



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

MELENDEZ GORDILLO RICARDO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: "Estudio de los Componentes Químicos en tres Variedades Mexicanas de Capsicum annum (guajillo, ancho y mulato)".

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE DR. FEDERICO A. GARCIA JIMENEZ

F. Garcia Jimenez

VOCAL DRA. OFELIA COLLERA ZUÑIGA

O. Collera

SECRETARIO DR. BENITO REYES TREJO

B. Reyes Trejo

SUPLENTE Q.F.I. MA. CARMEN NIÑO DE RIVERA OYARZABAL

C. Niño de Rivera

SUPLENTE Q. MARTHA JULIETA OLIVEROS GARCIA

M. Oliveros Garcia

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. a, 5 de Agosto de 1998.

[Firma]
Q.F.B. JOSE LUIS ALFREDO MORA GUEVARA
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO A CABO
EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. OFELIA COLLERA ZUÑIGA
Y ASESORIA DEL DR. FEDERICO GARCÍA JIMÉNEZ

AGRADECIMIENTOS:

A LA DRA. OFELIA COLLERA
ZUÑIGA, POR LA ACERTADA
DIRECCIÓN DE ESTE TRABAJO Y
POR TODO SU APOYO PARA
LOGRAR UNO DE MIS SUEÑOS MÁS
PRECIADOS.

AL DR. FEDERICO GARCÍA
JIMÉNEZ, POR LOS COMENTARIOS
Y APORTACIONES HECHAS PARA
LA ELEBORACIÓN DE ESTE
TRABAJO.

A MIS COMPAÑEROS DE
GENERACIÓN Y LABORATORIO
POR SU AMISTAD Y APOYO EN LOS
MOMENTOS DIFÍCILES.

A la memoria de mí Mamá:
Ma. del Carmen Gordillo Damas,
y a la memoria de mis Tios:
Ucdivina Damas Pérez y
Pablo Pérez Pérez,
con todo mí amor.

A mí Papá,
por su apoyo
y comprensión.

A mis Hermanos, por
su apoyo y cariño.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

m	metro.
mm	milímetro.
mg	miligramo.
ml	mililitro.
kg	kilogramo.
cm	centímetro.
g	gramo.
μm	micrómetro.
Å	angstroms (10^{-8} cm)
nm	nanómetro.
hrs.	horas.
$\lambda_{\text{máx.}}$	longitud de onda máxima.
RMN	resonancia magnética nuclear.
UV-VIS	ultravioleta y visible.
IR	infrarrojo.
HPLC	cromatografía líquida de alta presión.
Mesh	tamaño de malla.
S	separación.
P	purificación.
c.	cristalización.
c.p.p.	cromatografía en placa preparativa.
c.c.	cromatografía en columna.
c.c.f.	cromatografía en placa fina.

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS, CROMATOGRAMAS, TABLAS Y ANEXOS.

DESCRIPCIÓN	PÁGINA
<i>Figura</i> 1. PLANTA DE CHILE DEL GÉNERO <i>Capsicum annuum</i>	9
<i>Figura</i> 2. EJEMPLOS DE COMPUESTOS CAPSAICINOIDES.	11
<i>Figura</i> 3. EJEMPLOS DE CAROTENOIDES.	13
<i>Figura</i> 4. BIOSÍNTESIS DE CETOCAROTENOIDES EN FRUTOS DE <i>Capsicum annuum</i>	16
<i>Figura</i> 5. PROBABLE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN BLACK PAPRIKA.	17
<i>Figura</i> 6. SECUENCIA BIOSINTÉTICA PARA LA FORMACIÓN DE LOS ANILLOS β- y ε-IONONA, QUE DAN ORIGEN A LA SERIE DE LOS β, β-; β, ε- y ε, ε-CAROTENOS.	18
<i>Figura</i> 7. ESTRUCTURA DE ALGUNOS COMPONENTES AROMÁTICOS PRESENTES EN LOS FRUTOS DEL GÉNERO <i>Capsicum</i>	20
<i>Figura</i> 8. ESTRUCTURA DE LOS FLAVONOIDES.	21
<i>Figura</i> 9. DISTRIBUCIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFÍA BI-DIMENSIONAL EN PAPEL.	24
<i>Figura</i> 10. DISTRIBUCIÓN DE FLAVONOIDES EN PLACA CROMATOGRÁFICA BI-DIMENSIONAL, REVELADO CON LUZ ULTRAVIOLETA, DE LA VARIEDAD GUAJILLO.	60
GRÁFICA 1. CAMBIOS RELATIVOS EN LOS CAROTENOIDES DURANTE LA MADURACIÓN DE: capsantina, luteína, zeaxantina, β-caroteno, cucurbitaxantina A y β-criptoxantina.	14
GRÁFICA 2. CAMBIOS RELATIVOS EN LOS CAROTENOIDES DURANTE LA MADURACIÓN DE: capsorubina, violaxantina, antheraxantina, capsantina-5,6-epóxido y neoxantina.	15
CROMATOGRAMA No. 1. SEPARACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LAS TRES VARIEDADES: GUAJILLO, MULATO Y ANCHO.	44
CROMATOGRAMA No. 2. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE NORMAL DE LAS TRES VARIEDADES: GUAJILLO, ANCHO Y MULATO.	50
CROMATOGRAMA No. 3. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE REVERSA DEL GUAJILLO.	52
CROMATOGRAMA No. 4. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE REVERSA DEL CHILE MULATO.	53
CROMATOGRAMA No. 5. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE REVERSA DEL CHILE ANCHO.	54

DESCRIPCIÓN

PÁGINA

Tabla I.	COMPARACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A MASAS EN LAS TRES VARIETADES DE CHILES (guajillo, ancho y mulato).	45
Tabla II.	ESTRUCTURA DE ALGUNOS DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILE, IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	47
Tabla III.	PICOS RESUELTOS OBTENIDOS POR HPLC EN FASE NORMAL DE LAS TRES VARIETADES DE CHILES.	51
Tabla IV.	PICOS RESUELTOS OBTENIDOS POR HPLC EN FASE REVERSA DE LAS TRES VARIETADES DE CHILES.	55
Tabla V.	COMPARACIÓN DE LOS COMPONENTES CAROTENOIDES IDENTIFICADOS EN LAS TRES VARIETADES DE CHILES: guajillo, ancho y mulato.	56
Tabla VI.	CARACTERÍSTICAS DE LOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFÍA EN: CAPA FINA, PREPARATIVA Y EN COLUMNA.	57
Tabla VII.	VALORES DE LONGITUDES MÁXIMAS (λ) DE UV-VIS DE FLAVONOIDES SEPARADOS POR COLUMNA Y C.P.P. DE LAS VARIETADES: guajillo y mulato.	59

ANEXO 1.	ESPECTRO DE UV-VIS DEL β -CAROTENO ESTANDAR ANTES DEL TRATAMIENTO CON UV.	76
ANEXO 2.	ESPECTRO DE MASAS DEL β -CAROTENO ESTANDAR DETERMINADO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON UV.	77
ANEXO 3.	ESPECTRO DE MASAS DE OTRA MUESTRA DE β -CAROTENO ESTANDAR DETERMINADO ANTES DEL TRATAMIENTO CON UV.	78

ÍNDICE GENERAL

DESCRIPCIÓN	PÁGINA
RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	3
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.	5
2.1. HISTORIA DEL GÉNERO <i>CAPSICUM</i> .	6
2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS CHILES.	6
2.3. DESCRIPCIÓN DE LOS <i>CAPSICUM ANNUM</i> .	8
2.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS FRUTOS DE <i>CAPSICUM</i> .	10
2.4.1. CAPSAICINOIDES.	10
2.4.2. CAROTENOIDES.	11
2.4.3. COMPONENTES VOLÁTILES.	19
2.4.4. FLAVONOIDES.	22
2.5. MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES QUÍMICOS EN PLANTAS.	22
2.5.1. PARA CAROTENOS.	22
2.5.2. DEL GRUPO DE LOS VOLÁTILES.	23
2.5.3. DE ORIGEN FLAVONOIDES.	23
2.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y USOS DE LA PLANTA DEL GÉNERO <i>CAPSICUM</i> .	25
2.6.1. CAPSAICINAS.	25
2.6.2. CAROTENOS.	26
2.6.3. FLAVONAS.	26
3. PROBLEMA A RESOLVER.	28
1. OBJETIVO.	30
5. HIPÓTESIS.	31
6. METODOLOGÍA.	32
6.1. MATERIALES.	33
6.1.1. MATERIA PRIMA.	33

DESCRIPCIÓN	PÁGINA
6.1.2. MATERIAL DE VÍDRIO Y OROS.	33
6.1.3. DISOLVENTES.	34
6.1.4. REACTIVOS Y OTROS.	34
6.1.5. EQUIPOS.	35
6.2. MÉTODOS.	36
6.2.1. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.	36
6.2.2. COMPONENTES VOLÁTILES.	36
6.2.3. CAROTENOIDES (Pigmentos).	37
6.2.4. FLAVONOIDES.	40
7. RESULTADOS.	42
7.1. COMPONENTES VOLÁTILES.	43
7.2. CAROTENOIDES.	49
7.3. FLAVONOIDES.	59
8. DISCUSIÓN.	61
9. CONCLUSIONES.	66
10. BIBLIOGRAFÍA.	69
II. ANEXOS.	75

RESUMEN

Desde hace tiempo los mexicanos hemos desarrollado un gran aprecio por las plantas y flores. Desde entonces numerosos investigadores se dedicaron a analizar y describir las plantas y flores medicinales de México. El presente trabajo consiste en el estudio de los componentes químicos de tres variedades mexicanas de chiles (guajillo, ancho y mulato) cuyo nombre científico es *Capsicum annuum* de la familia solanaceae. Los chiles de las tres variedades fueron adquiridos en un centro comercial, enteros, maduros y deshidratados; a los cuales les fueron separados las semillas, el pericarpio fue cortado en pedazos y molido. Se extrajeron los componentes volátiles por medio de arrastre de vapor de agua, al residuo se le extrajo con diclorometano, obteniéndose componentes carotenoides, y posteriormente se trató con metanol, del que se obtuvieron los componentes flavonoides.

La separación e identificación de los componentes volátiles se realizó utilizando la técnica de cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas. De los componentes separados e identificados, se obtuvieron 6 comunes entre las tres variedades y, 31 componentes diferentes entre ellas. En el caso de los componentes de origen carotenoide, la separación e identificación se realizó utilizando la técnica de cromatografía de HPLC, en fase normal y en fase reversa de extractos saponificados, en columna y en capa fina de extractos no saponificados; además, se utilizaron 5 muestras auténticas de carotenos como referencias. De ésta manera, se lograron identificar 16 componentes de origen carotenoide comunes entre las variedades en estudio y, 12 componentes diferentes. En los flavonoides, la separación e identificación se realizó utilizando la cromatografía en placa bi-dimensional y en columna junto con la cromatografía en placa preparativa. Éste análisis fue incompleto, debido al tiempo disponible, ya que solo se trabajó con una variedad, el guajillo.

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre las variedades, principalmente en el grupo de componentes volátiles, ya que en los de origen carotenoide existe una mayor similitud entre las variedades. Lo anterior concuerda con las características que presentan las tres variedades: el aroma, sabor, color y morfología.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales es una de las actividades más antiguas del hombre; así, se define a la medicina tradicional como el conjunto de conocimientos, creencias, prácticas y recursos provenientes de la cultura popular, de lo que hace uso la población del país para resolver, en forma empírica sus problemas de salud, al margen o a pesar de la existencia de una medicina oficial e institucionalizada por el Estado (Lozoya, 1989).

México es un país vasto y diverso en recursos vegetales. Sin embargo el conocimiento y el estudio de la flora mexicana es aún deficiente, lo cual se manifiesta por la escasa literatura científica sobre ella. No obstante, el desarrollo del país requiere cada día más de los conocimientos de los recursos naturales especialmente los renovables (Cano, 1988). Dentro de este marco, las plantas de uso medicinal tienen una gran importancia, ya que son utilizadas por grupos étnicos y sociales que habitan nuestro país, cuyos conocimientos se han transmitido a través de generaciones, basándose en un saber empírico. La utilización de las plantas medicinales en una sociedad constituye parte de su cultura médica y se debe comprender como un proceso histórico continuo de interacción hombre-naturaleza.

Es un hecho que, desde hace dos décadas, en todo el mundo industrializado se replantea la utilidad y la vigencia de la herbolaria medicinal bajo el enfoque de una nueva biotecnología que augura revolucionar el mundo de los medicamentos provenientes de plantas (Wagner, 1985).

Con base en lo anterior, el presente trabajo pretende dar a conocer los resultados obtenidos del estudio químico de tres variedades mexicanas de chiles: guajillo, ancho y mulato (*Capsicum annuum*).

**2. FUNDAMENTO
TEÓRICO**

2.1. HISTORIA DEL GÉNERO *Capsicum*.

Los "Chiles" han formado parte básica de la dieta mexicana desde hace mucho tiempo. Es un condimento a menudo usado en los pueblos de América para la preparación de diversos guisos. Estudios arqueológicos han demostrado que las dietas típicas de las civilizaciones precolombinas, estaban basadas en maíz, chile, frijol y calabacita. De estos cuatro componentes de la dieta mexicana, el chile indudablemente ha inspirado mas historia, cuentos y leyendas que ningún otro. Los Aztecas lo llamaban "chilli" y no solo lo utilizaban como condimento sino además tenía usos medicinales. Los "ajis" como lo llamaban las tribus antillanas, han provocado polémica en cuanto a su origen; algunos botánicos lo consideran procedente de Asia, mientras que otros de América. Lo cierto es que ni los hindúes, romanos, griegos, chinos, y ni tampoco los árabes, durante el apogeo de su ciencia médica mencionan a esta planta.^(1,2)

El género *Capsicum* cuyo nombre significa literalmente "yo muerdo" fue establecido por Tournefort en 1700 y descrito en su obra titulada "Institutiones Rei Herbariae" y más tarde en 1742 ratificado por Linneo en su obra "General Plantarum".⁽²⁾ Pero las evidencias arqueológicas en Tehuacán (México), demuestran que esta planta estaba domesticada 5,000 años A.C., mucho más antiguas que las encontradas en Perú, cuya antigüedad registrada es del orden de 2,000 años A.C., por lo tanto, se puede decir que el origen del género *Capsicum* es sin duda, México, y después fue transportada a otras partes de América tropical por pájaros fruteros.^(2,3) Así mismo, se le atribuye a Cristobal Colón la llegada de éste género a Europa, específicamente a España, pues llevó una gran cantidad de frutos de su primer viaje al nuevo mundo, y; dada la resistencia de las semillas, ésto permitió que fueran transportadas a la India y muchos tropicos y subtropicos en la primera mitad del siglo XVI.^(1,3)

2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS CHILES (*Capsicum*).

Los chiles provienen de plantas del género *Capsicum* de la familia solanaceae, la misma familia que incluye las papayas, el tabaco y los tomates. Como se sabe, principalmente el clima y el tipo de suelo permiten desarrollar una

gran cantidad de variedades, haciendo difícil la clasificación, lo cual crea confusión en ella. En la actualidad se mencionan varias especies, por ejemplo: *C. pubescens*, *C. Chinense*, *C. pendulum*, *C. minimum*, *C. frutescens* y *C. annuum*; con más de 50 variedades o razas.^(1,2,4) Los trabajos de Irish en 1896 con respecto a la revisión del género *Capsicum* permitieron encauzar la opinión de los botánicos al considerar como una sola especie a *C. annuum* y *C. frutescens* de Linneo. Actualmente existe la proposición de reducir todas las variedades de *Capsicum* a una sola especie debido a que por ejemplo Bailey y Erwin aseguran que los caracteres morfológicos que se han considerado diferenciables entre ambas especies tienen variaciones tan amplias que en un momento dado pueden pertenecer a las dos.⁽²⁾ Aun cuando también es posible que dado el grado de diversificación, se presente el fenómeno contrario; es decir, algunas variedades de *Capsicum annuum* hallan llegado a separarse tanto en características genéticas como para formar nuevas especies.

DATOS TAXONÓMICOS⁽²⁾

División	Angiospermae	Orden	Tubiflorae
Clase	Dicotyledoneae	Familia	solanaceae
Subclase	Metachlamydae	Género	<i>Capsicum</i>

En México la clasificación admitida considera solo dos especies:⁽²⁾

I. *C. annuum*, con seis variedades:

1. *C. annuum* L. var. *conoides* Miller.
2. *C. annuum* L. var. *acuminatum* Fingerh.
3. *C. annuum* L. var. *longum* Sendt.
4. *C. annuum* L. var. *grossum* Sendt.
5. *C. annuum* L. var. *abbreviatum* Fingerh.
6. *C. annuum* L. var. *ceraciforme* Miller.

II. *C. frutescens*:

C. frutescens var. *baccatum*.

2.3. DESCRIPCIÓN DE LOS *Capsicum annuum*.

Las plantas de *Capsicum annuum* crecen a nivel del mar hasta 1,800 m o más en los trópicos. Se tienen que proteger del frío y, usualmente demandan una precipitación de 750 a 1,500 mm. No aceptan el agua abundante y los daña la inundación. Demandan suelos ricos en calcio y fósforo, con un pH entre 4.3 a 8.7. Una buena producción de chile llega a 2,500 kg por hectaria (en chile seco).^(3,4)

El *Capsicum* es una planta anual, que puede crecer hasta un metro de altura. Es de tallos empinados y ramosos con las hojas aovadas o entre aovadas y lanceoladas, sobre un prolongado rabillo, de bordes enteros o apenas sinuados en la base. Las flores suelen nacer de una en una, con el cabillo torcido hacia abajo. El cáliz, de una sola pieza, forma cinco dientecitos en el borde, los cuales persisten y se endurecen hasta madurar el fruto. La corola es blanca, rotácea, esto es, también de una pieza, pero con el tubo muy corto, y dividida en cinco lóbulos profundos (o en seis o siete, por excepción, lo mismo que el cáliz),^(1,4) figura 1. Inmediatamente después de la floración aparece según la especie, una baya (la guindilla) de color rojo amarillento o verde, y de forma muy variada, por lo regular prolongada y de 5 a 18 cm de longitud por 2 a 10 cm de diámetro. Dentro de ella tiene de dos a cuatro tabiques incompletos que se distribuyen a lo largo del pericarpio, esto es, de la pared del fruto, los cuales no llegan al centro, por lo cual esta baya solo forma una cavidad. En estos tabiques incompletos, carnosos y de color amarillento, y sobre todo en la base, donde concurren todos, se encuentran las semillas, que son arriñonadas o casi discoidales, comprimidas, de 4 a 5 mm y de color marfil. Dicho pericarpio o pared del fruto tiene un espesor variable, pero, por lo común, no más de 5 a 7 mm.^(1,4)

Los frutos del chile guajillo o guajío (*C. annuum* L. var. *longum* Sendt) tienen una longitud de 7 a 11 cm por 2 a 4 cm de ancho y es de color rojizo. Los del chile ancho y el mulato (*C. annuum* L. var. *grossum* Sendt), los cuales, el



Figura 1. PLANTA DE CHILE DEL GÉNERO CAPSICUM ANNUM.⁽¹⁾

primero es de color rojo oscuro de 8 a 12 cm de largo por 4 a 8 cm de diámetro, cultivable en el estado de Veracruz, Coahuila, Jalisco, Chiapas y en el Valle de México. El segundo al que se le denomina "chile poblano" cuando está fresco, se cultiva principalmente en todo el estado de Puebla. La forma del fruto es casi igual que el anterior, o puede ser más largo.⁽²⁾

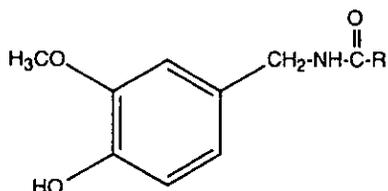
2.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA EN LOS FRUTOS DE *Capsicum*.

Como todo producto natural, los frutos de *Capsicum* contienen una amplia gama de componentes químicos, como las vitaminas C, B₁, B₂, E, A y grasas, entre otros componentes;^(3,5) pero los que se encuentran en mayor proporción, así como de importancia en éstos, son: los del grupo de la capsaicina, los de origen carotenoides, los componentes volátiles y los flavonoides.

