



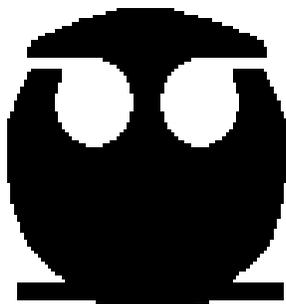
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Cuantificación de Capsaicinoides en Chiles Secos por Espectrofotometría UV utilizando Extracción en Fase Sólida como Método de Preparación de Muestras.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
OMAR ANGEL VELOZ MEZA



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Ernestina Cervera Flores

Vocal: Adolfo García Osuna.

Secretario: Enrique Martínez Manrique.

1er. Suplente: María de Lourdes Osnaya Suárez.

2do. Suplente: Erika María Ramírez Maya.

Lugar donde se realizó la investigación:

Laboratorio 3-B y 3-F (anexos), Edificio A, Facultad de Química.

Asesora: Ernestina Cervera Flores.

Supervisor Técnico: Silvia Mendoza Arellano.

Sustentante: Omar Angel Veloz Meza.

A G R A D E C I M I E N T O S

A Dios.

Por ser mi compañero y consejero en la vida.

A mis Padres Angel y Mary.

Por darme la vida y enseñarnos a mí y a mis hermanos los valores para ser unas personas de bien, y porque sin su apoyo este proyecto nunca hubiera llegado a su culminación. Los quiero mucho.

A mi Esposa Isabel.

Por todo su apoyo y por enseñarme que la vida es más llevadera si tenemos la compañía del ser amado.

A mi Hijo Diego Omar.

Porque eres el regalo más preciado que me ha dado Dios y una fuente de inspiración para seguir luchando.

A las profesoras Tina y Silvia.

Por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por la confianza que depositaron en mí y por darme la dicha de tener su amistad.

Al profesor Adolfo García Osuna.

Por brindarme su amistad y su apoyo para la realización de este trabajo.

Al profesor Enrique Martínez.

Por brindarme sus comentarios y apoyo para la mejora de este trabajo.

A mi hermano Jesús.

Por esos años maravillosos que compartimos, por tu apoyo para la culminación de este trabajo y por el futuro prospero que nos espera.

A mis Compadres Marta Deyanira y Pedro.

Por enseñarme que todavía existen las personas valientes y con un gran corazón que no se doblegan ante nada y por todo el apoyo y estímulo para la culminación de este trabajo.

A mis sobrinos Vania Yael y Pedro Josué.

Porque son una gran motivación para seguir progresando y ocupan un lugar muy especial en mi corazón, y para que sepan que los sueños se pueden cumplir a pesar de todas las adversidades. Recuerden que cuentan conmigo para todo.

A Omar Alpizar (Tocayito).

Por la motivación durante la carrera y por enseñarme que con ganas todo se puede.

A mi Familia Meza.

En especial a mis tías Delia, Margarita, Lety, Charo y familia, a mi tío Enrique y familia, a mis primas Nelly y Sandy y su familia, por el apoyo y sus palabras de aliento en los momentos difíciles, y porque ahora se que el espíritu de lucha lo herede de ustedes.

A mis suegros Vicente y Elena.

Por todo el apoyo brindado en los momentos difíciles, por ser buenas personas y por brindarme su confianza y amistad.

A mis sobrinos Alfredo y Edgar.

Porque ocupan un lugar muy especial en mi agenda de personas especiales, y porque saben que el camino esta trazado solo hay que seguirlo.

A mi tío Dr. Javier Baliño.

Por los consejos y vivencias que me hicieron crecer y llegar a la culminación de este trabajo.

A todos mis primos y primas.

Que influyeron de algún modo para la realización de este trabajo.

A mi carnal Ismael:

Porque se que puedo contar contigo incondicionalmente como un hermano.

A mis Compadres Cesar, Ismael, Helmer, Alberto, Leonardo y Miguel Angel:

Por sus consejos, su amistad y porque a final de cuentas somos más hermanos que compadres.

A mis amigos de la Facultad de Química:

Cesar Shimizu, Chore, Oliver, Goyo, Maricela, Paco y Claudia, Pato e Itzel, Lupita Monsivais, Laura, Chino, Arturo Resendiz, Julio Castillo, Vero, Arminda, Manuel Freyre, Cesar Zarazua, Marco A. Martínez, Sergio, Mimoso, Artista, y un largo etcétera. Por sus palabras de aliento para seguir adelante en los momentos difíciles, durante la estancia en la Facultad. Disculpen la falta de memoria en estos momentos (si no mencione a alguno).

A mis profesores de la Facultad de Química.

Porque gracias a su dedicación y entrega en la docencia logran formar profesionistas de excelencia con valores y ética.

A la Facultad de Química.

Porque al pasar de los años y aún después de la culminación de mi estancia terrenal, siempre te llevare en mi corazón.

FRASES Y PENSAMIENTOS

Todos los días Dios nos da un momento en que es posible cambiar todo lo que nos hace infelices.

Paulo Coelho.

Nadie sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta.

Publio Sirio.

La victoria pertenece a los más perseverantes.

Napoleón.

Si lloras porque no puedes ver el sol, las lágrimas no te dejarán ver las estrellas.

Kahlil Gibran.

El siguiente texto fue tomado del libro “**El señor de los anillos I. La comunidad del anillo**” de **J.R.R. Tolkien**, en un dialogo entre el Hobbit Frodo y Gandalf el mago, en las minas de Moria:

Frodo: Ojala que nunca hubiera venido a mí (anillo único). Como quisiera que nada hubiera sucedido.

Gandalf: Igual que todos los que viven eventos difíciles, pero ellos no los pueden decidir. *La única decisión posible es que hacer con el tiempo que tenemos.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
- Objetivos generales	3
- Objetivos específicos	3
ANTECEDENTES	4
- Chile	4
Morfología	5
Composición	6
- Capsaicinoides	8
- Extracción en fase sólida (EFS)	10
- Espectroscopia UV	16
Fundamentos	19
Ley de Lamber – Beer	19
Instrumentación UV/VIS	20
CAPITULO I: EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAS PRIMAS	22
- Equipos	22
- Reactivos	22
- Materias primas	23
CAPITULO II: METODOLOGÍA	24
- Espectrofotometría UV de capsaicinoides estándar	24
Registro de Espectros	24
- Curva Patrón de Capsaicinoides estándar en Metanol	25
- Recolección de muestras de dos variedades de chile (chile guajillo y chile chipotle) para pruebas preliminares	26
- Determinación de humedad de muestras para pruebas preliminares	27
- Extracción de los capsaicinoides con disolventes en chiles secos	28
- Selección de la parte del chile para la cuantificación	30
- Purificación del extracto utilizando Extracción en Fase Sólida	30

- Selección de columna de EFS para purificación del extracto	31
Columna de extracción C ₁₈	31
Acidificación del medio	31
Esterificación de ácidos grasos	32
Formación del clorhidrato	33
- Columnas de EFS narc-2, ácido carboxílico y amino	34
- Análisis por CG-EM de los eluatos utilizando columnas de EFS con adsorbente NH ₂	35
- Curva Patrón de Capsaicinoides disueltos con Metanol aplicando EFS NH ₂	36
- Recolección y preparación de muestras	37
- Determinación de humedad de muestras para cuantificación	38
- Cuantificación por UV de capsaicinoides en pericarpio y placenta de chiles secos	39
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
- Curva estándar de capsaicinoides en metanol	40
- Determinación de humedad de muestras para prueba preliminares	41
- Método de extracción con metanol	41
- Extracción con disolventes	43
Extracción con hexano-metanol	43
Extracción con Acetona-Éter de petróleo	44
- Pruebas para la columna Octadecyl (C ₁₈)	46
<i>Acidificación del medio</i>	46
<i>Esterificación de ácidos grasos</i>	48
<i>Formación del clorhidrato</i>	49
- Selección de la columna de EFS para purificación del extracto	50
- Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas	53
- Selección de la parte del chile para la cuantificación (Pb. preliminar)	59
- Determinación de humedad de 5 tipos de chiles secos	61
- Curva Patrón de Capsaicinoides en Metanol con EFS columna NH ₂	62
- Cuantificación por UV de capsaicinoides en chiles secos	64

CONCLUSIONES

72

BIBLIOGRAFÍA

74

INTRODUCCIÓN

El chile junto con el maíz y el frijol constituyen la base de la alimentación en nuestro país.¹ El chile se incluye como ingrediente en la mayoría de los platillos que contempla la gastronomía Mexicana, así como en botanas y confitería. Las principales variedades de chiles que se utilizan en la industria confitera son: el chile guajillo, el piquín, el de árbol y en menor cantidad el chipotle.

Los capsaicinoides son unos de los compuestos responsables de la pungencia de los chiles, se sabe que además de estos compuestos también están presentes compuestos fenólicos que producen pungencia², por lo que sería un error adjudicarles esta característica sólo a los capsaicinoides. Los capsaicinoides se utilizan no sólo como condimento en diferentes alimentos, sino también por sus propiedades terapéuticas como analgésicos³ en tratamientos para personas que padecen de artritis y reumatismo, cáncer en lengua o boca⁴, como estimulante de los sistemas respiratorio y cardiovascular⁵, así como en la preparación de aerosoles para defensa personal.⁶

La capsaicina y la dihidrocapsaicina son los capsaicinoides principales y son los responsables del 90% de la pungencia total que proporcionan estos compuestos, su estructura molecular se compone de un homólogo de vainillina y una fracción olefínica de un ácido graso, ambos absorben la radiación UV a longitudes de onda de 227 y 280 nm.⁷

Dentro de las escalas que se han utilizado para cuantificar la pungencia en los alimentos está la escala Scoville, implementada por Willbur Scoville, que utiliza un método organoléptico, en el cual se realiza una prueba a un panel de jueces

entrenados, se realizan varias diluciones de muestras con capsaicina hasta que ésta es imperceptible. El resultado de la dilución fue llamado el valor calórico de Scoville.⁸

Los métodos oficiales⁹ para determinar los capsaicinoides, utilizó como técnicas a la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), en este último la medición se hace utilizando detector UV.

En el departamento de Q. Analítica de la Facultad de Química se desarrolló una determinación cuantitativa de capsaicinoides utilizando espectrofotometría UV⁷ éste presentó el problema que la extracción utilizada no era específica y se extraían otros compuestos.

En este trabajo se utilizó un método por espectrofotometría UV optimizando la extracción de capsaicinoides con diversos disolventes y la posterior purificación de los extractos por extracción en fase sólida, eliminando otros compuestos presentes.

OBJETIVOS

Objetivos Generales.

- ❖ Optimizar la extracción de capsaicinoides de los chiles utilizando extracción en fase sólida.
- ❖ Cuantificar los capsaicinoides presentes en diferentes especies de chiles secos.

Objetivos Específicos:

- ❖ Determinar cuantitativamente los capsaicinoides presentes en chiles utilizando espectrofotometría UV.
- ❖ Estudiar el comportamiento de las columnas de extracción en fase sólida con diferentes adsorbentes y su aplicación en esta metodología.

ANTECEDENTES

CHILE

El nombre *Capsicum* se deriva probablemente del griego “*Kapso*” que significa “picadura” o “punzada”,¹⁰ haciendo referencia a la pungencia estimulada por el fruto.

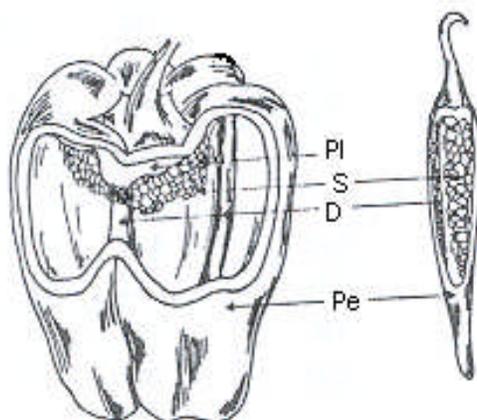
El genero *Capsicum* se clasifica por sus características morfológicas (ver Tabla 1); en la actualidad se tienen reconocidas cinco especies domesticadas que son: *C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. baccatum* y *C. pubescens*;

Tabla N. 1. Características morfológicas de las especies de *Capsicum*¹¹

Espece	Países en donde se encuentra	Características Morfológicas
<i>Capsicum annuum</i> Ej., var., <i>annuum</i> L.	México, América Central y diversos países de Europa	Flores: blancas; Pedicelo: solitario en el nodo, usualmente pendiente o erecto en algunos cultivos; Semillas: color amarillo suave.
<i>Capsicum frutescens</i> L.	India y África	Flores: amarillas a blancas; Pedicelo: largos y delgados, usualmente dos por nodo, tiesamente erectos; Semillas: color amarillo suave.
<i>Capsicum chinense</i>	Indias occidentales, norte de Sudamérica, Perú, Bolivia	Flores: blancas o blancas amarillentas; Pedicelo: corto y espeso, de tres a cinco por nodo; Semillas: amarillas con arrugas al margen.
<i>Capsicum baccatum</i> Ej., var., <i>pendulum</i>	Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia, Brasil	Flores: blancas con amarillo; Pedicelo: uno o raramente dos por nodo, pendientes o erectos; Semillas: color amarillo suave.
<i>Capsicum pubescens</i>	Bolivia, Colombia	Flores: púrpuras con blanco; Pedicelo: uno o raramente dos por nodo, pendientes o erectos; Semillas: negras, arrugadas y curvadas.

Morfología

La estructura del chile se compone de cuatro partes principalmente, como son: 1) El pericarpio que es liso y lustroso (arrugado en algunos cultivos) y cuyo color varía generalmente de rojo intenso a rojo café o naranja; algunas variedades en su etapa de madurez total presentan color verde; 2) El disipimento que son lóbulos marcados por protuberancias longitudinales y pueden tener de dos a cuatro; 3) La placenta que se encuentra en el centro y se extiende desde la base debajo del cáliz hasta el final del ápice; 4) Las semillas que son numerosas, y están pegadas a la placenta central, son amarillas (en algunos casos negras), lisas, de 1 a 5 mm con filo espeso y un micrópilo prominente y puntiagudo. (ver Figura 1)¹¹



Pe: pericarpio; D: disipimento
Pl: placenta; S: semillas

Figura N. 1. Secciones de los frutos *Capsicum*

Composición

Los componentes mayoritarios en el chile son: hidratos de carbono, proteínas y grasas; éstos aumentan rápidamente conforme el fruto madura. El contenido de fibra varía según la especie.⁷

La fructosa, junto con la glucosa, forman el 70 % de los azúcares reductores presentes. Hay una mayor cantidad de hidratos de carbono libres en las semillas que en el pericarpio o la placenta. El ácido cítrico es el ácido mayoritario, pero también se encuentran el ácido succínico, ácido fumárico y ácido málico.¹¹

El contenido de vitamina C en los chiles es de importancia nutrimental dada la cantidad en la que la contienen; sin embargo, la mayor parte de ésta se pierde durante el procesamiento de los frutos. Los frutos también son una buena fuente de los complejos A y B. El contenido de vitamina E es dependiente de la etapa de madurez y de factores genéticos, pero podría representar una característica nutrimental importante. Por otra parte, la asparagina y la prolina son los aminoácidos predominantes.¹¹

El contenido de grasa se encuentra principalmente en las semillas; los valores de grasa total varían de 9 a 16 % dependiendo del contenido de semillas de la variedad de que se trata. La composición de ácidos grasos en las muestras de chile, evidencian un alto contenido de ácido oléico, seguido de ácido linoléico, y un contenido más bajo de ácido mirístico.¹²

El contenido de cenizas es alto en el tallo; y las cenizas solubles en agua son la mayoría de las cenizas totales. El color se encuentra casi en su totalidad en el pericarpio (95 %), esto tiene especial importancia en la determinación de

capsaicinoides debido a que los métodos de extracción de capsaicinoides publicados también extraen el colorante y los ácidos grasos.¹¹

Los capsaicinoides se encuentran esencialmente en el pericarpio (el cual incluye el disipimento y la placenta, 90%), y en mucha menor cantidad en las semillas (10 %), probablemente por contaminación procedente de la placenta, como se especifica en la tabla N. 2.

