICINOIDES MÁS REPRESENTATIVOS DE ALGUNAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *CAPSICUM*

<i>Especie</i>	Capsaicina	Dihidrocapsaicina	Nordihidrocapsaicina
<b><i>C. annuum</i></b>	35-50%	40-45%	10-15%
<i>C. frutescens</i>	65-75%	22-26%	1-4%
<i>C. baccatum</i>	30-60%	30-60%	5-7%

Extraído de (Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002)

La capsaicina (trans 8-metil-N-vainillil-6 nonenamida) es el alcaloide lipofílico de mayor cantidad en los frutos del género *Capsicum*, usada como aditivo de alimentos y se encuentra principalmente en las placentas del fruto. La pungencia del fruto se mide mediante una prueba sensorial llamada prueba de Scoville, en la que la capsaicina pura reporta un valor de 16 millones de unidades conocidas como unidades Scoville (Scoville, 1912). El chile habanero presenta alrededor de 300,000 unidades Scoville, contra el pimiento morrón con solo 0-100 unidades Scoville. El umbral de la capsaicina en la cavidad bucal es de 15-17 ppm y aproximadamente entre 100 y 1000 unidades Scoville. La capsaicina es insoluble en agua fría y muy soluble en alcohol etílico, acetona, éter etílico y otros disolventes. La descripción de la estructura general de los capsaicinoides es una estructura con un grupo vainilloico, un grupo amida-ácido y una cadena hidrocarbonada como se muestra en la figura 5.

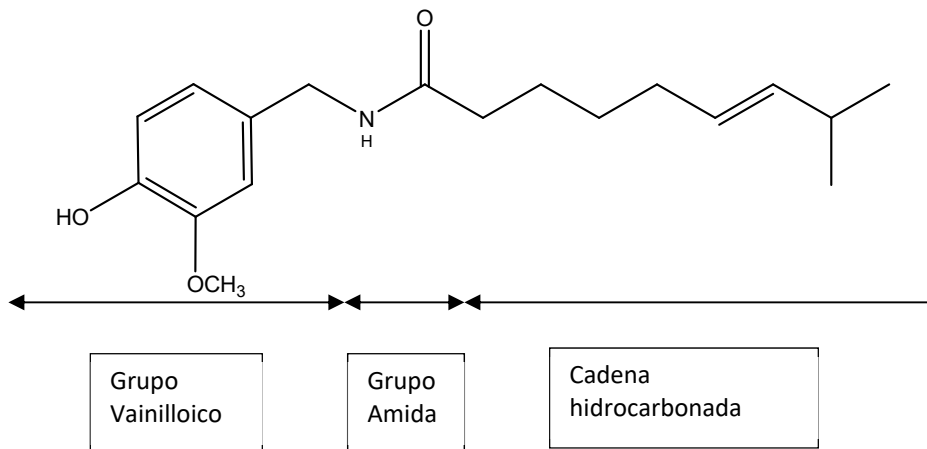


FIGURA 5. MOLÉCULA DE CAPSAICINA, MOSTRANDO LOS GRUPOS FUNCIONALES DE IMPORTANCIA, GRUPO VAINILLOICO, AMIDA Y CADENA HIDROCARBONADA.

El enlace de importancia para este trabajo es el enlace ácido-amida, ya que es el grupo funcional de hidrólisis reportado para la lipasa B (Duarte *et al.*, 2000).

## 1.6 La materia prima: chile guajillo puya (*Capsicum annuum longenses*.)

El chile guajillo pertenece al género *Capsicum* de la familia Solanaceae. Se han reportado aproximadamente 20 o 30 especies de este género abarcando desde la región tropical de área norte de Sudamérica, América Central, México y algunas islas de la región. Actualmente, son reconocidas cinco especies domesticadas de *Capsicum*: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens*.

El chile guajillo puya, *Capsicum Annuum longenses*, presenta diversos colorantes como son; los carotenoides y las xantófilas (entre ellas cantaxantinas, zeaxantinas y capsaxantinas) que proporcionan colores desde amarillos hasta un rojo intenso. A su vez, los carotenoides presentes son carotenos, bixina, cis-bixina, capsantina y capsorubina entre otros. La capsantina contribuye de un 30 a un 70% de los compuestos coloridos (Moorkoth *et al.*, 2014). Como se puede observar en la figura 6, la cadena hidrocarbonada insaturada es común para los colorantes, y los grupos funcionales de los extremos dan diferencia en el color y en sus propiedades físicas y químicas.

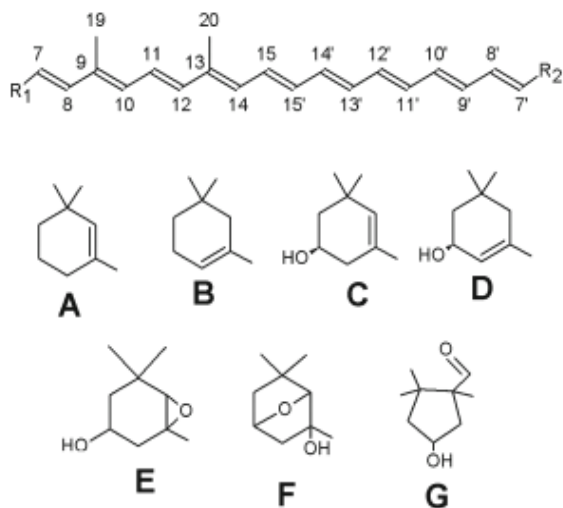


FIGURA 6. ESTRUCTURA Y NOMBRE DE LOS COMPUESTOS COLORIDOS DEL GENERO *CAPSICUM SP*, ADAPTADO DE Moorkoth *et al.*, (2014).

Compuestos coloridos	R1	R2
Beta Caroteno	A	A
Alfa Caroteno	A	B
Capsaxantina	C	G
Capsaxantina-5,6 epóxido	E	G
Capsaxantina-3,6 epóxido	F	G
Capsorubina	G	G
Criptocapsina	A	G
Alfa criptoxantina	C	B
Beta criptoxantina	C	A
Luteína	C	D
Antheraxantina	E	C
Violoxantina	E	E
Zeaxantina	C	C

La cantidad de capsaicinoides reportados para el chile guajillo puya oscilante entre 177 hasta 2900  $\mu\text{g/g}$  de chile seco, y carotenoides como color total desde 1250 hasta 1733  $\mu\text{g/g}$  de chile seco distribuido en la especie *Capsicum annuum* (Kirschbaum-Titze *et al.*, 2002; Moorkoth *et al.*, 2014; Santamaría *et al.*, 2000).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Extracción de capsaicina y $\beta$ -caroteno del chile guajillo con $\text{CO}_2$ supercrítico

En la extracción de los capsaicinoides con  $\text{CO}_2\text{SC}$ , se reportó la solubilidad de la capsaicina es entre  $16\text{-}30 \times 10^{-5}$  fracción mol a una temperatura de entre  $25^\circ\text{C}$  y  $40^\circ\text{C}$  en  $\text{CO}_2$  por Knez & Steiner (1992) y también en 1997, Knez & Skerget publicaron que la solubilidad de la capsaicina se ve disminuida en presencia de los colorantes lipofílicos, mientras que la solubilidad del pigmento no cambia en presencia de capsaicina y a su vez reportan que la extracción de  $\beta$ -caroteno y capsaicina a 90 bar (1305 psi) y  $40^\circ\text{C}$  obtienen un color amarillo-naranja y con alta cantidad de capsaicinoides.

La extracción de los colorantes y capsaicinoides es función de la densidad, como se muestra en la figura 7 donde, a densidades mayores de 0.65 g/ml se realiza la extracción de capsaicinoides y colorantes según lo reportado por Moreno (2000). Cabe señalar que a 280 nm se relacionan con capsaicinoides y 447 y 470 nm se relacionan con carotenoides y capsaxantinas.

Por medio de la modificación de la densidad del  $\text{CO}_2$ , es posible incrementar la densidad del  $\text{CO}_2\text{SC}$  hasta presentar similitud en polaridad a disolventes no polares como acetonitrilo, éter etílico y hexano. La extracción de colorantes y capsaicinoides por  $\text{CO}_2$  a 0.95g/ml, 90 Bar y  $40^\circ\text{C}$  es muy similar a la extracción por el hexano, mismo que se presenta en la tesis de Moreno (2000) mostrando la similitud de los extractos con disolventes orgánicos y  $\text{CO}_2\text{SC}$  a diferentes densidades, reproduciendo los resultados de Knez (1997), como se muestra claramente en la figura 7.

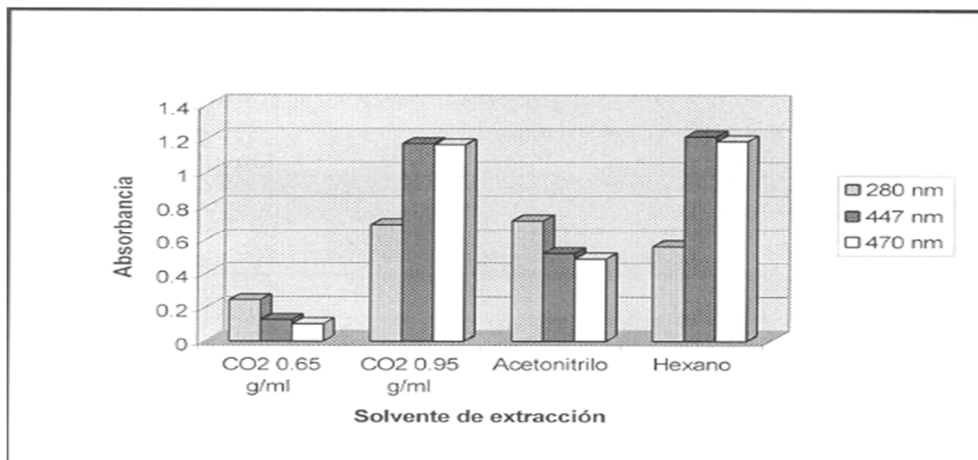


FIGURA 7. EFECTO DE LA DENSIDAD DEL  $\text{CO}_2\text{SC}$  EN LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES Y CAPSAICINOIDES ADAPTADA DE MORENO, (2000).

También se han extraído bixina, norbixina y cis bixina del annato (achiote mexicano), obteniendo resultados satisfactorios con CO<sub>2</sub> SC. Las condiciones de trabajo fueron 360 Bar y 60°C. La extracción del β-caroteno fue mayor que de la bixina, ya que la solubilidad del caroteno no se ve afectada por presencia de la bixina (Nobre *et al.*, 2001)

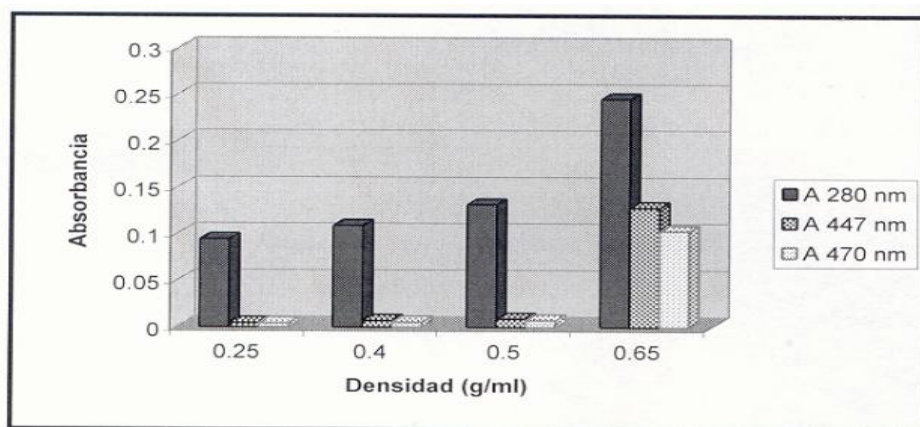


FIGURA 8. EFECTO DE LA POLARIDAD DEL SOLVENTE EN LA SOLUBILIDAD DE LOS CAPSAICINOIDES Y COLORANTES ADAPTADA DE MORENO (2000).

Cabe mencionar que en dichos estudios no hay referencia de haber estandarizado el tamaño de la partícula de las matrices utilizadas y el  $a_w$  de la harina del chile.



---

### III. HIPÓTESIS

- El nivel de conversión de los capsaicinoides por hidrólisis en medio CO<sub>2</sub> supercrítico por CALB es dependiente de la Presión/Temperatura y de la actividad acuosa ( $a_w$ ) en el biocatalizador.
- La hidrólisis de los capsaicinoides en CO<sub>2</sub> supercrítico como medio de reacción será comparable con las reacciones en otros medios no convencionales.

### IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la viabilidad de llevar a cabo la hidrólisis de capsaicinoides provenientes de la harina de chile guajillo puya (*Capsicum annuum L.*) en CO<sub>2</sub> SC por medio de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada con el fin de conseguir un extracto de colorantes de chile guajillo con la menor pungencia posible.

#### 4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar las mejores condiciones de extracción de los capsaicinoides de la harina de chile guajillo, para obtener los niveles de conversión máximos.
- 2.- Conocer la conversión de hidrólisis de los capsaicinoides mediante CALB en CO<sub>2</sub>SC y los posibles factores que afecten a la conversión, para conocer la eficiencia del proceso y su optimización y poder hacer la comparación con otros métodos de conversión o extracción.
- 3.- Establecer las condiciones de hidrólisis de los capsaicinoides extraídos de harina de chile guajillo en CO<sub>2</sub>SC catalizado por CALB, para obtener la factibilidad de la hidrólisis en una mezcla de reacción compleja en el disolvente CO<sub>2</sub>SC.

---

## V. METODOLOGÍA

### 5.1 Preparación de la muestra de harina de chile guajillo puya.

El chile guajillo puya se compró en el mercado de Xochimilco, en la Ciudad de México, fue limpiado, retirándole el pedúnculo y el cáliz (rama y base de la rama que sostiene el fruto). La molienda se realizó en un molino de rodillos acanalados. Posteriormente, se introdujo para su almacenamiento en bolsas metalizadas con zip-lock y almacenadas en ultracongelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se separaron las fracciones retenidas en malla USA standard 10 (2mm), 20 (0.850 mm) y 40 (0.425 mm).

En las extracciones y reacciones de harina de chile se utilizaron las fracciones menores a malla 40 y retenida en malla 20 (entre 0.425 mm y 0.850 mm).

### 5.2 Análisis proximal de la muestra:

La caracterización de la muestra es la primera etapa del análisis de la extracción de colorantes y capsaicinoides del chile guajillo puya. Las determinaciones fueron las siguientes:

Humedad. - Secado en horno a  $110^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante

Grasa. - Extracción por Soxhlet con éter etílico a  $100^{\circ}\text{C}$ / 8 h

Proteína. - Método de Kjeldahl, factor utilizado 6.25

Cenizas. - Ignición de muestra y calcinación en mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante

Carbohidratos totales. - Cálculo por diferencia

La metodología seguida para el análisis proximal en base a los métodos oficiales de la A.O.A.C para el análisis de especias. Humedad: método AOAC 941.11; grasa: Método AOAC 940.29; Proteína: método AOAC 920.165; Cenizas: Método AOAC 941.12.

### 5.3 Almacenamiento de muestra de harina de chile guajillo puya.

Para almacenar la harina de chile, esta se introdujo en bolsas metalizadas de 500 g con cierre hermético y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  en congelador REVCO para toda la experimentación. Previo al uso de una muestra y para evitar la humidificación de esta, se trasladó a un desecador al vacío con cloruro de calcio como deshidratante, dejando que la temperatura se equilibre a la del medio ambiente.

---

## 5.4 Método de cromatografía de capa fina (TLC) para identificación de capsaicinoides y vainillilamina

El análisis de identificación de capsaicinoides y vainillilamina por medio de cromatografía en capa fina (TLC) fue un recurso rápido para conocer si la reacción se llevaba a cabo. La cromatografía en capa fina separa los sustratos y los productos.

La fase móvil empleada fue dietil éter: acetato de etilo en una relación 7:1 a temperatura ambiente, como revelador de las aminas primarias, se empleó ninhidrina, la cual se roció una vez que la fase móvil eluyó completamente en la cromatoplaque y posteriormente se calentó a 90°C hasta la aparición de color oscuro. El color café oscuro fue indicador de la presencia de aminas primarias y, por tanto, indicador positivo de reacción. Se identificaron los capsaicinoides y vainillilamina con estándares puros. Los capsaicinoides no hacen reacción para aminas primarias y la vainillilamina si lo hace, ambas en presencia de ninhidrina.

## 5.5 Obtención de oleorresina por dióxido de carbono en estado supercrítico.

La oleorresina se extrajo en un reactor de alta presión a 345 bar y 60°C para garantizar que el CO<sub>2</sub> se encontrara en condiciones líquidas durante 5 horas. Posteriormente el reactor se enfrió y se recuperó y se almacenó la oleorresina. La obtención de la oleorresina fue realizada en condiciones estandarizadas como se realizaría la reacción con la lipasa

## 5.6 Hidrólisis enzimática en condiciones supercríticas

En la reacción se usaron tres tipos de muestras: oleorresina extraída con CO<sub>2</sub> supercrítico, harina de chile y una mezcla natural de capsaicinoides. 5 g de muestra o su equivalente en oleorresina (3.5 g) o capsaicinoides (0.03 g) se colocaron en un contenedor de malla de acero inoxidable con 2 g de CALB, después se introdujo el CO<sub>2</sub> al reactor y se llevó a las condiciones supercríticas descritas previamente para alcanzar una densidad de 0.8-0.9 g/mL.

El muestreo se realizó con un tubo de acero inoxidable con 3 válvulas con el volumen conocido de 5 ml.

El tubo de muestra se despresurizó y el gas burbujeado en etanol, posteriormente el tubo se lavó con etanol y con una mezcla acetona-hexano, la muestra se recuperó en un vial, donde se evaporó el disolvente y la muestra se resuspendió en 1 mL aforado de etanol grado HPLC.

Los productos de la reacción se analizaron por espectrofotometría UV-Vis y cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés)

---

## 5.6 Análisis de los productos de reacción por cromatografía de líquidos.

Para el análisis UV-VIS se diluyó 0.5 mL de muestra en 5 mL de etanol, posteriormente nuevamente en 2mL y se aforó a 10 mL de etanol y se realizó un barrido espectrofotométrico, en un equipo Perkin Elmer Lambda 35, desde 220 hasta 600 nm.

Los productos de reacción se analizaron en un equipo HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos con una bomba cuaternaria e inyector automático. Se inyectaron 10  $\mu$ L de muestra a una columna Waters C<sub>18</sub> de 3.9 X 150 mm., 5  $\mu$ m con precolumna de C<sub>18</sub> de 4 x 40 mm. Se empleó una fase isocrática acetonitrilo-agua (70-30%), la presión en la columna fue de 75 Bar a un flujo de 0.8 mL/min.

Se emplearon como estándares:

Estandares de Capsaicina >95%; CAS 404-86-4; Sigma Chemicals Co.

mezcla de capsaicinoides al 60% de Sigma Chemical Co;

hidrocloruro de 4-hidroxy-3-metoxibenzilamina (vainillilamina) >98%; CAS No 7149-10-2 ; Sigma chemicals Co

## 5.8 Ajuste de $a_w$ de muestra y biocatalizador con soluciones sobresaturadas

Las muestras de chile guajillo y el biocatalizador fueron acondicionadas a diferentes  $a_w$  usando soluciones salinas saturadas, las muestras se colocaron en un recipiente de vidrio herméticamente sellado a temperatura ambiente durante 72 h y conteniendo la solución salina correspondiente. La actividad acuosa fue verificada por un equipo de medición rotronic " $a_w$  meter". Las soluciones salinas saturadas y actividades acuosas entre paréntesis con desviación estándar son a 25°C: cloruro de litio (0.113  $\pm$  0.003) cloruro de magnesio (0.328  $\pm$  0.002), carbonato de potasio (0.432  $\pm$  0.004), nitrato de magnesio (0.529  $\pm$  0.002), cloruro de sodio (0.753  $\pm$  0.001), cloruro de potasio (0.843  $\pm$  0.003), sulfato de potasio (0.973  $\pm$  0.005), para  $a_w$  menores de 0.113, la muestra es liofilizada (Labuza, 2001), dichas soluciones fueron preparadas de acuerdo a las tablas conocidas de solución saturada (constante de solubilidad), calentándolas a ebullición y enfriando a temperatura ambiente.

**TABLA 3. ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ ) DE SOLUCIONES SATURADAS USADAS A TEMPERATURA DE 25°C. DATOS OBTENIDOS DE LABUZA (2001).**

Sales usadas	25°C
Cloruro de litio (LiCl)	0.113
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	0.328
Nitrato de magnesio (Mg[NO <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> )	0.529
Carbonato de potasio (K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	0.432
Cloruro de potasio (KCl)	0.843
Sulfato de potasio (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0.973
Cloruro de sodio (NaCl)	0.753

## 5.9 Estrategia experimental

1. Análisis exploratorios con capsaicinoides como reactivo químico, enzima CALB en medio CO<sub>2</sub>SC para conocer si la hidrólisis es positiva en condiciones del CO<sub>2</sub> supercrítico
2. Análisis exploratorios con harina de chile guajillo, enzima CALB en medio CO<sub>2</sub>SC para conocer si la hidrólisis es positiva en condiciones supercríticas.
3. Reacción de hidrólisis de capsicinoides de harina de chile guajillo, enzima CALB en medio CO<sub>2</sub>SC condiciones supercríticas modificando el  $a_w$  del biocatalizador (enzima-soporte) y de la harina de chile.
4. Reacción de hidrólisis de capsicinoides de oleoresina de chile guajillo, Enzima CALB en medio CO<sub>2</sub>SC condiciones supercríticas modificando el  $a_w$  de enzima.
5. Reacción de hidrólisis de capsicinoides de estándar químico, Enzima CALB en medio CO<sub>2</sub>SC, condiciones supercríticas modificando el  $a_w$  de la Enzima.
6. Cinética de extracción de capsaicinoides y colorantes naturales de Harina de chile a diferente  $a_w$
7. Máximo de solubilidad de capsaicinoides de estándar químico en las condiciones de reacción
8. Máximo de solubilidad de capsaicinoides de oleoresina en las condiciones de reacción.

*La estrategia #1 y #2* permite iniciar la definición del protocolo de proyecto de investigación.

*La estrategia #3*, de acuerdo a la bibliografía la enzima CALB a bajos  $a_w$  mostraba un impacto en los máximos de conversión para la reacción de hidrólisis.

---

*La estrategia #4* Identificamos los factores relacionados a la extracción de los capsaicinoides de la harina de chile. Así, quedaron los capsaicinoides y colorantes naturales rápidamente solubles y disponibles para el estudio de la reacción.

*La estrategia #5* nos permitió eliminar el factor de extracción y solubilidad de capsaicinoides por la presencia de los carotenoides y xantófilas afectando la solubilidad. A su vez, se verifica la contribución del soporte del biocatalizador sobre la adsorción por compuestos relacionados en la reacción.

*La estrategia #6* nos permite conocer si los capsaicinoides y la capsaicina se extraen diferencialmente en el tiempo mientras se llega a las condiciones de reacción.

*La estrategia #7 y #8* nos permiten conocer si la solubilidad es la misma en estándar químico y en matrices más complejas conteniendo carotenoides, xantófilas y aceites presentes en la oleoresina.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de caracterizar la muestra se realizó el análisis proximal con base en los métodos oficiales de la A.O.A.C para el análisis de especias donde posteriormente en la tabla 4 mostramos el comparativo y el resultado obtenido.

Los datos obtenidos reflejan de la gran variabilidad del manejo, almacenamiento, tratamiento del chile antes de ser consumido (Yuste, 1980). Existe una gran diversidad de chiles y su distribución es muy compleja ya que, al cambiar la maduración en el chile, se modifican sus características composicionales de acuerdo con su madurez o al nivel de humedad del fruto. En la tabla 4 se observa la variabilidad entre referencias, particularmente es de nuestro interés conocer la porción lipídica y de humedad para obtener los datos estandarizados en base seca y el porcentaje total de lípidos del fruto.

Para evitar la variación de la muestra durante el periodo de la experimentación, se decidió almacenar la harina del chile a  $-70^{\circ}\text{C}$  en bolsas de aluminio herméticamente selladas para evitar algún cambio en su composición.

**TABLA 4. COMPARACIÓN DE ANÁLISIS PROXIMALES DEL CHILE GUAJILLO.**

	(Moreno Menéndez, 2000)	(Santamaría <i>et al.</i> , 2000)	<b>Este Trabajo experimental</b>
Humedad (%)	4.43	8.6	14.99
Cenizas (%)	36.31	6.5	4.41
Grasa (%)	4.99	8.1	10.94
Proteína (%)	14.07	16.5	21.39
Carbohidratos totales (diferencia) (%)	40.2(fibra cruda 11.79)	60.3 (fibra cruda 29.3)	48.28
Base seca Cenizas (%)	37.99	NR	5.18
Base seca Grasa (%)	5.22	NR	12.88
Base seca proteína (%)	14.72	NR	25.45
Base seca carbohidratos totales (por diferencia) (%)	42.05 (fibra cruda 12.33)	NR	56.49

## 6.1 Espectros de absorción de UV-visible

Los espectros de absorción UV-visible nos indican las máximas longitudes de onda de los compuestos o de la mezcla de compuestos, por lo que también son una huella para la identificación de estos, ya que los compuestos presentan máximos de absorción relacionados a los grupos funcionales.