2.4.1. CAPSAICINOIDES.

Los chiles son especialmente conocidos por ser picantes, (la sensación de ardor en la boca). El principio pungente está formado por un grupo de compuestos llamados **capsaicinoides**, representados por la capsaicina y sus homólogos^(2,8) (*Figura 2*). Su estructura se asignó como lo muestra la fórmula general **I**. Recientes estudios farmacológicos han revelado que las sustancias responsables del picor son protoalcaloides que forman parte del grupo de las amidas (R-NH-COR).

En realidad la acción picante de los chiles se debe a una mezcla de amidas, en donde la capsaicina (**II**) forma aproximadamente el 69% del principio picante; la dihidrocapsaicina (**III**) constituye el 22%; y los demás componentes solamente se encuentran en trazas. Esto es en general, ya que en cada especie varía el picor, el sabor y el aroma. Otros homólogos presentes en el chile son la homocapsaicina (1%), (**IV**), la homodihidrocapsaicina (1%), (**V**) y la nordihidrocapsaicina (7%), (**VI**); (ver *Figura 2*). Los estudios químicos señalan que el largo de la cadena (R) está ligado al picor de la amida, observando además que el mayor picor se presenta cuando R contiene 9 átomos de carbono, presentándose variaciones en esta característica al aumentar o al acortarse dicha cadena.^(2,6)



I.

R:

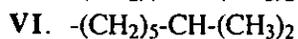
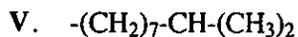
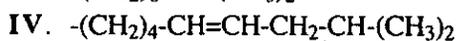
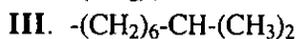
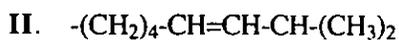


Figura 2. EJEMPLOS DE COMPUESTOS CAPSAICINOIDES.⁽²⁾

2.4.2. CAROTENOIDES.

En los chiles se han encontrado pigmentos de origen carotenoide; los cuales son tetraterpenos, constituidos de 8 unidades isoprénicas, provenientes de la condensación de dos unidades idénticas de C_{20} . La mayor parte de los carotenos tienen un esqueleto de carbono C_{40} y una unidad central de C_{22} , conteniendo de 9 a 11 dobles enlaces conjugados y 4 grupos metilos laterales en la cadena. El grupo final puede o no estar ciclizado, siendo los anillos iguales o diferentes. Un

caroteno cíclico clásico contiene dos anillos en la molécula, por ejemplo, el β -caroteno,⁽⁹⁾ *Figura 3*.

Existen dos grupos principales de carotenos: Los hidrocarburos (carotenos) y las xantofilas, *Figura 3*. Las xantofilas son derivados oxigenados de carotenos; el grupo oxigenado se puede encontrar como: hidroxí-, metoxi-, epoxi-, carboxi-, o grupo carbonilo. La mayor parte de las sustituciones se dan en la posición 1-6 y 1'-6', aunque son la principal excepción los 5,8-epóxidos.^(9,10)

Así mismo, diversas propiedades de los carotenos se atribuyen a su variada estructura química. Tienen la capacidad de amortiguar o inactivar los estados excitados de las moléculas, como en los procesos que se presentan en las reacciones fotosintéticas. Estas propiedades dependen de: la longitud y rigidez de las moléculas; la longitud de los cromóforos conjugados, y por lo tanto en el amortiguamiento y en la absorción de la luz, la naturaleza de los grupos finales (cíclicos o no cíclicos), y de la presencia de sustituyentes.⁽⁹⁾

Por otro lado, más de 30 carotenoides han sido encontrados en diferentes variedades de *Capsicum*⁽¹⁰⁾ rojos, entre los más comunes se encuentran los siguientes: anteraxantina, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, violaxantina, luteína, neoxantina, criptocapsina, criptoflavina, capsoluteína, luteoxantina, capsantina, 5,6-epoxi-capsantina, capsorubina, mutatoxantina, auroxantina, etc. Ha sido descrito que en la biosíntesis de los carotenos en los chiles rojos, la capsantina, capsorubina y criptocapsina, se forman a partir de los correspondientes 5,6-epoxicarotenoides (anteraxantina, violaxantina y 5,6-epoxi-criptoxantina),^(11,14,15) (ver *Figura 4*).

Estudios realizados en diferentes variedades de *Capsicum annuum*, revelan el comportamiento de los pigmentos durante la maduración de los frutos, (Gráfica 1 y 2).⁽¹¹⁾ La clorofila, principalmente la de tipo *a* desaparece más rápidamente que la *b*; así como, la luteína (β , ϵ -caroteno-3,3'-diol) y la neoxantina (5',6'-epoxi-6,7-dihidro-5,6,5',6'-tetrahidro- β , β -caroteno-3,5,3'-triol) también desaparecen, mientras que otros incrementan su concentración, como: el

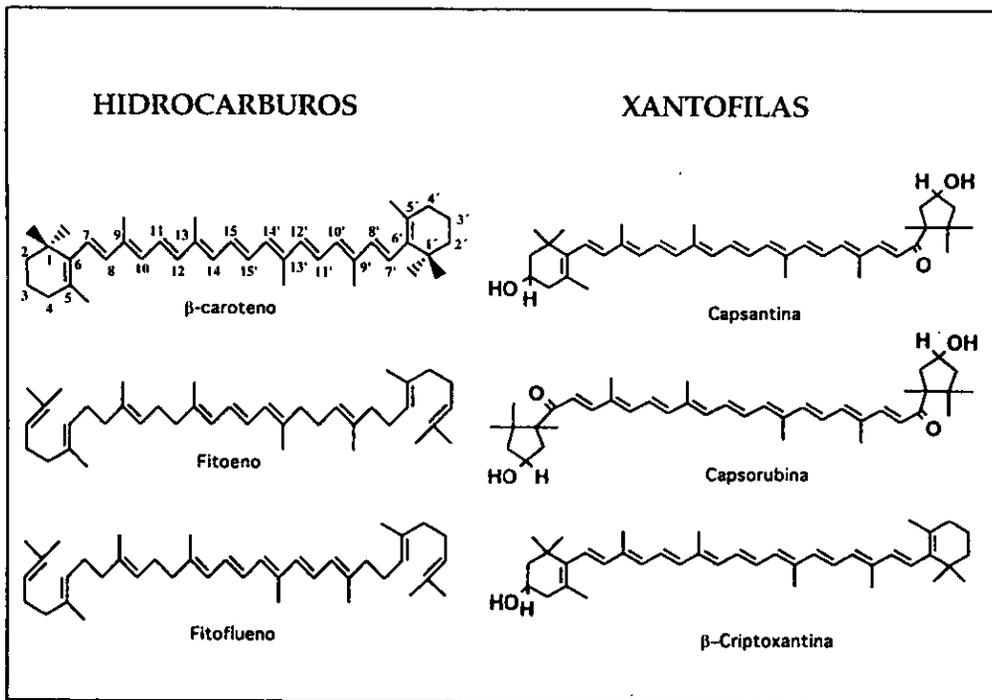
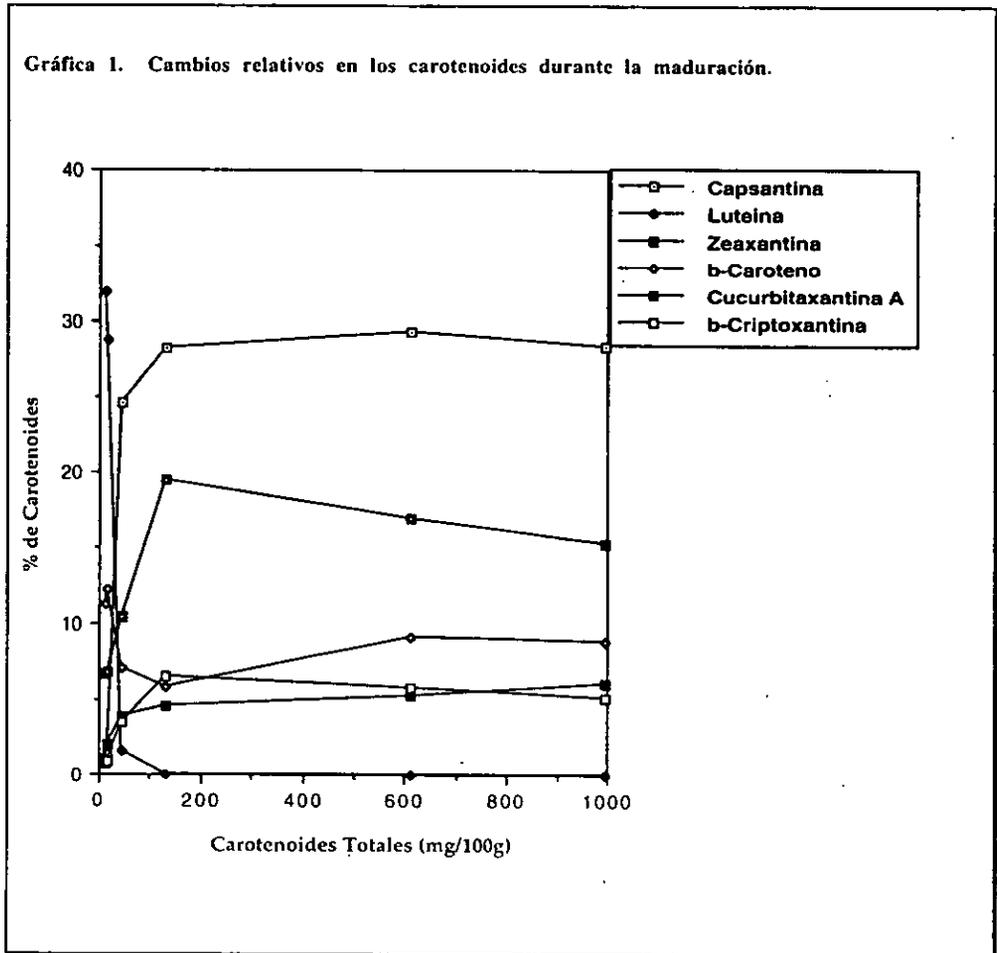


Figura 3. EJEMPLOS DE CAROTENOIDES.⁽⁹⁾

β , β -caroteno y la violaxantina (5,6,5',6'-diepoxi-5,6,5',6'-tetrahidro- β , β -caroteno-3,3'-diol); además, de que otros nuevos pigmentos se están formando: zeaxantina (β , β -caroteno-3,3'-diol), capsantina, capsorubina, β -criptoxantina y capsoluteína.⁽¹²⁾ En los primeros estados de maduración de los chiles, la concentración del α -criptoxantina es alta, conforme va madurando, éste va disminuyendo, y va aumentando la β -criptoxantina. Esto mismo ocurre con los α - y β - carotenos, con la excepción de que el α -caroteno permanece en bajas cantidades, tendiendo a disminuir, según va madurando el chile. Es posible que la desaparición de la luteína desempeñe un papel muy importante en los procesos fotosintéticos, detenidos durante la madurez. La criptocapsina se ha encontrado en

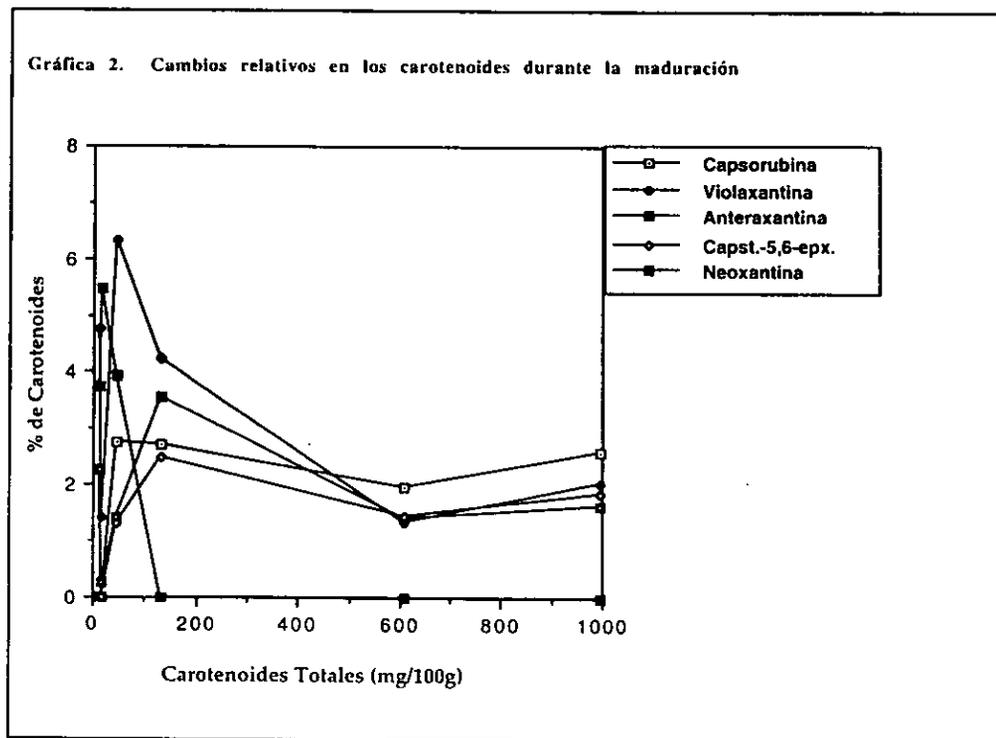
muy pequeñas cantidades. Los chiles amarillos contienen un alto porcentaje de carotenoides 5,6-epoxi, no así, los chiles rojos. Los porcentajes de éstos componentes varían según la variedad y estado de maduración de los chiles.^(11,16)

Gráfica 1. Cambios relativos en los carotenoides durante la maduración.



A principios de los 70's, en base a los estudios realizados a diversas variedades de *Capsicum* en diferentes estados de maduración, se propuso una posible ruta biosintética para la formación de los carotenoides a partir del β -caroteno, *Figura 4*. Por otro lado, Parkes *et al*, en 1986, aislaron cuatro nuevos carotenoides: karpoxantina, cucurbitaxantina A, 3,6-epoxicapsantina y 5,6-epoxicapsantina, de los chiles rojos. La presencia de estos nuevos componentes que contienen los grupos finales 3,6-epoxi y 3,5,6-trihidroxi, revelan una nueva ruta biosintética, *Figura 5*.

Gráfica 2. Cambios relativos en los carotenoides durante la maduración



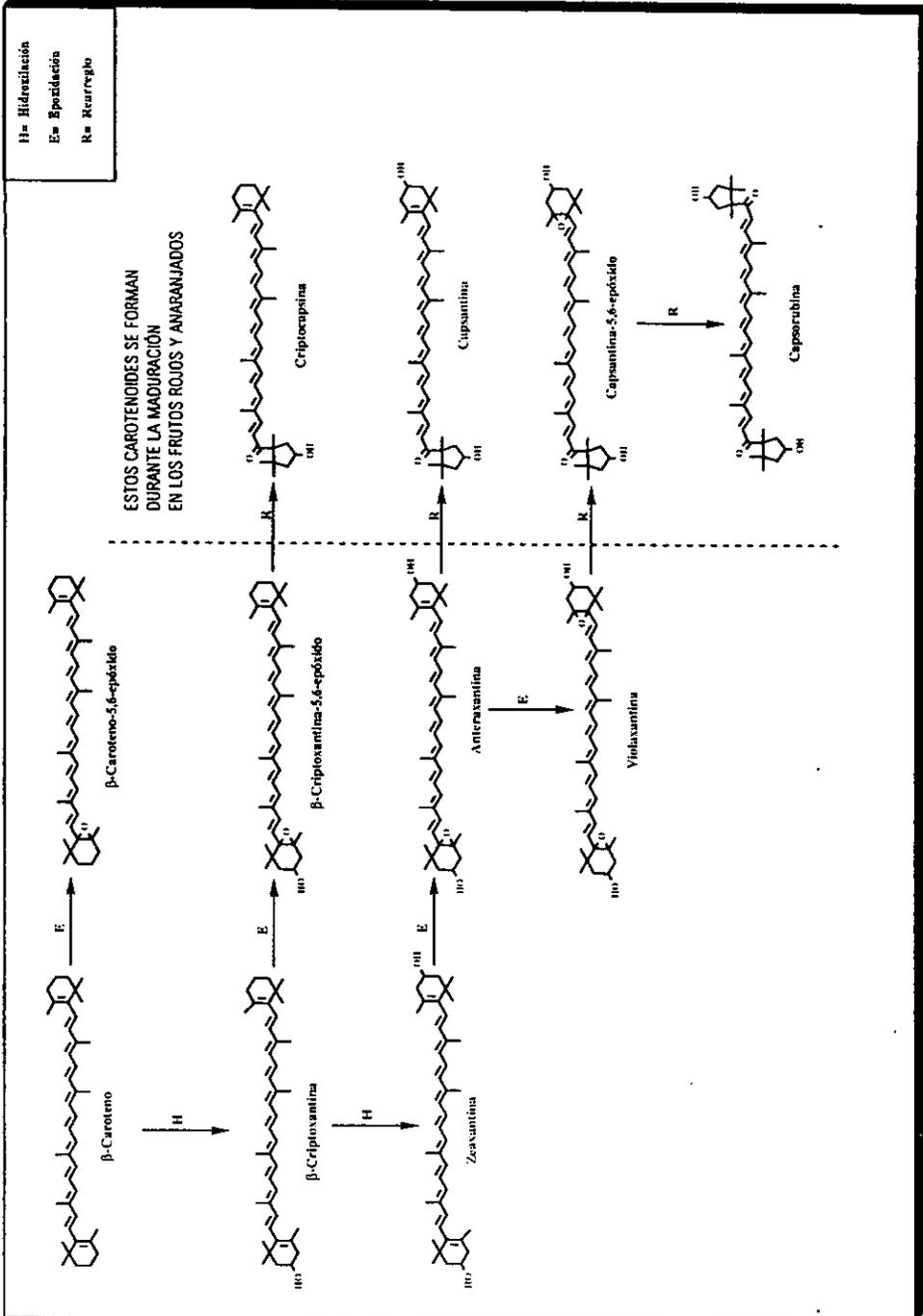


Figura 4. BIOSÍNTESIS DE CETOCAROTENOIDES EN FRUTOS DE *Capsicum annuum*. (17)

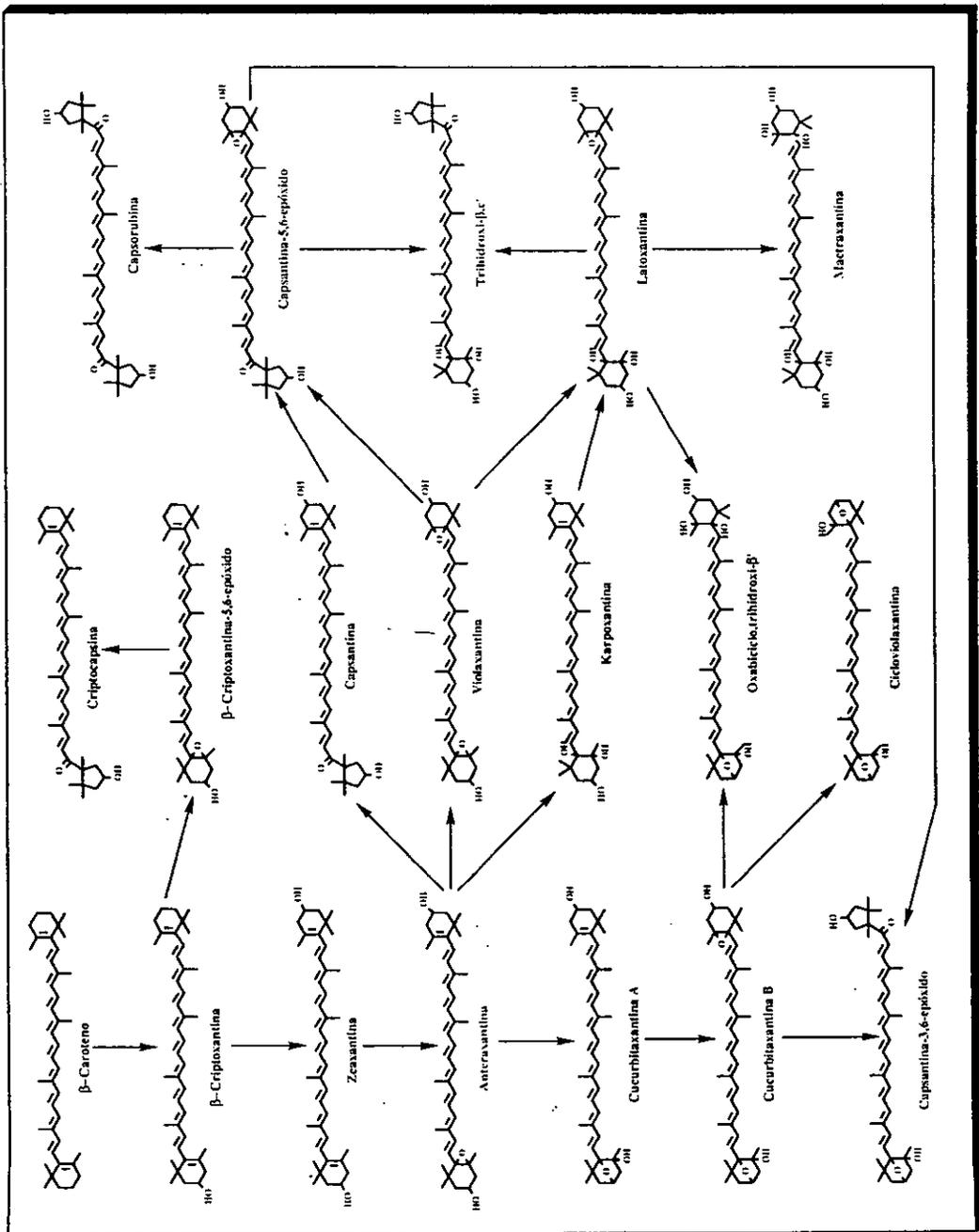


Figura 5. PROBABLE BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES EN BLACK PAPRIKA. (11)