Tabla N. 2. Composición promedio de frutos *Capsicum annum* L. y sus partes.¹¹

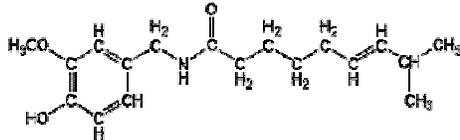
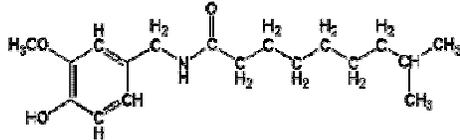
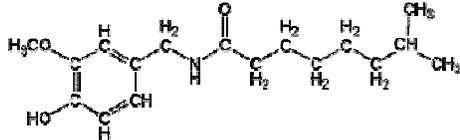
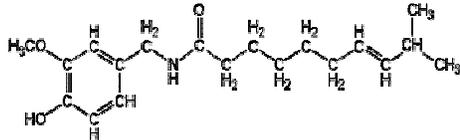
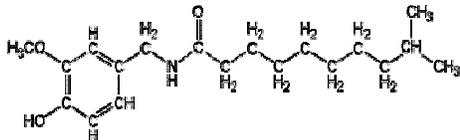
Constituyente	Entero	Pericarpio	Semilla	Tallo
Porcentaje del total	100	39.9	54.1	6.0
Humedad (%)	8.9	7.5	6.3	9.1
Extracto etéreo, total (%)	22.1	8.2	26.0	4.1
Extracto etéreo volátil (%)	0.4	0.6	0.3	0.3
Extracto etéreo no volátil (%)	21.7	7.5	25.7	8.7
Cenizas totales (%)	6.3	9.8	4.5	4.5
Cenizas solubles en agua (%)	5.7	8.6	2.5	8.8
Cenizas insolubles en ácido (%)	1.0	0.2	0.1	1.0
Proteína (N x 6.25)(%)	12.8	12.7	16.2	10.5
Fibra cruda (%)	31.8	34.9	37.2	25.0
Carbohidratos (dif.)(%)	27.0	24.3	16.1	45.9
Capsaicinoides (µg/g)	177	394	35	Trazas
Distribución de capsaicinoides (%)	100	89.2	10.2	Trazas
Color total (β-caroteno) (µg/g)	1733	3977	179	209
Distribución de colorantes (%)	100	94.6	4.9	0.5
Ácido ascórbico (mg/100g)	29	38.6	15.3	9.1
Hierro (mg/100g)	10.2	5.9	11.1	39.9
Fósforo (mg/100g)	356.6	262.8	464.1	102.1
Calcio (mg/100g)	210	200	70	1600

Capsaicinoides

El grupo de sustancias responsables de la pungencia en el chile tienen estructuras químicas muy similares y se conocen como capsaicinoides dentro del cual la capsaicina es una de las más importantes, sus estructuras se muestran en la tabla N. 3.

Los capsaicinoides pertenecen a la familia de los compuestos orgánicos llamada alquil-vainillil-amidas y son biosintetizados a partir de la L-fenilalanina y la L-valina o L-leucina hasta vainillilamina y ácidos grasos ramificados de 9-11 carbonos.¹³

Tabla N. 3. Estructura de los componentes del sabor pungente de *Capsicum*. Según Kosuge y Furuta (1970).

Componente	Estructura Química	P.M.	% del componente en la mezcla total
Capsaicina		305	48.6
Dihidrocapsaicina		307	36.0
Norhidrocapsaicina		293	7.4
Homodihidrocapsaicina		319	2.0
Homocapsaicina		316	2.0

La capsaicina es un compuesto que está formado por dos partes, la primera un homólogo de la vainillina y la segunda una fracción olefínica de un ácido graso, absorbe radiación UV a longitudes de onda de 227 y 281 nm,⁷ su peso molecular es de 305 g/mol, es soluble en metanol, etanol, acetona, cloroformo y éter e insoluble en agua y hexano.¹⁴ El contenido de capsaicina en algunas variedades de chiles varía entre 0.2 y 1%.¹⁵

En la tabla¹⁶ N. 4, se muestra el contenido de capsaicinoides en diversos tipos de chiles secos.

Tabla N. 4. Porcentaje de capsaicinoides en algunas variedades de chiles.

Variedad de Chile	% CAP's en Base Seca (gCapsaicina / 100 g_{muestra})
Pasilla	0.098
Poblano	0.200
Puya	0.250
Trompo	0.260
Árbol	0.135
Chilaca	0.537
Guajillo	0.590
Ancho	0.260
Cascabel	0.196
Mulato	0.433
Piquín	0.500
Chilpotle	0.497
Mora	0.250

Extracción en Fase Sólida (EFS)

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica de adsorción de suma importancia en el análisis cuantitativo, que consiste en separar, extraer, purificar y concentrar el analito en estudio utilizando columnas preempacadas con adsorbentes.

La extracción en fase sólida puede considerarse como una extracción líquido-sólido aunque algunos de los mecanismos que involucran la retención obedezcan a fenómenos diferentes. Existe un equilibrio entre la concentración de analito en la fase estacionaria $[A]_{fe}$ y la fase móvil $[A]_{fm}$, es decir¹⁷



Para que el analito presente en la muestra se retenga en la columna este equilibrio debe estar desplazado hacia la izquierda, mientras que para conseguir la elución del analito en cuestión el equilibrio debe desplazarse hacia la derecha.

La extracción en fase sólida se lleva a cabo en pequeñas columnas o cartuchos de plástico (polipropileno) o vidrio. Estas columnas se rellenan con cantidades variables de distintos materiales similares a los empleados para el relleno de las columnas de HPLC, de mayor granulometría y con una pequeña distribución de tamaños de partícula. Los materiales que se emplean para el relleno comprenden desde adsorbentes muy polares como la sílica, hasta muy poco polares como la sílica unida a los grupos C_{18} , pasando también por materiales de intercambio iónico, pudiendo tratarse de fases enlazadas a la sílice o a polímeros como estireno-divinilbenceno.

Los materiales de relleno más comunes se presentan en la tabla¹⁷ número 5.

Tabla No. 5. Diferentes tipos de adsorbentes para las columnas de EFS.

Tipo de Relleno		Características
Diamino *	$-(\text{CH}_2)_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	Intercambiador aniónico débil
Amonio cuaternario *	$-(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$	Intercambiador aniónico fuerte
Ácido carboxílico *	$-(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	Intercambiador catiónico débil
Ácido sulfónico *	$-\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{OH}$	Intercambiador catiónico fuerte
Alúmina	Al_2O_3	adsorbente polar
Florisil®	Mg_2O_3	adsorbente polar
Silica gel	SiO_2	adsorbente polar
Tierra de diatomea		adsorbente polar
Ciano *	$-(\text{CH}_2)_3\text{CN}$	adsorbente de polaridad media
Amino *	$-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	adsorbente de polaridad media
Fenilo *	$-\text{C}_6\text{H}_5$	adsorbente no polar
Octilo *	$-\text{C}_8\text{H}_{17}$	adsorbente no polar
Octadecil *	$-\text{C}_{18}\text{H}_{35}$	adsorbente no polar

* fases ligadas

Los mecanismos de separación ocurren por interacciones intermoleculares entre las moléculas del analito y los grupos funcionales del adsorbente, estas fuerzas son iónicas, enlaces de hidrógeno (puentes), dipolo – dipolo, dipolo inducido, fuerzas de dispersión (dipolo – dipolo inducido).

Un adsorbente muy utilizado es el Octadecyl C_{18} , es el adsorbente de menor polaridad disponible y el más adecuado de todos los adsorbentes para aislar con un mecanismo de fase inversa que es cuando la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es relativamente polar, por lo tanto, los componentes más polares salen primero de la columna, y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución.. Los compuestos extremadamente no polares son difíciles de eluir del C_{18} , este adsorbente no retiene moléculas muy polares como los hidratos de carbono. Es considerado el adsorbente menos selectivo y no retiene nada de matrices acuosas. El adsorbente C_{18} es excelente para desalinizar matrices porque las sales pasan a través del adsorbente sin ser retenidas.

Otro mecanismo de separación es por medio de la cromatografía en fase normal, ésta se puede dar con adsorbentes polares o por enlaces de diferentes compuestos con el adsorbente polar de la columna. Los adsorbentes que se utilizan son: Sílica Gel (SiO_2), Kieselguhr ($SiOn$), Florisil® (Mg_2O_3) y Alumina (Al_2O_3); los adsorbentes de las fases ligadas son: Ciano (CN), Diol (COHCOH) y Amino (NH_2).¹⁸

La columna de extracción en fase sólida con adsorbente amino (NH_2) es comúnmente usada en modo de fase normal para la separación de lípidos (ácidos grasos y colesterol)¹⁹ esta columna se puede comportar como una columna de intercambio iónico en la que el adsorbente se cataloga como un anión de intercambio. En este caso el analito ionizado es extraído de la solución y se queda en el adsorbente, que tiene carga opuesta.

La función de esta columna como fase normal sirve para extraer analitos que son polares hasta analitos de polaridad moderada, se acondiciona con un solvente polar que puede ser en el que la muestra ésta disuelta.

Las fases ligadas usadas en fase normal se forman cuando están presentes grupos R como ciano, amino o diol contenidos en una cama de sílica gel; el analito disuelto en un solvente polar de bajo peso molecular, como es el metanol, se pasa a través de la columna previamente acondicionada con el mismo solvente.

Las técnicas de purificación del analito tienen tres modos de uso, los cuales son: limpieza de la muestra, concentración de la muestra y remoción de la matriz.

La purificación requerida depende de la especificidad del método de detección y la presencia de interferencias potenciales en la matriz de la muestra.

En el modo de remoción de la matriz el rol del adsorbente es inverso al de las otras dos técnicas de purificación, ya que las impurezas son retenidas en éste y el analito pasa libremente a través de la columna.

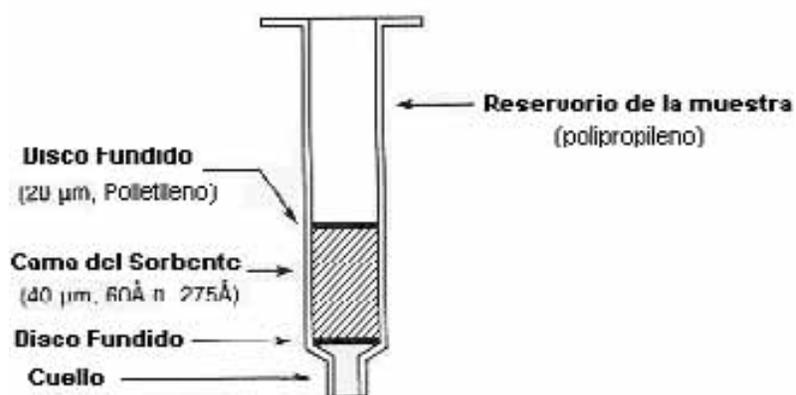


Figura 2. Columna de Extracción en Fase Sólida¹⁸

La figura 2 muestra la estructura de una columna desechable preempacada con una fase sólida de adsorbente. Estas columnas de polipropileno están empacadas con 100, 200, 500 y 1000 mg de adsorbente NH_2 colocado en sílica gel.¹⁸ La capacidad de muestra de las columnas es de 1, 3 ó 6 mL.

A la cantidad total de compuestos (analitos e interferencias) que pueden ser retenidos de la matriz de una muestra específica por la masa definida de adsorbente se le llama capacidad de columna. La capacidad de columna ha sido estimada de 10 – 20 mg de analito/cartucho.²⁰ En análisis ambientales, farmacéuticos y en alimentos se ha estimado una capacidad de 3 – 12 mg,¹⁸ la capacidad de la columna es específica para cada analito.

En la figura 3 se muestra los pasos para usar las columnas de extracción en fase sólida:¹⁸

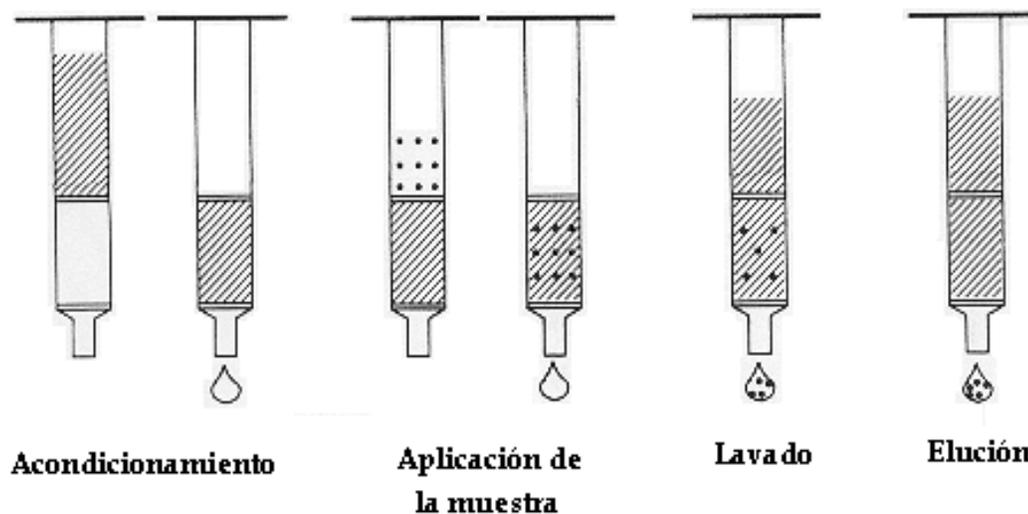


Figura N. 3. Pasos para el uso de columnas de extracción en fase sólida.

Acondicionamiento. Esta operación tiene por objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna. Los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran totalmente activados. El primer paso, se utiliza además para eliminar cualquier impureza que este presente.

Aplicación de la muestra. La muestra se aplica en la columna utilizando un caudal determinado (comúnmente de 1 a 10 mL/min.), este paso debe efectuarse lentamente porque caudales demasiado rápidos a través de la columna pueden producir efectos cinéticos en el material de relleno lo que conduce a bajas recuperaciones de analito. Esta operación se puede efectuar por aplicación directa de la solución a inyectar de manera tal que se logre la elución del analito y la retención de impurezas cuyo comportamiento sea muy afín a la columna.

Lavado. Al retener el analito que se quiere cuantificar en la columna se debe lavar de preferencia con el disolvente en el que tenemos a la muestra, para eliminar las posibles impurezas que se quedaron en la columna. El volumen de lavado va a estar determinado por la naturaleza de la muestra con la que se este trabajando.

Elución. En esta parte se busca retener el analito en estudio y dejar pasar las impurezas. Dependiendo del diseño de las columnas y de las necesidades del usuario, el solvente a pasar puede impulsarse con la ayuda de una jeringa o aspirarse con vacío (Manifold). Es importante mencionar que durante la operación de aplicación de la muestra y en los sucesivos de solvente, lavado y elución, las columnas deben mantenerse húmedas y no dejar que se sequen para obtener una buena recuperación del analito.

Espectroscopia UV

La espectroscopia de absorción molecular en la región UV abarca de 180-380 nm²¹ en el espectro electromagnético; tiene su principal aplicación en el análisis cuantitativo de sistemas orgánicos, inorgánicos y bioquímicos; su sensibilidad razonable, sus límites de detección son alrededor de 10⁻⁵ M; su selectividad moderada a alta; su exactitud y precisión, así como su rapidez la hacen una técnica de gran aplicación en la química analítica.

Muchos componentes orgánicos absorben radiación directamente en la región UV, esta absorción se debe a dos tipos de electrones: a) los electrones compartidos por varios átomos y que participan directamente en los enlaces, y b) los electrones no compartidos que se localizan principalmente en los átomos de oxígeno, halogenuros, azufre y nitrógeno.²² La longitud de onda a la que absorbe una molécula orgánica depende de la fuerza de unión de los enlaces. Los que se comparten en enlaces sencillos como carbono-carbono o carbono-hidrógeno, están unidos con tal fuerza que sólo es posible la absorción con fotones más energéticos que los UV de la parte media. Los electrones que participan en dobles y triples enlaces están débilmente unidos, por lo que es fácil excitarlos; esto justifica el porque las especies con enlaces insaturados absorben en la región UV medio. Los grupos funcionales orgánicos insaturados que absorben en la región UV y visible se conocen como cromóforos.²²

Podemos reconocer tres tipos de transiciones electrónicas que incluyen (1) electrones *p*, *s* y *n*, (2) electrones *d* y *f*, (3) electrones de transferencia de carga, las de mayor importancia en el estudio de las moléculas orgánicas son las primeras, que es en las que nos enfocaremos.

Los electrones que contribuyen a la absorción por una molécula orgánica son: (1) aquellos que participan directamente en la formación del enlace entre átomos y, por tanto se asocian con más de un átomo; (2) electrones no enlazantes o electrones que no participan en ningún enlace que están en gran parte localizados alrededor de átomos como oxígeno, halógenos, azufre y nitrógeno.

Las zonas no localizadas entre los átomos que están ocupadas por los electrones enlazantes se llaman orbitales moleculares y pueden considerarse como el resultado del solapamiento de los orbitales atómicos. Cuando se combinan dos orbitales atómicos se origina un orbital molecular enlazante de baja energía y un orbital molecular antienlazante de alta energía.

Los orbitales moleculares asociados con los enlaces sencillos, en las moléculas orgánicas, se designan como orbitales sigma (s), y los electrones correspondientes son electrones s .

El doble enlace en una molécula orgánica contiene dos tipos de orbitales moleculares: un orbital sigma (s) correspondiente a un par de electrones enlazantes y un orbital molecular pi (p) asociado con el otro par. Los orbitales pi se forman por el solapamiento paralelo de orbitales p atómicos.

Las transiciones electrónicas posibles entre los distintos niveles de energía son cuatro: $s \rightarrow s^*$, $n \rightarrow s^*$, $n \rightarrow p^*$ y $p \rightarrow p^*$.