Los extractos en hexano o en CO<sub>2</sub> SC a densidades aproximadas a 0.95, son muy similares comprobando al observar los barridos espectrales correspondientes (Figuras 9 y 10).

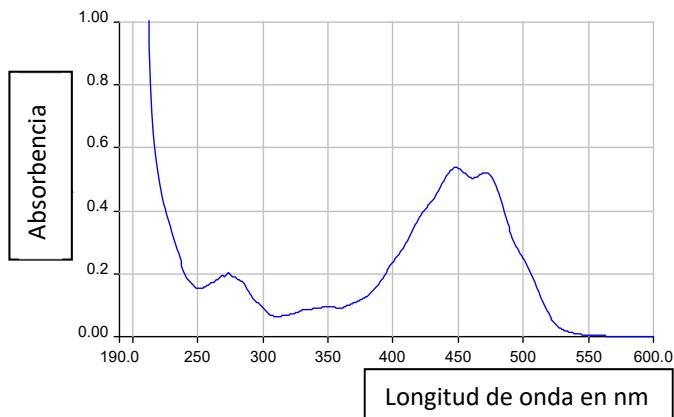


FIGURA 9. ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE PARA UN EXTRACTO DE CAPSAICINOIDES DE 1 mg DE REACTIVO QUÍMICO CON CO<sub>2</sub>SC.

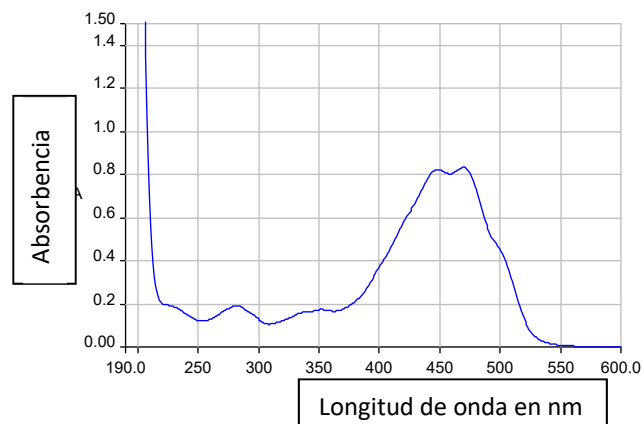


FIGURA 10. ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE PARA UN EXTRACTO DE CAPSAICINOIDES DE 1 mg DE REACTIVO QUÍMICO CON EN ETANOL.

En el espectro de absorción de UV-Vis de los capsaicinoides y de la vainillilamina es muy similar, ya que ambos presentan una señal desde 240 a 280nm como se muestra en las figuras 9 y 10 donde es complicado el seguimiento de los reactivos o productos de la reacción por métodos colorimétricos simples. Sin embargo, la capsaicina presenta un pico de absorbencia a 210 nm.

La curva patrón es lineal para las diferentes concentraciones empleadas en las longitudes de onda de 240 y 280 para capsaicina y vainillilamina en el intervalo de 5 a 100 ppm. Como lo muestra figura 11.

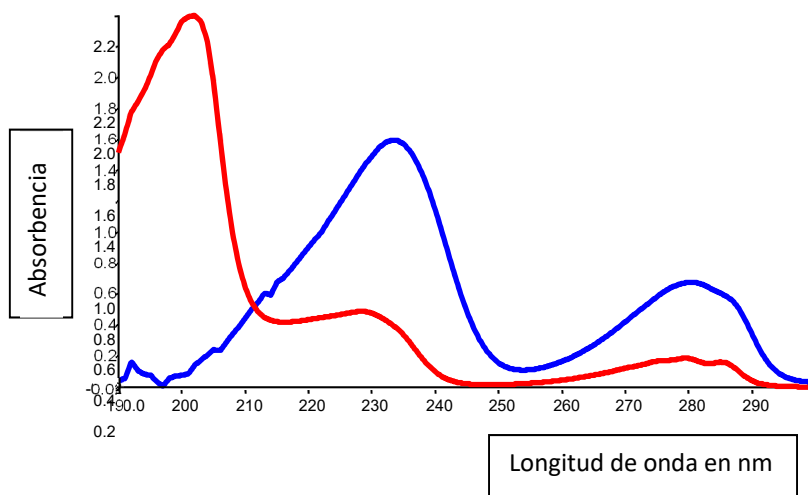


FIGURA 11. BARRIDO DE UV-VIS PARA CAPSAICINA (ROJO) Y PARA VAINILLILAMNIA (AZUL).



## 6.2 Identificación de capsaicinoides y de vainillilamina por cromatografía de capa fina.

El seguimiento preliminar de la reacción se realizó por medio de la reacción con ninhidrina (2,2 hidroxil-1,3 indanodiona), reaccionando con la amina primaria de la vainillilamina produciendo un color púrpura o azulado, llamado púrpura de Ruhemann, permitiendo la identificación selectiva del producto y, en la práctica, se muestra en la figura 12 diferenciando claramente entre reactivos y productos.

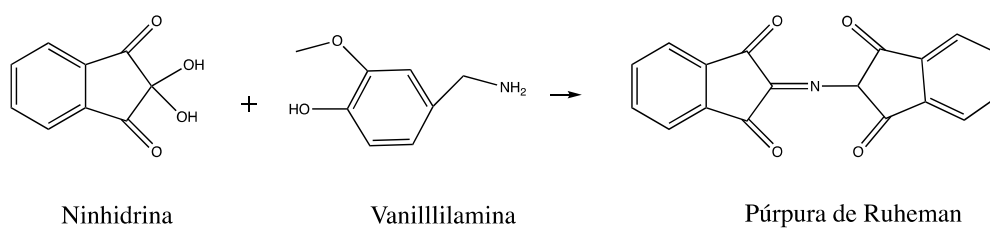


FIGURA 12. ESQUEMA DE REACCIÓN DEL PURPURA DE RUHEMAN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS AMINAS PRIMARIAS.

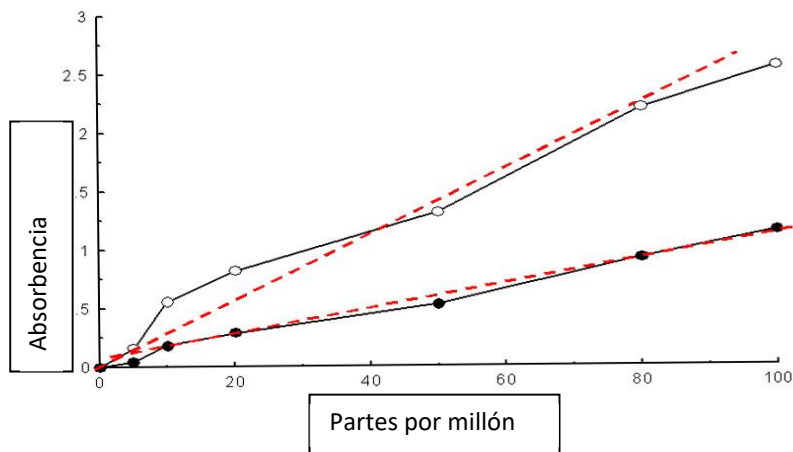


FIGURA 13. CURVA PATRÓN PARA CUANTIFICAR CAPSAICINOIDES, EL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR PARA LA LONGITUD DE ONDA DE 240 nm FUE 2593.7, Y PARA LA LONGITUD DE ONDA DE 280 nm FUE DE 1054.6. LOS CIRCULOS BLANCOS SON 240 nm Y CIRCULOS OSCUROS 280 nm.



FIGURA 14. REACCIÓN DE NINHIDRINA SOBRE PRODUCTOS (VAINILLILAMINA) Y REACTIVOS (CAPSAICINA) DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS.

En la figura 14 se muestra la cromatopla de capa fina donde se presentan los capsaicinoides y vainillilamina observados con ninhidrina, del lado izquierdo es revelada la vainillilamina y del derecho capsaicina sin color.

En la figura 15 se muestran los corrimientos después de la reacción, del lado derecho con luz visible y con ninhidrina y del lado derecho revelada con luz UV a 254 nm para verificar la presencia de los compuestos. En el carril 1 está la capsaicina, en el carril 2 la vainillilamina, en el carril 3 y 4 son los extractos recuperados del reactor y del biocatalizador respectivamente. En las cromatoplas se observa la capsaicina, la vainillilamina revelada y los carotenoides hasta la parte superior de la corrida cromatográfica.

Al implementar la metodología se observa una separación de los capsaicinoides con respecto al producto, identificando capsaicinoides y la vainillilamina de la mezcla de reacción. Los R<sub>f</sub> son continuamente reproducidos, mientras que la vainillilamina no se mueve del punto de inicio siendo revelada con ninhidrina.

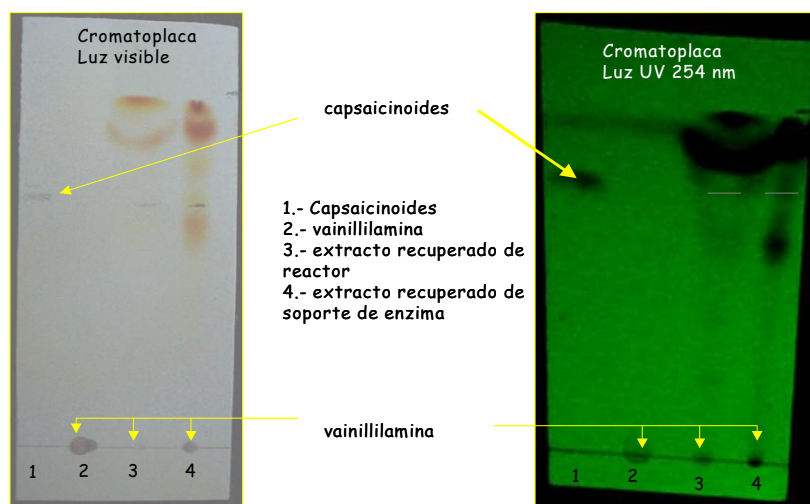


FIGURA 15. CROMATOPLACA E (LAVADO DE ENZIMA), R (LAVADO DE REACTOR), CAP (CAPSAICININA), VAN (VAINILLILAMINA) DERECHO LUZ VISIBLE, LADO IZQUIERDO REVELADO CON LUZ UV. REACCIÓN SOBRE OLEORESINA QUÍMICO.

Las observaciones anteriores fortalecen la evidencia de la hidrólisis por CALB sobre capsaicinoides donde uno de los productos es vainillilamina aún en una matriz compleja como es el extracto de la harina del chile guajillo. En el carril 3 y 4 de la cromatoplaqa mostrados en la figura 15 se observan los capsaicinoides y la vainillilamina, dando positivo a la hidrólisis catalizada por la enzima. Se realizó el control donde no se observa la presencia de la vainillilamina cuando no hay presencia del biocatalizador (dato no mostrado).

## 6.2 Identificación y cuantificación de capsaicinoides y vainillilamina por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).

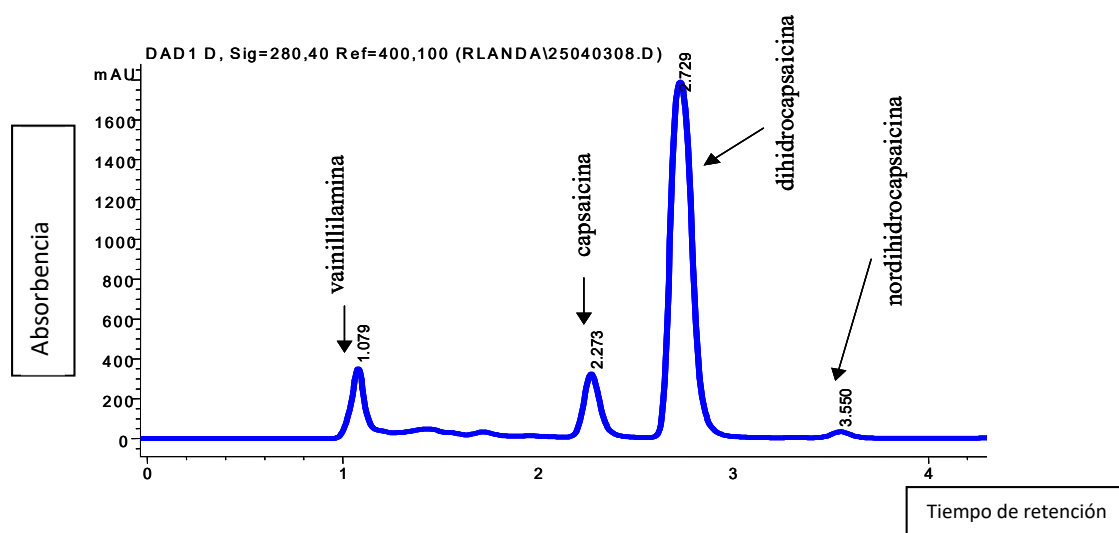


FIGURA 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CAPSAICINOIDES POR HPLC.