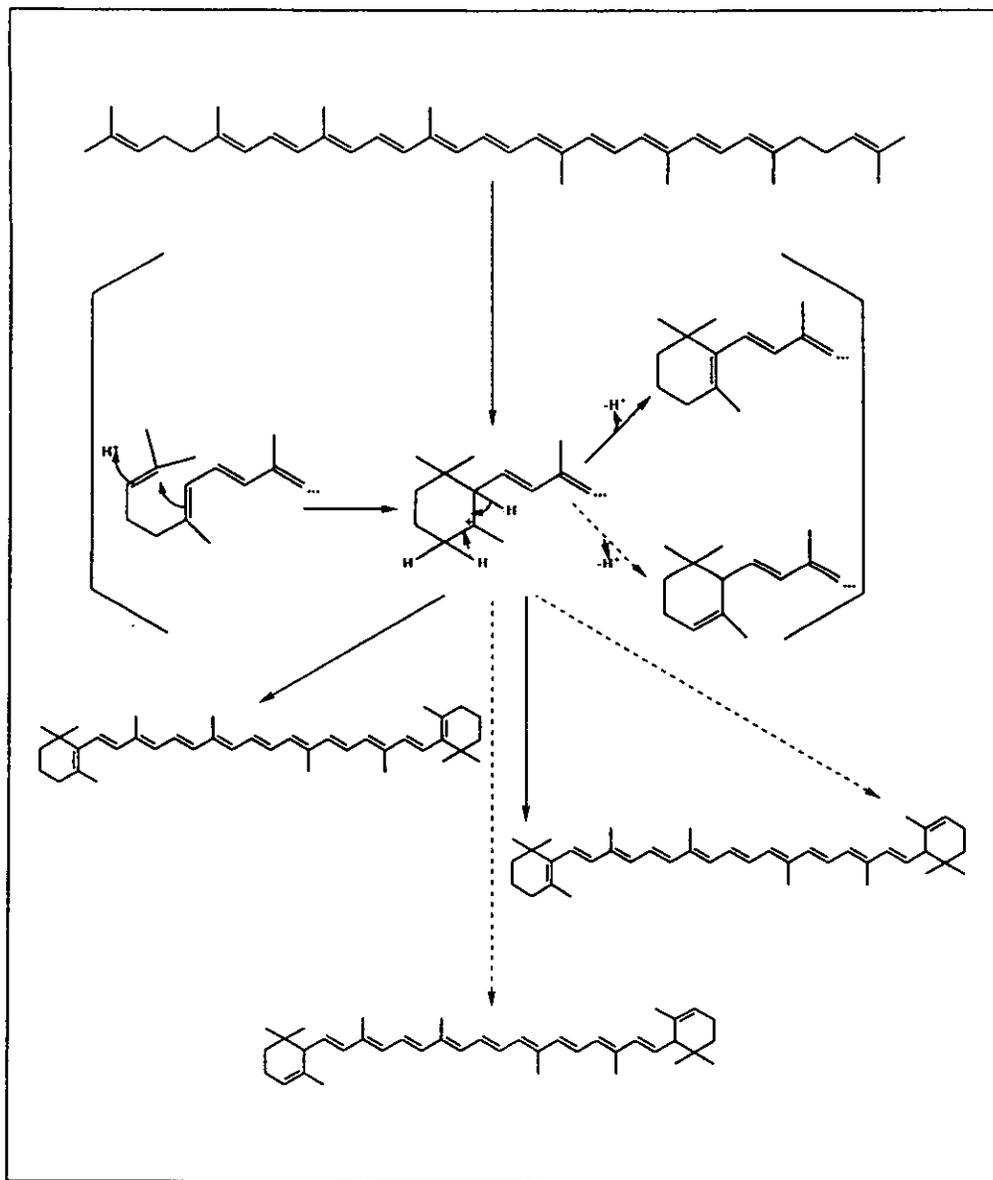


Figura 6. SECUENCIA BIOSINTÉTICA PARA LA FORMACIÓN DE LOS ANILLOS β - Y ϵ - IONONA, QUE DAN ORIGEN A LA SERIE DE LOS β , β -; β , ϵ - Y ϵ , ϵ -CAROTENOS.⁽¹⁵⁾

Porter y Lincoln, 1950, así como Weedon, 1971, dan una posible ruta carotenogénica de los precursores que dan origen a las tres principales familias de carotenos de tipo hidrocarburo: los que tienen dos anillos de β -ionona, que dan origen a la serie de los β,β -carotenos, los que poseen tanto un anillo β -ionona y uno de ϵ -ionona, que dan origen a la serie de β,ϵ -carotenos; y finalmente, los que poseen dos anillos ϵ -ionona, y que dan origen a la serie de ϵ,ϵ -carotenos. La existencia de los anillos ionona, de un tipo o de otro, se originan cuando ocurre la ciclización en uno de los extremos del licopeno (γ,γ -caroteno), por la acción de la enzima licopenociclasa, que da como resultado un carbocación. Esto se da por la liberación de un protón, que finalmente origina un doble enlace; la posición de éste depende de la localización del átomo de hidrógeno liberado, dando así, origen a los anillos β ó ϵ ,⁽¹⁵⁾ *Figura 6*.

2.4.3. COMPONENTES VOLÁTILES.

Otro grupo de componentes muy importantes en los frutos de *Capsicum* son los volátiles, responsables del aroma de éstos; entre los cuales se han identificado pirazinas. Más de 125 componentes volátiles se han encontrado en frutos de *Capsicum* frescos y procesados; aunque aún no se ha determinado con exactitud la importancia de todos éstos componentes en el aroma. Entre los que se encuentran en una proporción importante en el chile campana, están: 1-penten-3-ona, tolueno, hexanal, (Z)- y (E)-2-pental, (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenal, (E)- β -ocimeno, 1-hexanol, (Z)-3-hexenol, y, 6-metilheptil-2-propenoato. Todos éstos compuestos, excepto el (E)-2-hexenal, decrecen significativamente durante la maduración.⁽¹⁹⁾

Butter, *et al* (1969), determinaron que la 2-metoxi-3-isobutilpirazina, (E, Z)-2,6-nonadienal, y el (E,E)-decadienal son componentes importantes en el aroma de los chiles. Chitmoood *et al*, (1983), sugieren que existe una relación entre los componentes volátiles: 2-isobutil-3-metoxipirazina, 2-sec-butil-3-metoxipirazina, (Z)-3-hexenol y algunos otros que caracterizan el aroma de 3 variedades de *Capsicum* cultivados en California, U.S.A.. La composición de los

componentes volátiles en los chiles varía notablemente de acuerdo al estado de maduración.^(19,20)

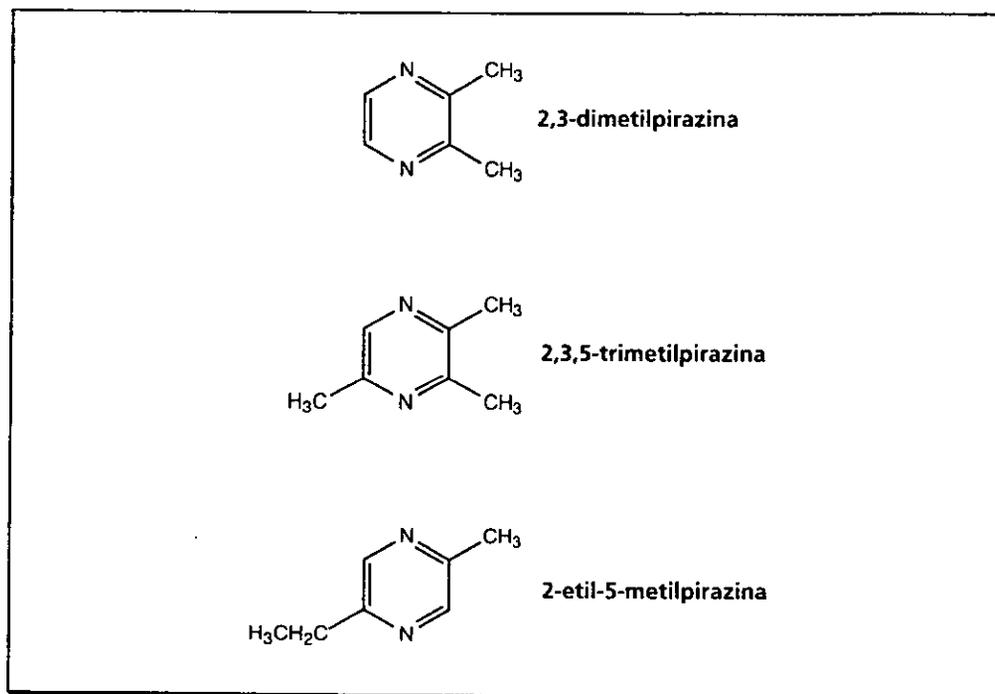


Figura 7. ESTRUCTURA DE ALGUNOS COMPONENTES AROMÁTICOS PRESENTES EN LOS FRUTOS DEL GÉNERO *Capsicum*.⁽⁸⁾

Se han encontrado 24 componentes en el aroma del chile tabasco; del chile morrón rojo se aislaron 17 alcoholes, 20 compuestos carbonílicos, 14 ácidos carboxílicos, 6 pirazinas, 21 éteres y 14 terpenos. De las pirazinas encontradas en el pimiento morrón, la 2,3-dimetilpirazina, la 2,3,5-trimetilpirazina y la 2-metil-5-etilpirazina (Figura 7) forman el 75% de su aroma.

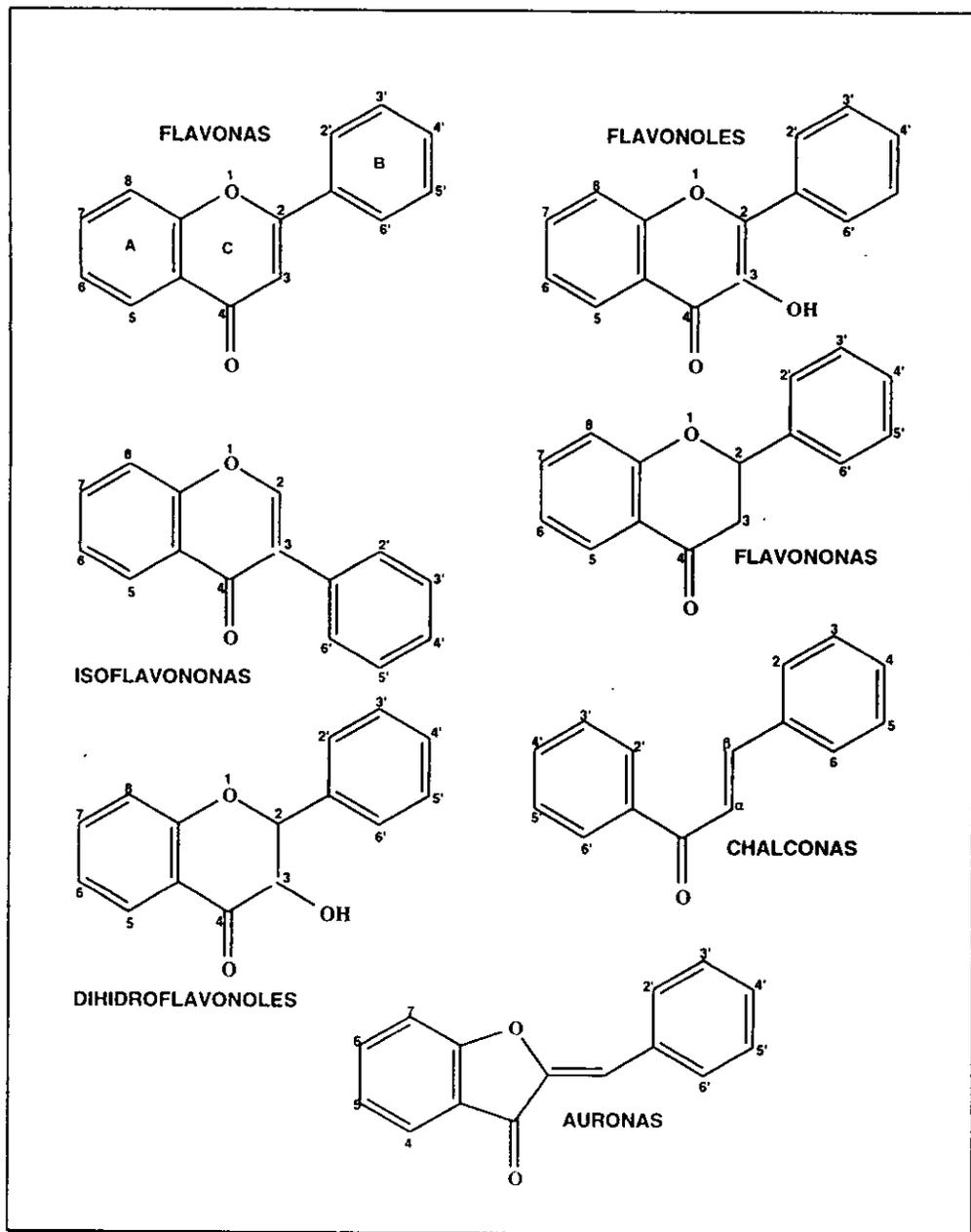


Figura 8. ESTRUCTURA DE LOS FLAVONOIDES. (25)

2.4.4. FLAVONOIDES.

Los flavonoides es otro grupo de componentes muy importantes que estan presentes en los *Capsicum*. Debido a su biosíntesis los flavonoides se encuentran en todas las plantas verdes, excepto en algas y en ceratófilas. Particularmente, los flavonoides son hidrocarburos heterocíclicos insaturados, con variaciones en su estructura (*Figura 8*).

Las C-glicosilflavonas, como las: vitexinas, iso-vitexinas, orientinas, iso-orientinas y vicentinas, así como también, los O-glicósidos de flavonas, como las: apigeninas, luteolinas y los crisoiroides, son los flavonoides que se encuentran con mayor frecuencia en el género *Capsicum*.⁽²⁷⁾

2.5. MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA LA EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN, PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES QUÍMICOS EN PLANTAS.

2.5.1. PARA CAROTENOS.

Para el aislamiento e identificación de carotenoides presentes en plantas, existen muchos métodos y técnicas. En el caso particular de los pigmentos de *Capsicum*; los cuales se encuentran en su gran mayoría esterificados con ácidos grasos. Se recomienda primeramente, extracciones vía maceración, con posterior saponificación bajo condiciones controladas. Después de esto, la técnica más utilizada para el aislamiento e identificación es la **cromatografía**, que puede ser: en papel y en placa, solo que tienen ciertos inconvenientes, hay un aumento en la inestabilidad de los carotenos, por la exposición prolongada a la luz y el oxígeno presentes en el sistema. Otros métodos se basan en la cromatografía en columna y la cromatografía de gases; aunque éste último no es recomendable, ya que los carotenos son termolábiles. La cromatografía más utilizada es la de **HPLC**.

Aunque, lo más viable es utilizar una combinación de los diferentes métodos cromatográficos, principalmente la cromatografía en capa fina y la de HPLC.⁽²⁷⁾

En la actualidad, existen numerosos métodos de análisis por HPLC, el más utilizado es el desarrollado en fase inversa, siguiéndole el de fase normal. Se debe tener cuidado cuando se utiliza una fase polar, ya que puede provocar isomerización y transformaciones de los carotenoides durante la separación, por ejemplo, la violaxantina se transforma a su derivado 5,8-epóxido. En la preparación de los extractos, algunos autores argumentan que la saponificación es un método agresivo, que produce marcadas transformaciones; por lo que se recomienda llevarlo a cabo bajo condiciones suaves y controladas.^(10,14)

2.5.2. DEL GRUPO DE LOS VOLÁTILES.

En el aislamiento e identificación de los componentes volátiles se utilizan diversos métodos, entre los más importantes están: la cromatografía de gases acoplada a masas, la cromatografía en columna, el método de Osme (Miranda-López *et al*, 1992), y el método sensorial "Sniffing-port panel" (Linssen *et al*, 1993). Para la extracción de componentes volátiles, el método más utilizado por las grandes ventajas que proporciona, es el arrastre con vapor de agua; y para la separación e identificación, se utiliza frecuentemente la cromatografía de gases-masas.

2.5.3. DE ORIGEN FLAVONOIDE.

Así mismo, las técnicas que se emplean con mayor frecuencia para la extracción y preaislamiento de los flavonoides, incluyen la utilización de diversos disolventes, desde poco polares, como: benceno, cloroformo, acetato de etilo, etc.; hasta muy polares, como: acetona, alcoholes, agua, etc.; y mezclas de éstos. Para la purificación e identificación de los mismos, se utilizan las técnicas de: cristalización; cromatografía en columna, en papel, en capa fina, en HPLC, en gases-líquido; y las espectroscopías (masas, RMN, UV-VIS e IR).^(25,26)

La técnica de cromatografía **bi-dimensional** en papel es una de las mejores para una rápida separación de mezclas de flavonoides de extractos crudos de metanol o de metanol-agua. Para esta técnica, se emplea papel cromatográfico Whatman del no. 3 y dos sistemas de elución:⁽²⁵⁾

1. TBA: T, alcohol terbutílico grado reactivo; B, ácido acético glacial y; A, agua.
2. HPAC: ácido acético glacial; 15 ml del ácido en 85 ml de agua.

El material es revelado en luz UV en ausencia o en presencia de vapores de amoniaco. La distribución de los flavonoides es muy característica y reproducible para cada tipo de componente, según se muestra en la *Figura 9*.

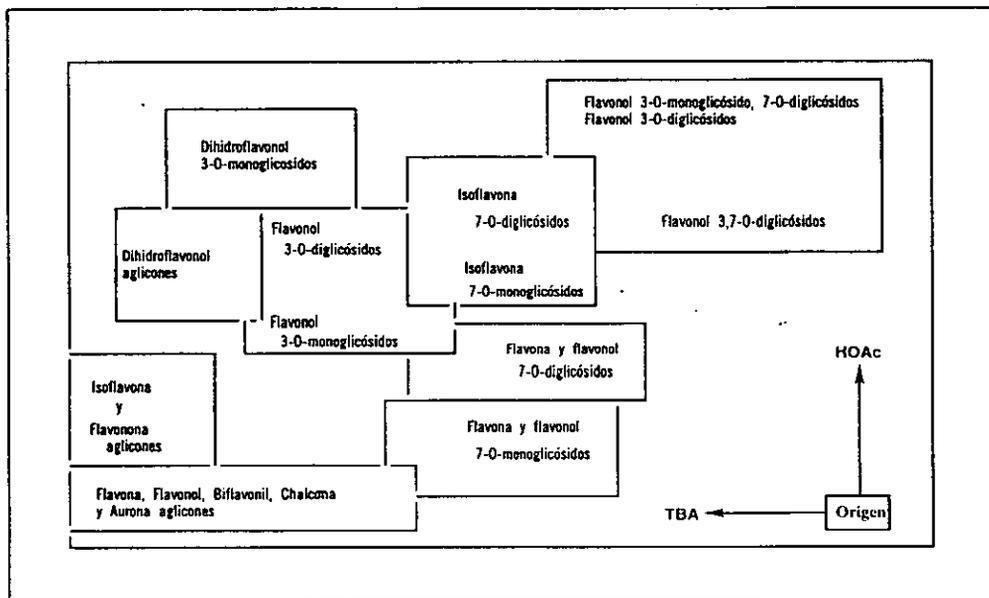


Figura 9. DISTRIBUCIÓN DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFÍA BI-DIMENSIONAL EN PAPEL.⁽²⁵⁾

2.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y USOS DE LA PLANTA DEL GÉNERO *Capsicum*.