Transiciones $s \rightarrow s^*$. En este caso, un electrón de un orbital s enlazante de una molécula se excita al correspondiente orbital antienlazante mediante la absorción de radiación, por lo que se dice que la molécula se encuentra en un estado excitado s , s^* , la energía requerida para que tenga lugar esta transición es grande;

los máximos de absorción debidos a estas transiciones nunca se observan en la región ultravioleta comúnmente accesible.

Transiciones $n \rightarrow s^*$. Los compuestos saturados que contienen pares de electrones no compartidos son los que sufren estas transiciones, requieren menos energía que las de tipo $s \rightarrow s^*$. Los máximos de absorción para estas transiciones tienden a desplazarse hacia longitudes de onda más cortas en presencia de disolventes polares. El número de grupos funcionales orgánicos con picos en la región ultravioleta de fácil detección es relativamente pequeño.

Transiciones $n \rightarrow p^*$ y $p \rightarrow p^*$. La mayoría de de las aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos se basan en estas transiciones porque la energía requerida para estos procesos produce picos de absorción dentro de una región espectral experimentalmente accesible (200 a 700 nm). Ambas transiciones requieren la presencia de grupos funcionales insaturados que aportan los electrones p, a estos centros absorbentes no saturados se les aplica el término de cromóforos.

Las absortividades molares para los picos asociados con la excitación al estado n , p^* son, generalmente bajas y normalmente se encuentran entre 10 y 100 L / mol cm; por otra parte los valores para las transiciones $p \rightarrow p^*$ normalmente oscilan entre 1,000 y 10,000. Los picos asociados con transiciones $n \rightarrow p^*$ generalmente se desplazan hacia longitudes de onda más cortas cuando aumenta la polaridad del disolvente. Normalmente, aunque no siempre, se observa la tendencia opuesta en las transiciones $p \rightarrow p^*$, este efecto surge, aparentemente, de una mayor solvatación del par de electrones no enlazantes que disminuye la energía del orbital n .²²

Fundamentos

Ley de Lambert-Beer.

La absorción de la radiación UV por la materia tiene aplicaciones cualitativas, debido a que cada cromóforo presenta una absorción máxima a una longitud de onda característica; y cuantitativas, que se fundamentan en que si el número de moléculas que sufren una transición electrónica es grande, la cantidad de energía absorbida será grande y dará como resultado en el espectro de UV una banda intensa, en el caso de que el número de moléculas que sufren transición electrónica sea menor la cantidad de energía absorbida es pequeña y dará una banda de poca intensidad. Esta información es el fundamento de la Ley de Lambert y Beer: La fracción de radiación absorbida por un medio, es proporcional al número de átomos, iones o moléculas absorbentes a través de las cuales pasa.²¹

La intensidad de absorción además de la concentración depende de dos factores: la probabilidad de interacción entre la energía de radiación y el orbital molecular y la diferencia entre el estado basal y el estado excitado.

Cuando se mantiene constante la longitud de onda de la radiación incidente y se aumenta la concentración del analito, la absorbancia deberá incrementarse proporcionalmente con la concentración, por lo que si se gráfica la concentración en función de la absorbancia se obtiene una línea recta y la pendiente de ésta es el coeficiente de absorptividad medido a la longitud de onda en la que se mide la absorbancia. Esta gráfica se conoce como curva de calibración o curva patrón y es el principio de las aplicaciones cuantitativas de la espectroscopia UV.²³

La expresión matemática de la ley de Lambert-Beer²¹ es:

$$A = (\varepsilon)(C)(l)$$

A = absorbancia

ε = coeficiente de absortividad molar

C = concentración

l = longitud de la celda

Instrumentación UV/VIS

Los instrumentos para medir la absorción de la radiación UV y Visible están constituidos principalmente por tres partes, las cuales son: la fuente de radiación UV, un sistema óptico que permite dirigir la radiación a la muestra y un detector de la radiación.

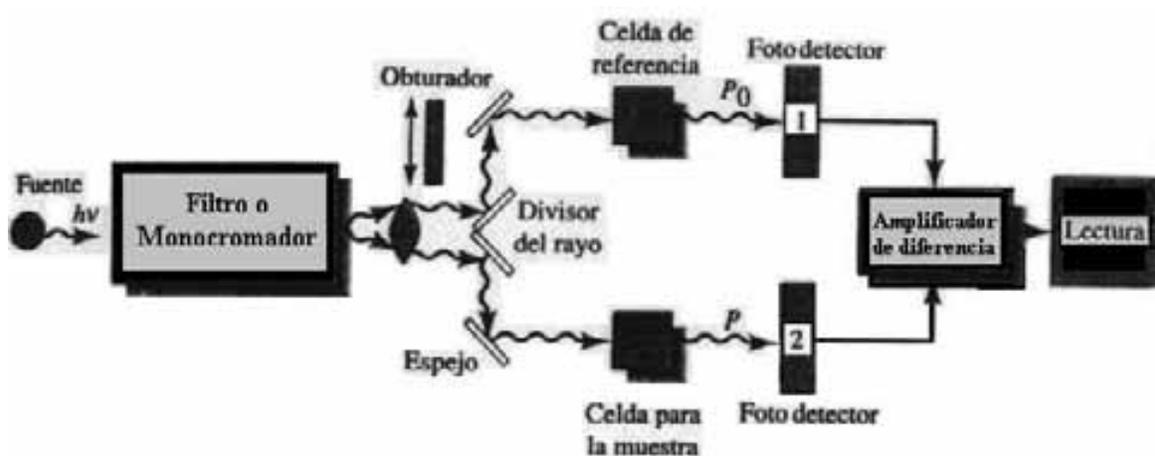


Figura 4. Diagrama de un instrumento de doble haz²¹

La fuente debe generar un haz de radiación cuya emisión deberá ser estable durante periodos de tiempo razonables. Entre ellas se encuentran principalmente las lámparas de Tungsteno y Deuterio.²¹

El sistema óptico está constituido por celdas, lentes, espejos, ventanas y elementos que se encargan de seleccionar la longitud de onda de trabajo; el objetivo de estos elementos es el de dirigir la radiación hacia la muestra, en la región de la longitud de onda que se elija y monocromatizarla.⁷

Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, en los que uno de los haces pasa por la celda para la muestra y el otro por la celda de referencia, para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados.

Los detectores de absorción UV más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. Las fuentes de deuterio o de filamento de Wolframio con filtros de interferencia también proporcionan una forma sencilla de detectar las especies absorbentes de la celda. Los detectores espectrofotométricos de UV más potentes son los instrumentos de diodos en serie.

CAPÍTULO I: EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAS PRIMAS

Equipos

Espectrofotómetro Unicam UV Thermo Spectronic, acoplado al Software Vision 32.

Balanza analítica Sartorius BP2105 de 210 g y sensibilidad de 0.1 mg.

Parrilla eléctrica Fisher Scientific.

Agitador magnético.

Estufa.

Columnas de extracción en fase sólida J.T. Baker® Bakerbond spe™ con adsorbentes:

Octadecyl (C₁₈).

Amino (NH₂).

Ácido carboxílico (COOH).

Narc-2.

Manifold J. T. Baker.

Reactivos

Estándar de Capsaicina (65 % capsaicina, 35 % dihidrocapsaicina) Sigma – Aldrich.

Metanol grado analítico J. T. Baker.

Carbón vegetal activado.

Ácido sulfúrico 4N.

Diclorometano.

Hidróxido de potasio al 5 % en metanol.

Ácido clorhídrico al 10 % en metanol.

Trifluoruro de boro.

Hexano.

Bicarbonato de sodio al 4.5 % en agua.

Sulfato de sodio anhidro.

Dietil éter.

Materias Primas

Chiles secos:

Chile guajillo.

Chile Chipotle.

Chile Pasilla.

Chile Mulato.

Chile de Árbol.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

Espectrofotometría UV de capsaicinoides estándar

Registro de espectros

El estándar que se empleó es una mezcla de capsaicinoides sintéticos (65% de capsaicina y 35% dihidrocapsaicina) de SIGMA-Aldrich, se utilizó como disolvente el metanol, 10 mg de capsaicinoides se disuelven en 10 ml de metanol.

Los capsaicinoides absorben al UV presentando dos lambdas máximas de absorción.

El metanol no absorbe a estas lambdas máximas, a continuación se muestran los espectros en la figura N. 5.

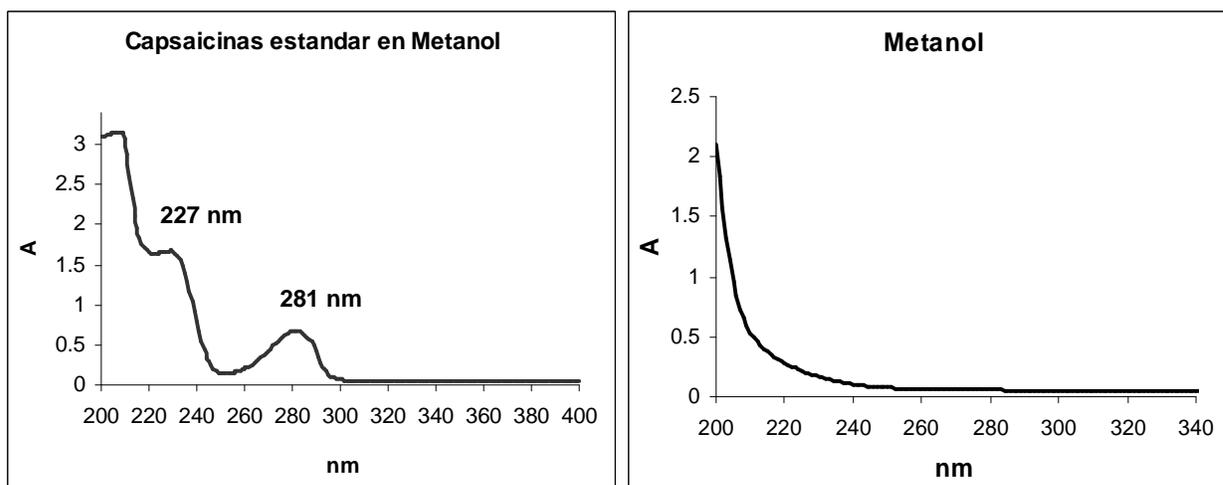


Figura N. 5. Espectros UV del estándar de capsaicinoides y del disolvente.

Se observan las lambdas máximas de absorción del estándar a 227 nm y 281 nm.

Curva Patrón de Capsaicinoides estándar en metanol

Se prepararon las disoluciones correspondientes para obtener cinco puntos en la gráfica, dentro del intervalo lineal que den lecturas aproximadas de 0.2-1.2 unidades de absorbancia, y se leyeron en el espectrofotómetro de UV a 281 nm.

Para la preparación de la curva de calibración se pesaron 3.8 mg del estándar de capsaicinoides, se disolvieron en metanol y se llevaron a 25 mL. De esta solución madre ($C = 0.152 \text{ mg/mL}$) se tomaron 1, 2, 4, 5 y 7 mL, se colocaron cada uno en un matraz y se aforaron a 10 mL. Las concentraciones de la curva de calibración y los resultados al UV se muestran en la tabla N. 6.

Tabla N. 6. Concentraciones de los puntos de curva de calibración.

Matraz	V _{sol. madre}	Aforo (mL)	C _{mg/mL}
1	1	10	0.0228
2	2	10	0.0380
3	4	10	0.0608
4	5	10	0.0836
5	7	10	0.1064

El gráfico y la regresión lineal se muestran en el capítulo de resultados (Ver pág. 39).

Recolección de muestras de dos variedades de chile (chile guajillo y chile chipotle) para pruebas preliminares

Las muestras son chile guajillo y chile chipotle, a granel (muestras A) y de marca (muestras B), los datos se muestran a continuación:

Muestras A, se compraron en el interior del mercado de Azcapotzalco, en el local 308, entrada 3, calle: López Rayón Sur, Azcapotzalco, Centro. Descripción de la muestra: son chiles secos, enteros, envasados en bolsa de plástico, sin número de lote, al momento de la compra se tenían a la intemperie.

Muestras B, se compraron en la tienda de autoservicio Comercial Mexicana, ubicada en Plaza Azcapotzalco; la marca adquirida fue San Lázaro, con número de lote LB1AE, y presentación de 100 g.

De estas muestras se prepararon tres tipos de sub-muestras secas de cada chile:

- a) Chiles secos enteros molidos.
- b) Pericarpios y placentas molidas
- c) Semillas molidas.

Determinación de humedad de muestras para pruebas preliminares

El secado es la pérdida de peso que sufre un material cuando se calienta a una temperatura cercana a la de ebullición del agua durante un tiempo determinado o hasta que dos pesadas sucesivas no difieran. El tiempo y la temperatura varían dependiendo del tipo de alimento y del tamaño de partícula. El residuo obtenido de este proceso de secado se denomina sólidos totales.

La técnica indica pesar de 1 a 10 g en un pesafiltro a peso constante, y secar durante 3 horas en la estufa a $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}^{24}$.

La fórmula que se utilizó para el cálculo fue la siguiente:

$$\% \textit{Humedad} = \frac{[(P_{\textit{muestra}} + P_{\textit{pesafiltro}}) - (P_{\textit{muestra seca}} + P_{\textit{pesafiltro}})]}{P_{\textit{muestra}}}$$

Cabe señalar que la determinación de humedad se realizó con el fin de eliminar agua de la muestra para evitar cualquier posible interferencia en la cuantificación, y no como un factor determinante en este trabajo. Por lo que, no se tomó en cuenta para la cuantificación.

Los datos de la humedad en las muestras utilizadas se reportan en el capítulo de resultados (Ver pág. 39).

Extracción de los capsaicinoides con disolventes en chiles secos

La extracción que se lleva a cabo es sólido – líquido y se define como el retiro de un analito soluble en un solvente de una matriz sólida permeable e insoluble en éste.

Extracción con Metanol.

Esta metodología se realizó con la finalidad de extraer a los capsaicinoides de la muestra del chile, se sabe por la literatura que por este método se extrae, además, la fracción grasa, por lo que se requerirá una purificación posterior

La metodología de extracción publicada⁷ es la siguiente:

Pesar 1 gramo de muestra y colocarlo en un matraz Erlenmeyer, agregar 25 mL de metanol y agitar durante 15 minutos (durante este tiempo se mantiene tapado con un vidrio de reloj), se eliminan los compuestos coloridos presentes en el extracto agregándole 0.25 g de carbón activado manteniendo la agitación por 2 minutos. Se filtra obteniendo un filtrado de color naranja pálido, se toma 1 mL y se afora a 10 mL.

Los espectros se muestran en la pagina 40

Extracción con Hexano – Metanol

Esta metodología se realizó con la finalidad de solubilizar a los capsaicinoides en un disolvente (metanol) y a los ácidos grasos presentes en el otro (hexano), se decidió usar esta metodología apoyándonos en la literatura, ya que la capsaicina no es soluble en hexano y los ácidos grasos si¹¹, la metodología es la siguiente:

Pesar 1 g de muestra, colocarlo en un vaso de precipitados de 100 mL y agregar 25 mL de hexano, agitar por 10 minutos, filtrar, secar la muestra para eliminarlo. A la muestra desengrasada agregarle 25 mL de metanol y agitar por 15 minutos, filtrar, tomar 1 mL y llevarlo a 10 mL, leer al UV.

Los espectros se muestran en la página 41

Extracción con Acetona y Éter de petróleo

Con esta metodología se busca eliminar la fracción grasa del extracto. La metodología se tomo de un artículo²⁵ en el cual se realiza una extracción con una mezcla de disolventes como son acetona y éter de petróleo (1:1). La metodología usada es la siguiente:

Pesar 10 g de muestra en un matraz, homogenizar con 25 mL de acetona y 25 mL de éter de petróleo agitar durante 10 minutos, filtrar y lavar con 25 mL de agua, colocar el filtrado en un embudo de separación y eliminar la fase acuosa, adicionar sulfato de sodio anhidro a la fase etérea, eliminar el sulfato de sodio, evaporar la fase etérea hasta concentrar, leer al UV a 281 nm.

Los espectros se muestran en las páginas 42 y 43.

Selección de la parte del chile para la cuantificación

Se trabajó el método de extracción elegido (Pág. 25), de las muestras de chile se prepararon tres sub-muestras de chile entero, semillas, y pericarpio y placenta de dos variedades guajillo y chipotle; de cada sub-muestra se realizó la cuantificación por triplicado y se tomó el promedio como valor comparativo para seleccionar la parte del chile más adecuada para la realización de este trabajo.

Los espectros se muestran en el capítulo de resultados (Pág. 54).

Purificación del extracto utilizando Extracción en Fase Sólida

Los cartuchos de extracción en fase sólida utilizados en este trabajo fueron columnas de extracción de: octadecil C₁₈, narc-2 (patente J. T. Baker®), ácido carboxílico (COOH) y amino (NH₂), del modelo Bakerbond spe* de la marca J.T. Baker.

Para utilizar las columnas de extracción se debe seguir el siguiente procedimiento²⁰.

1. Acondicionar las columnas con un disolvente adecuado para solvatar los grupos funcionales del sorbente, aproximadamente 10 minutos.
2. Aplicar la muestra a la columna: La muestra obtenida de la extracción se pone en contacto con el sorbente colocándola dentro de la columna.
3. La muestra se aspira a través de la columna: el extracto es obligado a pasar a través del sorbente de la columna por presión positiva (con una jeringa) o presión negativa a vacío (con un Manifold).