Los capsaicinoides y la vainillilamina se identificaron y cuantificaron mediante la técnica de HPLC, el perfil se muestra en la figura 16. A cada señal corresponde a un tiempo de retención vainillilamina para  $1.7 \pm 0.2$  min, capsaicina para  $2.2 \pm 0.3$  min, dihidrocapsaicina para  $2.72 \pm 0.2$  min, norhidrocapsaicina para  $3.5 \pm 0.2$  min. Las curvas patrón de reactivos y producto se realizaron en un intervalo de concentraciones de 5 a 120 ppm, con una correlación lineal de 0.998 de R cuadrada.

---

## 6.3 Composición de los capsaicinoides totales en la muestra de harina de chile guajillo puya.

### Controles de extracción

La extracción de los capsaicinoides se realizó mediante el uso de disolventes (hexano y etanol), esto con la finalidad de cuantificar los niveles máximos de extracción reportados 2.75 mg de capsaicinoides /gramos de harina de chile. (Moreno Menéndez, 2000), y con ello de tener una base de comparación por la extracción en CO<sub>2</sub>SC.

El etanol es un solvente polar en contraste con el hexano que es un solvente no polar, el motivo de estas extracciones es que el extracto con etanol nos proporcionará la cantidad total de capsaicinoides posibles de extraer de la muestra y el hexano nos daría la idea de cuanto se podría extraer en condiciones supercríticas, de igual manera, el hexano proporcionaría la cantidad total de colorantes de la muestra.

Como era de esperarse la extracción etanólica extrajo mayor cantidad de capsaicinoides y un residual de colorantes hidrofóbicos 52 mg de capsaicinoides/ gramos de harina de chile. La extracción con hexano fue selectiva a los colorantes presentes, mientras que los capsaicinoides se extrajeron en concentraciones muy bajas, en la figura 15 y 16 se observa el perfil de concentración. En el caso del etanol los capsaicinoides están en un máximo aproximado de las 160 cuentas de absorbencia, mientras que el hexano entre 15 y 25 cuentas de absorbencia. El hexano y el CO<sub>2</sub> SC a una  $\delta = 0.96$  g/mL tienen características de polaridad y de constante dieléctrica similares y comparables, es de esperarse mayor extracción por CO<sub>2</sub>SC por casusa de la mayor permeabilidad, la alta difusividad y la baja tensión superficial

Las concentraciones de los capsaicinoides encontrados en la harina de chile guajillo puya se muestran en la tabla 5.

**TABLA 5. EXTRACCIÓN DE CAPSAICINOIDES DE LA HARINA DE CHILE GUAJILLO COMPARANDO ENTRE ETANOL Y CO<sub>2</sub>SC.**

Extracción en etanol (mg/g de harina)	Extracción en CO <sub>2</sub> SC (mg/g de harina)
2.750 +/- 13%	52 +/- 15%

Claramente, el CO<sub>2</sub>SC presenta cerca de 20 veces más extracción de capsaicinoides que la obtenida por etanol por la metodología de soxhlet durante 24h. que por CO<sub>2</sub>SC a 24h, 60°C y 5000 psi.

La distribución de los capsaicinoides en el total del componente capsidoico se muestran en la tabla 6. La distribución fue cuantificada en cada extracto, encontrando concordancia entre la literatura y los datos obtenidos sobre el porcentaje de los capsaicinoides en el chile guajillo puya, mientras que la distribución en la muestra, fueron para la capsaicina en un 41.5%, la dihidrocapsaicina en un 49% y la nordihidrocapsaicina en un 9.5%.

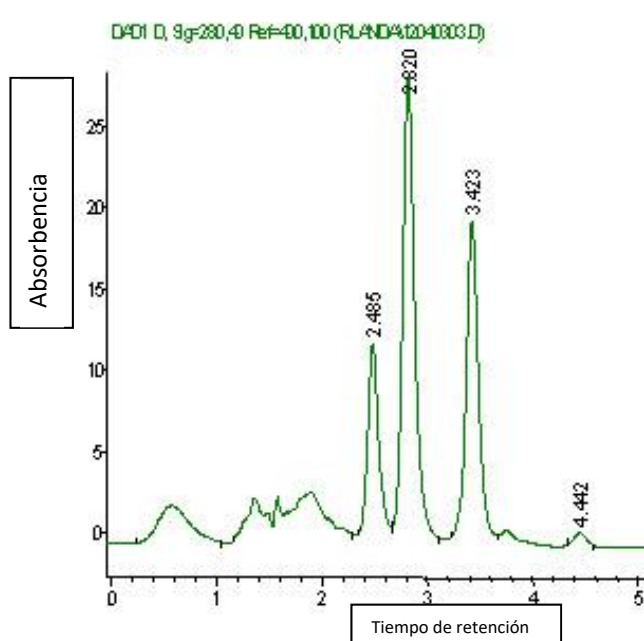


FIGURA 15. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CAPSAICINOIDES EXTRAIDOS POR HEXANO.

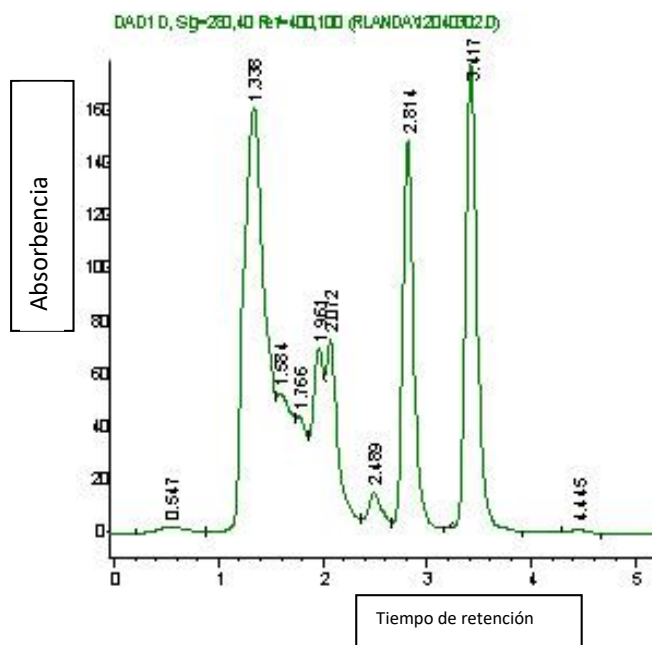


FIGURA 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CAPSAICINOIDES EXTRAIDOS POR ETANOL.

TABLA 6 DISTRIBUCIÓN DE CAPSAICINOIDES MÁS REPRESENTATIVOS DE ALGUNAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Capsicum*.

Especie de chile/ capsaicinoide	Capsaicina	Dihidrocapsaicina	Nordihidrocapsaicina
<i>C. annuum</i> <sup>1</sup>	33-50%	40-45%	10-15%
<i>C. frutescens</i> <sup>1</sup>	65-75%	22-26%	1-4%
<i>C. baccatum</i> <sup>1</sup>	30-60%	30-60%	5-7%
<i>C. annuum</i> L (extracto con etanol) <sup>2</sup>	45.50%	55.07%	0.43%
<i>C. annuum</i> L (extracto con CO <sub>2</sub> ) <sup>2</sup>	30-42% (41.5%)	40-66% (49%)	7-14% (9.5%)
referencias 1 Moorkoth <i>et al.</i> , 2014 2 trabajo experimental			

## 6.4 Resultados iniciales de la reacción de hidrólisis de capsaicinoides por CALB en fluido supercrítico.

Los primeros resultados obtuvimos el 60% de conversión en 48 h similar a lo reportado por Duarte (2000) en disolventes orgánicos y en reacciones en CO<sub>2</sub>SC. (Arroyo, 1999; Ottosson & Hult, 2001; Pirozzi & Greco, 2004). Se confirmó la hidrólisis enzimática, se observó la amina terminal de la vainillina con el cambio de perfil del espectro de UV-VIS para capsaicinoides y aparición de vainillilamina.

Como se observa en la figura 17 al empalmar los cromatogramas se detecta claramente la presencia de los productos esperados de la reacción y disminución en la concentración de los reactivos (aparición de vainillilamina y desaparición de capsaicinoides) confirmando los picos característicos de cada compuesto por el espectro de UV-VIS en el detector de arreglo de diodos en el intervalo de 200 a 800 nm.

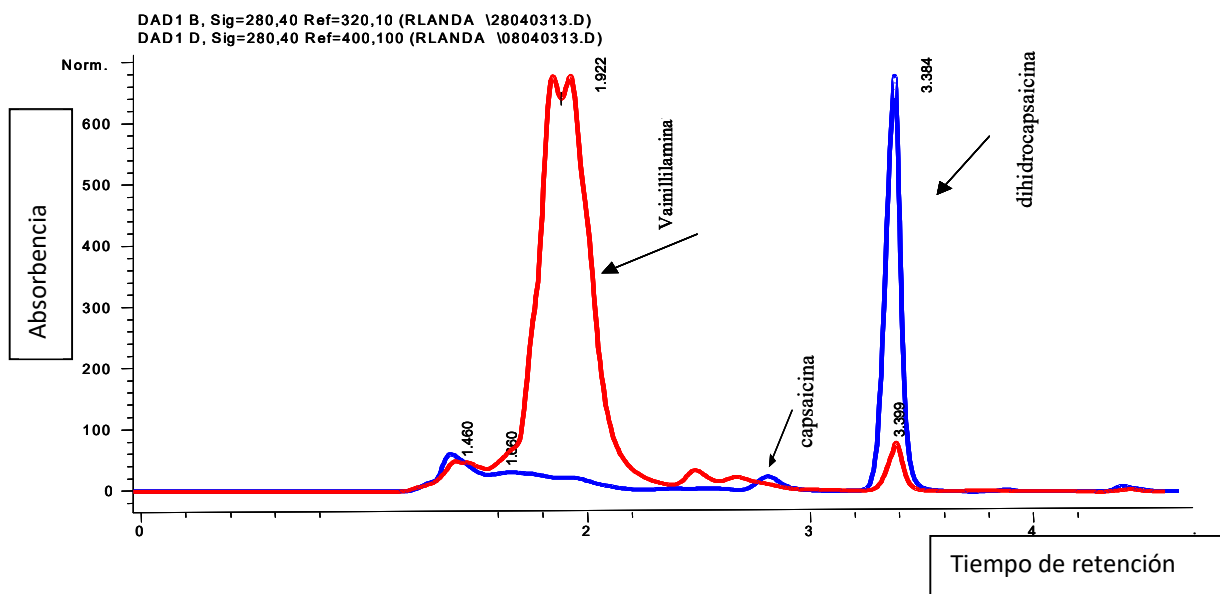


FIGURA 17. COMPARACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE CAPSAICINOIDES Y VAINILLILAMINA ANTES DE LA REACCIÓN (AZUL) DESPUES DE LA REACCIÓN (ROJO).

---

## 6.5 Efecto de la actividad acuosa en la reacción sobre capsaicinoides en CO<sub>2</sub>SC

La hidrólisis de los capsaicinoides ha sido el objetivo del estudio para eliminar la pungencia de productos derivados de los chiles con importancia en alimentos y farmacéuticos, de manera tal que se pueda emplear a los extractos como colorantes naturales con un alto valor agregado y alternativa comercial a los colorantes artificiales.