2.6.1. CAPSAICINAS.

Tanto a los chiles como a la capsaicina se les atribuye el de causar indigestión y úlceras. Pero estudios recientes en el Instituto Médico de Baylor han probado que el chile no es un irritante. Se ha visto con el uso de videoendoscopías, que comidas suaves (carne y papas) fueron comparadas con comidas que contenían chiles picantes y se encontró que no había mucha diferencia en el grado de irritación al estómago. Por el contrario, se encontró que la aspirina es muy irritante a las paredes del estómago. En 1986 un grupo de investigadores en Nebraska anunciaron que los chiles son mutagénicos y posiblemente causan cáncer. Estudios consecutivos demostraron que la capsaicina es un antioxidante y retrasa la producción de nitrosamina.^(6,7) En resumen, muchos investigadores han concluido que la capsaicina tiene muy poco efecto en las posibilidades de causar cáncer. Otros estudios han demostrado que la capsaicina tiene efectos benéficos sobre el corazón y las arterias. Primeramente, la capsaicina disminuye el número de coágulos de sangre en las venas. Además, la presión arterial se reduce, porque las arterias se relajan. Finalmente, se fortalecen los latidos del corazón, como consecuencia de los dos efectos anteriores. También se ha demostrado que la capsaicina reduce la cantidad de triglicéridos en la sangre. Además de estos efectos benéficos para el corazón y el sistema circulatorio producida por la ingesta de chile, otros estudios permiten observar un aumento en el metabolismo traducido como pérdida de peso corporal, aumento en el flujo y cantidad de los jugos digestivos del estómago, resultando en una mayor saciedad alimenticia, sin los peligros asociados con la grasa animal y las comidas fritas.^(6,7,8)

Actualmente la capsaicina se emplea combinada con otros fármacos con la finalidad de potenciar el efecto analgésico de los mismos. Lo anterior constituye una alternativa importante para el tratamiento del dolor ya que otros medicamentos del grupo de los opiodes, aún cuando se utilizan para controlar dicho padecimiento, poseen efectos indeseables como el de la dependencia y adicción.^(1,6,7)

Otros estudios indican que la capsaicina actúa en proteínas especiales llamadas receptores vainilloides que pueden encontrarse en neuronas, las cuales envían el mensaje de dolor al cerebro; estas neuronas especiales se llaman nociceptores; los investigadores piensan ahora que la capsaicina, primero actúa con estos receptores para abrir puertas en estos nociceptores permitiendo así que un neuropéptido específico llamado sustancia P sea liberado. La sustancia P actúa entonces en otros receptores de la neurona adjunta para enviar el mensaje de dolor preciso al cerebro por medio del impulso electroquímico normal usado para transmitir mensajes en el sistema nervioso. La capsaicina tiene la capacidad de reducir la cantidad de sustancia P en los nervios. Se ha demostrado también que una aplicación continua de capsaicina, prevendrá a estas neuronas la acumulación adicional de sustancia P; como resultado, la capsaicina impide efectivamente la transmisión del mensaje de dolor. Este efecto de la capsaicina se usa para tratar el dolor asociado con el estado avanzado de viruela y artritis reumática.^(6,7)

2.6.2. CAROTENOS.

Los carotenoides constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos y se encuentran presentes en plantas, animales y unicelulares. Estos carotenos son de gran importancia para el hombre, por ejemplo, el β -caroteno y la β -criptoxantina son provitamina A, capsantina, capsorubina y criptocapsina, los cuales se encuentran principalmente en los frutos de *Capsicum*, y son utilizados como colorantes naturales en alimentos. Además, son muy importantes en el proceso de maduración de los frutos. Aparentemente, algunos tipos de cáncer de piel son debidos a la falta de carotenos oxigenados (xantofilas) en la dieta, por lo que, se consideran a éstos como posibles agentes antineoplásicos.^(10,11,12,13)

2.6.3. FLAVONAS.

Los flavonoides son una clase de componentes que le dan un color muy especial a las plantas, además, presentan diversos efectos farmacológicos, y se utilizan en aplicaciones clínicas. Algunos de los efectos que producen estos componentes son:^(26,27)

- Efectos antivirales en animales y humanos.
- Beneficios en la reconstrucción de tejidos humanos (cicatrización).
- Refuerzan los capilares y reducen las hemorragias.
- Activan la agregación de eritrocitos en el torrente sanguíneo.
- Actúan contrarrestando la pungencia del chile.
- Algunos flavonoides son tóxicos.

Por todo lo anterior y como resultado de la evaluación farmacológica de estos recursos, ahora se puede entender, el porqué nuestros antepasados y hasta la actualidad, se han hecho preparados de extractos, tinturas, ungüentos y emplastos de guindillas, de efectos rubefacientes sobre la piel y las mucosas. Se emplean sobre todo en caso de dolores reumáticos, de ciática o de pleuresía, de lumbago y tortícolis. En tomas internas, la guindilla tiene una acción estomacal: estimula el peristaltismo gastro intestinal y favorece la secreción de jugos gástricos; por lo que en Hawaii, se utiliza en personas que tienen problemas de anorexia. En otros países se utiliza como afrodisíaco; en Indonesia, las raíces se utilizan para combatir la gonorrea. En resumen, los *Capsicum* tienen una amplia gama de usos en muchos países, pero sin duda el más importante es como hortaliza y como condimento en la preparación de sopas, ensaladas, adobos, para diferentes clases de embutidos, como sazonador, colorante, etc.^(1,4,8) Sin embargo, es evidente que las diferentes variedades de chiles, presentan diferencias en aroma, sabor, color, etc., y este aspecto no ha sido debidamente valorado y estudiado en la literatura, y menos con variedades mexicanas.

3. PROBLEMA A RESOLVER

Los frutos del género *Capsicum* se incluyen en la dieta de los pueblos del hemisferio americano desde mucho tiempo antes del descubrimiento de América. Después de la llegada de los europeos al Nuevo Mundo, las plantas de éste género fueron dispersadas al resto del planeta, especialmente en las zonas tropicales y subtropicales. En México, donde se ha cultivado el chile y se conoce desde hace 5 mil años, y donde a veces es el único alimento, es uno de los países que más lo consume. Los frutos, frescos o secos, son usados como especias y forman parte importante en la dieta de millones de personas. Obviamente, la característica fundamental de estos frutos es la sensación de picor cuando se comen. Esta característica es variable y como algunos tienen gran picor sólo se agregan en pequeñas cantidades. Además de ello, muestran una amplia y agradable gama de aromas, por lo que son un ingrediente popular de ciertos alimentos en algunas etnias del mundo.⁽²⁾

La clasificación botánica del género *Capsicum* es muy confusa, pero estudios recientes señalan al menos dos especies mayores: *C. annuum* y *C. frutescens*. Como una generalización se puede decir que los chiles de mayor tamaño pertenecen a *C. annuum* y son bajos en picor, mientras que *C. frutescens* incluye a los más pequeños pero más picantes. Además de los problemas de la clasificación botánica, existe una enorme lista de nombres comunes, al menos en México, para las variedades individuales, entre las que hay frutos de color rojo (cuando se les deja madurar), verdes y de variados tonos de amarillo, aunque otros son violeta, casi negros y también blancos.

Por lo anterior, se requiere ampliar los conocimientos químicos de las variedades de *Capsicum annuum*. En este trabajo se realizó el estudio de los componentes químicos en tres variedades mexicanas del género *Capsicum*: guajillo, ancho y mulato, siendo éstos los más populares. Además, se necesitan desarrollar métodos y técnicas de bajo costo para el aislamiento de los componentes de interés comercial; dejando así preparado el camino para que en el futuro se puedan desarrollar las técnicas apropiadas para una explotación comercial.

1. OBJETIVO

Determinar las diferencias químicas en tres variedades mexicanas de *Capsicum annum* (guajillo, ancho y mulato), y relacionar éstas diferencias con las aplicaciones de las distintas variedades. Aislar los diferentes componentes y estudiar su rendimiento para considerar, de acuerdo con los resultados que se obtengan, la posibilidad de desarrollar técnicas para utilizarlos con fines comerciales como colorantes o como saborizantes.

5. HIPÓTESIS

Son evidentes las diferencias entre las tres variedades de chile en estudio; en la morfología, color, sabor y aroma; y desde luego, en su uso. Por lo tanto, deben existir también diferencias en sus componentes químicos. Por lo que resulta de interés investigar éstas diferencias en composición, que adicionalmente podrían apoyar el establecimiento de variedades diferentes en *Capsicum annuum*.

6. METODOLOGIA

6.1. MATERIALES.

6.1.1. MATERIA PRIMA.

Chiles enteros: guajillo, ancho y mulato; maduros y deshidratados, de marca comercial "San Lazaro", procesados y envasados por DIGRANS, S.A., Enrique Durante No. 20, colonia el partidor, Cuautitlán, Edo. Méx., México.

6.1.2. MATERIAL DE VIDRIO Y OTROS.

- Cámaras de elución de 50 ml;
- Cámaras de elución para placas preparativa;
- Capilares (de diferentes diámetros);
- Tubos de vidrio para cromatografía en columna (de diferentes tamaños);
- Cromatoplasmas de sílicagel para cromatografía en placa preparativa, espesor de 2 mm (20x20) y de 0.5 mm (5x10), G-200UV₂₅₄;
- Cromatofolios de aluminio con sílicagel, ALUGRAM SilG/UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor;
- Embudos de separación, de diferentes capacidades;
- Matraces bola de 50, 100, 250, 500 y 3000 ml;
- Matraz bola de tres bocas de 5000 ml;
- Trampa de agua;
- Matraces Kitazato, de diferentes capacidades;
- Matraces Erlenmeyer, de diferentes capacidades;
- Pipetas Pasteur;
- Probetas de 10, 25, 100 y 1000 ml;
- Tubos de ensayo, de diferentes capacidades;
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 ml;
- Viales, de diferentes capacidades;

- Refrigerantes;
- Pinzas de tres dedos con nuez;
- Soporte universal;
- Embudos de filtración rápida y para vacío (Buchner);
- Tubos de vidrio con llave de teflón (diferentes tamaños);
- Anillo de hierro;
- Papel filtro Whatman, de diferentes diámetros y calidades;
- Papel aluminio.

6.1.3. DISOLVENTES.

Los disolventes utilizados fueron grado reactivo, secados por métodos descritos en la literatura⁽²⁸⁾ y destilados antes de ser empleados^(a). También se utilizaron de grado HPLC^(b).

- Hexano^(a,b);
- Acetato de etilo^(a);
- Diclorometano^(a);
- Eter etílico^(a);
- Acetona^(a,b);
- Metanol^(a,b);
- Etanol^(a);
- Agua^(a);
- Acetonitrilo^(b);
- Dietilamida^(a).

6.1.4. REACTIVOS Y OTROS.

- Hidróxido de potasio;
- Sulfato de sodio;
- Ácido acético glacial;

- Cloruro de calcio;
- Alcohol terbutílico;
- Celita;
- Sílicagel para columna (70-260 y 270-400 mesh);
- Alúmina;
- Referencias de: capsantina, licopeno, β -caroteno, criptoxantina y prolicopeno¹⁴.

6.1.5. EQUIPOS.

- Cromatógrafo de HPLC, Waters Deltaprep 4000: Preparative Chromatography System, Waters 4000: System controller, y Waters 486: Tunable Absorbance Dectector;
- Cromatógrafo de Gases, Hewlett Packard Series II 5890;
- Espectrofotómetro UV-VIS, Shimadzu U-160 y Perkin-Elmer 283 B;
- Espectrofotómetro I.R., Nicolet FT-IR Magna 750;
- Espectrómetro de masas, Jeol JMS-AX505HA;
- Equipo de evaporación de disolventes (rotavapor), Büchi, RE111, con baño de agua, Büchi 461;
- Balanza semianalítica Mettler PE 3600;
- Lámpara de ultravioleta Listed INSP & MEAS 399-J;
- Reostato type 2PF1010;
- Molino de cuchillas, Pulvex 100 MINI MF10/30;
- Recirculador, Water Bath Cooler Sargent-Welch;
- Bomba para alto vacío;
- Canastilla de calentamiento.

¹⁴PROPORCIONADOS POR EL DR. FERNANDO WALLS A., INSTITUTO DE QUÍMICA, U.N.A.M.

6.2. MÉTODOS.

Para el estudio de los componentes químicos en *Capsicum annuum*, se trabajaron tres variedades mexicanas: guajillo, ancho y mulato; se utilizó únicamente el pericarpio de los frutos. Los componentes químicos se dividieron en tres grandes grupos:

1. Componentes volátiles;
2. Carotenoides; y
3. Flavonoides.

6.2.1. PREPARACIÓN DE LA MATERIA PRIMA.

a. Adquisición del material. Las tres variedades de chiles se adquirieron en una tienda de autoservicio, de marca "San Lazaro", 1,500 g por variedad.

b. Selección y limpieza del material. Se seleccionaron 1,000 g por cada variedad. Estos chiles seleccionados fueron limpiados del polvo y/o de otro contaminante, uno por uno con toallas de papel y aire seco.

c. Separación de las semillas y tallo del pericarpio. Se abrieron los frutos y se extrajeron las semillas y el tallo; al pericarpio fue fraccionado en pedazos pequeños.

d. Molienda y Pesada del pericarpio. Los pedazos de pericarpio fueron molidos y pesados, obteniéndose: 658.43 g del guajillo, 660.61 g del ancho y 683.20 g del mulato.

6.2.2. COMPONENTES VOLÁTILES.

a. Extracción de los componentes. La extracción de los volátiles se realizó mediante arrastre con vapor de agua, para cada variedad. Utilizando un sistema de arrastre que se compone de: un recipiente de cobre con espiral, que funcionó

como baño de vapor; un matraz bola de tres bocas de 5,000 ml de capacidad; un inyector de vapor; un condensador con doble camisa de enfriamiento; dos trampas con hielo seco cada uno y, un matraz Kitazato de 1,000 ml como receptor del condensado.

La cantidad de los chiles obtenidos después de la molienda (ver pag. 36, d.) se colocaron en un matraz de tres bocas, y se procedió a armar el sistema de destilación. Una vez realizado ésto, se aplicó vapor directamente al matraz conteniendo el chile; además, se estuvo calentando el matraz por medio de un baño de vapor; ésto fue para mantener una temperatura adecuada dentro del matraz y no dejar que se condensara el vapor. Al condensador utilizado se le adaptó un circulador con agua fría (5° C), además de ponerle una camisa con hielo seco. En la salida del condensador se le adaptaron dos trampas con hielo seco cada uno; y al final, un matraz kitazato donde se recolectó el condensado, (agua + aceite).

Debido a que se obtuvo una cantidad muy pequeña de aceite, se realizaron extracciones con diclorometano. Éstos extractos fueron reunidos y secados con sulfato de sodio; se filtró y eliminó el diclorometano en un rotavapor, bajo condiciones suaves y controladas (Temp. 30° C), obteniéndose en promedio de 150 mg de un aceite amarillo-naranja por variedad.

b. Separación e identificación. Una vez extraídos los volátiles, se analizaron por cromatografía de gases-masas bajo las siguientes condiciones: 40° C a 7° C/min. hasta 290° C; donde se lograron separar los componentes más importantes, identificándose a algunos de ellos.

6.2.3. CAROTENOIDES (Pigmentos).

a. Extracción de los pigmentos. Para la extracción de carotenoides, se emplearon diclorometano, acetona y una mezcla de hexano-acetona 4:1, de acuerdo a lo descrito en la literatura.^(11,17)

Después de extraer los componentes volátiles, el residuo vegetal de cada variedad fue extraído con 3 litros de diclorometano vía maceración por 48 horas. Se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose un líquido viscoso que pesó 10.86 g de extracto de chile guajillo, 10.60 g de extracto de chile ancho y 10.54 g de extracto de chile mulato.

b. Separación y purificación de los carotenoides. Para la separación (S) y purificación (P) de carotenos se utilizaron las siguientes técnicas: cromatografía en placa preparativa (c.p.p.), cromatografía en columna (c.c.), HPLC y cristalización (c).

Separación y purificación por c.p.p. Fue tomada una muestra de cada extracto de las tres variedades, las cuales fueron aplicadas en cromatoplasas; éstas fueron eluidas en un sistema Hexano-acetato de etilo 90:10. Hubo una separación de los pigmentos en bandas, entre 17 y 22, de diferentes colores y R_f ; de estas bandas, se tomaron las más abundantes y coloridas, y que además presentaban una mejor separación. Las bandas fueron cortadas y extraídos los pigmentos con acetato de etilo; éstas fueron recromatografiadas en c.p.p., de dos a tres veces más en diferentes sistemas de elución (hexano, hexano-acetato de etilo: 9.5:0.5, 9:1, 7:3 y 1:1); hasta obtener una sola banda. Por medio de la c.c.f. se verificó que solo eran una sola mancha; después, se les determinó el espectro de UV-VIS y el R_f , (ver tabla VI, página 57).

Separación por c.c. y c.p.p. Se utilizaron columnas de vidrio (40 cm x 5 cm) y columnas con bulbo y llave de teflón (65 cm x 3 cm), empacadas con sílicagel para columna. El primer tipo de columna se utilizó para percolada (aprox. 5 g), y la segunda, para separar (1 a 2 g). Se realizó una primera separación con la percolada, el sistema de elución utilizado fue: hexano pasando por mezclas de hexano-acetato de etilo, hasta acetato de etilo); se tomaron las bandas más abundantes, con una mejor separación y de color intenso (rojo, naranja y amarillo). Después, estas bandas se volvieron a eluir en una columna

preparativa; donde se obtuvo una mejor separación, e igualmente como en los casos anteriores, se tomaron las bandas más abundantes y de mayor coloración y mejor separación. En los dos tipos de columnas se inició con hexano, continuando con: mezclas de hexano-acetato de etilo, mezclas de diclorometano-acetona, para terminar con acetona. Las bandas colectadas se continuaron purificando en p.p., hasta obtener una sola banda. Después de detectar por c.c.f. la pureza de los pigmentos, se analizaron por UV-VIS, y se les determinó su R_f (ver tabla VI, página 57).

Saponificación. De los extractos de diclorometano obtenidos de cada variedad se tomaron 5 g y fueron saponificados en éter (1 g de muestra en 6 ml de éter), con hidróxido de potasio en metanol al 30% (1 g de muestra en 1 ml de disolución). Esta muestra se agitó por 8 hrs. a temperatura ambiente y cubierto de la luz; después de esto, se mantuvo el extracto saponificado en refrigeración.^(6,19)

Separación e identificación por HPLC. Se utilizaron dos métodos en la separación e identificación de pigmentos saponificados por HPLC. En el primero, se siguió el método empleado por Almela *et al*, 1990,⁽²³⁾ con algunas pequeñas modificaciones. Se utilizó una columna para fase normal (μ -porasil 125 Å 10 μ m, 3.9x150 mm, Waters Division of MILLIPORE), bajo las siguientes condiciones: velocidad de flujo, 1 ml/min; longitud de onda, 460 nm. La elución se inició con una mezcla de hexano-acetona (9.5:0.5), y después de la inyección, se continuo con el siguiente gradiente: la proporción de hexano se disminuyó a un 75% en 30 min.; se mantuvo esta proporción por 5 min., para después aumentar el hexano a 95% en 5 min.