Las muestras que se probaron son: disolución de capsaicinoides estándar, disolución de ácido linoléico estándar y una mezcla de los dos estándares.

Selección de la columna de EFS para la purificación del extracto

La selección de la columna se hizo con el fin de purificar el extracto obtenido debido a que junto con los capsaicinoides se extrae la fracción grasa, ésta causa interferencia en la cuantificación.

Columna de extracción C₁₈

Descripción: Columna empacada con fase inversa puede retener compuestos no polares o de polaridad moderada, los analitos son extraídos de soluciones polares. Al aplicar los extractos a esta columna de acuerdo al procedimiento descrito y registrar los espectros de UV de los eluatos se evidencia la presencia de capsaicinoides y ácidos grasos, por lo que el C₁₈ no es un sorbente adecuado.

Para mejorar su acción de limpieza se realizaron las siguientes experiencias:

Acidificación del medio

La acidificación del medio se realizó con el fin de modificar la polaridad del eluyente y lograr que se retengan en el adsorbente de la columna, buscando la retención de la capsaicina o los ácidos grasos en la columna de extracción en fase sólida C₁₈.

El ensayo consistió en cambiar el pH del estándar en metanol, que en un principio era de 7.5, para esto se tomaron dos muestras y se agregó H₂SO₄, los valores de pH obtenidos fueron, uno de 0.7 y otro de 1.1. Al registrar el espectro de UV se corroboró que aún cambiando la polaridad del eluyente, el adsorbente de la columna no presenta afinidad ni por los capsaicinoides, ni por los ácidos grasos (Ver pág. 44).

Esterificación de ácidos grasos

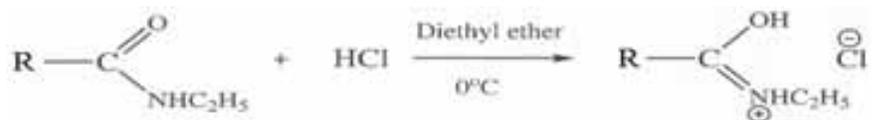
La esterificación se efectuó con el fin de cambiar la polaridad de los ácidos grasos formando ésteres, para que se retengan en la columna C₁₈. La técnica²⁴ se describe a continuación:

Disolver 50 mg de estándar de ácido graso en 10 mL de diclorometano, tomar 1 mL de esta disolución y evaporar con nitrógeno en baño de agua tibia, agregar 2 mL de KOH al 5% en metanol y agitar hasta disolver, calentar a 80 °C por 1 h agitando cada 15 minutos; agregar 2 mL de HCl al 10 % en metanol, 10 µL de BF₃ y calentar a 80 °C por 1 h; adicionar 2 mL de H₂O y 2 mL de hexano, extraer el hexano y agregar otros 2 mL de hexano, extraer el hexano y juntar los 4 mL de hexano, agregar 2 mL de bicarbonato de sodio al 4 % en agua, separar y colocar la fase orgánica en un matraz de 5 mL y aforar con hexano, secar con sulfato de sodio anhidro, separar por decantación el sulfato; guardar la muestra en un lugar seco y tapada.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos no se retuvieron en la columna C₁₈, además de que la parte esterificada presenta absorción de radiación UV en una zona muy amplia e interfiere en la cuantificación de los capsaicinoides, por lo que esta técnica no fue funcional para este trabajo (Ver pág. 45).

Formación del Clorhidrato

Se realizó la formación del clorhidrato de capsaicina con el fin de cambiar la polaridad del eluyente y observar su comportamiento en la columna. La reacción²⁶ que se lleva a cabo es la siguiente:



La metodología²⁶ consiste en: pesar 3.5 mg del estándar de capsaicoides llevar a 25 mL (C = 0.14 mg/mL) con dietiléter, agregar igual volumen de HCl concentrado y bajar la temperatura a 0 °C para obtener el clorhidrato, posteriormente se pasa ésta solución por la columna C₁₈ y se registra el espectro al UV.

Al realizar esta metodología se encontró que había dos fases en el medio de reacción, por lo que se decidió pasar cada una por la columna y leer al UV.

Los ensayos anteriores determinan que el uso de la columna de extracción en fase sólida C₁₈ no es la adecuada para los fines que se proponen en este trabajo.

Los resultados se muestran en la página 46.

Columnas de EFS narc-2 (patente J. T. Baker®), ácido carboxílico (COOH) y amino (NH₂)

La columna narc-2® contiene un adsorbente con propiedades hidrofóbicas y de intercambio iónico.

La columna ácido carboxílico (COOH) es una columna de intercambio iónico ácido carboxílico pegado sobre una cama de sílica gel.

La columna amino (NH₂) es una columna empacada con fase polar de amino propilsilano (NH₂) pegado sobre una cama de sílica gel, puede actuar como una columna de intercambio iónico.

Todas las columnas se probaron con una disolución de concentraciones de los capsaicinoides y ácido linoléico (uno de los de mayor concentración en la composición del chile) aproximada a la que contiene el chile. Las columnas se acondicionaron con 5 mL de metanol por 15 minutos, se pasa la muestra a través de cada una de las columnas para saber su comportamiento. A los eluatos se les registra el espectro de UV.

Los ensayos anteriores determinan que se llevo a cabo la purificación del extracto en la columna de EFS amino, reteniendo la fracción grasa y dejando pasar los capsaicinoides para su cuantificación (Ver pág. 47-48).

Análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-EM) de los eluatos utilizando columnas de EFS con adsorbente NH₂

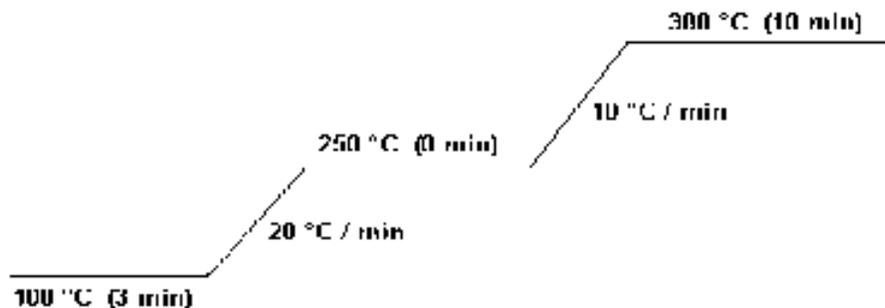
Para corroborar la separación de la capsaicina de la fracción grasa por medio del cartucho con adsorbente amino se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Se prepararon tres muestras:

1. Muestra de estándar de capsaicinoides en metanol (0.062 mg/mL).
2. Muestra de la mezcla de estándar de capsaicinoides con estándar de ácido linoléico en metanol (5.25 mg/mL).
3. Muestra de la mezcla de estándares en metanol pasada por el cartucho de extracción en fase sólida NH₂.

Las condiciones en las que se trabajaron las muestras son:

Temperatura del inyector = 300 °C



La cromatografía (CG-EM) realizada es para confirmar la efectividad del cartucho.

(Ver pág. 49 a 54).

Curva Patrón de Capsaicinoides disueltos con Metanol aplicando EFS NH₂

La curva patrón se realizó así debido a las condiciones en las que se trabajó la muestra, de tal manera que se corrigió de la anterior en la cual no se utiliza la extracción en fase sólida.

El estándar que se utilizó es la capsaicina sintética de SIGMA-Aldrich, como disolvente se usa metanol. Se preparó una curva patrón de forma que se tuvieran cinco puntos en la gráfica, dentro del intervalo que dieran lecturas aproximadas de 0.2-1.2 unidades de absorbancia, cada una de ellas se pasó a través de la columna de extracción en fase sólida con adsorbente amino y se leyeron en el espectrofotómetro UV en un intervalo de 200 a 400 nm ya que la capsaicina tiene su lambda máxima de absorción a 281 nm a la cual se realizó el gráfico.

Para la preparación de la curva de calibración se pesaron 3.7 mg del estándar de capsaicinoides, se disolvió en metanol y se llevó a 25 mL. De esta solución madre (0.148 mg/mL) se tomaron alícuotas de 1, 3, 4, 5 y 7 mL, se colocaron cada uno en un matraz y se aforó a 10 mL, se pasó cada dilución por la columna de EFS con adsorbente NH₂ previamente acondicionada con metanol. Los datos de la curva de calibración se muestran en la página 59.

Recolección y preparación de muestras

Las variedades con las que se realizó la extracción son chile guajillo, chile chipotle, chile pasilla, chile mulato y chile de árbol.

Las muestras se adquirieron en diferentes tiendas de autoservicio del Distrito Federal. Éstas vienen envasadas en una bolsa de plástico de color transparente y con la marca del producto en la carátula, se aprecia el chile seco y entero. Los datos de las muestras se presentan a continuación:

CHILE CHIPOTLE

Marca	La Merced
Razón Social	Empacadora La Merced, S.A. de C.V.
Dirección	Fraccionamiento Industrial Esfuerzo Nacional, Ecatepec, Edo. Méx., C.P. 55320, Tel. 5788-2088
Gramaje	100 g
Origen	Producto de México
Lote	10
Caducidad	Enero 2006

CHILE DE ÁRBOL

Marca	Chiles Secos
Razón Social	Distribuidora MYDAC, S.A. de C.V.
Dirección	Central de Abastos, Zona V, sector 7, nave 4, bodega U-169. Col. Iztapalapa, C.P. 09040, México, D.F.
Gramaje	100 g
Origen	Producto de México
Lote	07
Caducidad	Diciembre 2007

CHILE GUAJILLO

Marca	Chiles Secos
Razón Social	Distribuidora MYDAC, S.A. de C.V.
Dirección	Central de Abastos, Zona V, sector 7, nave 4, bodega U-169. Col. Iztapalapa, C.P. 09040, México, D.F.
Gramaje	200 g
Origen	Producto de México
Lote	11
Caducidad	Mayo 2007

CHILE MULATO

Marca	Chiles Secos
Razón Social	Distribuidora MYDAC, S.A. de C.V.
Dirección	Central de Abastos, Zona V, sector 7, nave 4, bodega U-169. Col. Iztapalapa, C.P. 09040, México, D.F.
Gramaje	200 g
Origen	Producto de México
Lote	002
Caducidad	Diciembre 2007

CHILE PASILLA

Marca	San Lázaro
Razón Social	DIAGRANS, S.A.
Dirección	Enrique Durant N. 20, Col. El Partidor, Cuautitlán, Edo Méx., C.P. 54879, Tel. 5899-7100.
Gramaje	100 g
Origen	Producto de Perú
Lote	07
Caducidad	Diciembre 2007

Determinación de humedad de muestras para cuantificación

Las muestras de los cinco tipos de chiles se prepararon de la siguiente manera: se abrieron los chiles con tijeras, se eliminaron las semillas de todas las muestras, sólo se tomó el pericarpio y la placenta y se metieron a un procesador de alimentos para reducir el tamaño de partícula y se metieron a la estufa a 103 ± 2 °C por un lapso de 3 horas. Se tomó la lectura de peso a las 2 ½ horas, después cada 15 minutos, cuando se completaron las 3 horas se mantuvo a peso constante. Los datos de la humedad de estas muestras y el gráfico se observan en el capítulo de resultados (Ver pág. 55).

Las muestras secas se extrajeron se trabajan de acuerdo a la siguiente metodología:

Se pesó aproximadamente 1 gramo de muestra y se colocó en un matraz Erlenmeyer, agregar 25 mL de metanol agitar durante 15 minutos (durante este tiempo se mantiene tapado con un vidrio de reloj). Se filtró, se tomó una alícuota de 1 mL y se aforo a 10 mL, se colocó la columna de EFS Amino (NH_2) en el Manifold, se acondicionó con metanol por 15 minutos, se desecho el metanol (es importante no dejar que seque), se agrego una parte del extracto a la columna aproximadamente un mililitro y se desechó; el extracto se pasa nuevamente por la columna y se recibe en un matraz Erlenmeyer de 25 mL limpió y seco.

Las muestras así trabajadas se destinan a la cuantificación.

Cuantificación por UV de capsaicinoides en pericarpio y placenta de chiles secos

Se realizo la cuantificación de los capsaicinoides presentes en la placenta y pericarpio de los diferentes tipos de chiles con los que se trabajo, se tomaron tres muestras de aproximadamente 1 gramo cada una, se realizo la extracción y la purificación con EFS, de aquí se tomó 1 mL del extracto y se leyó al UV, al final se tomaron las absorbancias para calcular el porcentaje de capsaicinoides presentes en la muestras y se promediaron.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva estándar de capsaicinoides en metanol

Las gráficas representan los espectros y la curva patrón.

Tabla N. 7. Datos para la curva de calibración.

C (mg/mL)	A (281 nm)
0.0228	0.2629
0.0380	0.3924
0.0608	0.6021
0.0836	0.7962
0.1064	1.0045

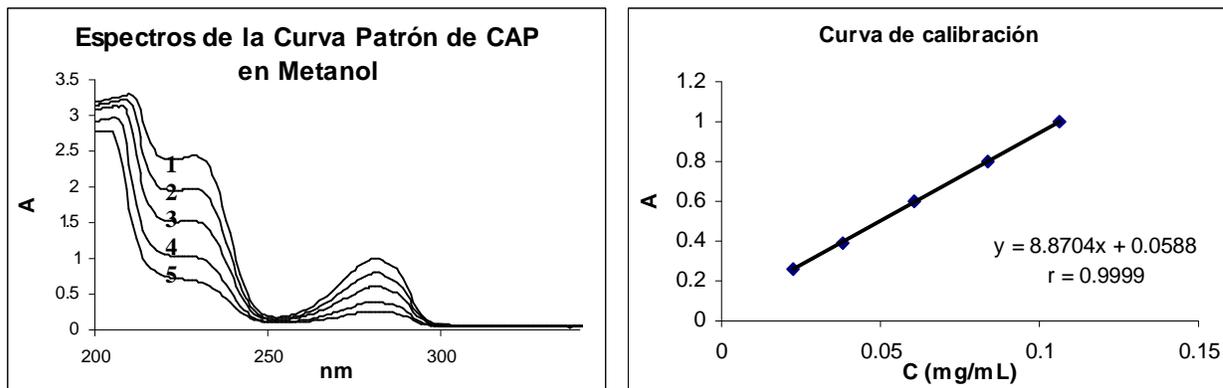


Figura N. 6. Representación grafica de los espectros al UV de la curva patrón y regresión lineal de la misma.

Longitud de onda máxima (λ_{\max}) elegida es 281 nm.

Coefficiente de absortividad (a) es 8.8704 mL/mg*cm.

La curva de calibración se realizó para evaluar las pruebas preeliminares; para la cuantificación de capsaicinoides final se utilizó la curva patrón que se muestra mas adelante.

Determinación de humedad de muestras para pruebas preliminares

Las muestras se dividieron en tres sub-muestras: Pericarpio y Placenta (PP), Chile Entero (ChE) y Semillas (S), a estas sub-muestras se les determinó la humedad por triplicado y se promediaron, los resultados (promedios) se observan en la tabla:

Tabla N. 8. Datos de humedad de las sub-muestras de chile guajillo y chipotle de marca y a granel.

Muestra	% de Humedad				
	Chile	Chipotle San Lázaro	Chipotle Sin Marca	Guajillo San Lázaro	Guajillo Sin Marca
Semillas		7.17	6.98	6.38	5.13
Pericarpio y placenta		13.78	18.71	14.66	10.71
Chile entero		11.10	15.08	13.25	8.06

La determinación de humedad en las muestras se realizó con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de agua para evitar cualquier posible interferencia en la cuantificación de los capsaicinoides. Por lo que no se tomó en cuenta para la determinación.

Método de extracción con metanol

En este método se agrega carbón activado con la finalidad eliminar la fracción colorida del extracto, pero tiene el inconveniente que ésta también retiene los capsaicinoides, lo que queda demostrado al registrar los espectros al UV antes y después de agregar el carbón donde se observa la desaparición de la absorbancia a 280 nm.

Considerando que la fracción colorida absorbe arriba de 400 nm, se prueba el método de extracción con metanol eliminando la agitación con carbón activado.

La fracción grasa también es retenida. Los espectros se muestran a continuación.

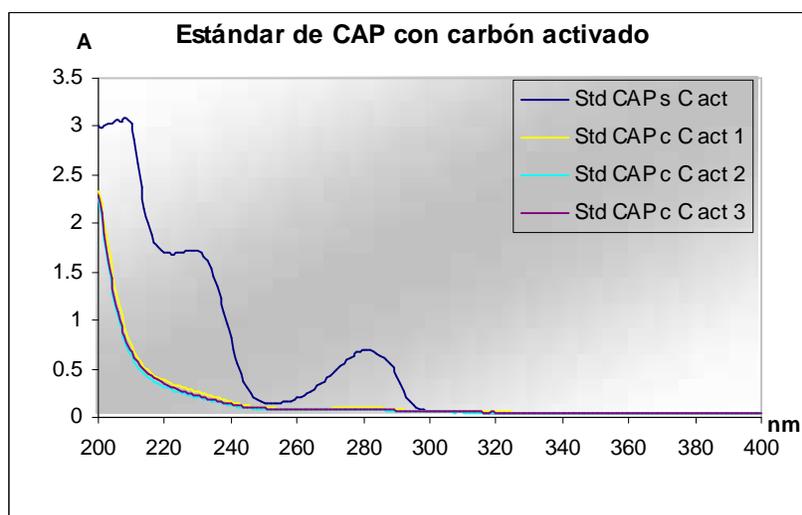


Figura N. 7. Espectros de la retención de capsaicinoides de la muestra de chile con carbón activado.