La hidrólisis de los capsaicinoides en disolventes poco polares, fue reportada por primera por el grupo de López Munguía con conversiones del 70% en medios acuosos y como resultados preliminares observaron hidrólisis en medios oleosos y en conjunto con oleorresina (Castillo, Torres-Gavilán, Severiano, Arturo, & López-Munguía, 2007). Por su parte Kovata (1999) lograron la síntesis de capsaicinoides en medio no acuoso con la enzima Novozyme 435®, a 70°C y 72 h obteniendo el 50% de conversión. Así demostraron que la velocidad de conversión es función del tamaño de la cadena del acilo donador en el ácido graso. (Kobata *et al.*, 1999)

En nuestro estudio trabajamos en la dirección de establecer el comportamiento de la conversión de los capsaicinoides en medios no acuosos (fluido supercrítico de CO<sub>2</sub>) y sus posibles ventajas al uso de disolventes no polares.

Con el fin de validar la reproducibilidad en el estudio de la reacción-extracción de capsaicinoides, se establecieron los parámetros de extracción y reacción descritos en la metodología. Solo enunciaremos los que fueron establecidos previamente por bibliografía y datos experimentales.

- **Condiciones Supercríticas.** - Temperatura inicial de llenado de reactor, temperatura de reacción, presión, densidad de fluido supercrítico, calidad de CO<sub>2</sub>, gasto de CO<sub>2</sub>, tamaño de muestra, temperatura de despresurización de muestreador, tiempo de reacción.
- **Enzima.** - miligramos de biocatalizador, enzima, proteína presente en biocatalizador,  $a_w$ , lote de producción de NOVOZYME 435, empaquetado en reactor, material de empaquetamiento de enzima.
- **Harina de chile guajillo.** - tamaño de partícula,  $a_w$ , temperatura de mantenimiento de muestra, método de muestreo, homogenización de muestra, estandarización de capsaicinoides y de colorantes naturales, miligramos de muestra, análisis proximal de la harina de chile guajillo.
- **Estándar vainillilamina.** -preparación deshidrocloración, miligramos de muestra.
- **Estándar de capsaicina y capsaicinoides.** -miligramos de muestra, estandarización por HPLC, dato de solubilidad en CO<sub>2</sub>SC, solubilidad en presencia de carotenoides en CO<sub>2</sub>SC.
- **Oleorresina.** - cantidad para análisis suficientes, % oleoso, Cantidad de capsaicinoides y colorantes naturales,  $a_w$ , mantenimiento de muestra.
- **Preparación de muestra para análisis en HPLC y espectrofotométricamente.** – Recuperación de capsaicinoides y colorantes por fase sólida., tipo de fase sólida, volúmenes de recobro.
- **Nitrógeno de secado de muestras:** Calidad de nitrógeno, nitrógeno extra seco, Gasto de nitrógeno

- 
- **Disolventes de HPLC.** - Calidad y disponibilidad.
  - **Columna de HPLC.** - Número de muestras (mantener la separación adecuada antes de limpieza), fase estacionaria, dimensiones.
  - **Metodología de análisis de HPLC**

Las fuentes de capsaicinoides utilizadas fueron:

1.- *Capsaicinoides estándar*, producto químico reactivo técnico, esta fuente de capsaicinoides fue obtenida de sigma-aldrich (capsaicinoides al 60% de concentración), nos permite llegar a saturación sin ver afectado el equilibrio por presencia de algún otro elemento que pudiera estar presente en la matriz de reacción. De esta forma conocemos el comportamiento de la enzima en condiciones estándar de reacción,  $a_w$ , fenómenos de solubilidad en el  $\text{CO}_2\text{SC}$  y fenómenos de transporte en el ambiente (soporte) de la enzima inmovilizada.

2.- *Oleoresina* de chile guajillo estandarizada en concentración de capsaicinoides, preparada por  $\text{CO}_2\text{SC}$  proveniente de la extracción de la harina de chile guajillo. Esta fuente nos permite conocer el efecto completo de matriz sin tomar en cuenta el proceso de extracción de la harina de chile. Así como establecer los datos iniciales de concentración de capsaicinoides y carotenoides. Los parámetros de la oleoresina fueron 46 mg de Capsaicinoides/ gramos de oleoresina.

3.- *Harina de chile guajillo estandarizada.* (sistema extracción – reacción). Fuente natural donde se realizó la extracción-reacción para la conversión de capsaicinoides en el sistema  $\text{CO}_2\text{SC}$ .

La reacción se realizó en un reactor marca Supercritical Fluid Technology a  $60^\circ\text{C}$  y 5000 psi de presión en 24 h con 0.5g de harina de chile guajillo previamente pasado por un tamiz No 20, y 2 g de biocatalizador.

En nuestro estudio comprobamos la influencia del  $a_w$  Inicial en el biocatalizador sobre la conversión de los capsaicinoides. En la figura 18 se muestra la conversión del 75% para un  $a_w$  de 0.8, no reportada anteriormente, así como conversiones alrededor del 10% en valores de  $a_w$  menor a 0.30 en 24 h.

La influencia del  $a_w$  sobre la conversión de sustratos por la enzima CALB fue estudiada anteriormente (Chamouleau, Coulon, Girardin, & Ghoul, 2001), donde reportan un máximo de conversión de 28.5% de palmitato de fructosa en el solvente 2-metil-2-butanol a bajas actividades de agua (*i.e.* 0.07), concluyendo que, las capas moleculares de agua en el soporte del biocatalizador afectan a los fenómenos de transporte y la solubilidad de los sustratos en la transesterificación, aunque la transesterificación es reversible a la hidrólisis normalmente por cantidad de agua en el sistema, en disolventes orgánicos no se comporta de esa manera.



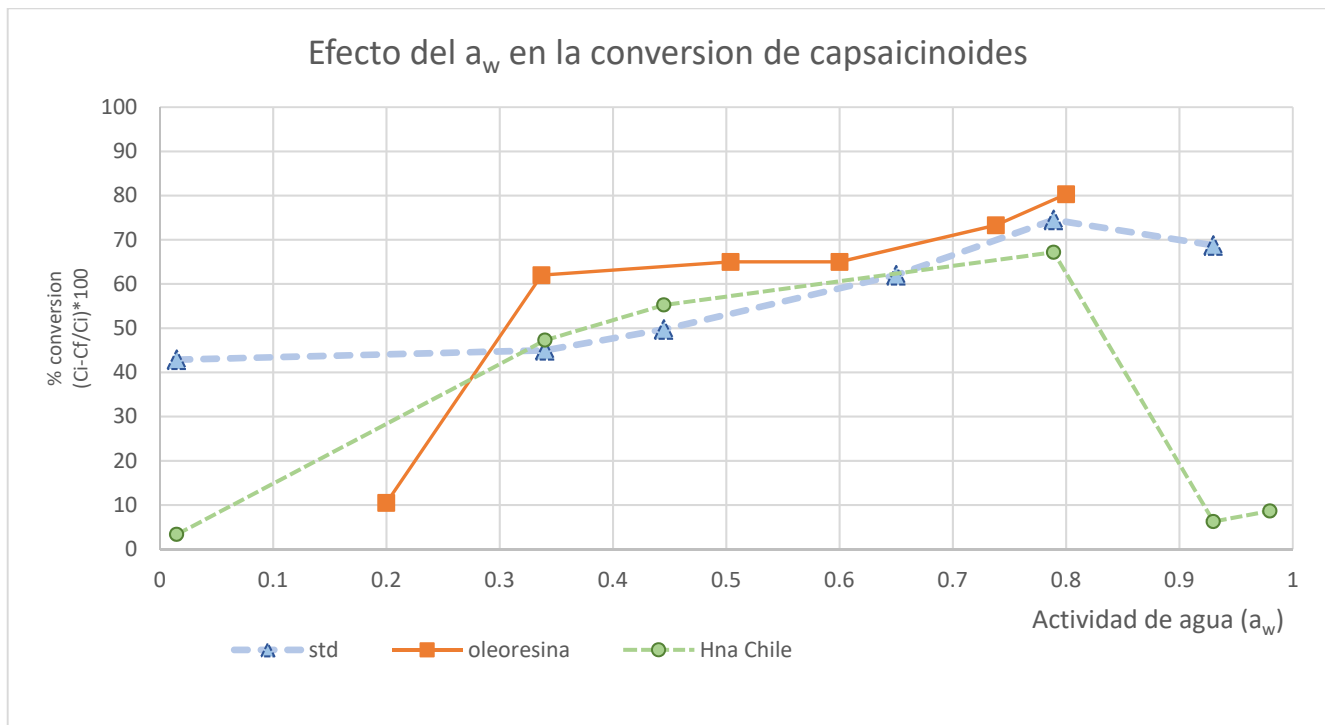


FIGURA 18. EFECTO DE LA ACTIVIDAD ACUOSA EN LA CONVERSIÓN DE CAPSAICINOIDES PROVENIENTES DE 3 FUENTES DIFERENTES.

Estudiar la hidrólisis de los capsaicinoides comerciales obtenidos como reactivos estándar nos permitió conocer los niveles de conversión en sustratos puros. Los datos obtenidos en esta reacción, se relacionan con autores que previamente habían utilizado el  $\text{CO}_2\text{SC}$ , (Duarte *et al.*, 2000; Hoffman, Lego, & Galetto, 1983; Kobata *et al.*, 1999), donde hay una diferencia significativa de las conversiones en disolventes orgánicos, tendiendo a polaridades bajas mayor, mayor nivel de conversión.

Un punto referente para asegurar la saturación de los capsaicinoides en sistema y que el biocatalizador tuviera acceso al máximo de concentración fue conocer la solubilidad en el medio, mismo que fue comprobado y corroborado experimentalmente, y estando de acuerdo con la literatura publicada. (Chemie, Niirnberg, & Erlangen, 1992; De, Valderrama, & Bottini, 2005; Gnayfeed, Daood, Illés, & Biacs, 2001; Škerget & Knez, 1997; Yao Jp Chandra A., 1994)

Como era de esperarse, los resultados de las reacciones con reactivo químico contienen menor variación que los datos experimentales en matrices más complejas. La oleorresina y la extracción en harina de chile son sistemas complejos donde las propiedades de la matriz afectan en ambos sentidos a la reacción, ya sea disminuir la productividad catalítica o aumentarla. En el caso de la harina, el efecto de la extracción de los capsaicinoides y colorantes naturales es una variable más a los factores de la presentación de los resultados de hidrólisis.

Acorde con la revisión bibliográfica realizada, Hailing (1994) propone que los factores que afectan las reacciones biocatalizadas en medios no convencionales son:

- 
- 1) Distribución de los componentes de la fase.
  - 2) Temperatura
  - 3) Cantidad de Enzima activa
  - 4) Reversibilidad de la reacción
  - 5) Distribución del agua en el sistema biocatalítico.
    - a) Equilibrio de agua
    - b) Competencia del agua
    - c) Efecto del solvente y reactivos vía competición por el agua
    - d) Efecto del soporte y otros aditivos vía competición por el agua
    - e) Efecto cinético del agua como reactivo
    - f) Equilibrio de agua
    - g) Actividad de agua en la microestructura del sistema de reacción.
    - h) Estado normal de la actividad acuosa
    - i) Métodos de control del agua

De acuerdo con lo anterior se enlistan los factores observados y el resultado en nuestra discusión se presentan a continuación:

- La Solubilidad de capsaicinoides en presencia de carotenoides o matriz lipídica a diferentes temperaturas, es complicada de medir por los factores fisicoquímicos de los componentes y las condiciones del estado supercrítico es mayor al 40%. Sin embargo en la literatura se encuentra que existe un cambio de solubilidad de los capsaicinoides en CO<sub>2</sub>SC, por presencia de carotenoides (Perva-Uzunalić, Škerget, Weinreich, & Knez, 2004; Škerget & Knez, 1997; Skerget, Knez, & Habulin, 1995).
- Para la velocidad de extracción de los capsaicinoides, desde la matriz vegetal y a diferente  $a_w$ , se observó un cambio gradual en la extracción, así también los colorantes naturales lipofílicos provenientes de la harina de chile, incluso una extracción de la matriz diferenciada dependiente al  $a_w$ . En la bibliografía encontramos que las plantas tienen compartimentalizados los compuestos capsaicinoicos en vacuolas del interior de las células, y la pared es susceptible a modificaciones por incrementos en la cantidad de agua (Del Valle *et al.*, 2005; Santamaría *et al.*, 2000)
- Un factor a cuidar es el cambio en la solubilidad de los capsaicinoides por temperatura, donde el máximo es de 60°C como lo reportan Škerget & Knez (1997), en nuestro experimentos se mantuvo la temperatura máxima aceptada en reportes anteriores de actividad catalítica por CALB en CO<sub>2</sub>SC a 70°C por Castillo *et al.*, (2007), esto con el fin de mantener la solubilidad de los reactantes constante, cabe destacar que la solubilidad de los mismos es influenciada por la presencia de los carotenoides y por la temperatura fijada en la reacción.(Škerget & Knez, 1997), también el reactor al llenarse de CO<sub>2</sub>, va cambiando la temperatura desde 10°C hasta 60°C. donde pudiera iniciar la extracción.
- Competencia entre radical acilo donador (ácidos grasos y agua), este efecto no se observó en la reacción de hidrólisis ya que sugerimos que es más rápida que la reacción de transesterificación por el acilo

---

donador. Posiblemente la cantidad de agua para la hidrólisis es suficiente en el biocatalizador y por tanto la velocidad de catálisis se ve beneficiada hacia la hidrólisis y no la transesterificación. Dicho efecto ha sido reportado como reacciones de transesterificación e hidrólisis en condiciones similares de reacción y de biocatalizador (Hoang & Matsuda, 2017; Matsuda *et al.*, 2005).