En el segundo sistema se utilizó el método empleado por József Deli *et al*, 1996.⁽¹¹⁾ Se empleó una columna para fase inversa (μ -Bondapak C_{18} , 3.9x300 mm, Waters Division of MILLIPORE); bajo las siguientes condiciones: velocidad de flujo, 1.5 ml/min; longitud de onda, 450 nm; el sistema de elución fue utilizando el siguiente gradiente: se inició con 100% de A por 8 min.; a 80% de A y 20% de B en 8 min.; a 50% de A y 50% de B en 8 min.; a 100% de B en 7 min.; 100%

de **B** por 2 min., a 100% de **C** en 6 min.; 100% de **C** por 5 min. Donde: **A**, es la mezcla agua en metanol al 12% (v/v); **B**, es metanol 100% y; **C**, es la mezcla acetona en metanol al 50% (v/v)⁽¹¹⁾. En los dos sistemas, se corrió una mezcla de dos muestras conocidas (β -caroteno y capsantina); ésta sirvió como referencia.

c. Cristalización de capsantina. Se tomaron 5 g del extracto de diclorometano, los cuales se saponificaron utilizando el método mencionado anteriormente. Una vez saponificado, la fase del éter se lavó y se seco (con sulfato de sodio), para después concentrarlo. Se diluyó con hexano (1 g por mililitro de hexano). Se dejó reposar por 24 hrs. en refrigeración. Después de éste tiempo se formaron cristales; los cuales se filtraron al vacío. Los cristales recuperados se volvieron a recristalizar varias veces más, hasta que, por c.c.f. se determinó una buena pureza. De esta manera, se le realizaron análisis de UV-VIS y comparación con una referencia.

d. Identificación de carotenoides. Para la identificación de los carotenos aislados por los métodos anteriormente mencionados, éste se realizó de la siguiente manera. Por un lado, se utilizaron 5 referencias (β -caroteno, β -criptoxantina, licopeno, prolicopeno y capsantina); a éstas se les determinó su espectro de UV-VIS, I.R. y de masas. Las cuales, tomándolas como referencias, se compararon por c.c.f. con los extractos de cada variedad, y por R_f se determinó si se encontraba este componente en los extractos de cada variedad. Así también, los pigmentos que se lograron separar y purificar, se les determinó su espectro de UV-VIS, R_f y pigmentación (tabla VI). Finalmente, por HPLC y tomando en cuenta los tiempos de retención, se lograron identificar de manera tentativa algunos otros componentes de origen carotenoide (tablas III, IV, páginas: 51 y 55, respectivamente).

6.2.4. FLAVONOIDES.

a. Extracción de flavonoides. Después de la extracción de los pigmentos; al residuo vegetal, le fue adicionada una mezcla de metanol-agua (9:1), y se dejó

macerar por 3 días en ausencia de luz. Posteriormente, se filtró y se le evaporó la mezcla de solventes en un rotavapor utilizando una bomba de alto vacío. Se obtuvo un polvo café-rojizo, con un promedio de 60 g por variedad.

b. Separación e identificación de los componentes. Una muestra de 6.0 g del extracto metanólico de la variedad guajillo, fue preadsorbido en sílicagel para columna (70-260 mesh) y, se adicionó a una columna cromatográfica previamente empacada con celita en el fondo de la misma y el resto con sílicagel. La columna fue eluída utilizando diferentes disolventes, el orden de adición fue el siguiente: hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo, diclorometano, mezclas de diclorometano-acetona, acetona y para finalizar con metanol. Cada fracción de disolvente fue concentrada y analizada en placas cromatográficas para controlar y detectar la separación de los diversos componentes según su polaridad.

Las fracciones acetónicas y metanólicas se analizaron utilizando la técnica bi-dimensional⁽²⁰⁾ en placas cromatográfica (ALUGRAM o Sil G/UV₂₅₄ de 10x10 cm y 5x5 cm). Para la elución de las mismas, se utilizaron dos sistemas:

1. TBA: T, alcohol terbutílico; B, ácido acético y; A, agua (3:1:1).
2. HOAC: ácido acético glacial, 15 ml del mismo en 85 ml de agua.

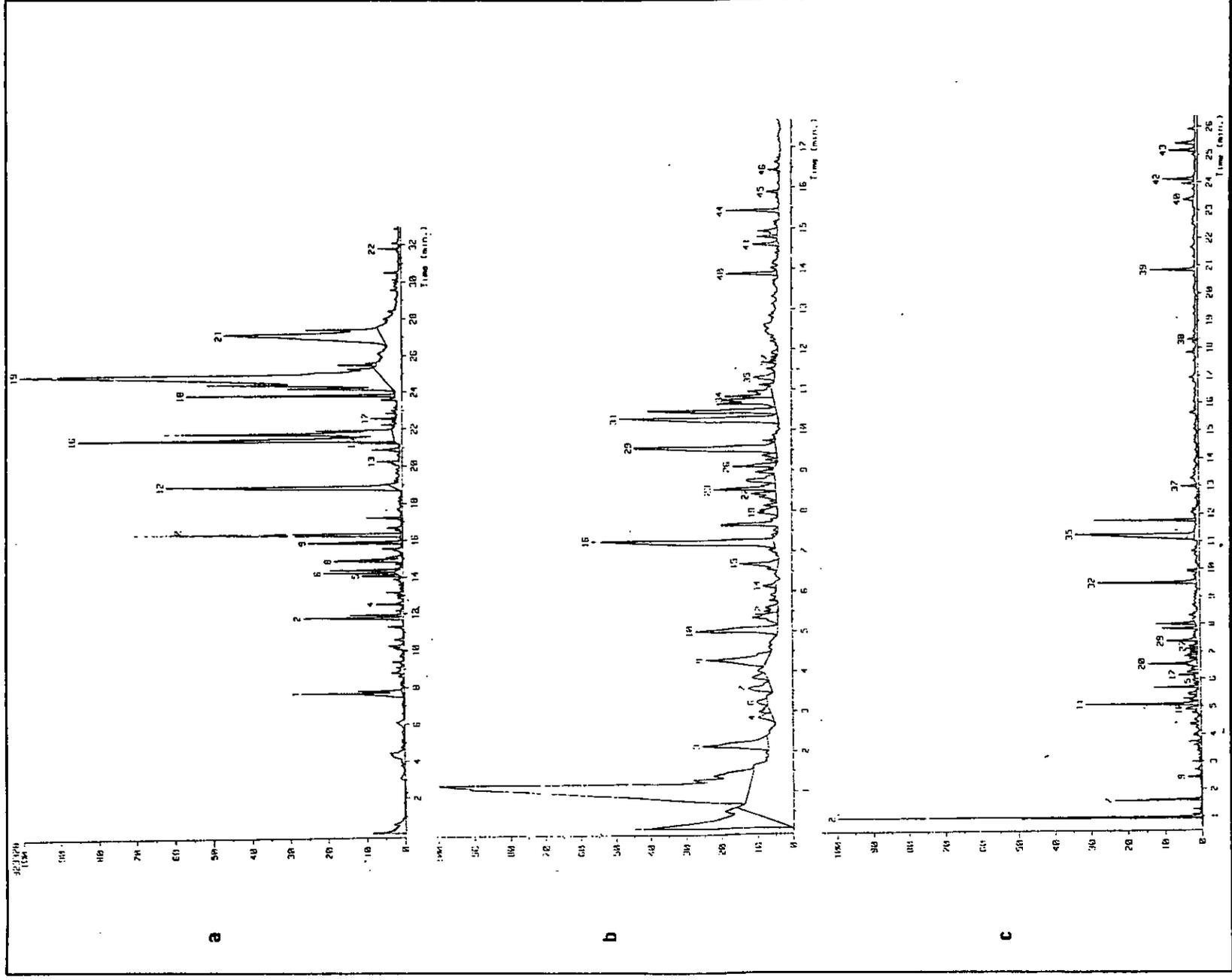
Después del secado de las placas, éstas fueron reveladas en presencia de luz ultravioleta y determinada la posición de las mismas (*Figura 10*, página 60). Algunas de las fracciones menos polares se purificaron en c.p.p. y fueron analizadas por UV-VIS (tabla VII, página 59). El análisis de los componentes flavonoides fue de manera tentativa analizando únicamente una variedad, el guajillo.

7. R E S U L T A D O S

En el estudio químico de tres variedades mexicanas de *Capsicum annum* (guajillo, ancho y mulato), se obtuvieron los resultados siguientes:

7.1. COMPONENTES VOLÁTILES.

Los extractos obtenidos por arrastre de vapor de agua de las tres variedades de chiles, fueron separados por cromatografía de gases acoplada a un espectrofotómetro de masas. Los picos separados y en una buena proporción fueron: 22 en el chile guajillo, 46 para el chile mulato y 43 en el chile ancho, *cromatograma 1: a. b. y c.* respectivamente. De éstos picos separados, se identificaron algunos componentes, al compararlos con el banco de memoria del equipo de masas, como se puede observar en la tabla I, cuyas estructuras se muestran en la tabla II.



GROMATOGRAMA No. 1. SEPARACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DE LAS TRES VARIETADES: a: GURJILLO, b: MULATO Y c: ANCHO.

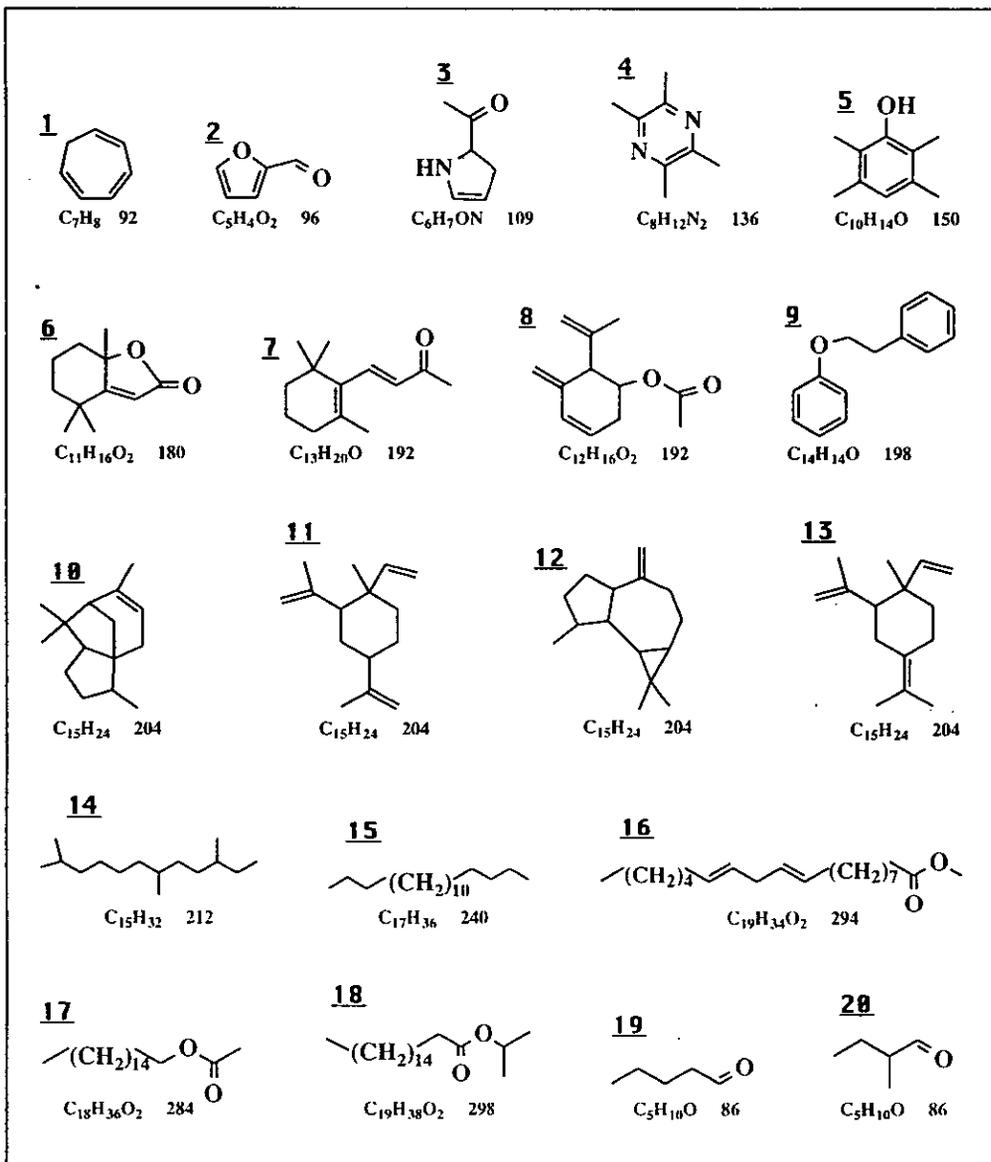
Tabla I. **COMPARACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES IDENTIFICADOS POR CROMATOGRFIA DE GASES ACOPLADA A MASAS EN LAS TRES VARIEDADES DE CHILES (guajillo, ancho y mulato).**

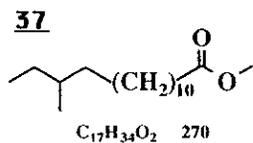
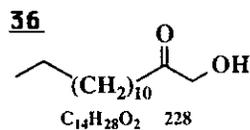
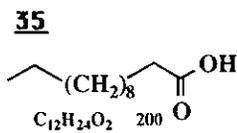
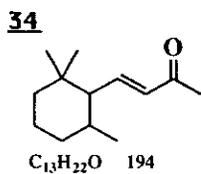
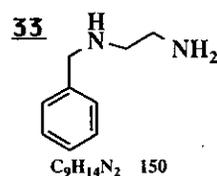
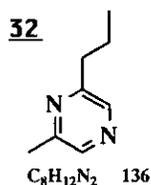
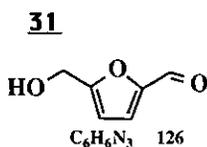
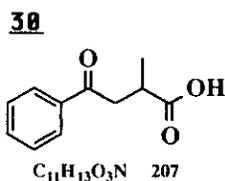
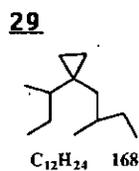
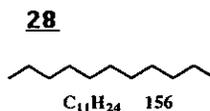
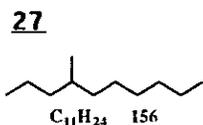
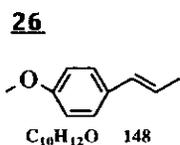
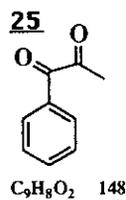
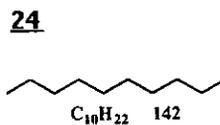
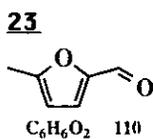
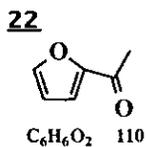
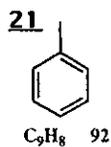
No.	COMPONENTE	ABUNDANCIAS RELATIVAS (%)		
		GUAJILLO	ANCHO	MULATO
1	1,3,5-cicloheptatrieno	10.96		
2	Furfural	8.2	63.48	
3	1-(1H-pirrol-2-il)etanona	17.78	58.50	92.23
4	Tetrametilpirazina	7.43		
5	2,3,5,6-tetrametilfenol	1.66		
6	5,6,7,7a-tetrahidro-4,4,7a-trimetil-(R)-2(4H)-benzofuranona	19.17	14.74	100.00
7	4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona	5.07		50.33
8	3-ciclohexen-1-ol-5-metilen-6-(1-metiletetil)acetato	4.85		
9	Etilfenoxibenceno	45.28	5.05	
10	2,3,4,7,8,8a-hexahidro-3,6,8,8-tetrametil-1H-3a,7-metanoazuleno	1.42		
11	1-etil-1-metil-2,4-bis-(1-metiletetil)-1s-Ciclohexano	0.72		
12	decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-1H-ciclopropenazuleno	3.04		
13	1-etil-1-metil-2-(1-metiletetil)-4-(1-metiletetil)Ciclohexano	5.64		
14	2,7,10-trimetildodecano	1.91		
15	Heptadecano	1.09		
16	Acido (9E,12E)-octadecadienoico-metilester	5.98		
17	Acetato de n-hexadecanilo	6.00		
18	Metiletiléster del ácido hexadecanoico	1.82		
19	Pentanal		32.58	
20	2-metilbutanal		25.50	
21	Tolueno		8.41	
22	1-(2-furanyl)-etanona		32.59	
23	5-metil-2-furancarboxaldehido		23.62	
24	Decano		13.78	
25	1-fenil-1, 2-propadiona		11.88	
26	1-metoxi-4-(1-propenil)-benceno		42.24	
27	4-metildecano		5.28	
28	Undecano		11.08	

CONTINUACIÓN...(Tabla 1).

No.	COMPONENTE	ABUNDANCIAS RELATIVAS (%)		
		GUAJILLO	ANCHO	MULATO
<u>29</u>	11-(2-metilbutil)-1-(1-metil-propil)-ciclopropano		3.37	
<u>30</u>	Acido 3-(m-aminobenzoil)-2-metilpropionico		12.02	87.23
<u>31</u>	5-(hidroximetil)furfural			33.68
<u>32</u>	2-metil-6-propilpirazina			27.98
<u>33</u>	N-(fenilmetil)-1,2-etanodiamina			92.23
<u>34</u>	4-(2,6,6-trimetilciclohexil)-3-buten-2-ona			27.44
<u>35</u>	Acido dodecanoico			9.07
<u>36</u>	Acido tetradecanoico			6.78
<u>37</u>	13-metilpentadecanoato de metilo			14.03

Tabla II. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS DE LOS COMPONENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE CHILE, IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS.

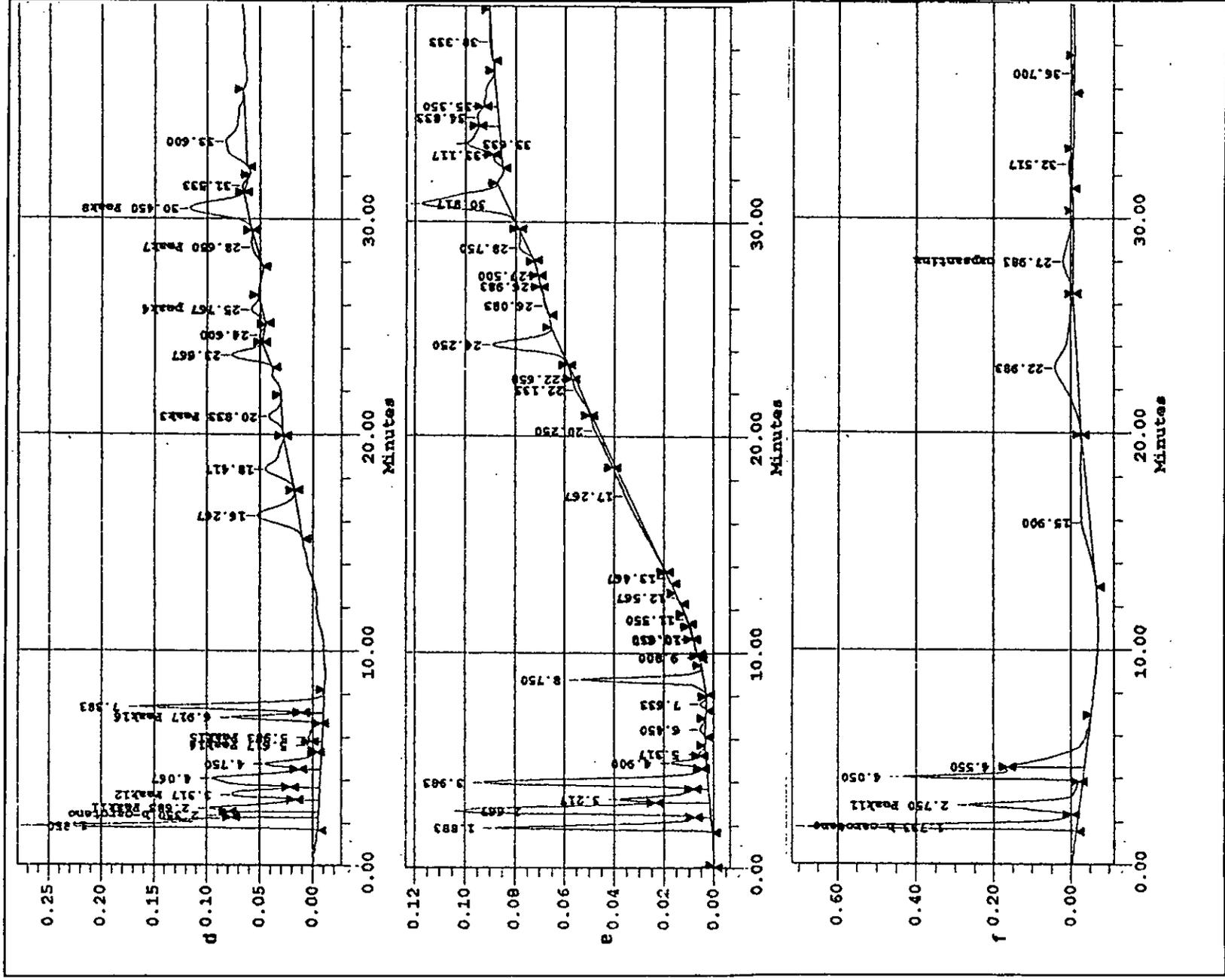




7.2. CAROTENOIDES.

Componentes separados e identificados por HPLC. Los extractos de diclorometano saponificados fueron analizados por medio de la técnica de cromatografía de HPLC en fase normal y en fase reversa. En la fase normal, cuyo *cromatograma 2* se muestra en la página 50, se separaron 26 componentes para el chile guajillo, de los cuales 12 fueron identificados; 31 componentes se separaron en el chile mulato, identificándose 15 de ellos, y; en el chile ancho, 22 componentes fueron separados, de los cuales se identificaron 9 de éstos; dichos resultados se muestran en la tabla III. En la fase reversa, cuyos *cromatogramas (3, 4 y 5)* se muestran en las páginas 52, 53 y 54 respectivamente, se separaron 21 componentes para el chile guajillo, identificándose 12 de ellos; en el chile mulato, se separaron 16 componentes, de los cuales 8 fueron identificados, y; 25 componentes fueron separados en el chile ancho, identificándose 7 de ellos. Estos resultados se muestran en la tabla IV.