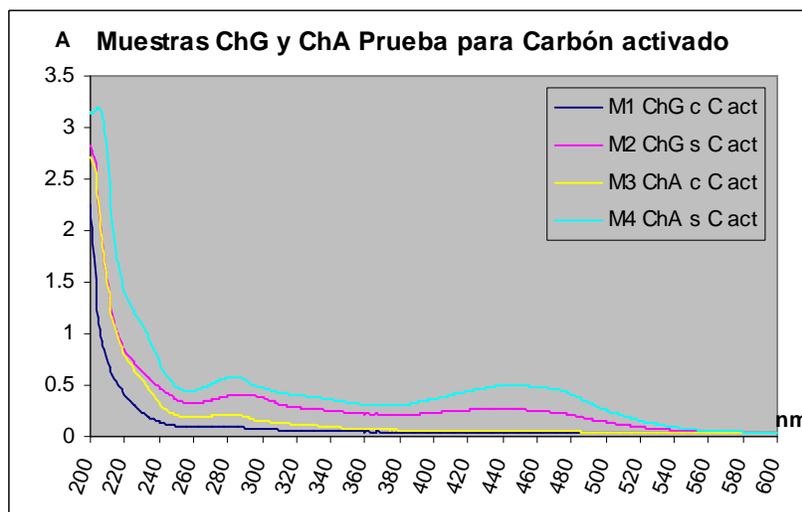


Figura N. 8. Espectros de la muestra de chile con y sin carbón activado.

Extracción con disolventes

Extracción con Hexano-Metanol.

Al realizar la mezcla de disolventes, agregar la muestra y agitar por veinte minutos se observaron dos fases; se esperaba que los capsaicinoides se extrajeran en la fase alcohólica (metanol) y la fracción grasa se quedará en la fase orgánica (hexano). Los espectros (figura 9) muestran que los capsaicinoides y la fracción grasa se extraen en la fase menos polar, ya que solamente se presenta absorción de 240 a 300 nm, por lo que esta técnica no es funcional para los objetivos planteados.

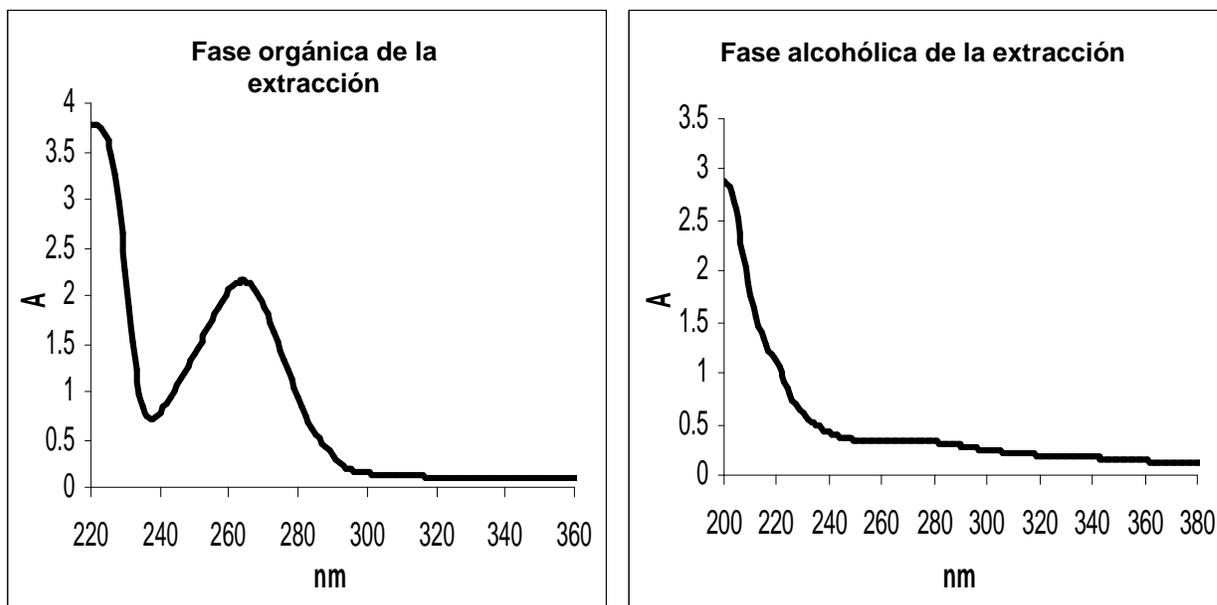


Figura N. 9. Espectros de las fases de la extracción con hexano-metanol.

Extracción con Acetona-Éter de petróleo.

Los espectros obtenidos al aplicar la metodología²⁵ muestran un ligero incremento de la longitud de onda a 280 nm. La figura 10 muestra el espectro de la fase etérea.

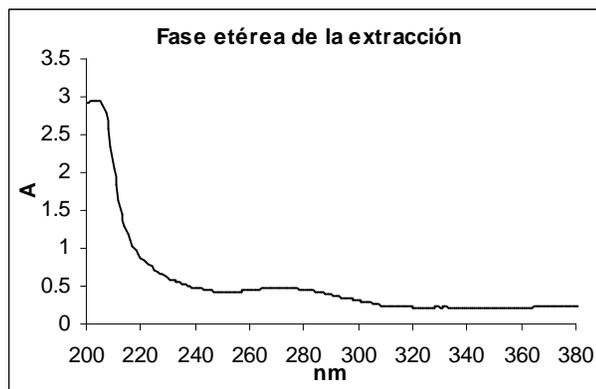


Figura N. 10. Fase etérea de la extracción acetona éter de petróleo

Para comprobar que se trataba de capsaicinoides, se agregó un poco del estándar y se observó un incremento en la longitud de onda en la que absorben los capsaicinoides.

El espectro de la figura 11 indica el fortalecimiento con una muestra del estándar de capsaicinoides.

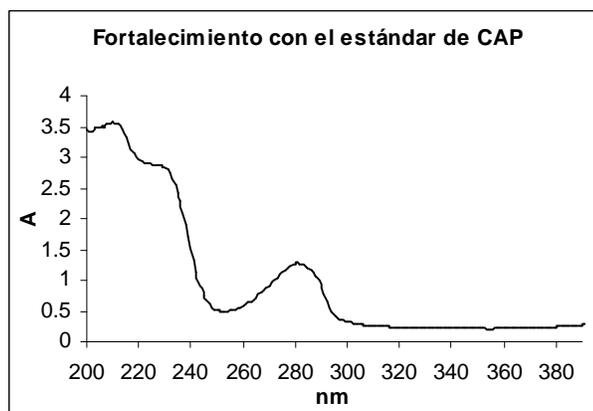


Figura N. 11. Fortalecimiento de la muestra con estándar de capsaicinoides.

Para corroborar estos resultados se leyó la muestra utilizando segunda derivada, esto nos indica la presencia de más cromóforos además de los capsaicinoides, y se observó que hay dos compuestos en mayor cantidad que los capsaicinoides, aún así se evaporó la muestra con nitrógeno y se mandó a realizar una cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, en la cual se observó que el extracto contiene en mayor cantidad ácidos grasos los cuales interfieren en la cuantificación de los capsaicinoides. Debido al resultado obtenido no consideramos importante mostrar el cromatograma.

En la figura 12 muestra el espectro de la segunda derivada para el extracto obtenido, donde se comprueba la presencia de un compuesto en mayor cantidad que los capsaicinoides, esto se aprecia porque el pico no está bien definido y se presenta una longitud de onda máxima diferente a la característica de los capsaicinoides (281 nm). La presencia de este compuesto interfiere en la cuantificación de los capsaicinoides, por lo que, se descartó el uso de esta metodología como medio de purificación de la muestra.

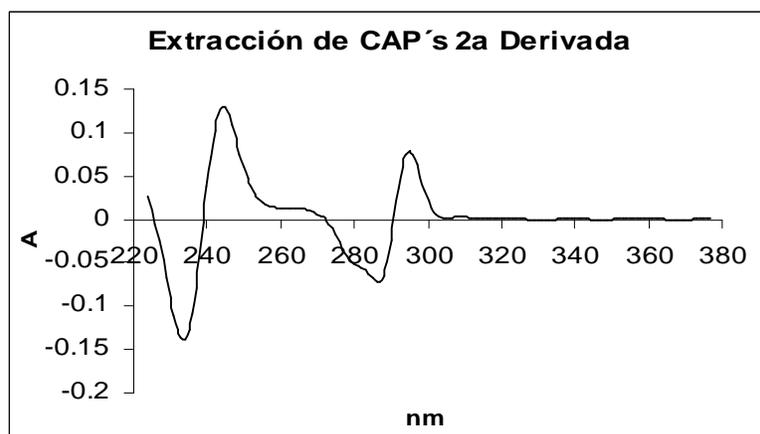


Figura N. 12. Espectro de la segunda derivada del extracto obtenido de la muestra de Chile e la fase etérea.

El comparativo de los métodos de extracción probados concluye que para los fines de este trabajo el disolvente adecuado es el metanol.

Pruebas para la columna Octadecyl (C₁₈)

Acidificación del Medio.

La acidificación se realizó con la finalidad de modificar la polaridad de la fase móvil y se esperaba la retención ya fuera de los capsaicinoides o la fracción grasa. El pH de las soluciones se midió con un potenciómetro, en el primer caso se tiene un pH de 1.1 (figura 14) y en el segundo caso se tiene un pH de 0.7 (figura 15). En la figura 13 se muestra el espectro del estándar de capsaicinoides sin acidificar.

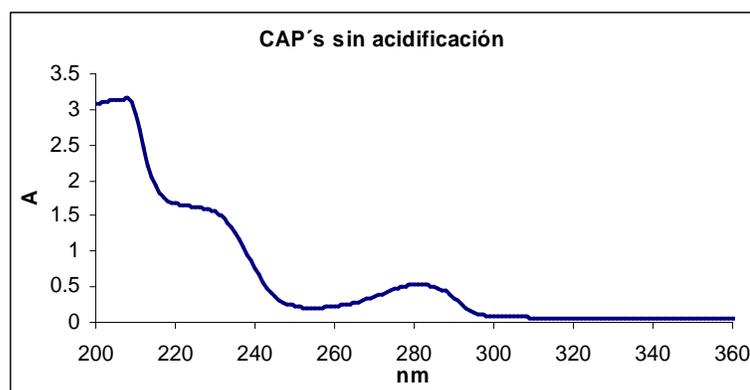


Figura N. 13. Espectro del estándar de capsaicinoides sin acidificación.

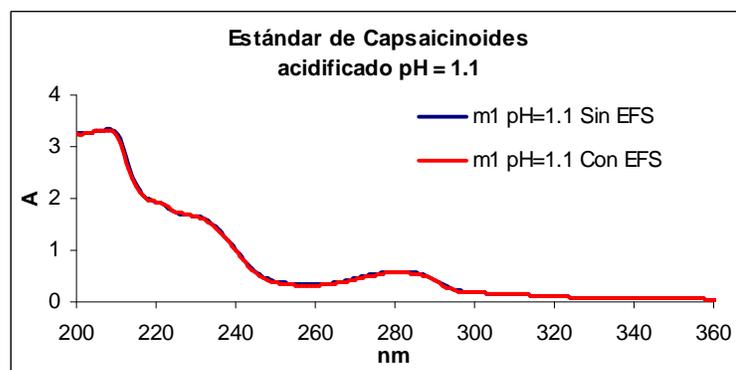


Figura N. 14. Espectro de la reacción de los capsaicinoides a la acidificación de la fase móvil (pH = 1.1).

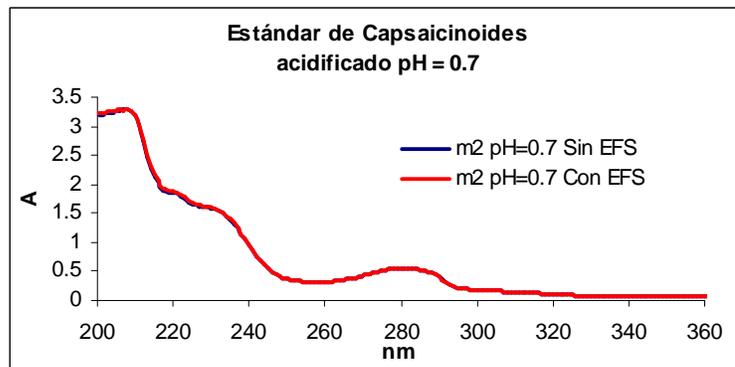


Figura N. 15. Espectro de la reacción de los capsaicinoides a la acidificación de la fase móvil (pH = 0.7).

Como se observa al modificar el pH de la fase móvil no se crea ningún efecto favorable en el analito para que se retenga en la columna, debido a esto no se observa ningún cambio en el espectro, y se descarta esta posibilidad de aplicación.

Esterificación de ácidos grasos

La esterificación se realizó con una muestra del estándar de ácido linoléico, esperando que al cambiar la polaridad del ácido, éste se retuviera en la columna utilizada (octadecyl C_{18}). Los resultados de esta metodología no fueron satisfactorios, ya que se encontró que el compuesto generado muestra varias bandas de absorción (figura N. 16), y éstas tapan por completo la zona en donde absorben radiación UV los capsaicinoides, los espectros se muestran a continuación.

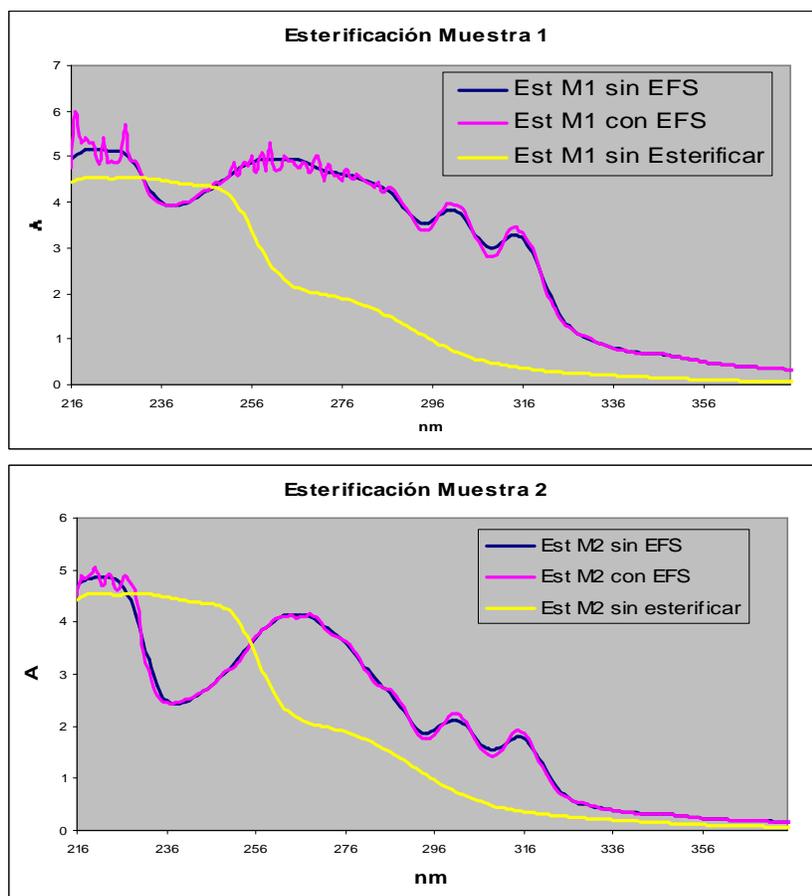


Figura N. 16. Espectros de la esterificación del ácido graso de las muestras 1 y 2.

Según la apreciación de los espectros se puede decir que los ácidos grasos ésterificados no se retienen en la columna Octadecyl C₁₈, y absorben en la zona donde los capsaicinoides presentan su λ máxima (281 nm), por lo que la esterificación del ácido no es funcional para los objetivos planteados.

Formación del clorhidrato

En la formación del clorhidrato hay una separación de fases, al registrar las I_{\max} de absorción se observa que la mayor parte de los capsaicinoides se encuentran en la fase orgánica, cuando deberían estar en la fase acuosa por la naturaleza química de los clorhidratos; se cree que la reacción que se llevo a cabo no es muy cuantitativa, porque se aprecia una señal muy débil en el espectro, por lo que esta técnica no es útil para fines del objetivo planteado, debido a esto no se profundizo más en ésta experiencia. La figura N. 17 muestra los espectros de las dos fases.