- Efecto de la cantidad de agua en la hidrólisis en disolventes no polares, El efecto de  $a_w$  es factor determinante en la hidrólisis de capsaicinoides por lipasa B (CALB), las reacciones en medios no acuosos, es de suma importancia la microcantidad de agua que debe rondar entre 2-20mM. (Škerget & Knez, 1997). Los niveles de agua que se reportaron indican que a tiempos cortos de reacción la concentración de agua tiene que ser relativamente alta (12mM) mientras que a tiempos largos de reacción es preferible una baja concentración de agua (4mM). También, por arriba de 29.4 MPa no hubo diferencia entre 50°C y 70°C.

Al analizar el efecto de la actividad acuosa, hemos observado que hay 3 diferentes comportamientos de acuerdo con la figura 18:

- A. Hidrólisis de capsaicinoides en actividades acuosas menores al valor de 0.30 (región 1).
- B. Hidrólisis de capsaicinoides en actividades acuosas entre valores de 0.30 a 0.80 (región 2).
- C. Hidrólisis de capsaicinoides en actividades acuosas mayores a valores 0.80 (región 3).

### 6.5.1 Hidrólisis de capsaicinoides en actividades acuosas menores de 0.30 (región 1)

En la figura 18 se observa la conversión de capsaicinoides hasta en un 45% a un  $a_w$  menor que 0.30. Dichos capsaicinoides se presentan como reactivo químico. Sin embargo, la conversión se redujo a menos del 10% a un  $a_w$  menor que 0.30 donde la matriz es más compleja, siendo que en dichos sistemas se encuentran todo lo soluble no polar extraído por el  $\text{CO}_2\text{SC}$ , como es el caso de las xantófilas, grasas y aceites y posiblemente ceras. Un fenómeno por discutir es la transferencia del reactivo al interior del biocatalizador. En  $a_w$  bajos la afinidad de los compuestos lipídicos al soporte del biocatalizador es mayor, haciendo una barrera hidrofóbica para la transferencia del agua y de los capsaicinoides al seno de la reacción. (Mora-Pale, Perez-Munguia, Gonzalez-Mejia, Dordick, & Barzana, 2007)

Una observación clara, en dichas condiciones, obedece a que el biocatalizador se notaba colorido, dando un indicativo de la adsorción de los compuestos a la superficie dicho efecto no detectado en valores más altos de  $a_w$ .

Existen 2 fenómenos diferentes en esta región de la figura 18.

- 1.- Fenómeno de solubilidad de capsaicinoides por efecto de partición entre los tres principales compuestos que son  $\text{CO}_2\text{SC}$ , capsaicinoides y compuestos no polares (xantófilas principalmente).
- 2.- Efecto del  $a_w$  sobre la extracción y solubilización en los capsaicinoides provenientes de Harina de Chile y de la oleoresina.

---

El fenómeno de solubilidad de capsaicinoides por efecto de partición entre  $\text{CO}_2\text{SC}$ , capsaicinoides y compuestos no polares (xantófilas principalmente) explica lo complicado que es hacer la medición de los sistemas de multi-componentes y cómo se comporta la solubilidad en la presencia de cada uno de ellos y entre ellos. Por ejemplo, existen reportes sobre el cambio de solubilidad de los capsaicinoides en presencia de carotenoides. (Chandra & Nair, 1997).

En la publicación de Škerget y Knez (1997) se menciona que los carotenoides no presentan un cambio en su solubilidad por la mezcla ternaria entre B-carotenoides-capsaicina- $\text{CO}_2$ . Sin embargo, si se observa un cambio de solubilidad en la presencia de los B-carotenoides. En la misma publicación mencionan que a bajas presiones de 90 bar y  $40^\circ\text{C}$  hay una diferencia de extracción, porque la concentración de capsaicinoides es muy alta y el color se observa ligeramente naranja-amarillento, sin embargo, a 400 bar y  $40^\circ$  se observa un extracto oscuro naranja-rojizo y poco pungente (menor cantidad de capsaicinoides).

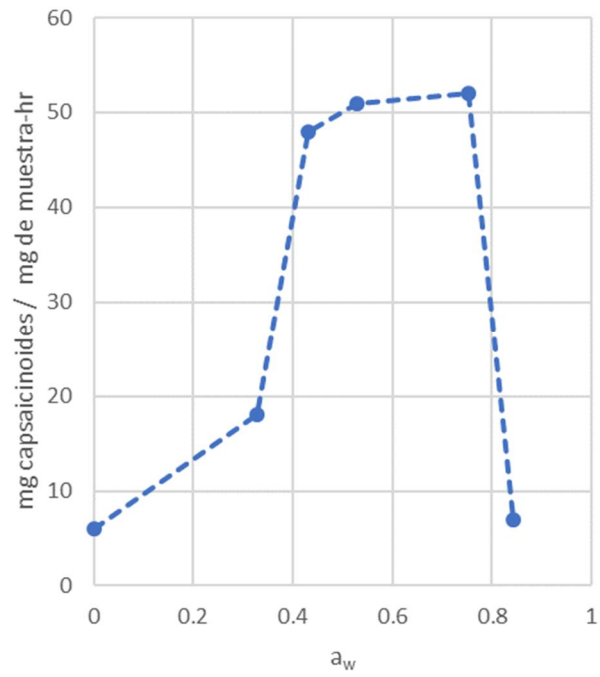
Las observaciones anteriores reflejan que, si hay una diferencia de solubilidad de los capsaicinoides ante la presencia de los carotenoides y xantófilas del extracto de chile, en consecuencia, habrá una afectación en la hidrólisis. El efecto que hay en el biocatalizador es un ambiente con alta cantidad de xantofilas haciendo un ambiente hidrofóbico, por lo tanto, tiene explicación la diferencia de hidrólisis entre el estándar químico oleorresina y de extracción de harina de chile.

### Efecto del $a_w$ sobre la extracción y solubilización en los capsaicinoides provenientes de harina de chile y de la oleorresina

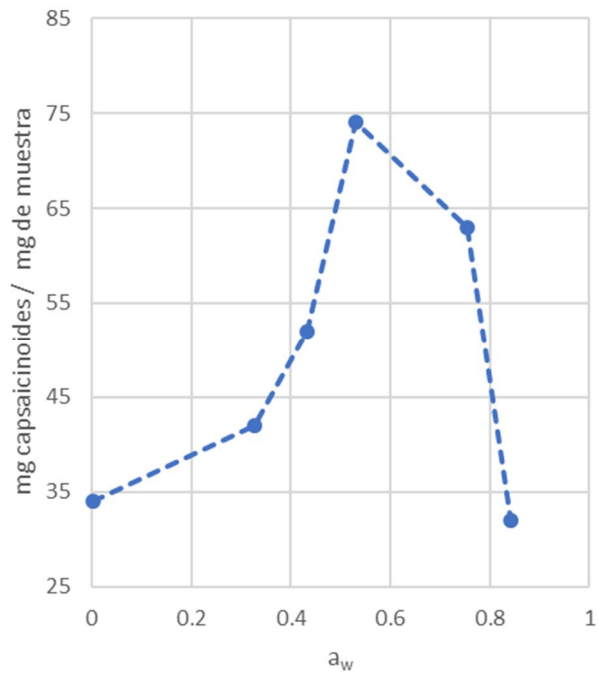
En las figuras 19 y 20 se muestran los valores de  $a_w$  menor que 0.30, se observa el máximo de extracción y cinética de extracción de los colorantes respectivamente, siendo afectado directamente por la cantidad de agua en la matriz vegetal.

Perva-Uzunalić *et al.* (2004), en su publicación, demuestran que la extracción y separación selectiva de carotenoides y capsaicinoides en  $\text{CO}_2\text{SC}$  dependen de la presión y temperatura. Sin embargo, no mencionan nada sobre las condiciones de preparación de la harina de chile.

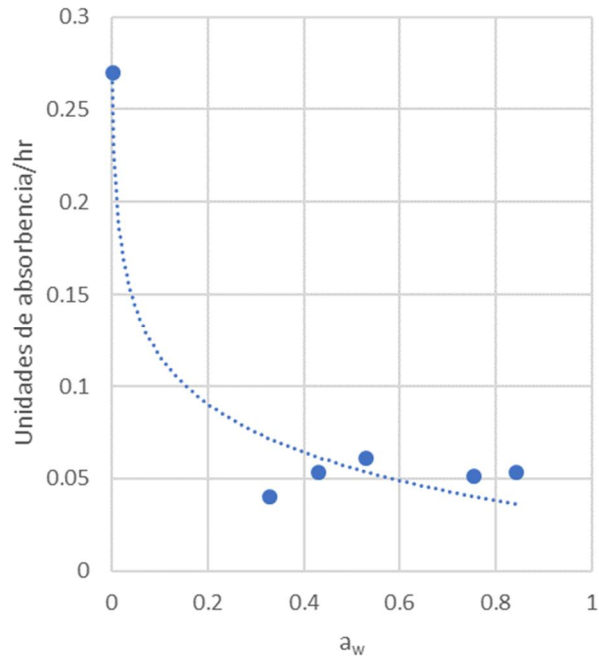
Se podría especular sobre si la conversión se ve reducida por falta de agua (sustrato de la reacción) necesaria para la hidrólisis, sin embargo, esto se descarta por los motivos más adelante expuestos. Es más probable que exista un problema de solubilidad de los capsaicinoides y de partición entre fases en el sistema ternario o multi-composición. Se observa claramente la hidrólisis en dicha actividad de agua para el estándar químico y no sucede en las otras fuentes de oleorresina y de extracción de harina de chile.



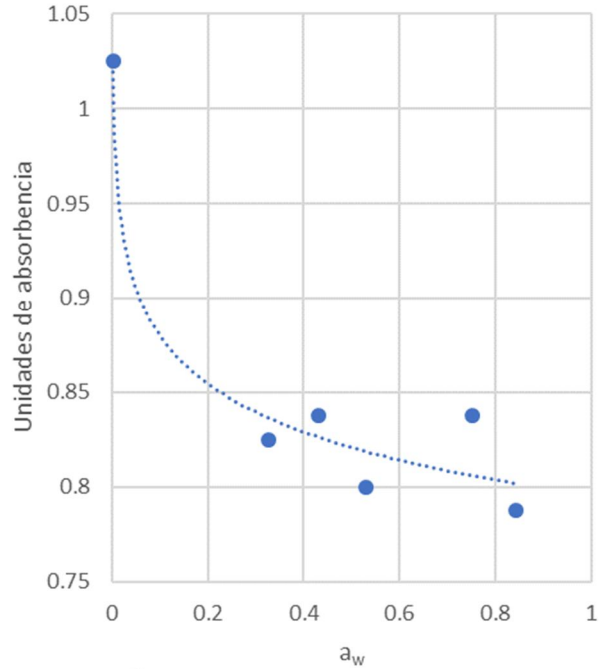
**FIGURA 19. EFECTO DEL  $a_w$  DE LA HARINA DE CHILE SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE EXTRACCIÓN DE CAPSAICINOIDES EN EL  $CO_2SC$ .**



**FIGURA 20. EFECTO DEL  $a_w$  DE LA HARINA DE CHILE SOBRE EL MAXIMO DE EXTRACCIÓN DE CAPSAICINOIDES EN EL  $CO_2SC$ .**



**FIGURA 21. EFECTO DEL  $a_w$  DE LA HARINA DE CHILE SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE EXTRACCIÓN DE COLORANTES DETECTABLES A 450 nm.**



**FIGURA 22. EFECTO DEL  $a_w$  DE LA HARINA DE CHILE SOBRE EL MAXIMO DE EXTRACCIÓN DE LOS COLORANTES DETECTABLES A 450 nm.**

---

Las figuras 19, 20, 21 y 22 muestran el efecto de la actividad de agua en la extracción para los capsaicinoides y los colorantes lipídicos en la harina de chile. A  $a_w$  menores del valor de 0.3 se observa el máximo de extracción de los colorantes lipídicos, y por el contrario se observan los mínimos de extracción de los capsaicinoides. Cabe resaltar que comparando la velocidad de extracción y el máximo de extracción a un  $a_w$  de 0.3, la velocidad de solubilización es alta (*i.e.* 50), ocurriendo lo contrario para el máximo de extracción que es bajo.