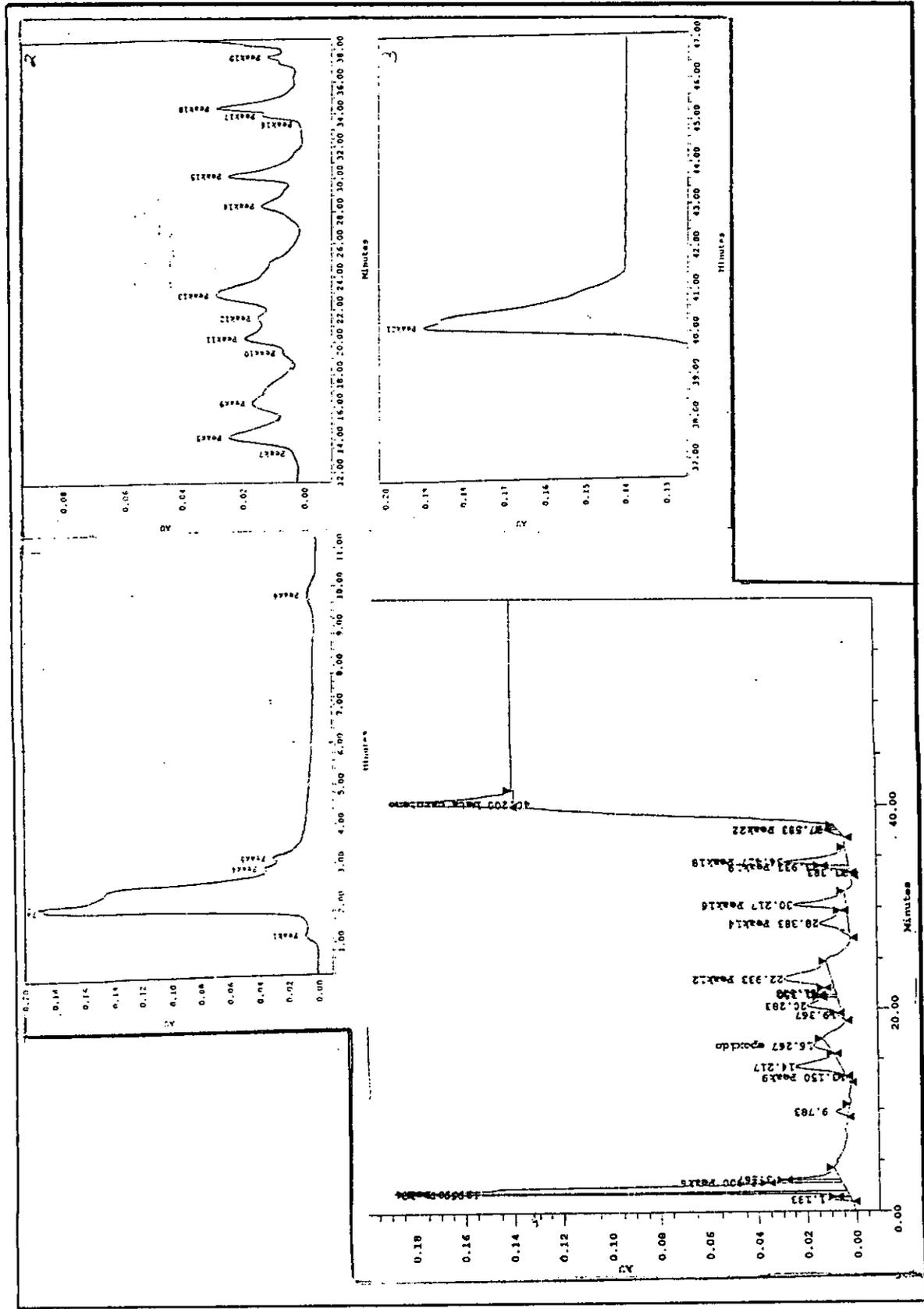
Resultados comparativos. Los extractos de diclorometano no saponificados de cada variedad de *Capsicum*, fueron separados por cromatografía en capa fina, preparativa y por columna de vidrio empacada con sílicagel. Al comparar los compuestos separados con muestras auténticas de carotenoides y tomando en cuenta sus características (tabla VI), se lograron identificar algunos de ellos, así junto con los identificados por HPLC, se establecieron diferencias en las tres variedades estudiadas, las cuales se muestran en la tabla V.



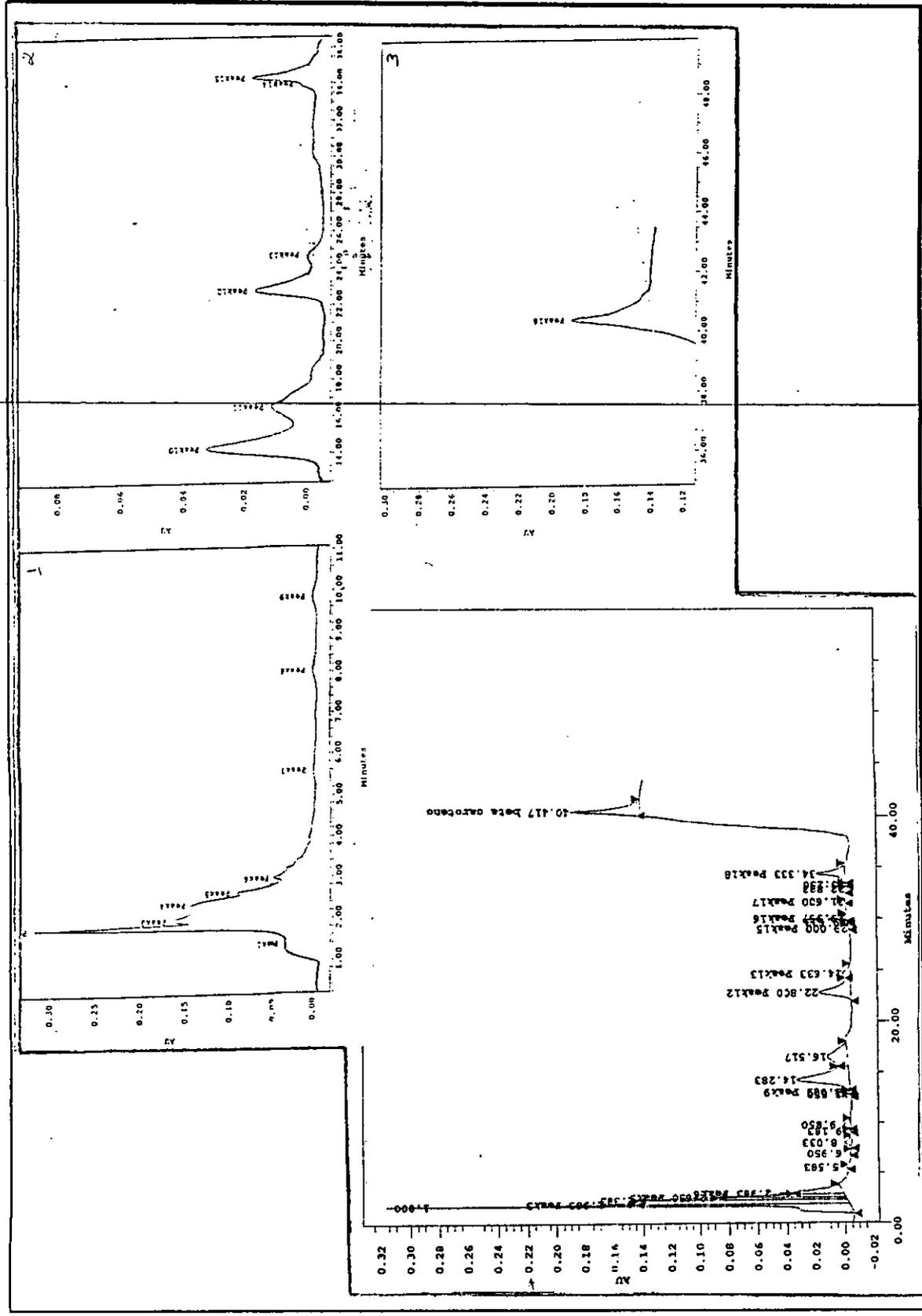
GROMATOGRAMA No. 2. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE NORMAL DE LAS TRES VARIETADES: d: GUAJILLO, e: MULATO Y f: ANCHO.

Tabla III. PICOS RESUELTOS OBTENIDOS POR HPLC EN FASE NORMAL DE LAS TRES VARIETADES DE CHILES.

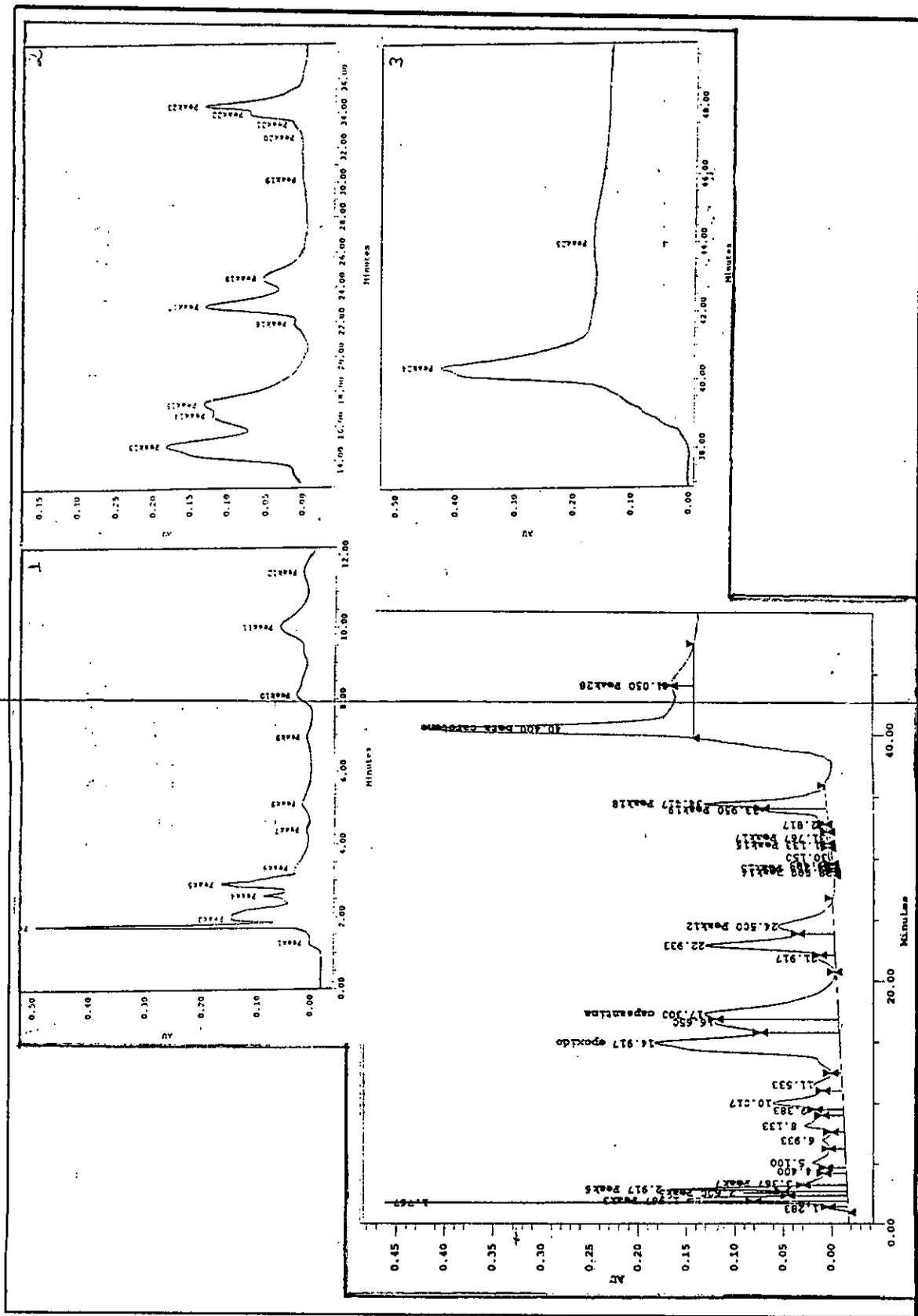
#	GUAJILLO			MULATO			ANCHO		
	CAROTENOIDE	Tr (min)	ÁREA	CAROTENOIDE	Tr (min)	ÁREA	CAROTENOIDE	Tr (min)	ÁREA
1	No identificado	1.850	4987625	No identificado	0.083	1843	β-Caroteno	1.733	10420953
2	β-Caroteno	2.350	1325125	β-Caroteno	1.883	1426165	α-Caroteno	2.750	7304936
3	α-Caroteno	2.683	2362192	α-Caroteno	2.667	2404546	No identificado	3.067	<100
4	No identificado	3.067	<100	Criptocapsina	3.217	732909	Criptocapsina	3.317	<100
5	Criptocapsina	3.317	2122920	Criptoflavina	3.983	2016859	Criptoflavina	4.050	9690804
6	Criptoflavina	4.067	3259530	No identificado	4.900	264265	No identificado	4.550	5974331
7	No identificado	4.750	1274622	No identificado	5.317	44452	No identificado	5.450	<100
8	No identificado	5.450	<100	No identificado	6.450	56726	No identificado	5.650	<100
9	No identificado	5.617	313264	β-Criptoxantina	7.633	43186	No identificado	6.217	<100
10	No identificado	5.983	514731	No identificado	8.750	921122	No identificado	6.767	<100
11	No identificado	6.917	1366866	Anteraxantina	9.800	<100	Anteraxantina	9.333	<100
12	β-Criptoxantina	7.383	3323612	No identificado	10.617	14147	No identificado	15.900	4436763
13	Anteraxantina	9.333	<100	No identificado	10.650	4069	No identificado	21.683	<100
14	No identificado	16.267	1992564	Luteína	11.550	3089	No identificado	22.983	9370447
15	No identificado	18.417	1366218	No identificado	12.567	3648	No identificado	26.050	<100
16	Zeaxantina	20.833	509000	Capsoluteína	13.467	5669	No identificado	26.600	<100
17	No identificado	23.667	1054543	Luteoxantina	17.267	338443	Capsantina	27.983	3072150
18	No identificado	24.600	99946	Zeaxantina	20.250	233174	Epoxicapsantina	28.683	<100
19	No identificado	25.767	356117	No identificado	22.133	153395	No identificado	30.333	<100
20	No identificado	26.600	<100	No identificado	22.650	41233	Violaxantina	30.950	<100
21	Capsantina	27.767	<100	No identificado	24.250	948960	Capsorubina	32.517	742009
22	Epoxicapsantina	28.650	262723	No identificado	26.083	38313	No identificado	36.700	375661
23	No identificado	30.450	2431521	No identificado	26.983	10456			
24	Violaxantina	30.950	<100	Capsantina	27.500	5940			
25	Capsorubina	31.533	92238	Epoxicapsantina	28.750	150692			
26	Neoxantina	33.600	1854713	Violaxantina	30.817	1444426			
27				Capsorubina	33.117	87629			
28				Neoxantina	33.633	771340			
29				No identificado	34.833	422370			
30				No identificado	35.350	323893			
31				No identificado	38.333	76777			



GROMATOGRAMA No. 3. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE REVERSA DEL CHILE GUARILLO.



GROMATOGRAMA No. 4. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE REVERSA DEL CHILE MULATO.



GROMATOGRAMA No. 5. SEPARACIÓN DE CAROTENOIDES DEL MATERIAL SAPONIFICADO POR HPLC EN FASE REVERSA DEL CHILE ANCHO.

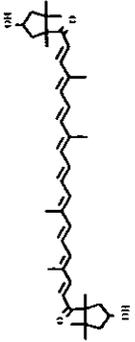
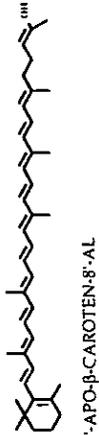
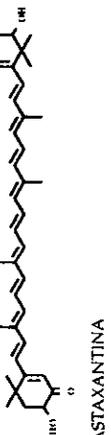
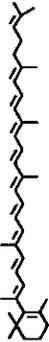
Tabla IV. PICOS RESUELTOS OBTENIDOS POR HPLC EN FASE REVERSA DE LAS TRES VARIETADES DE CHILES:

#	GUAJILLO			MULATO			ANCHO		
	CAROTENOIDE	Tr (min)	ÁREA	CAROTENOIDE	Tr (min)	ÁREA	CAROTENOIDE	Tr (min)	ÁREA
1	No identificado	1.183	151884	No identificado	1.383	745719	No identificado	1.283	22606
2	No identificado	1.950	2041037	No identificado	1.800	3241063	No identificado	1.767	513137
3	No identificado	2.050	5601960	No identificado	1.983	4098011	No identificado	1.967	166201
4	No identificado	2.900	434117	No identificado	2.383	1655201	No identificado	2.600	107475
5	No identificado	3.167	508242	No identificado	2.650	1195972	No identificado	2.917	183505
6	Latoxantina	9.783	178812	No identificado	2.983	1030139	No identificado	3.367	48333
7	Neoxantina	13.250	32519	No identificado	5.583	16920	No identificado	4.400	27689
8	Violaxantina	14.233	1515261	No identificado	8.017	98620	No identificado	5.100	34587
9	Capsantina	16.317	1439372	Latoxantina	9.850	118517	No identificado	6.933	22917
10	Cicloviolaxantina	19.367	58418	Violaxantina	14.283	2192624	No identificado	8.133	40958
11	Apteraxantina	20.283	809628	Capsantina	16.517	1065930	No identificado	10.017	73252
12	Mutatoxantina	21.533	359390	9-Cis-capsantina	22.800	947436	Capsorubina	11.533	28548
13	9-Cis-capsantina	22.933	1514222	Luteina	24.700	68543	Violaxantina	14.917	190972
14	15-Cis-zeaxantina	28.400	976950	α -Criptoxantina	33.983	60981	Capsantina	16.650	127815
15	No identificado	30.217	1261515	β -Criptoxantina	34.333	581498	No identificado	17.300	138172
16	No identificado	33.383	4425	β -Caroteno	40.417	1424596	No identificado	21.917	17069
17	α -Criptoxantina	33.933	256901				9-Cis-capsantina	22.933	133061
18	β -Criptoxantina	34.417	1090568				No identificado	24.500	56613
19	No identificado	37.533	124318				No identificado	30.150	3080
20	No identificado	37.583	44603				No identificado	32.600	2812
21	β -Caroteno	40.200	1995706				No identificado	33.367	11581
22							α -Criptoxantina	33.950	69644
23							β -Criptoxantina	34.417	127570
24							β -Caroteno	40.400	275903
25							No identificado	44.000	21552

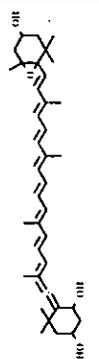
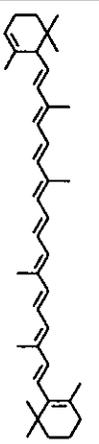
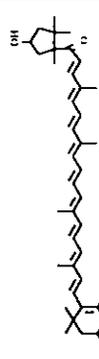
Tabla V. **COMPARACIÓN DE LOS COMPONENTES CAROTENOIDES IDENTIFICADOS EN LAS TRES VARIETADES DE CHILES (guajillo, ancho y mulato).**

No.	COMPONENTE	GUAJILLO	ANCHO	MULATO
1	β -caroteno	SI	SI	SI
2	α -caroteno	SI	SI	SI
3	Criptocapsina	SI	SI	SI
4	Criptoflavina	SI	SI	SI
5	β -criptoxantina	SI	SI	SI
6	α -criptoxantina	SI	SI	SI
7	Anteraxantina	SI	SI	SI
8	Capsantina	SI	SI	SI
9	Violaxantina	SI	SI	SI
10	Capsorubina	SI	SI	SI
11	Epoxicapsantina	SI	SI	SI
12	9-cis-capsantina	SI	SI	SI
13	Cicloviolaxantina	SI	NO	NO
14	Mutatoxantina	SI	NO	NO
15	15-cis-zeaxantina	SI	NO	NO
16	Latoxantina	SI	NO	SI
17	Neoxantina	SI	NO	SI
18	Zeaxantina	SI	NO	SI
19	Luteina	NO	NO	SI
20	Luteoxantina	NO	NO	SI
21	Capsoluteina	NO	NO	SI
22	β,ϕ -caroteno	SI	NO	NO
23	Astaxantina	NO	NO	SI
24	β,β -caroteno-5,6-epóxido	NO	NO	SI
25	Echinenona	NO	NO	SI
26	8'-apo- β -caroten-8'-al	SI	NO	SI
27	Auroxantina	NO	NO	SI
28	β,ϵ -caroteno	NO	SI	NO

Tabla VI. CARACTERÍSTICAS DE LOS CAROTENOIDES IDENTIFICADOS POR CROMATOGRAFÍA EN: CAPA FINA, PREPARATIVA Y EN COLUMNA.