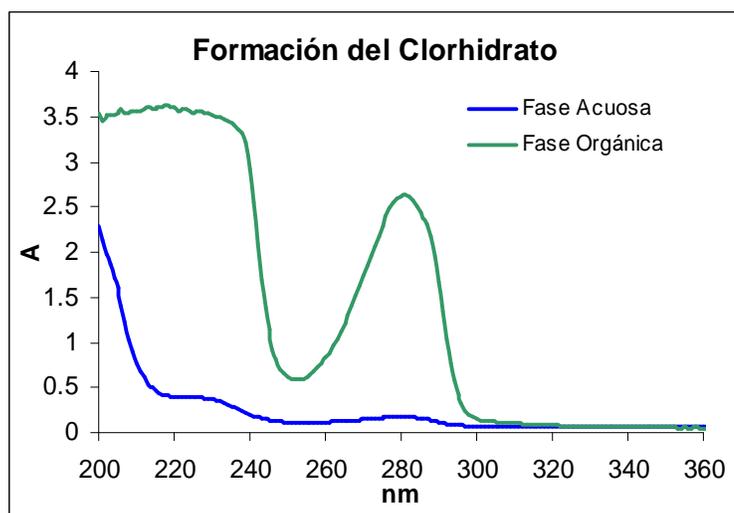


Figura N. 17. Espectros de las dos fases en la formación del clorhidrato de capsaicina.

Selección de la columna de EFS para purificación del extracto

La figura 18, muestra el comportamiento de los espectros del estándar de capsaicinoides sin pasarla por el cartucho de extracción en fase sólida y con extracción en fase sólida pasándola por los diferentes adsorbentes, esto con el fin de lograr la separación de los ácidos grasos de los capsaicinoides en la muestra de chile, para su posterior cuantificación.

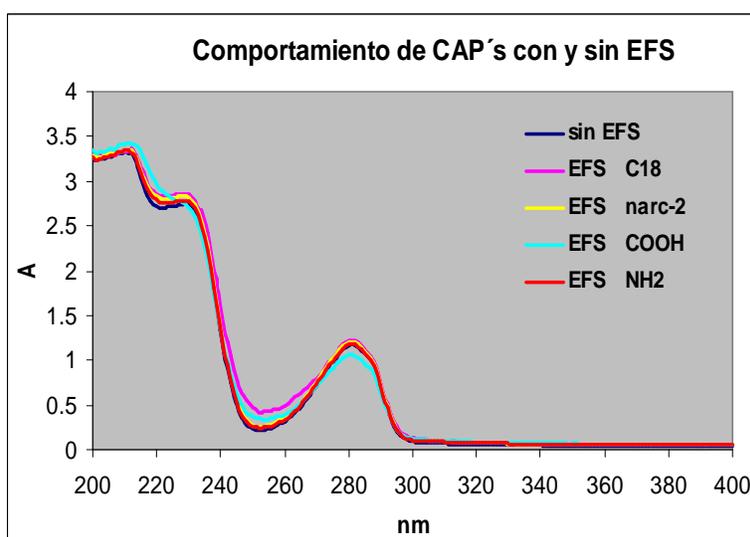


Figura N. 18. Espectros del comportamiento del estándar de capsaicinoides al aplicar la extracción en fase sólida.

Como se puede observar los capsaicinoides no presentan afinidad por ninguno de los adsorbentes de los cartuchos, por lo que se realizó la misma experiencia con el ácido graso para saber su comportamiento, los resultados se muestran a continuación.

La figura 19 muestra el comportamiento de los espectros del estándar de ácido linoléico sin pasar por la columna EFS y al pasar por diferentes adsorbentes, como se puede apreciar la columna con adsorbente amino (NH_2) presenta afinidad por este.

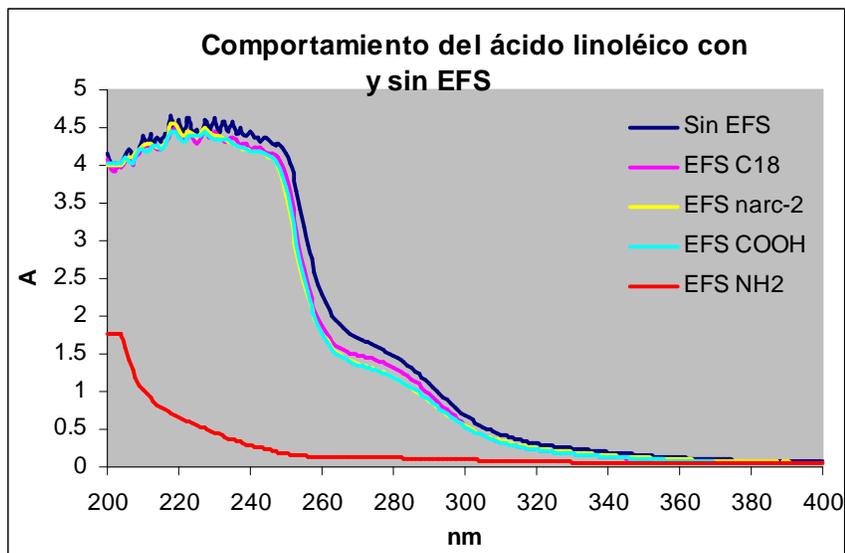


Figura N. 19. Espectros del comportamiento del estándar de ácido linoléico al aplicar la extracción en fase sólida.

Basados en los resultados obtenidos se preparó una mezcla de estándares de ácido linoléico y capsaicinoides en las proporciones en las que se encuentran en los chiles y se pasó por la columna de extracción en fase sólida con adsorbente Amino (NH_2), para conocer si al estar juntos y pasarlos por esta columna hay separación. Los resultados se muestran en la figura 20.

Los espectros muestran como de la mezcla de estándares se retiene el ácido graso, esto se corrobora porque se observa una disminución en el valor de la absorbancia, y se observa el pico característico de los capsaicinoides ($I_{\text{máx.}} = 281 \text{ nm}$) después de la extracción en fase sólida. A ésta mezcla se le realizó un análisis por CG-EM para confirmar la eliminación del ácido graso.

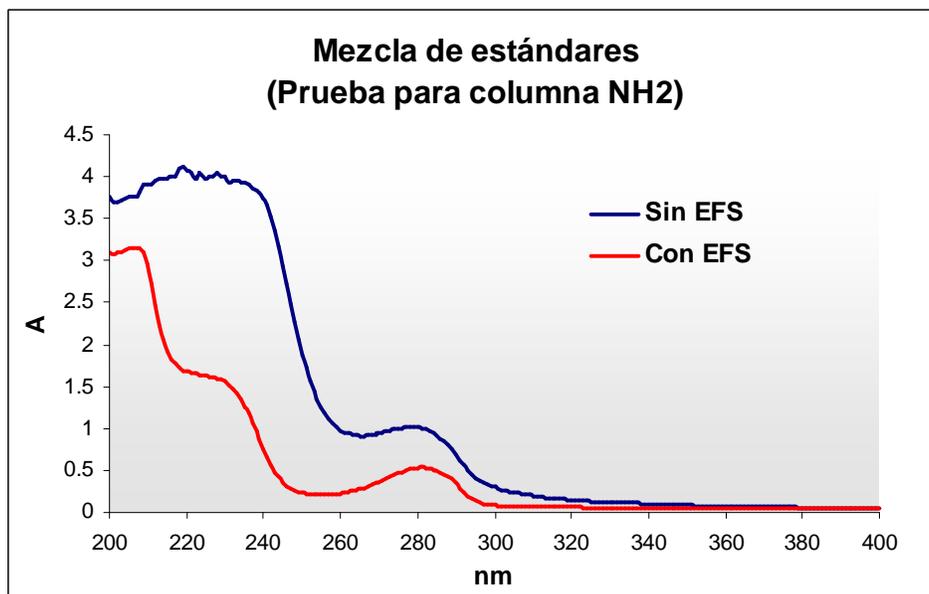


Figura N. 20. Espectros de la mezcla de estándares al aplicar EFS con la columna elegida.

Por lo tanto, la columna de EFS que se utilizó para la purificación de la muestra es la que contiene como adsorbente grupos amino.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con el fin de conocer si al aplicar la EFS a la mezcla de estándares, lo que se obtiene son los capsaicinoides y se retiene la fracción grasa. El resultado obtenido fue satisfactorio.

En la figura 21 se observa el cromatograma de los compuestos que contiene el estándar de capsaicinoides.

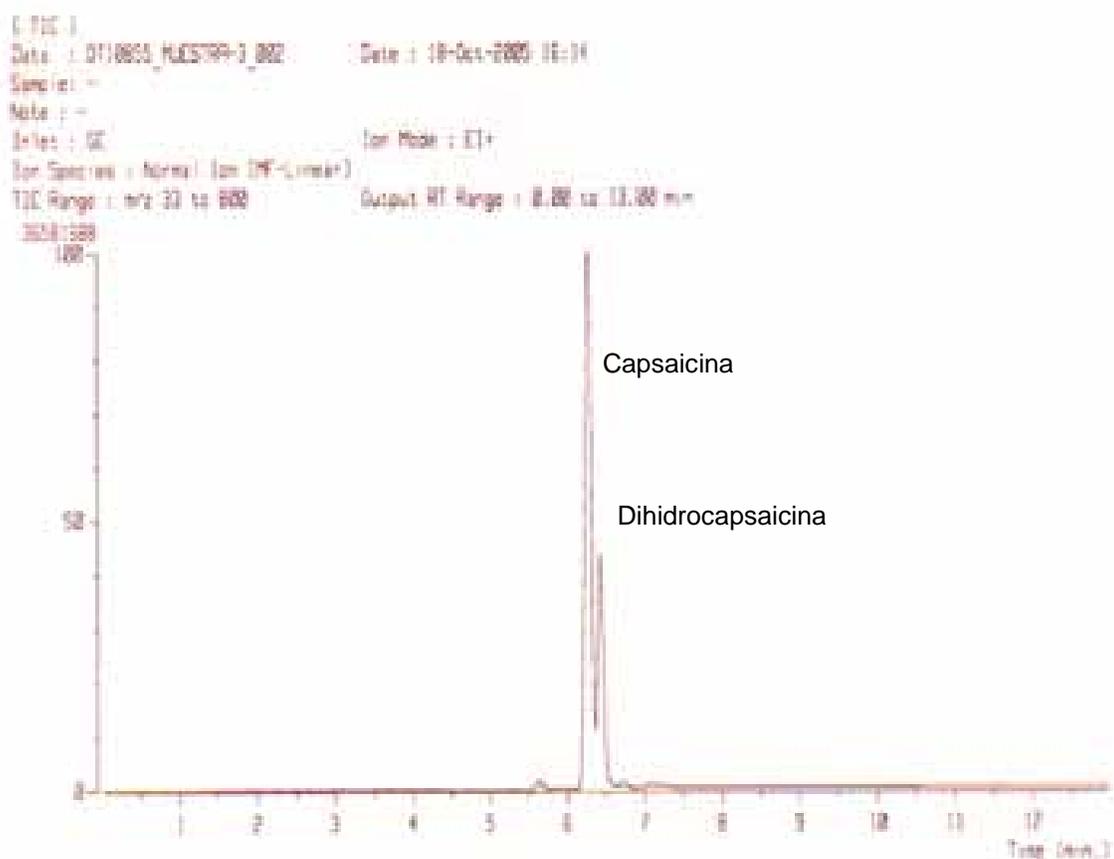


Figura N. 21. Cromatograma del estándar de capsaicinoides.

En la figura N. 22 se muestran los espectros de masas del estándar de capsaicinoides en el cual se observan los pesos moleculares de 305 y 307 que pertenecen a la capsaicina y a la dihidrocapsaicina respectivamente.

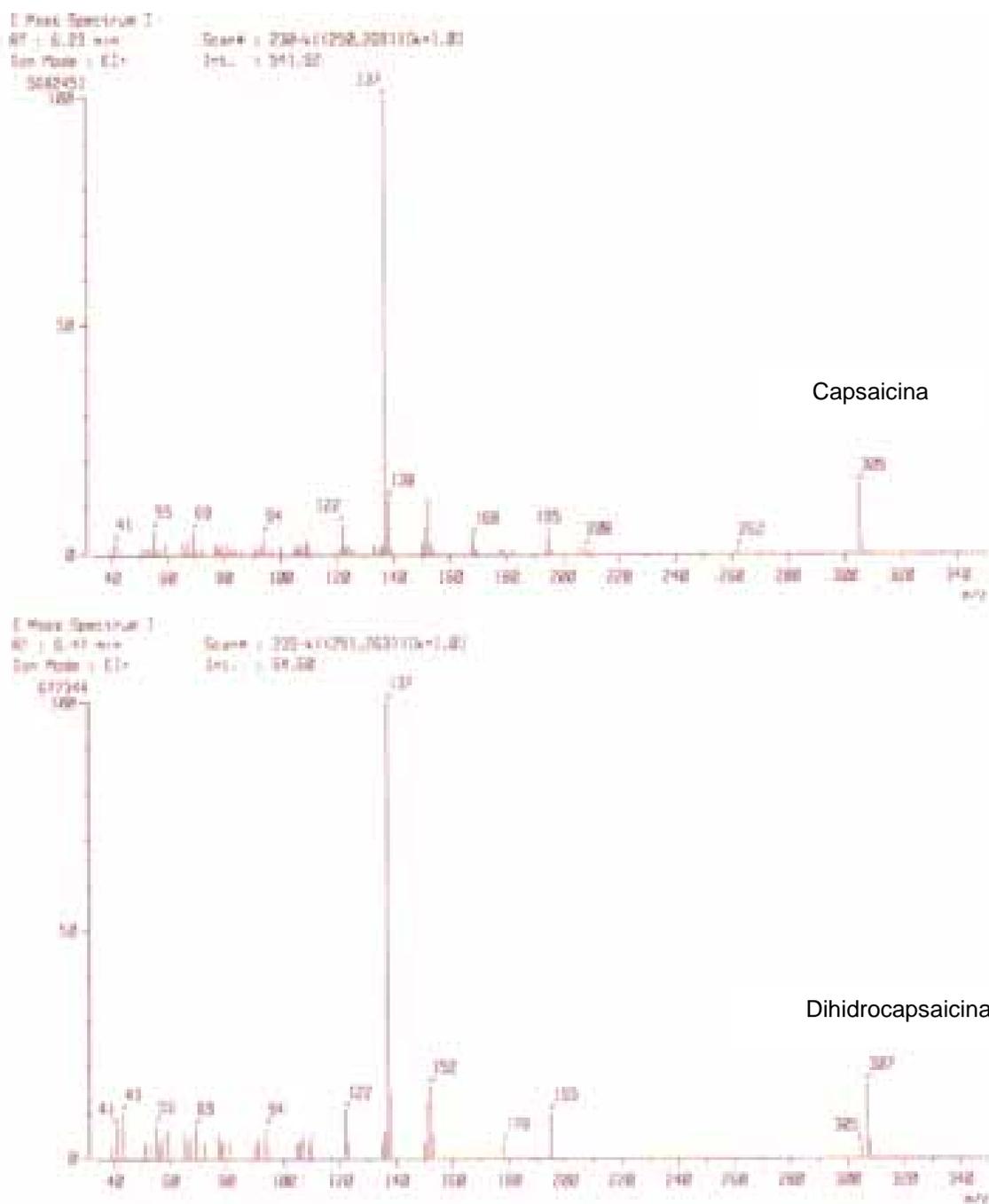


Figura N. 22. Espectros de masas del estándar de capsaicinoides.

En la figura 23 se muestra el cromatograma de la mezcla de estándares (capsaicinoides y ácido linoléico) sin aplicar EFS, como se observa la cantidad de ácido graso es tan grande que no deja ver a los capsaicinoides.