En el caso de la Harina de chile, las complicaciones observadas para la extracción de los compuesto de interés se relacionan a las observaciones de Santamaria *et al* Y Uquiche & Ortiz (Santamaría *et al.*, 2000; Uquiche & Ortiz, 2004) donde reportan que capsaicinoides, xantófilas y carotenoides se encuentran en el interior y adheridos por la composición de la matriz vegetal, el cual es hidrofóbico, estos autores afirman que las capas moleculares de agua en la matriz vegetal evitan la transferencia de los compuestos hidrofóbicos. La permeabilidad de las estructuras vegetales se ve modificada a mayores valores de  $a_w$ , mismo efecto que se ve en nuestro estudio en función de la extracción como barrera de permeación al  $\text{CO}_2$  y como factor de solubilidad de los capsaicinoides. A mayor  $a_w$ , mayor barrera, por ello en valores de  $a_w$  menores de 0.3 permiten la extracción diferenciada y favorecida de los compuestos más hidrófobos que los de hidrofobicidad media como es el caso de los capsaicinoides. En el reporte presentado por Perva-Uzunalić *et al.*, (2004) mencionan una diferencia en la extracción de capsaicinoides y carotenoides de la harina de chile en función de la densidad del  $\text{CO}_2\text{SC}$ ; sin embargo, no mencionan ninguna preparación de la muestra sobre la cantidad de agua del chile.

Para valores de  $a_w$  mayor a 0.3, el efecto en la velocidad de extracción y la cantidad extraída se ven disminuidos para los colorantes; pero favoreciendo a los capsaicinoides. Esto, como se ha explicado podría asociarse a una mayor cantidad de capas de agua superficial en el material hidrofóbico que esta soportada de la CALB. Sin embargo, se ve una caída drástica en regiones de  $a_w$  cercanos a 1, donde coexisten multicapas de humedad en la superficie del biocatalizador y la extracción es afectada por dos fases, generando así una barrera para la extracción de los compuestos liposolubles. Los datos quedan confirmados con los reportes de Knez y Skerget.(Škerget & Knez, 1997; Skerget *et al.*, 1995)

Las partículas celulares del chile están contenidas en una estructura hidrofílica (Arvayo-Enríquez *et al.*, 2013), dicha estructura está formada por una matriz gelatinosa rica en pectinas, hemicelulosas y glicoproteínas, de lo cual refuerza la hipótesis de que a mayor  $a_w$  se generan barreras polares para que la difusión del  $\text{CO}_2\text{SC}$  pueda solvatar y extraer los compuestos hidrofóbicos tales como los carotenoides y xantófilas.

Por lo anterior expuesto, es más probable que los fenómenos de transporte en el sistema reacción-extracción de harina de chile presenten un impacto mayor en la hidrólisis, y no que el agua disponible sea parte del reactivo limitante de la reacción a  $a_w$  menor a 0.3.

---

## 6.5.2 Comportamiento de hidrólisis a actividades acuosas entre valores de 0.30 a 0.80.(Región 2)

En actividades acuosas entre valores de 0.3 y 0.8, observamos un máximo de actividad catalítica, muy probablemente por el efecto de la solubilidad y la difusividad en el sistema Enzima-Sustrato-soporte catalítico. También podría asociarse con multicapas lipídicas que mejoran la actividad de las lipasas como fue argumentado por Okahata *et al* (1995)., donde se incrementó hasta 10 veces la actividad enzimática.

Existen múltiples referencias donde se discute el efecto del  $a_w$  en los biocatalizadores, que explican el efecto significativo en las reacciones de hidrólisis, transesterificaciones, y la enantioselectividad para medios no convencionales. En nuestro estudio al incrementar el valor de  $a_w$  también se ve dicho efecto, salvo fuera de los intervalos menores a 0.3 y mayor a 0.8. Se espera que en la escala de valor partiendo de 0.3 hasta 0.8 no se incrementa la cantidad de agua disponible para la hidrólisis en las cercanías a la enzima (la enzima y soporte hacen biocatalizador), donde experimentalmente comprobamos que el efecto es constante en la reacción. En la figura 23 se muestra la cantidad de agua en el biocatalizador y el incremento del  $a_w$ , podemos observar que el cambio de agua disponible no se incrementa a intervalos intermedios y observamos el mismo comportamiento de la hidrólisis que se muestra en la figura 18.

De esta manera podemos concluir que el cambio de la actividad catalítica está influenciado por las capas moleculares de agua pero que no la vuelven disponible, siendo este el sustrato limitante.

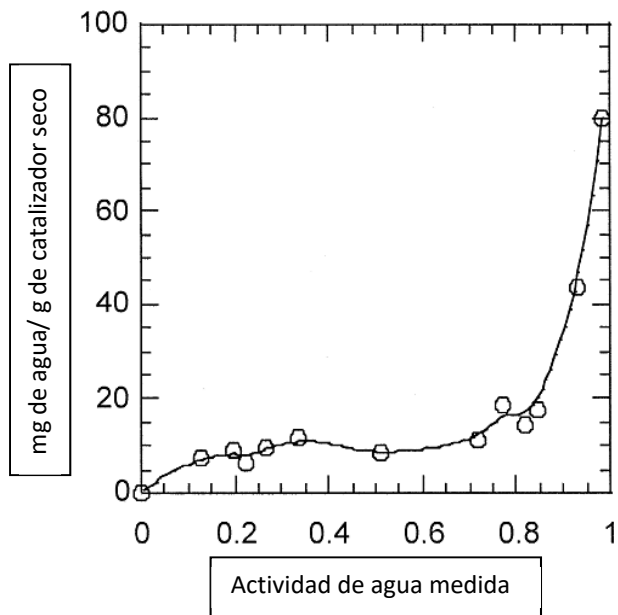
## 6.5.3 Comportamiento de hidrólisis a actividades acuosas mayores al valor de 0.80.(Región 3)

En valores de  $a_w$  por arriba de 0.8, se tendrían 2 explicaciones:

La primer explicación es la presencia de multicapas de agua en el biocatalizador favorece el fenómeno de barrera a los compuestos poco solubles en agua en la superficie porosa del soporte enzimático, como es propuesto por Chamouleau *et al.*, (2001).

La segunda posible explicación es que la enzima podría tener una reacción ácido-base con ácido carbónico sobre la enzima, perdiendo su actividad.(Matsuda *et al.*, 2005). También Klibanov *et al* (1988) encuentran el decremento de la actividad biocatalítica con la cantidad de agua en el medio.(Zaks & Klibanov, 1988).





**FIGURA 23.** RELACIÓN ENTRE CANTIDAD DE AGUA ADSORBIDA POR EL CATALIZADOR DE POLIVINILO DE LA NOVOZYME 435 Y LA ACTIVIDAD ACUOSA. ADAPTADO DE Chamouleau *et al.*, (2001).

De acuerdo con Chamouleau *et al.*, (2001) la absorción de agua a diferentes  $a_w$  de la CALB explica el agua disponible que existe en la región menor a un  $a_w$  de 0.80. Arriba de 0.8 la cantidad de agua disponible se dispara a multicapas de agua (Chamouleau *et al.*, 2001).

Por lo que podemos concluir que el efecto de la hidrólisis es función del cambio de la solubilidad de los capsaicinoides por la presencia de compuestos liposolubles de cadena larga, relacionados a los carotenoides y de las xantófilas.

---

## VII. CONCLUSIONES

- La reacción de hidrólisis de los capsaicinoides en medio supercrítico con presión de 5000 psi y una temperatura de 60°C, llegamos a un máximo del 75% de conversión. Dicho valor es mayor a la conversión reportada en medios orgánicos (Duarte *et al.*, 2000)
- El CO<sub>2</sub>SC es un mejor disolvente para la extracción que la extracción por hexano en el mismo tiempo.
- Para la conversión entre las fuentes estudiadas (reactivo técnico químico, oleoresina y harina de chile) se mantiene el perfil de la reacción a excepción de valores bajos de  $a_w$ . Se observa mayor conversión en el reactivo químico que en las otras 2 fuentes, demostrando que es una diferencia de partición de fase con la presencia de los compuestos lipídicos en valores de  $a_w$  por debajo de 0.3.
- El perfil de comportamiento de la CALB ante la variación del  $a_w$  es similar al mostrado por Kollera *et al.* (2001) en medios orgánicos, para nueve lipasas inmovilizadas. (Kollera, Arisa, & Ujangb, 2001).
- En la región 2 (valores de  $a_w$  menores 0.3 y mayores a 0.8) la reacción de hidrólisis no presenta variaciones notables.
- El  $a_w$  es un factor determinante en la extracción e hidrólisis de los capsaicinoides en fluido supercrítico, reduciéndose notablemente en valores de  $a_w$  por debajo de 0.30 y mayores a 0.80. Sin embargo, entre estos valores de  $a_w$  se incrementa la solubilidad e hidrólisis de los capsaicinoides obteniendo un máximo de la reacción buscada de hidrólisis.
- La extracción máxima de los capsaicinoides y de los colorantes es diferencial por efecto del  $a_w$ , donde a bajos valores se favorece la extracción de los colorantes, en valores medios (i.e. en el intervalo de 0.4 a 0.7) se favorece la extracción de los capsaicinoides y se inhibe la extracción de los colorantes, mientras que en la región 3, valores altos (i.e. mayor que 0.8) la extracción y la reacción se ven disminuidas, aunque el efecto puede ser explicado por fenómenos separados, en el caso de la reacción se propone que se debe a capas multimoleculares en el soporte del biocatalizador y en el caso de la extracción se le atribuye a el efecto de la polaridad y su carácter hidrofílico que engloba a las partículas vegetales donde se encuentran ocluidos los capsaicinoides y los colorantes naturales.

### Recomendaciones de continuación de la investigación

- Determinar si hay afectación de los carotenoides presentes en el sistema de reacción al adicionar reactivos químicos estándar de capsaicinoides, y su nivel de incidencia.
- Verificar el termino de las reacciones a tiempos mayores a 24 h. Esto principalmente para valores de actividad de agua entre 0.30 y 0.80.
- Realizar cabo estudios sistemáticos para determinar la cinética de hidrólisis en valores de  $a_w$  menores a 0.30.
- Hay que confirmar que la extracción es inhibida a  $a_w$  mayores de 0.8 para la harina y la teoría de barreras hidrofílicas para la transferencia de capsaicinoides al seno de la enzima en el biocatalizador.