COMPONENTE Y ESTRUCTURA	λ _{MAX}	R _f	COMPONENTE Y ESTRUCTURA	COLOR	λ _{MAX}	R _f
 CAPSORUBINA	442, 467, 498 ^(H)	0.20 ^(b)	 8'-APO-β-CAROTEN-8'-AL	Naranja	452 ^(M)	0.56 ^(b)
 β-CAROTENO	425, 447, 473 ^(H)	0.86 ^(A)	 ASTAXANTINA	Rojo obscuro	468 ^(M)	0.44 ^(c)
 β-PO-CAROTENO	440, 466, 494 ^(H)	0.62 ^(A)	 β,β-CAROTENO-5,6-EPOXIDO	Amarillo-Verdoso	420, 442, 472 ^(M)	0.75 ^(b)
 ANTERAXANTINA	420, 446, 470 ^(H)	0.70 ^(d)	 ECHINONONA	Rujo	462 ^(M)	0.43 ^(c)
 LUTEINA	420, 446,	0.55 ^(b) 472 ^(H)	 AUROXANTINA	Naranja	370, 398, 423 ^(H)	0.17 ^(d)

CONTINUACIÓN...(Tabla VI).

COMPONENTE Y ESTRUCTURA	COLOR	λ_{MAX}	R _f	COMPONENTE Y ESTRUCTURA	COLOR	λ_{MAX}	R _f
 NEOXANTINA	Amarillo	420, 438, 464 ⁽¹¹⁾	0,15 ⁽¹⁾	 β,ε-CAROTENO	Amarillo-Claro	421, 446, 471 ⁽¹¹⁾	0,80 ⁽¹⁾
 CAPSANTINA	Rojo obscuro	467 ⁽¹¹⁾	0,41 ⁽¹¹⁾ 0,26 ⁽¹²⁾				

SISTEMA DE SOLVENTES: hexano-acetato de etilo: ⁽¹⁾(95:5), ⁽²⁾(90:10), ⁽³⁾(80:20), ⁽⁴⁾(70:30), ⁽⁵⁾(50:50), ⁽⁶⁾hexano-acetona-dietilamina: (10:4:1).⁽⁹⁾

SOLVENTE PARA UV-VIS: ⁽¹¹⁾hexano, ⁽¹²⁾metanol.

7.3. FLAVONOIDES.

En el extracto metanólico de los chiles guajillo y mulato, analizados por cromatografía en columna empacada con sílicagel y celita, se lograron separar 9 componentes para el chile guajillo y 4 para el mulato, los cuales se les determinaron sus valores de longitudes máximas ($\lambda_{m\acute{a}x.}$), éstos se muestran en la tabla VII.

Otra parte del extracto metanólico del chile guajillo fue analizado utilizando la técnica bi-dimensional descrito en su oportunidad, dando como resultado 11 posibles componentes de origen flavonoides, dichos resultados se muestran en la figura 10.

Tabla VII. VALORES DE λ MÁXIMAS (cm^{-1}) DE UV-VIS DE FLAVONOIDES SEPARADOS POR COLUMNA Y C. P. P., DE LAS VARIETADES: guajillo y mulato.

GUAJILLO	MULATO
UV-VIS	UV-VIS
605, 208, 330	276, 336
284	278, 325
287	583, 657
266, 244	603, 625, 659
275	
776, 762	
322	
325	
272	

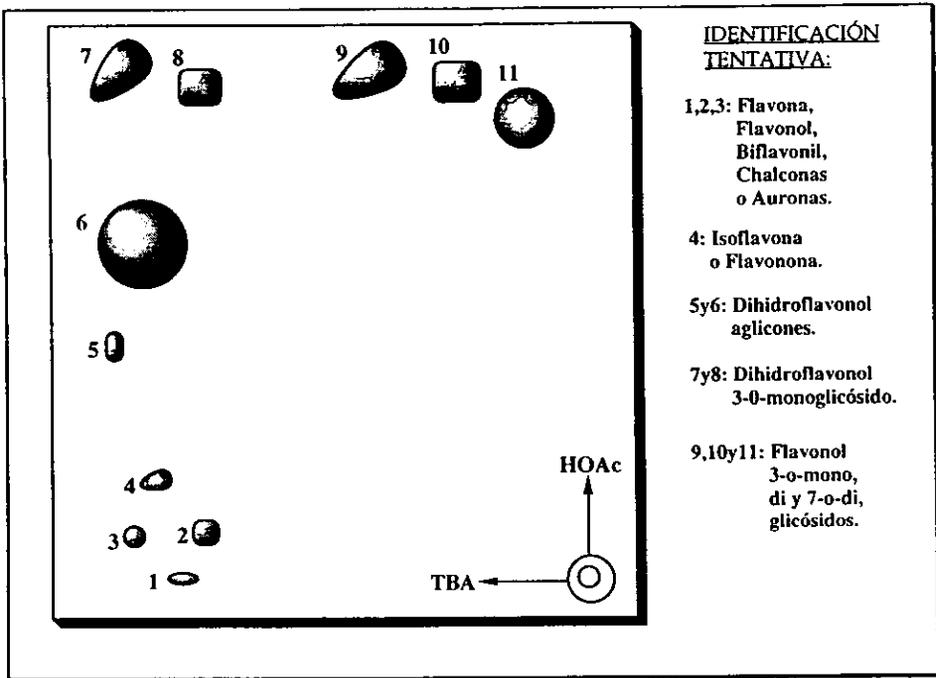


Figura 9. DISTRUBUCIÓN DE FLAVONOIDES EN PLACA CROMATOGRÁFICA BI-DIMENSIONAL, REVELADO CON LUZ ULTRAVIOLETA, DE LA VARIEDAD GUAJILLO.

**B. DISCUSIÓN
DE
RESULTADOS**

El estudio de los componentes químicos a tres variedades Mexicanas de chiles (guajillo, mulato y ancho), se llevó a cabo dividiéndolos en tres grandes grupos: 1. Componentes Volátiles, 2. Carotenoides y 3. Flavonoides. Para de esta manera hacer comparaciones y determinar las diferencias entre las tres variedades.

Se determinó que el material a utilizar: chiles fuera de marca comercial, maduros y deshidratados (página 33), pues éstos van directamente para el consumo. También, se determinó trabajar únicamente con la pulpa de éstos. La cantidad de chiles empleados fue constante para las tres variedades, en promedio de 647.4 g.

Primero se extrajeron los componentes volátiles para cada una de las tres variedades en estudio. Se utilizaron las mismas técnicas de extracción así como de separación e identificación, ver página 36 y 37; y siempre bajo las mismas condiciones. La identificación se realizó comparando los espectros de masas con los datos que posee el sistema de computo del mismo equipo.

Los resultados de este primer grupo de componentes muestran diferencias significativas entre las tres variedades; según se observa en el *cromatograma 1*, aquí se pueden detectar diferencias tanto en el número como en la distribución de los picos resueltos. De los componentes que se identificaron, como nos muestra la tabla I, página 45, son muy pocos los comunes; de hecho, sólo uno el 5, 6, 7, 7a-tetrahidro-4, 4, 7a-trimetil-(R)-2(4H)-benzofuranona es común entre las tres variedades; tres fueron comunes entre el guajillo y el ancho (2-furanocarboxaldehído, 1-(1H-pirrol-2-il)etanona y Etilfenoxibenceno); uno entre el guajillo y el mulato (4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona); y, uno más entre el ancho y el mulato (ácido 3-(m-aminobenzoil)-2-metilpropionico). Los demás componentes identificados son diferentes entre ellos.

Los componentes: pentanal y tolueno identificados en el chile ancho, así como, el 2-furanocarboxaldehído identificado en el chile guajillo y ancho; han

sido encontrados en otras variedades de *Capsicum*;⁽¹⁹⁾ otros componentes como: la tetrametilpirazina, el 5-(hidroximetil)-2-furanocarboxaldehído, la 2-metil-6-propilpirazina, la 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-3-buten-2-ona, la 1-(2-furanil)-etanona, el 5-metil-2-furanocarboxaldehído y la 1-fenil-1,2-propadiona, entre otros; también se han encontrado componentes semejantes a estos en otras variedades de *Capsicum*. Los demás componentes, al parecer, no han sido encontrados en éste género. Lo anterior concuerda con que las tres variedades de chiles en estudio tienen diferente aroma, así como sabor.

Para el segundo grupo de componentes, los carotenoides; se probaron dos diferentes disolventes y una mezcla: 1. diclorometano, 2. hexano-acetona 4:1 y 3. acetona, esto de acuerdo a lo descrito en la literatura.^(11,17) Después de hacer un seguimiento por c.c.f., se concluyó que el diclorometano es el disolvente que mejor extrajo los pigmentos del chile; por lo tanto, se ocupó este disolvente para la extracción de éstos en las tres variedades de *Capsicum* en estudio. Para la separación e identificación de la mayoría de ellas se realizó por medio de HPLC: en fase normal y en fase reversa, en base a lo descrito en la literatura.^(11,23) Otros carotenoides, como lo muestra la tabla VI, página 57, fueron separados y purificados por cromatografía en columna y por placa preparativa; obteniendo de cada uno de éstos, su color característico, el R_f y las longitudes (λ) máximas, para de esta manera identificar de manera tentativa a estos carotenoides. Las cuatro referencias de carotenos con los que se contaron fueron comparados en c.c.f. con extractos, de los cuales: el β -caroteno, la capsantina y criptoxantina fueron los únicos que se encontraron en los extractos. El licopeno y prolicopeno, no se encontraron en ningún extracto de las variedades de chiles estudiadas; esto concuerda también con las referencias, las cuales mencionan, que no han encontrado éstos componentes en los *Capsicum*.

Se puede afirmar que la fase normal y la fase reversa son complementarios, pues, como se muestra en el *cromatograma 2*, que es de la fase normal, hay una mejor separación para los carotenoides menos polares; el *cromatograma 3, 4 y 5*, que son de la fase inversa; nos muestran que es mejor para la separación de los carotenoides más polares. También, se puede observar que hay ciertas diferencias;

pero hay más semejanza en este grupo de componentes a diferencia del anterior; según se observa en la tabla V (página 56). De los componentes identificados, la mayoría son comunes entre las tres variedades (12 carotenoides), estos carotenoides comunes son: β -caroteno, α -caroteno, criptocapsina, criptoflavina, β -criptoxantina, α -criptoxantina, anteraxantina, capsantina, violaxantina, capsorubina, epoxicapsantina y 9-cis-capsantina. Entre el guajillo y el mulato, 3 son comunes: lutoxantina, neoxantina y zeaxantina. En el guajillo únicamente, 3 componentes son particulares para esta variedad, y son: cicloviolaxantina, mutatoxantina y 15-cis-zeaxantina. Y, en el mulato, sólo 3 componentes son particulares y son: luteína, luteoxantina y capsoluteína. En resumen, las tres variedades tienen en promedio la misma cantidad de picos, 23 por variedad; ésto según nos demuestra la siguiente tabla:

	GUAJILLO NO. DE PICOS RESUELTOS	MULATO NO. DE PICOS RESUELTOS	ANCHO NO. DE PICOS RESUELTOS
FASE NORMAL	26	31	22
FASE REVERSA	21	16	25
PROMEDIO	23.5	23.5	23.5

La identificación de carotenoides por HPLC fué por medio del tiempo de retención, tomando cuenta las referencias ya mencionadas; y que concuerdan con los separados por c.c. y por c.p.p. Además, se contó con muestras conocidas de carotenoides (ver página 35), los cuales sirvieron como referencias.

En cuanto al grupo de flavonoides, la extracción de éstos en las tres variedades se logró por medio del solvente utilizado para su extracción que fué acetona, metanol y agua; y se pudieron caracterizar por medio de la cromatografía en placa bi-dimensional y revelados por la fluorescencia característica para este tipo de componentes (ver *figura 10*, pag. 60).

Como se muestra en la parte de resultados, *figura 10* páginas 59 y 60; la identificación fué de manera tentativa y general para una sola variedad, el guajillo, identificandose los siguientes grupos de flavonoides: 1. flavona o flavonol o biflavonil, chalconas o auronas; 2. isoflavona o flavononas; 3. dihidroflavonol aglicones; 4. dihidroflavonol-3-O-monoglicósidos; y, 5. flavonol: 3-O-mono, di y 7-O-di, glicósidos.

Utilizando la cromatografía en columna y en p.p. se lograron separar algunos flavonoides de las variedades guajillo y mulato, de los cuales, nueve componentes del chile guajillo se les determinó sus longitudes (λ) máximas, y cuatro del chile mulato; en el caso del chile ancho ya no se logró obtener ninguno, ésto debido al tiempo. La gran diferencia en las longitudes (λ) máximas obtenidas, nos hace pensar que en estas variedades existen diferentes clases de flavonoides presentes; confirmandolo y complementandolo los resultados de la placa bi-dimensional del chile guajillo.

Para poder utilizar a las muestras como estandares (β -caroteno, capsantina, licopeno, criptoxantina y prolicopeno), se determinaron nuevamente, sus constantes espectroscópicas; las cuales sí concuerdan con las establecidas. Durante el desarrollo de ésta práctica, se observó que en el caso particular del β -caroteno, éste, después de un cierto tiempo y determinadas sus longitudes (λ) máximas que corresponden exactamente al del β -caroteno (ver anexo 1); al analizarlo por espectroscopía de masas esta misma muestra, éste corresponde a la estructura base del β -caroteno pero con un grupo peróxido (ver anexo 2); ya que el peso molecular del β -caroteno es de 536 y el que se obtuvo después fue de 600; o sea 64 más, que corresponden al de un doble grupo peróxido. Para confirmar lo anterior, se tomó una nueva muestra del estandar de β -caroteno y se le determinó su espectro de masas, el cual sí corresponde al del β -caroteno. Las referencias confirman ésta posibilidad. Lo anterior nos demuestra la escasa estabilidad de estos componentes.

9. CONCLUSIONES

La determinación de las diferencias de las tres variedades estudiadas se hicieron en base específicamente con dos grupos de componentes: volátiles y carotenoides. De esta manera; con el presente trabajo se ha comprobado que las diferencias "evidentes": en la morfología, color, sabor y aroma, en las tres variedades de chiles estudiadas; se deben a sus diferencias en los componentes químicos, principalmente en el grupo de los volátiles; pues, como ya se ha discutido, se encontraron diferencias importantes en las tres variedades de chiles en estudio. Lo anterior, tomándolo como base, puede dar pauta para una mejor clasificación de éstos chiles, ya que como se ha mencionado, aún no existe una clasificación confiable para los *Capsicum*; siendo éste otro de los objetivos de este trabajo.

En el chile mulato y ancho se encontró un alto contenido de clorofila, a diferencia del guajillo que no se encontró nada; tomando en cuenta que se trabajaron con chiles maduros y que siguen el mismo proceso de secado; significa que existen diferencias durante el proceso de maduración, dada por diferencias significativas en la biosíntesis de éstos. Lo anterior es muy importante tomarlo en cuenta para establecer las diferencias entre estos chiles.

El manejo de estos componentes es muy difícil debido a su alta inestabilidad; principalmente el grupo de los carotenoides, como se comprobó durante el desarrollo de este trabajo. Pero sí se trabajan y se usan mezclados, como extractos, se puede pensar en una explotación a nivel industrial de éstos componentes; de hecho ya existe esto en otros países, pues como se ha mencionado en su oportunidad, una gran cantidad de componentes de *Capsicum* tienen una amplia aplicación en los alimentos, cosméticos, medicamentos, etc.. En México aún no es tan explotado este campo y menos con variedades Mexicanas; he aquí la importancia de estos trabajos. En la comida y medicina tradicional en nuestro país es donde tienen una gran importancia las variedades de *Capsicum*.

El estudio de identificación con el grupo de los flavonoides fue de manera tentativa; quedando así el camino iniciado para trabajos posteriores. Así también, se demostró la inestabilidad del β -caroteno, el cual como se mencionó, hay la posibilidad de que forme grupos de peróxido; siendo ésto muy importante, por lo cual se requiere profundizar más sobre ésto en otros trabajos. De esta manera, se concluye con éste; aunque evidentemente queda mucho por hacer.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Font, Q. P.; "Plantas Medicinales"; ed. Labor, S. A.; tercera edición, (1976); Barcelona, España; pp. 561-583.
2. Castro Cid del Prado, Victor; "Determinación de Capsaicina en Algunas Variedades Mexicanas de *Capsicum*"; México, U.N.A.M.; Tesis Profesional, 1979; ed. del autor.
3. Gonzalez, C. M.; "Especies Vegetales de Importancia Económica en México"; ed. Porrúa, S. A., (1984); México, D. F.; pp. 66
4. Simón, E. J. and Chadwick, F. A.; "Herbs"; ed. Archon Books, (1989); U. S. A.; pp. 13-15.
5. Duke, A. J.; "Handbook of Medicinal Herbs"; ed. CRC Press, Inc.; fourth printing, (1987); Boca Raton, Florida, U. S. A.; pp. 98-99.
6. Galindo, G. H., Martínez, O. J., Rosales, G. E. y Guevara, B. I.; "La Capsaicina, el Principio Pungente del Chile; su Naturaleza, Absorción, Metabolismo y Efectos Farmacológicos"; *Ciencia*; 46, (1995); pp. 84-102.
7. Govinderajan, V. S. and Sathyanerayana, M. N.; "*Capsicum*: Production, Technology, Chemistry and Quality"; *Food Sci. Nutr.*; 29, 6, (1991); pp. 436- 444.
8. Thomas, E. F.; "*Capsicum* Production, Technology, Chemistry and Quality"; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; CRC Press, Inc.; Boca Raton, Florida, U. S. A.; 24, 3, 1986, pp 245- 355.
9. Mordi, R. C.; "*Carotenoids*: Functions and Degradation"; *Chem. Ind.*, 1, (1993); pp. 79- 83.
10. Mínguez, I. M. and Méndez, H., D.; "Separation and Quantification of the Carotenoid Pigments in Red Peppers (*Capsicum annuum* L.), Paprika, and Oleoresin by Reversed-Phase HPLC"; *J. Agric. Food Chem.*, 41, (1993); pp. 1616-1620.