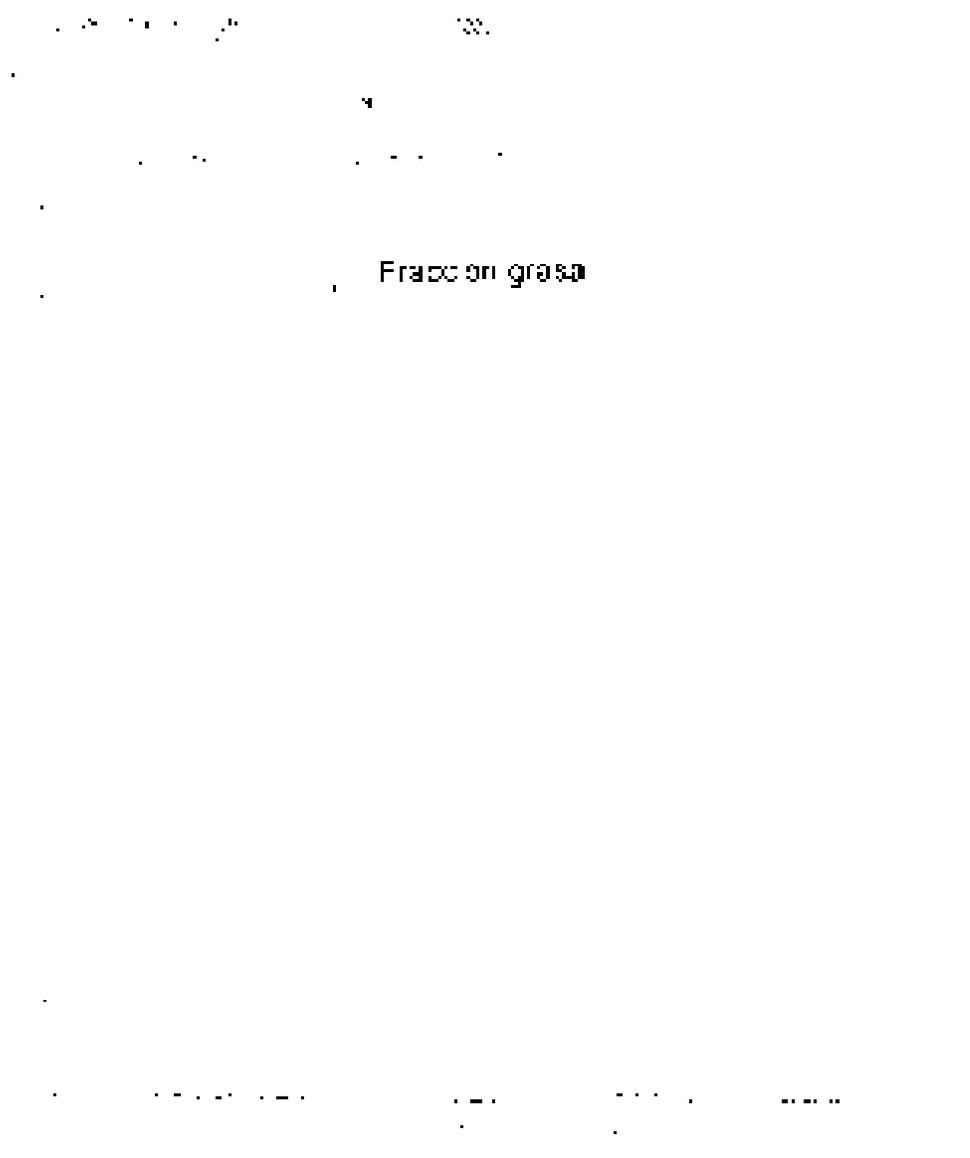


Figura N. 23. Cromatograma de la mezcla de estándares.

En la figura 24 se observa el espectro de masas de la mezcla de estándares (capsaicinoides y ácido linoléico) sin aplicar EFS solo aparece la fracción grasa, debido a la baja concentración de capsaicinoides presentes.

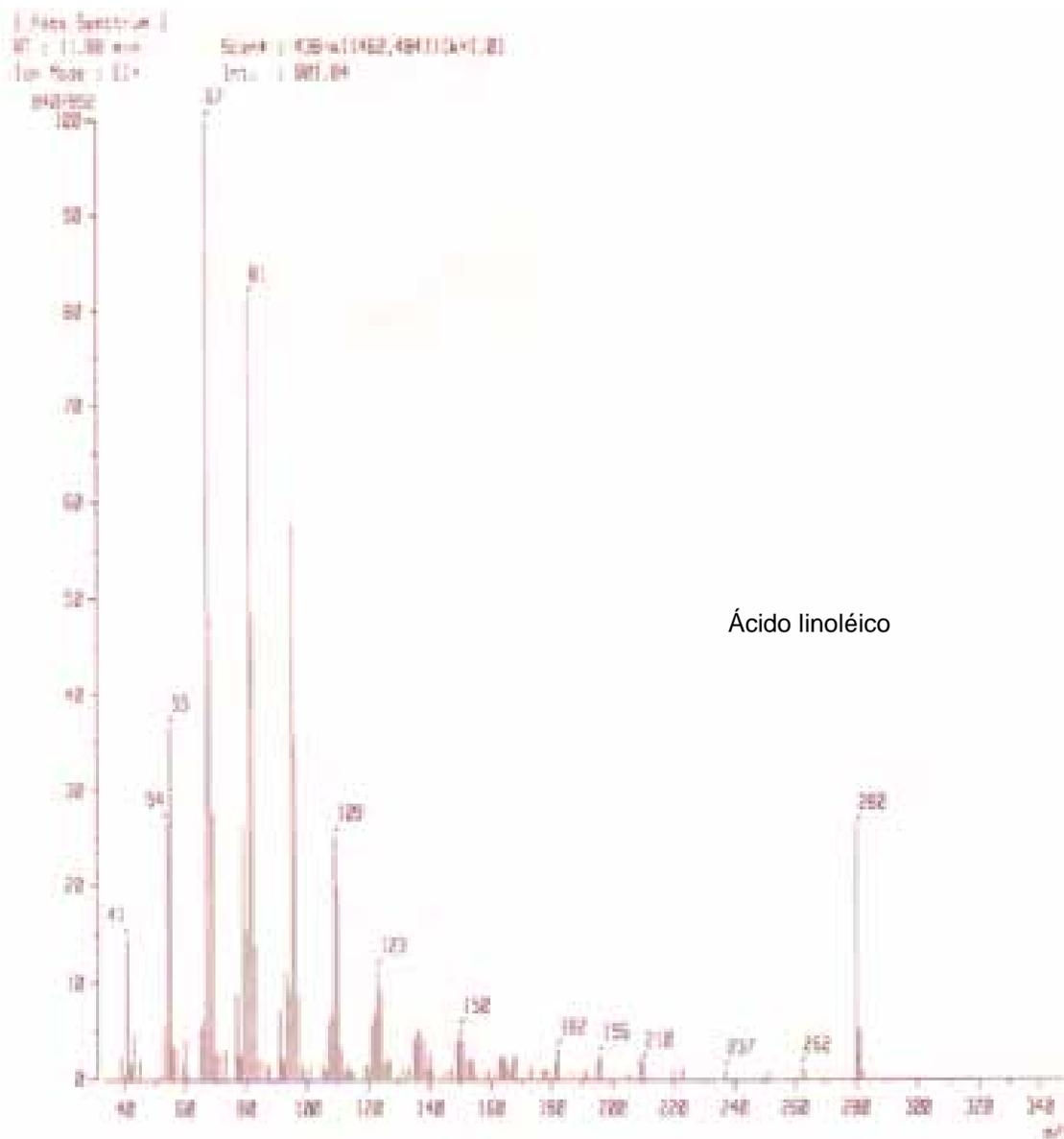


Figura N. 24. Espectro de masas de la mezcla de estándares.

La figura 25 corresponde al eluato de la disolución después de pasarlo por la columna de NH₂ EFS, se observaron la capsaicina y la dihidrocapsaicina.

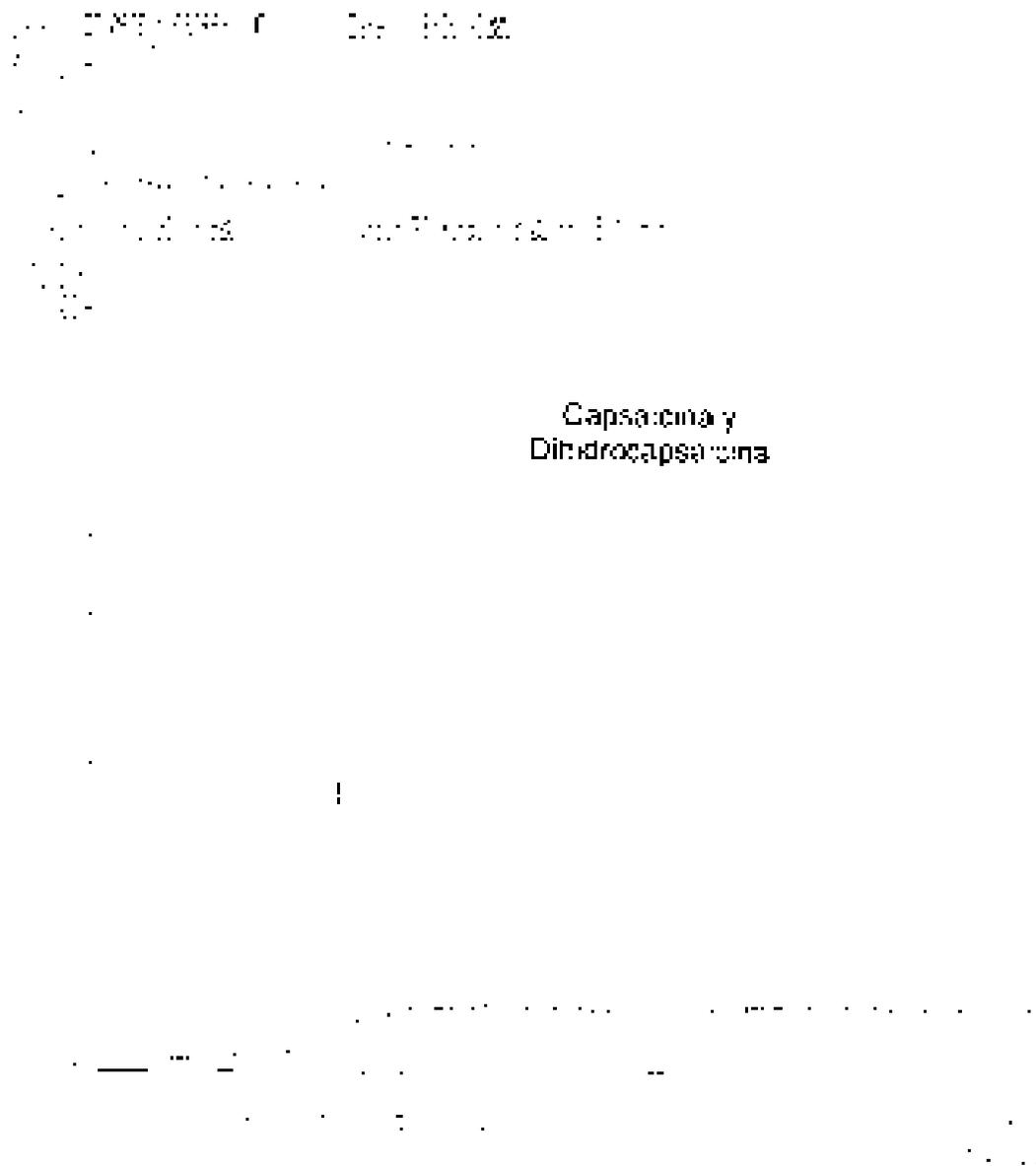


Figura N. 25. Cromatograma de la mezcla de estándares aplicando EFS.

La figura 26 muestra el espectro de masas de la mezcla de estándares (capsaicinoides y ácido linoléico) aplicando EFS.

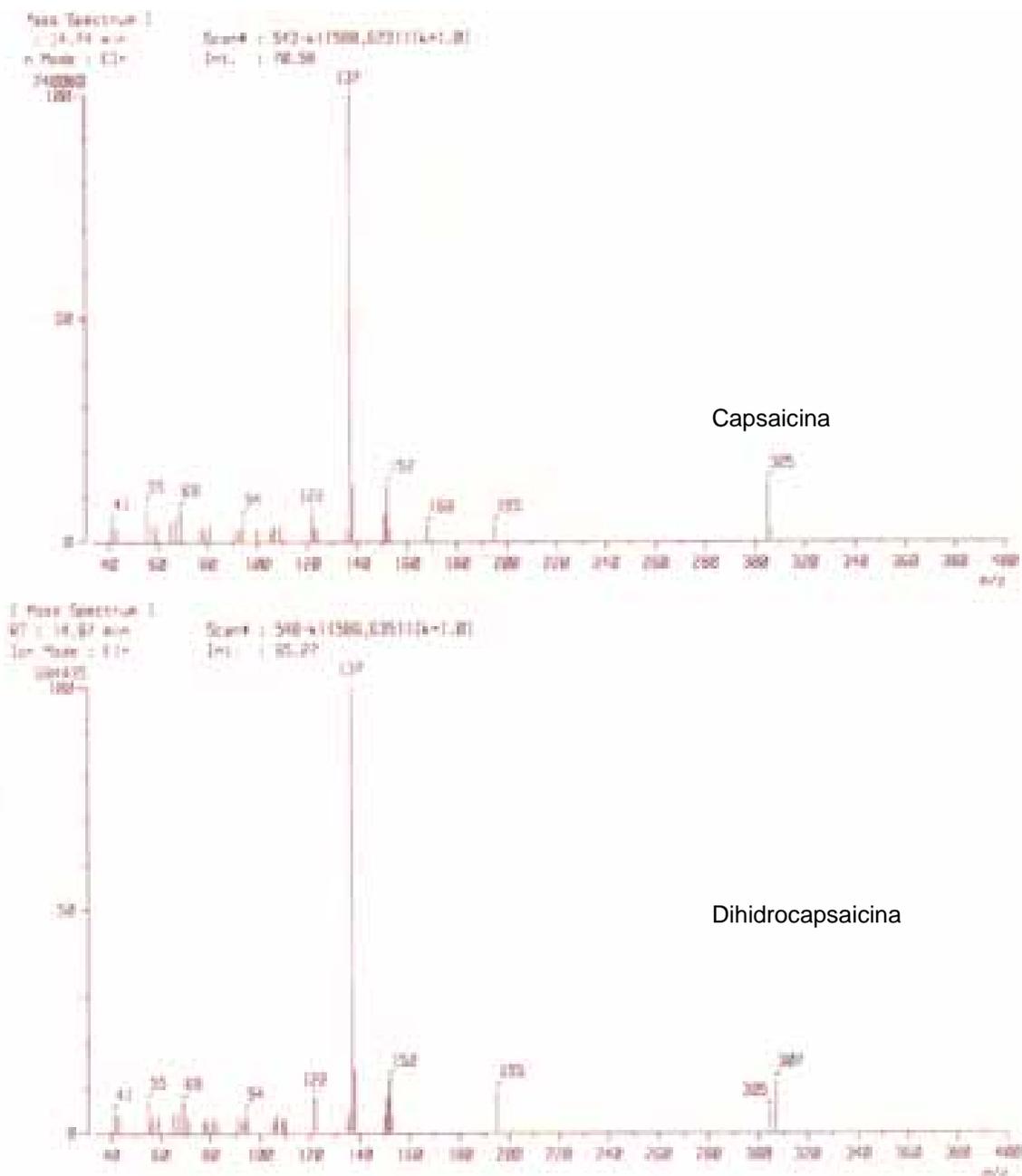


Figura 26. Espectros de masas de la mezcla de estándares después de aplicar EFS.

Selección de la parte del chile para la cuantificación (prueba preliminar)

Después de aplicar el método de extracción descrito anteriormente (Pág. 36) se obtuvieron las gráficas que se presentan en la figura 27, donde se observa la eliminación de la fracción de ácidos grasos en las muestras.

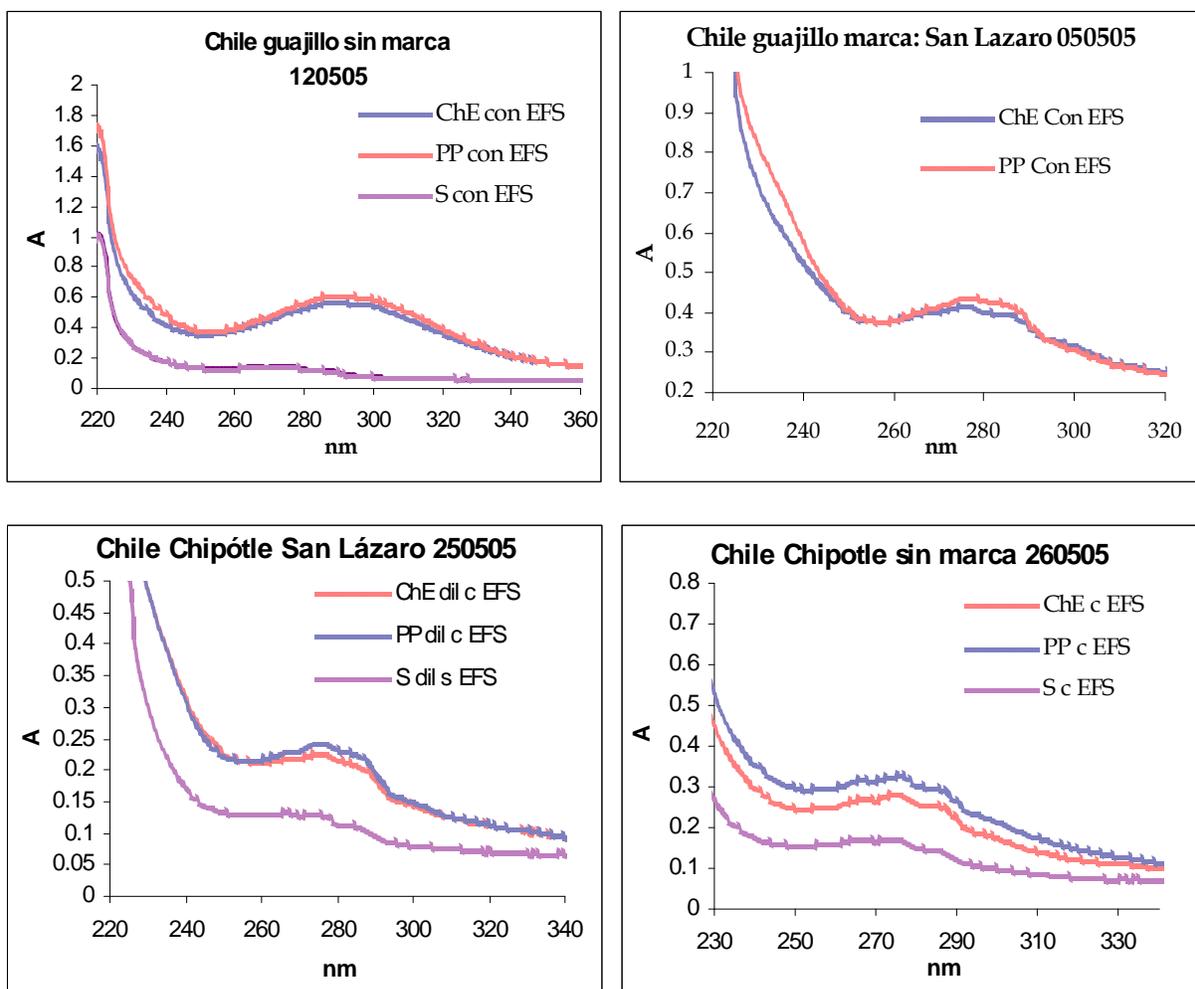


Figura N. 27. Espectros UV de las muestras de chile guajillo y chipotle de marca y sin marca.