---

## Bibliografía

- Arroyo, M. (1999). Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media, *0229*(April 1998), 3–12.
- Arvayo-Enríquez, H., Mondaca-Fernández, I., Gortáez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J., & Rodríguez-Ramírez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: A review. *Analytical Methods*, *5*(12), 2916–2924. <https://doi.org/10.1039/c3ay26295b>
- Calvo, L., Romero, M. D., Alba, C., Ortiz, F., & Gutiérrez, M. (2002). Enzymatic Synthesis of Food Additives in Supercritical CO<sub>2</sub>. *Chemical Engineering Transactions, High Pressure in Venice.*, *2*, 181–186.
- Castillo, E., Torres-Gavilán, A., Severiano, P., Arturo, N., & López-Munguía, A. (2007). Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. *Food Chemistry*, *100*(3), 1202–1208. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.026>
- Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M., & Ghoul, M. (2001). Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, *11*(4–6), 949–954. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00166-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00166-1)
- Chandra, A., & Nair, M. G. (1997). Supercritical Fluid Carbon Dioxide Extraction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Carotene from Carrot (*Daucus carota* L.), *8*(February 1996), 244–246.
- Chemie, T., Niirnberg, U. E., & Erlangen, D.-. (1992). Solubility of Capsaicin in Dense CO<sub>2</sub>, *251*, 251–255.
- De, J. C., Valderrama, O., & Bottini, S. B. (2005). Measurement and modeling of solubilities of capsaicin in high-pressure CO<sub>2</sub>, *34*, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.11.014>
- Del Valle, J. M., De La Fuente, J. C., & Cardarelli, D. A. (2005). Contributions to supercritical extraction of vegetable substrates in Latin America. *Journal of Food Engineering*, *67*(1–2), 35–57. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.051>
- Duarte, D. R., Castillo, E., Bárzana, E., & López-Munguía, A. (2000). Capsaicin hydrolysis by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnology Letters*, *22*(22), 1811–1814. <https://doi.org/10.1023/A:1005622704504>
- Gnayfeed, M. H., Daood, H. G., Illés, V., & Biacs, P. A. (2001). Supercritical CO<sub>2</sub> and Subcritical Propane Extraction of Pungent Paprika and Quantification of Carotenoids, Tocopherols, and Capsaicinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(6), 2761–2766. <https://doi.org/10.1021/jf001292q>
- Hoang, H. N., & Matsuda, T. (2017). *Chapter 1. Biotransformation Using Liquid and Supercritical CO<sub>2</sub>. Future Directions in Biocatalysis* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63743-7.00001-9>
- Hoffman, P. G., Lego, M. C., & Galetto, W. G. (1983). Separation and Quantitation of Red Pepper Major Heat Principles by Reverse-Phase High-Pressure Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *31*(6), 1326–1330. <https://doi.org/10.1021/jf00120a044>
- Kirschbaum-Titze, P., Mueller-Seitz, E., & Petz, M. (2002). Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 2. Heterogeneity of capsaicinoid content in individual fruits from one plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(5), 1264–1266. <https://doi.org/10.1021/jf0105283>

- 
- Kobata, K., Kobayashi, M., Tamura, Y., Miyoshi, S., Ogawa, S., & Watanabe, T. (1999). Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oils or fatty acid derivatives in n-hexane. *Biotechnology Letters*, 21(6), 547–550. <https://doi.org/10.1023/A:1005567923159>
- Kollera, G., Arisa, M. J., & Ujangb, Z. (2001). DEPENDENCE OF THE SYNTHETIC ACTIVITY OF NINE IMMOBILIZED LIPASES ON WATER ACTIVITY, 19, 37–49.
- Labuza, S. S. S. M. S. R. T. P. (2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. (Wiley, Ed.). Retrieved from <https://doi.org/10.1002/0471142913.faa0203s00>
- Liu, Y., Chen, D., & Yan, Y. (2013). Effect of ionic liquids, organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment on the conformation and catalytic properties of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.028>
- Matsuda, T., Harada, T., & Nakamura, K. (2005). Biocatalysis in Supercritical CO<sub>2</sub>. *Current Organic Chemistry*, 9(3), 299–315. <https://doi.org/10.2174/1385272053369060>
- Moorkoth, V., Arimboor, R., Chandrasekhar, L. P., Menon, K. R., & Natarajan, R. B. (2014). Red pepper (*Capsicum annuum*) carotenoids as a source of natural food colors: analysis and stability—a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1258–1271. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1260-7>
- Mora-Pale, J. M., Perez-Munguia, S., Gonzalez-Mejia, J. C., Dordick, J. S., & Barzana, E. (2007). The Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Lutein Diesters in Non-Aqueous Media is Favored at Extremely Low Water Activities. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(3), 535–542. <https://doi.org/10.1002/bit>
- Moreno Menéndez, A. (2000). *Extracción supercrítica de colorantes y capsaicina de Capsicum Annuum*. UNAM, México.
- Nobre, B. P., Queiroz, E. M., Pessoa, F. L. P., Coelho, J. P., Palavra, A. F., & Mendes, R. L. (2001). SOLUBILITY OF BIXIN AND BIXIN /  $\beta$  -CAROTENE MIXTURES IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE.
- Novozymes Biopharma DK A/S. (2014). Immobilized lipases for biocatalysis. Novozymes Biopharma DK. Retrieved from [https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis\\_brochure\\_Immobilised\\_Lipases.pdf](https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Immobilised_Lipases.pdf)
- Ottosson, J., & Hult, K. (2001). Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetic resolution of sec-alcohols. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 11(4–6), 1025–1028. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(00\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00088-6)
- Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Weinreich, B., & Knez, Ž. (2004). Extraction of chilli pepper (var. Byedige) with supercritical CO<sub>2</sub>: Effect of pressure and temperature on capsaicinoid and colour extraction efficiency. *Food Chemistry*, 87(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.016>
- Pirozzi, D., & Greco, G. (2004). Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(2), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.01.002>
- Rizvi, S. S. H. (1994). *Supercritical fluid processing of food and biomaterials* (1st ed.). Springer US. Retrieved from <https://www.springer.com/gp/book/9781461359074>
- Santamaría, R. I., Reyes-Duarte, M. D., Bárzana, E., Fernando, D., Gama, F. M., Mota, M., & López-Munguía, A. (2000). Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya

- 
- (*Capsicum annum* L.) using ethanol as solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 3063–3067. <https://doi.org/10.1021/jf991242p>
- Sato, K., Sasaki, S. S., Goda, Y., Yamada, T., Nunomura, O., Ishikawa, K., & Maitani, T. (1999). Direct connection of supercritical fluid extraction and supercritical fluid chromatography as a rapid quantitative method for capsaicinoids in placentas of *Capsicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4665–4668. <https://doi.org/10.1021/jf990488r>
- Scoville, W. L. (1912). Note on Capsicums. *The Journal of the American Pharmaceutical Association (1912)*, 1(5), 453–454. <https://doi.org/10.1002/jps.3080010520>
- Secundo, F., & Carrea, G. (2002). Lipase activity and conformation in neat organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20(May), 93–102. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00155-8)
- Škerget, M., & Knez, Ž. (1997). Solubility of Binary Solid Mixture  $\beta$ -Carotene–Capsaicin in Dense CO<sub>2</sub>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2066–2069. <https://doi.org/10.1021/jf960936k>
- Skerget, M., Knez, Z., & Habulin, M. (1995). Solubility of  $\beta$ -carotene and oleic acid in dense, 109, 131–138.
- Taylor, L. T. (1996). *supercritical fluid extraction* (1 edition). Wiley-Interscience.
- Uquiche, E., & Ortiz, J. (2004). Supercritical carbon dioxide extraction of red pepper (*Capsicum annum* L.) oleoresin, 65, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.12.003>
- Yao Jp Chandra A., N. M. (1994). Supercritical carbon-dioxide extraction of scotch bonnet (*capsicum-annuum*) and quantification of capsaicin and dihydrocapsaicin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (6), 1303–1305. <https://doi.org/10.1021/jf00042a010>
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1988). The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(17), 8017–8021. <https://doi.org/10.1042/BA20030133>

---

---

## Indice de Figuras

Figura 1. DIAGRAMA DE FASES DEL DIOXIDO DE CARBONO, ADAPTADA DE TAYLOR (1996). .....	5
Figura 2. ISOTERMAS DE DENSIDAD DE FLUIDO SUPERCRITICO DE CO <sub>2</sub> EN FUNCIÓN DE LA PRESIÓN. adaptada de Perry et al., (2007), Cuadro verde indica área de extracción óptima para compuestos hidrofóbicos. ....	6
Figura 3. REPRESENTACION DE LIPASA CALB EN AZUL RESIDUOS DE AMINOACIDOS DEL SITIO ACTIVO, ROJO ZONA DE ESTRUCTURA SECUNDARIA ALFA-HELICE, AMARILLO ESTRUCTURA SECUNDARIA BETA PLEGADA adaptada del Protein Data Bank. Código PDB 4K6G. ....	9
Figura 4. REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE LA CAPSAICINA, PRODUCTOS VAINILLILAMINA Y ACIDO 8-METIL-6-TRANS-NONENOICO. ADAPTADO DE DUARTE <i>ET AL.</i> ,(2000). ....	10
Figura 5. MOLÉCULA DE CAPSAICINA, MOSTRANDO LOS GRUPOS FUNCIONALES DE IMPORTANCIA, GRUPO VAINILLOICO, AMIDA Y CADENA HIDROCARBONADA. ....	12
Figura 6. ESTRUCTURA Y NOMBRE DE LOS COMPUESTOS COLORIDOS DEL GENERO CAPSICUM SP, adaptado de Moorkoth <i>et al.</i> , (2014). ....	13
Figura 7. EFECTO DE LA DENSIDAD DEL CO <sub>2</sub> SC EN LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES Y CAPSAICINOIDES adaptada de moreno, (2000). ....	14
Figura 8. EFECTO DE LA POLARIDAD DEL SOLVENTE EN LA SOLUBILIDAD DE LOS CAPSAICINOIDES Y COLORANTES adaptada de moreno (2000). ....	15
Figura 9. ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE PARA UN EXTRACTO DE CAPSAICINOIDES DE 1 mg DE REACTIVO QUÍMICO CON CO <sub>2</sub> SC. ....	23
Figura 10. ESPECTRO DE ABSORCIÓN UV-VISIBLE PARA UN EXTRACTO DE CAPSAICINOIDES DE 1 mg DE REACTIVO QUÍMICO CON en etanol. ....	23
Figura 11. BARRIDO DE UV-VIS PARA CAPSAICINA (ROJO) Y PARA VAINILLILAMNIA (AZUL). ....	23
Figura 12. ESQUEMA DE REACCIÓN DEL PURPURA DE RUHEMAN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LAS AMINAS PRIMARIAS. ....	24
Figura 13. CURVA PATRÓN PARA CUANTIFICAR CAPSAICINOIDES, EL COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR PARA LA LONGITUD DE ONDA DE 240 nm FUE 2593.7, Y PARA LA LONGITUD DE ONDA DE 280 nm FUE DE 1054.6. LOS CIRCULOS BLANCOS SON 240 nm Y CIRCULOS OSCUROS 280 nm. ....	24
Figura 14. REACCIÓN DE NINHIDRINA SOBRE PRODUCTOS (VAINILLILAMINA) Y REACTIVOS (CAPSAICINA)DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS. ....	25
Figura 15. CROMATOPLACA E (LAVADO DE ENZIMA), R (LAVADO DE REACTOR), CAP (CAPSAICININA), VAN (VAINILLILAMINA) DERECHO LUZ VISIBLE, LADO IZQUIERDO REVELADO CON LUZ UV. REACCIÓN SOBRE OLEORESINA QUÍMICO. ....	25
Figura 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE CAPSAICINOIDES POR HPLC. ....	26
Figura 17. COMPARACIÓN DE PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE CAPSAICINOIDES Y VAINILLILAMINA ANTES DE LA REACCIÓN (AZUL) DESPUES DE LA REACCIÓN (ROJO). ....	29
	45

---

Figura 18. EFECTO DE LA ACTIVIDAD ACUOSA EN LA CONVERSIÓN DE CAPSAICINOIDES PROVENIENTES DE 3 FUENTES DIFERENTES.....	32
Figura 19. Efecto del $a_w$ de la harina de chile sobre la velocidad inicial de extracción de capsaicoides en el $CO_2SC$ .....	36
Figura 20. EFECTO DEL $a_w$ DE LA HARINA DE CHILE SOBRE EL MAXIMO DE EXTRACCIÓN DE CAPSAICINOIDES EN EL $CO_2SC$ . .....	36
Figura 21. EFECTO DEL $a_w$ DE LA HARINA DE CHILE SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE EXTRACCIÓN DE COLORANTES DETECTABLES A 450 nm.....	37
Figura 22. EFECTO DEL $a_w$ DE LA HARINA DE CHILE SOBRE EL MAXIMO DE EXTRACCIÓN DE LOS COLORANTES DETECTABLES A 450 nm.....	37
Figura 23. RELACIÓN ENTRE CANTIDAD DE AGUA ADSORBIDA POR EL CATALIZADOR de polivinilo de la novozyme 435 Y LA ACTIVIDAD ACUOSA. Adaptado de Chamouleau <i>et al.</i> , (2001).....	40

## Indice de tablas

Tabla 1. COMPARACIÓN RELATIVA DE SOLVATACIÓN (EXTRACCIÓN) ENTRE DISOLVENTES Y $CO_2SC$ A DIFERENTES DENSIDADES .....	7
Tabla 2. DISTRIBUCIÓN DE CAPSAICINOIDES MÁS REPRESENTATIVOS DE ALGUNAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Capsicum</i> .....	11
Tabla 3. ACTIVIDAD DE AGUA ( $a_w$ ) DE SOLUCIONES SATURADAS USADAS A TEMPERATURA de 25°C. DATOS OBTENIDOS DE LABUZA (2001). .....	20
Tabla 4. COMPARACIÓN DE ANÁLISIS PROXIMALES DEL CHILE GUAJILLO. ....	22
Tabla 5. Extracción de capsaicoides de la harina de chile guajillo comparando entre etanol y $CO_2SC$ . .....	27
Tabla 6 DISTRIBUCIÓN DE CAPSAICINOIDES MÁS REPRESENTATIVOS DE ALGUNAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Capsicum</i> . .....	28