11. Deli, J., Matus, Z. and Tóth, G.; "Carotenoid Composition in the Fruits of *Capsicum annuum* Cv. Szentesi Kosszarvú during Ripening"; *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3, (1996); pp. 711-716.
12. Levy, A., Harel, S., Palevitch, D., Akiri, B., Menagem, E. and Kanner, E.; "Carotenoids Pigments and b-Carotene in Paprika Fruits (*Capsicum Spp.*) with Different Genotypes "; *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2, (1995); pp. 362-366.
13. Biacs, P., Daood, H. and Huszka, T.; "Carotenoids and Carotenoid Esters New Cross-Cultivars of Paprika"; *J. Agric. Food Chem.*, 41, 11, (1993); pp. 1864-1867.
14. Minguez-Mosquera, M. and Horneros-Méndez, D.; "Changes in Carotenoid Esterification during the Fruit Ripening of *Capsicum annuum* Cv. Bola"; *J. Agric. Food Chem.*, 42, 3, (1994); pp. 640-644.
15. Minguez-Mosquera, M. and Horneros-Méndez, D.; "Formation and Transformation of Pigments during the Fruit Ripening of *Capsicum annuum* Cv. Bola and Agridulce"; *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1, (1994); pp. 38-44.
16. Minguez-Mosquera, M. and Horneros-Méndez, D.; "Comparative Study of the Effect of Paprika Processing on the Carotenoids in Peppers (*Capsicum annuum*) of the Bola and Agridulce Varieties"; *J. Agric. Food Chem.*, 42, 7, (1994); pp. 1555-1560.
17. Davies, B. H., Susan, M. and Kirk, J. T. O.; "The Nature and Biosynthesis of the Carotenoides of Different Colour Varieties of *Capsicum annuum*"; *Phytochem.*, 2, (1970); pp. 797- 805.
18. Deli, J., Matus, Z. and Szabolcs, J.; "Carotenoid Composition in the Fruits of Black Paprika (*Capsicum annuum* Variety *longum nigrum*) during Ripening", *J. Agric. Food Chem.*, 40, (1992), pp. 2072-2076.
19. Luning, A. P. and Rijk, T.; "Gas Chromatography, Mass Spectrometry and Sniffing Port Analyses of Volatile Compounds of Fresh Bell Peppers (*Capsicum*

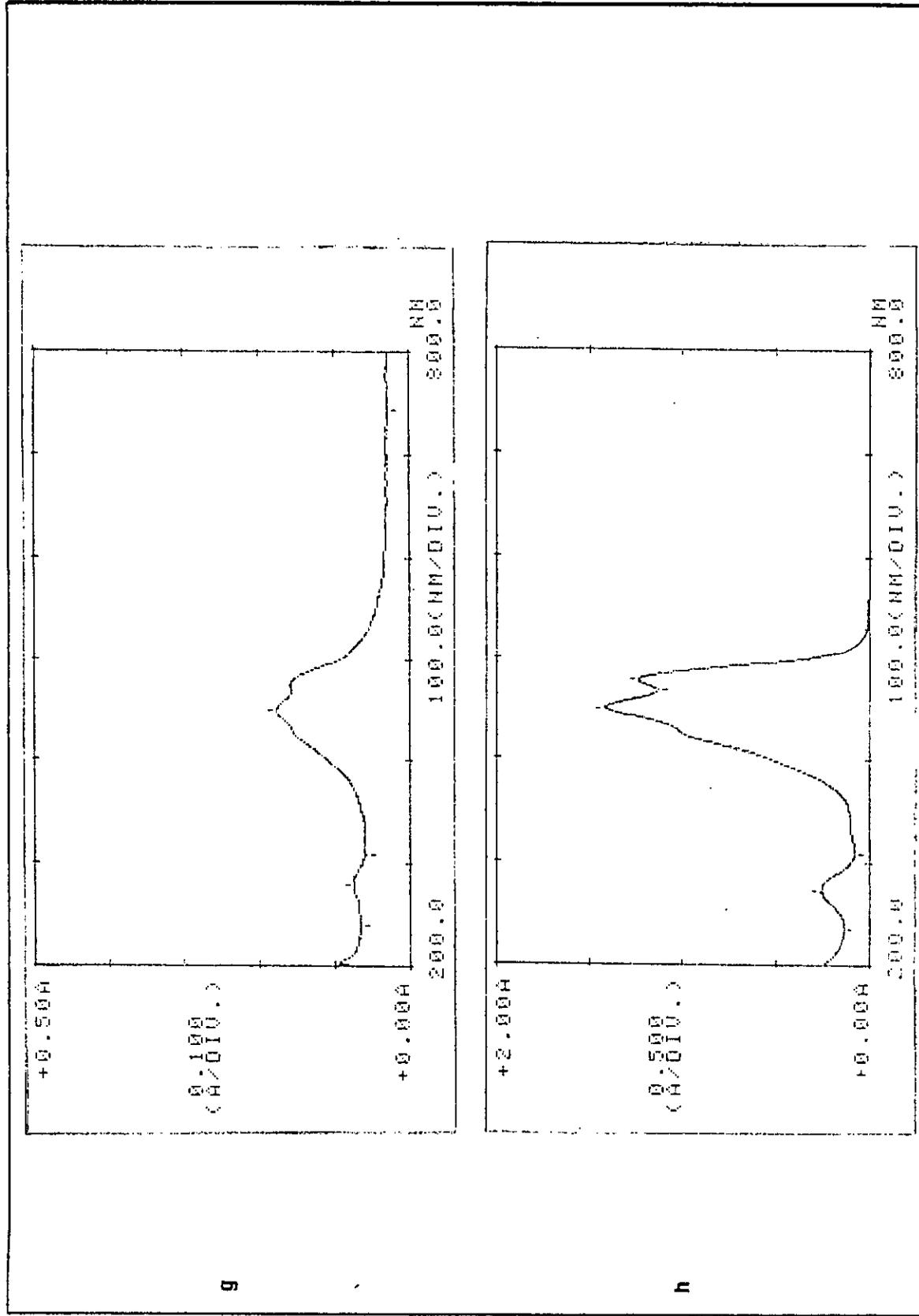
- annuum*) at Different Ripening Stages"; *J. Agric. Food Chem.*, 42, (1994); pp. 977-983.
20. Luning, P., Ebbenhorst-Seller, T. and Rijk., T.; "Effect of Hot-Air Drying on Flavour Compounds of Bell Peppers (*Capsicum annuum*)"; *J. Sci. Food Agric.*, 68, (1995); pp. 355-365
 21. Huffman, V. L., Schadle, E. R., Villalon, B. and Burns, E. E.; "Volatile Components and Pungency in Fresh and Processed Jalapeño Peppers"; *J. Food Sci.*, 43, (1978); pp. 809-1811.
 22. Lee, Y., Howard, L. R. and Villalón, B.; "Flavonoids and Antioxidant Activity of Pepper (*Capsicum annuum*) Cultivars"; *J. Food Sci.*, 60, (1995); pp. 473-476.
 23. Almela, L., López-Roca, M-J., Candela, E. M. and Alcázar, D., M.; "Separation and Determination of individual carotenoids in a *Capsicum* Cultivar by Normal-Phase High-Performance Liquid Chromatography"; *J. Chromatogr.*; 502, 106, (1990); pp. 96-106.
 24. Harbone, B. J.; "Phytochemical Methods, A GUIDE TO MODERN TECHNIQUES OF PLANT ANALYSIS"; Ed. CHAPMAN AND HALL; Second Edition, (1984); New York, U. S. A.; pp. 128-141.
 25. Mabry, J. T., Markham, R. K. and Thomas, B. M.; "The Systematic Identification of Flavonoids"; Ed. Springer-Verlag; (1970); New York, U. S. A.; pp. 3-22.
 26. Harborne, B. J. and Mabry, T. J.; "The Flavonoids"; Ed. CHAPMAN AND HALL; (1975); London, Eng.; pp. 2-15.
 27. Ballard, E. R., McClure, W. J., Eshbaugh, H. W. and Wilson, G. K.; "A Chemosystematic Study of Selected Taxa of *Capsicum* "; *J. Amer. Bot.*, 57, 2, (1970); pp. 225-233.

28. Perrin, D. D., Armarego, W. L. F. and Perrin, D., R.; "Purification of Laboratory Chemicals"; Ed. PERGAMON PRESS; 2nd Edition, (1980); New York, U. S. A.; pp. 74-562.
29. Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M. and Garrido-Fernández, J.; "Influence of Industrial Drying Processes of Pepper Fruits (*Capsicum annuum* Cv. Bola) for Paprika on the Carotenoid Content"; *J. Agric. Food Chem.*, 42, 5, (1994); pp. 1190-1193.
30. Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M. and Garrido-Fernández, J.; "Competition between the Processes of Biosynthesis and Degradation of Carotenoids during the Drying of Peppers"; *J. Agric. Food Chem.*, 42, 3, (1994); pp. 645-648.
31. Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M. and Garrido-Fernández, J.; "Color Quality in Paprika"; *J. Agric. Food Chem.*, 40, 12, (1992); pp. 2384-2388.
32. Mínguez-Mosquera, M. I., Jarén-Galán, M. and Garrido-Fernández, J.; "Effect of Processing of Paprika on the Main Carotenes and Esterified Xanthophylls Present in the Fresh Fruit"; *J. Agric. Food Chem.*, 43, 11, (1993); pp. 2120-2124.
33. Mitchell, E. G., McLauchlan, L. R., Beattie, R. T., Banos, C. and Gillen, A. A.; "Effect of Gamma Irradiation on the Carotene Content of Mangos and Red *Capsicums*"; *J. Food Sci.*, 55, 4, (1990); pp. 1185-1186.
34. Biacs, A. P., Czinkotai, B. and Hoschke, Á.; "Factors Affecting Stability of Colored Substances in Paprika Powders"; *J. Agric. Food Chem.*, 40, 3, (1992); pp. 365-367.
35. Camara, B. and Monéger, R.; "Free and Esterified Carotenoids in Green and Red Fruits of *Capsicum annuum*"; *Phytochem.*; 17, (1978); pp. 91- 93.
36. Ittah, Y., Kanner, J. and Granit, R.; "Hydrolysis Study of Carotenoid Pigments of Paprika (*Capsicum annuum* L. Variety Lehava) by HPLC/Photodiode Array Detection"; *J. Agric. Food Chem.*, 41, 6, (1993); pp. 899-901.

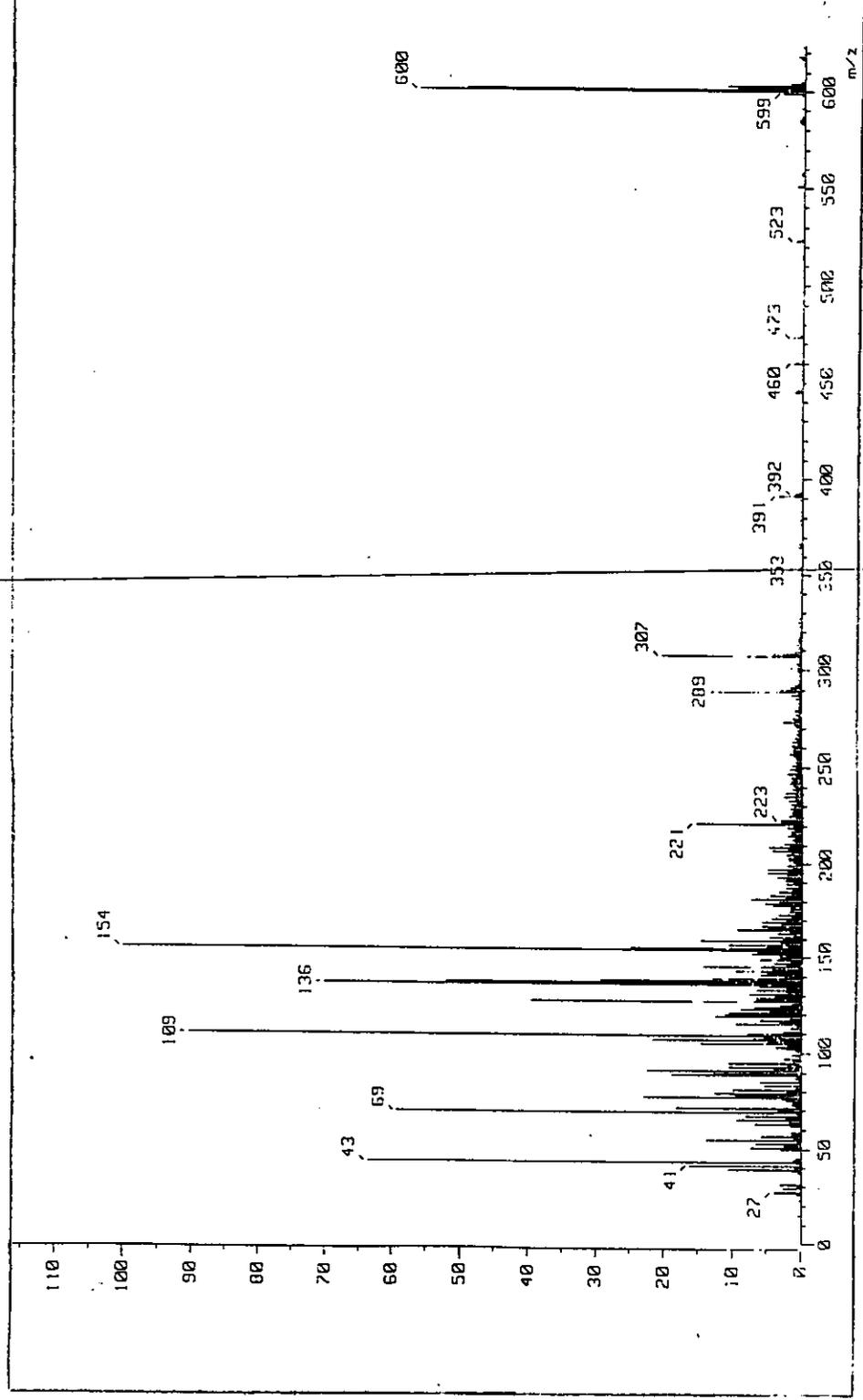
37. Gregory, K. G., Chen, T-S. and Philip, T.; "Quantitative Analysis of Carotenoids and Carotenoid Esters in Fruits by HPLC: Red Bell Peppers"; *J. Food Sci.*, 52, 3, (1987); pp. 1071-1073.
38. Almela, L., López-Roca, M-J., Candela, E. M. and Alcázar, D. M.; "Carotenoid Composition of New Cultivars of Red Pepper for Paprika"; *J. Agric. Food Chem.*, 39, 9, (1991); pp. 1606-1609.
39. Goda, Y., Sakamoto, S., Nakanishi, T., Maitani, T. and Yamada, T.; "Identification of Monoesterified Capsanthin in Paprika (*Capsicum annuum*): The Nature of Esterification of Capsanthin"; *Chem. Pharm. Bull.*, 43, 7, (1995); pp. 1248-1250.
40. Yuste, F., Castro, V. and Walls, F.; "Determinación de Capsaicina en algunas Variedades Mexicanas del Género *Capsicum* "; *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 24, 4, (1995); pp. 166-167.
41. Games, E. D. and Alcock, J. N.; "Analysis of Pepper and *Capsicum* Oleoresins by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Field Desorption Mass Spectrometry"; *J. Chromatogr.*; 294, (1984); pp. 269-279.
42. Watts, D. C., Maxwell, R. J., Games, E. D. and Rossiter, M.; "Analysis of Carotenoids by Field Desorption Mass Spectrometry"; *Organic Mass Spectrometry*. 10, (1975); pp. 1102-1110.
43. Jursík, T., Stránský, K. and Ubik, K., "Trapping System for Trace Organic Volatiles"; *J. Chromatogr.*, 586, (1991), pp. 315-322.
44. Parker, S. R.; "Absorption, Metabolism and Transport of Carotenoids"; *J. FASEB*, 10, 5, (1996); pp. 542-551.
45. Otto, I. and Birkhauser, V. B.; "Carotenoids"; Ed. Und Stuttgart; Alemania; 1971; pp. 63-92.

II. A N E X O

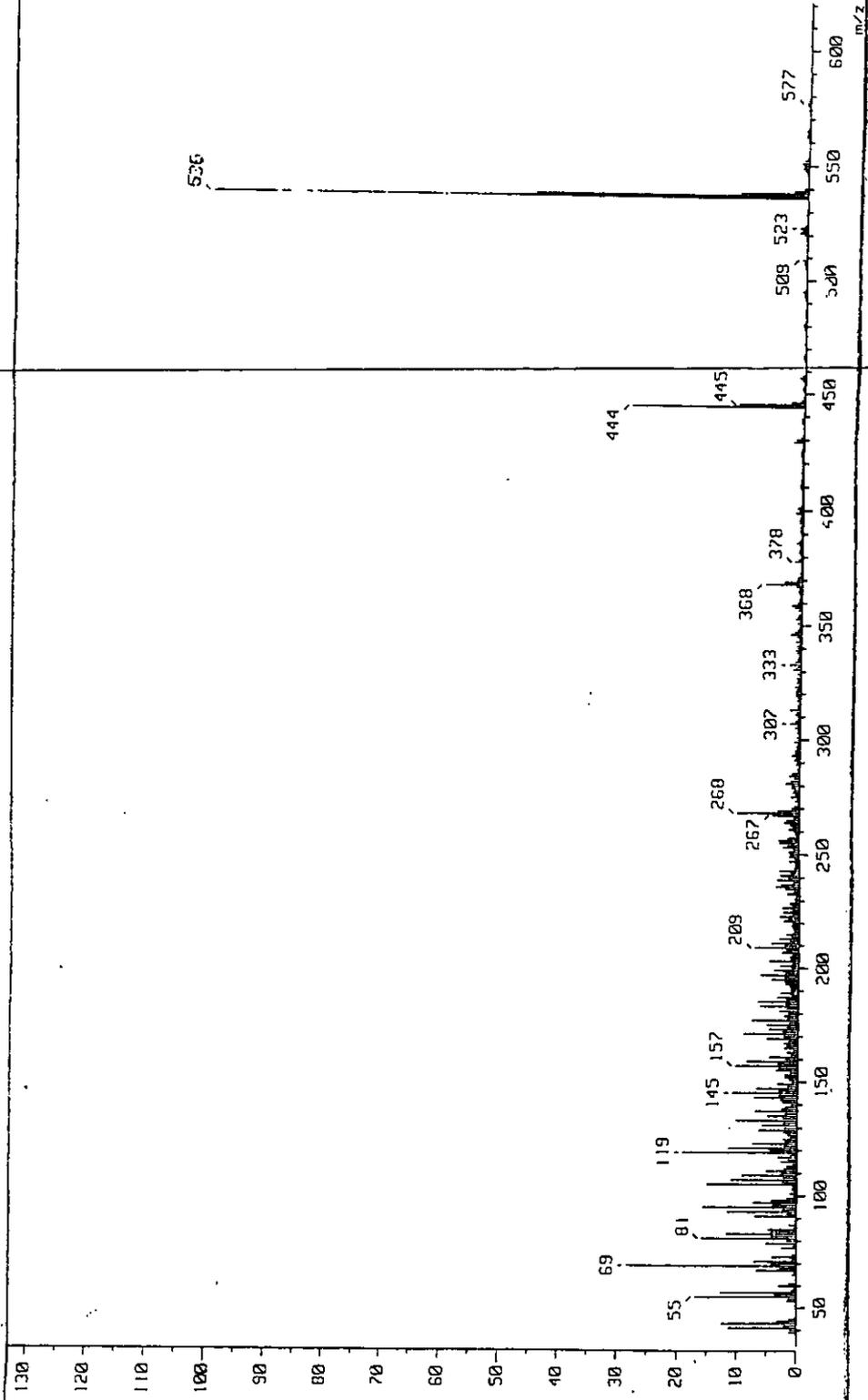
ESTA COSA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



ANEXO 1. ESPECTRO DE UV-VIS DEL β -CAROTENO ESTANDAR ANTES DEL TRATAMIENTO; g: EN METANOL, h: EN HEXANO.



ANEXO 2. ESPECTRO DE MASAS DEL β -CARDOTENO ESTANDAR DETERMINADO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO.



ANEXO 3. ESPECTRO DE MASAS DE OTRA MUESTRA DE β -CAROTENO ESTANDAR DETERMINADO DIRECTAMENTE.