Nomenclatura:

ChE = Chile Entero Molido.

PP = Pericarpio y Placenta.

S = Semillas.

La concentración de capsaicinoides encontrada en cada una de las muestras y en las partes del chile se reporta en la tabla N. 9.

Tabla N. 9. Concentración de capsaicinoides encontrada en las muestras de chiles y en sus partes.

Chile Chipotle	Sub-muestra	A_{291 nm}	% Capsaicinoides en B. S.
San Lázaro	Chile Entero	0.1730	0.103
	Pericarpio y Placenta	0.1835	0.113
	Semillas	0.0728	0.042
Sin Marca	Chile Entero	0.2078	0.128
	Pericarpio y Placenta	0.2510	0.164
	Semillas	0.1148	0.066
Chile Guajillo	Sub-muestra	A_{287 nm}	% Capsaicinoides en B.S.
San Lázaro	Chile Entero	0.3876	0.137
	Pericarpio y Placenta	0.4075	0.146
	Semillas	-----	-----
Sin Marca	Chile Entero	0.5658	0.175
	Pericarpio y Placenta	0.6087	0.203
	Semillas	0.1110	0.035

Como se puede apreciar en el estudio espectrofotométrico al UV, la parte del chile que mayor concentración de capsaicinoides tiene es el pericarpio y la placenta, por lo tanto estas partes son las que se va a utilizar para la cuantificación. Las semillas tienen la mayor cantidad de ácidos grasos (que absorben al UV y causan interferencia) y menor cantidad de capsaicinoides, por lo que no se van a utilizar para la cuantificación. En esta parte sólo se trató de seleccionar la parte del chile que más conviene trabajar.

Determinación de humedad de 5 tipos de chiles secos

Las partes de las muestras con las que se trabajó fueron pericarpio y placenta de los diferentes tipos de chile, se les determinó la humedad por triplicado pesando aproximadamente 1 gramo de muestra para cada caso y se promediaron para obtener un resultado más confiable. En la figura 28 se muestran los resultados de la determinación de humedad.

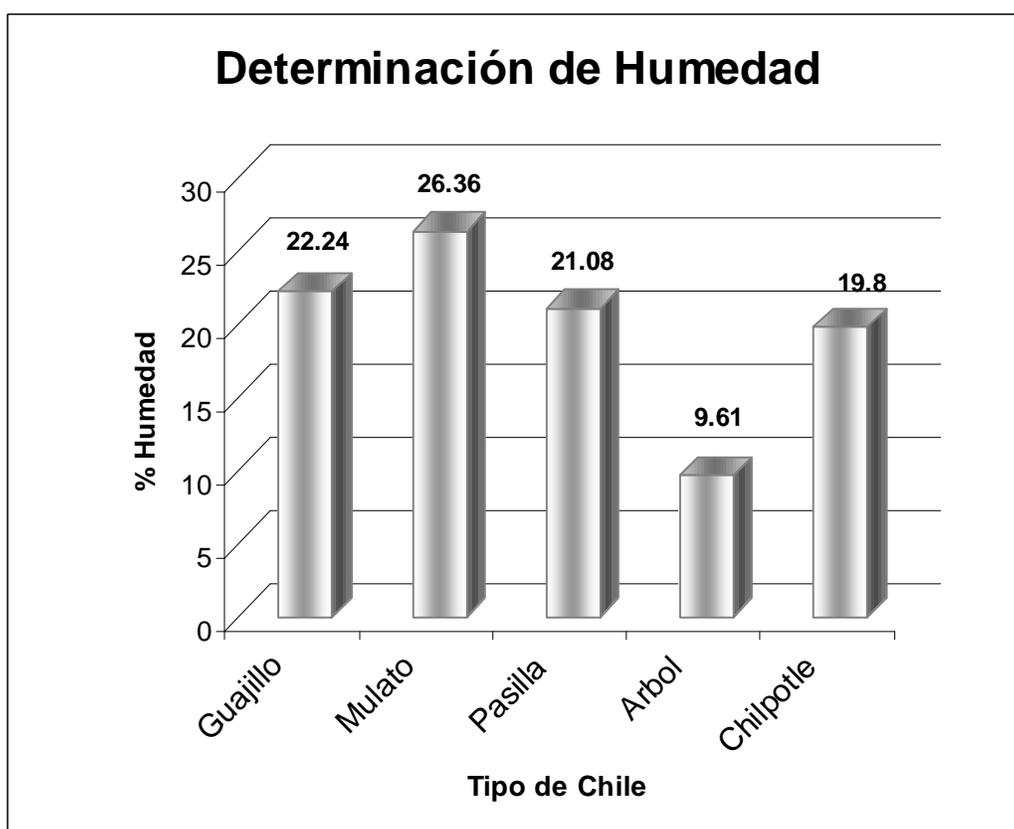


Figura N. 28. Humedad de las muestras de chile para la cuantificación de CAP's.

Curva patrón de capsaicinoides en metanol con EFS columna NH₂

La figura 29 representa los espectros de las diferentes concentraciones de la curva patrón y la figura 30 muestra las regresiones lineales a diferentes longitudes de onda. Para la cuantificación de los capsaicinoides se utilizaron los coeficientes de absorptividad (a) según la longitud de onda máxima que presentaba cada tipo de chile, se realizó de esta manera debido a que la longitud de onda máxima de los capsaicinoides cambia según el tipo de chile de donde se extraiga, esto se corroboró al agregar un poco de estándar de capsaicinoides a los extractos y notar el incremento del pico a cada longitud de onda característica de cada tipo de chile. La tabla 10 muestra las concentraciones y las absorbancias que sirvieron para obtener las regresiones lineales. La tabla 11 muestra los datos de las regresiones lineales a diferentes longitudes de onda máxima que presentaban los diferentes tipos de chiles.

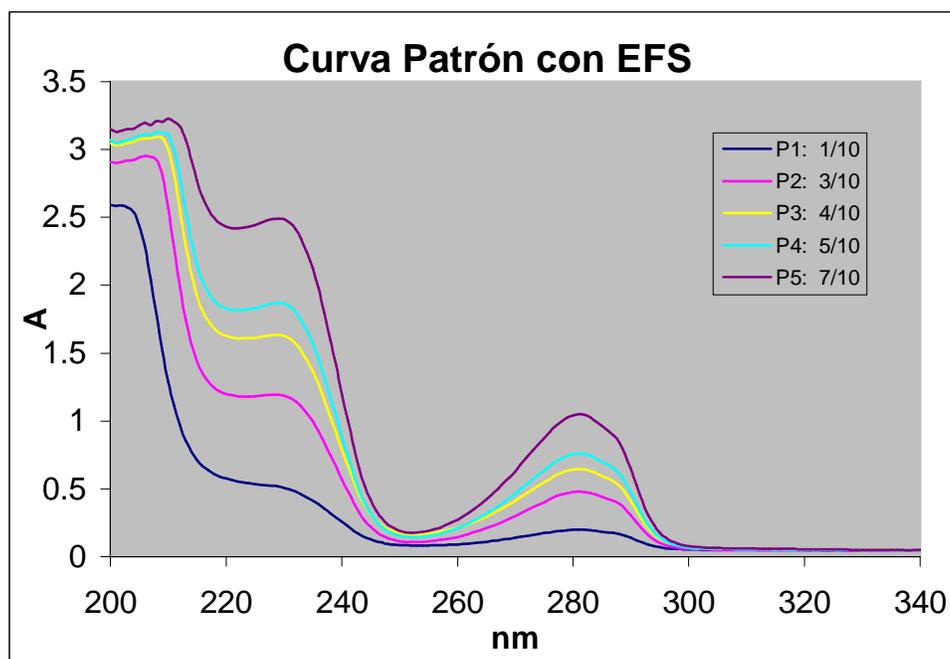


Figura N. 29. Espectros de la curva patrón de capsaicinoides usando EFS.

Tabla N. 10. Datos de concentraciones y absorbancias para las regresiones lineales.

Punto	C (mg/mL)	A máx. (281 nm)	A (283 nm)	A (287 nm)	A (290 nm)	A (291 nm)
1	0.0148	0.1986	0.1951	0.1747	0.1399	0.1222
2	0.0444	0.4799	0.4960	0.4111	0.3075	0.2540
3	0.0592	0.6481	0.6329	0.5543	0.4129	0.3399
4	0.0740	0.7619	0.7454	0.6506	0.4776	0.3900
5	0.1036	1.0495	1.0264	0.8940	0.6498	0.5259
A (mL/mg*cm)		9.5767	9.2679	8.0993	5.7426	4.5510

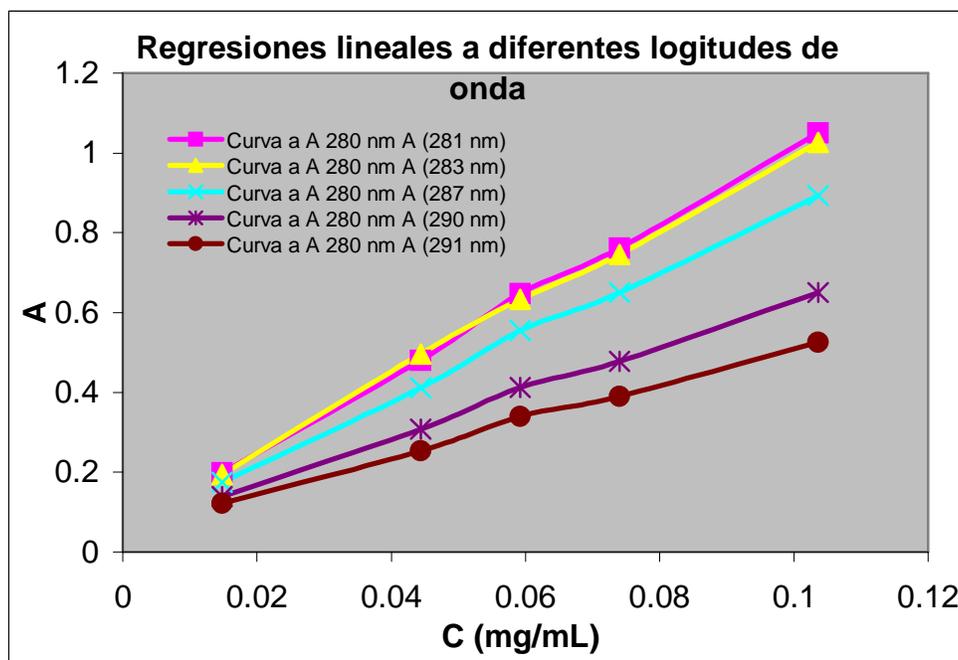


Figura N. 30. Regresiones lineales a diferentes longitudes de onda.

Tabla N. 11. Datos de regresiones lineales a diferente longitud de onda máxima.

	I máx.	Regresión lineal	Coef. de correlación (r)
Estándar de CAP's	281 nm	$Y = 9.5767x + 0.0607$	0.9993
Tipo de Chile			
Chipotle	291 nm	$Y = 4.551x + 0.057$	0.9987
De árbol	283 nm	$Y = 9.2679x + 0.0705$	0.9991
Guajillo	287 nm	$Y = 8.0993x + 0.0575$	0.9993
Mulato	290 nm	$Y = 5.7426x + 0.0576$	0.9989
Pasilla	283 nm	$Y = 9.2679x + 0.0705$	0.9991

Cuantificación por UV de capsaicinoides en chiles secos

Se realizó la cuantificación de los capsaicinoides presentes en la placenta y pericarpio de los diferentes tipos de chile con los que se trabajó, se realizó este ensayo por triplicado, se tomaron las absorbancias para calcular el porcentaje de capsaicinoides presentes en las muestras y se promediaron; el espectro de los diferentes tipos de chile se muestran en la figura 31.

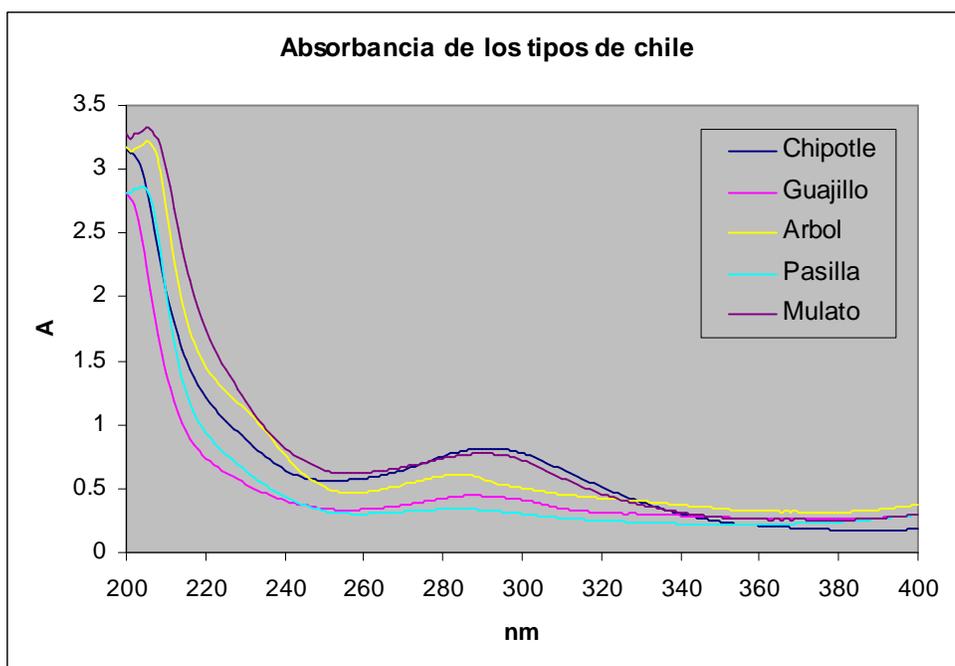


Figura N. 31. Espectros de los diferentes tipos de chile con los que se trabajó.

Por lo que se calculó el coeficiente de absortividad para cada uno de ellos.

Tabla N. 12. Lambdas máximas de absorción y absorbancias de los tipos de chiles.

Tipo de chile	λ_{\max} (nm)	Absorbancia
Chipotle	291	0.8127
Guajillo	287	0.4455
Árbol	283	0.6059
Pasilla	283	0.3397
Mulato	290	0.7738

Para el chile chipotle.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

Tabla N. 13. Datos para los cálculos de cuantificación de CAP's en chile chipotle.

Chile Chipotle (Pericarpio y Placenta)		
Muestra	A_{291 nm}	P_{muestra} (g)
1	0.8929	1.0009
2	0.9495	1.0014
3	0.8127	1.0002
A = 4.551 mL/mg*cm		

Muestra 1.

$$C = \frac{0.8929}{(4.551 \text{ mL/mg} * \text{cm})(1 \text{ cm})} = 0.1962 \text{ mg / mL}$$

$$0.1962 \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ mL}$$

$$X_1 \text{ ----- } 25 \text{ mL}$$

$$X_1 = 4.905 \text{ mg}$$

$$4.905 \text{ mg} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 4.905 * 10^{-3} \text{ g}$$

$$4.905 * 10^{-3} \text{ g} \text{ ----- } 1.0009 \text{ g}$$

$$X_2 \text{ ----- } 100 \text{ g}$$

$$X_2 = 0.49 \% \text{ CAP en BH}$$

$$0.49 \% \text{ CAP en BH} \text{ ----- } 80.2 \% \text{ BS}$$

$$X_3 \text{ ----- } 100 \% \text{ BS}$$

$$X_3 = 0.61 \% \text{ CAP en BS}$$

Las concentraciones de capsaicinoides para las tres muestras de chile chipotle se muestran en la tabla 14.

Tabla N. 14. Concentración de capsaicinoides en el chile chipotle.

Muestra	% Capsaicinoides
1	0.49
2	0.52
3	0.45
Promedio	0.486
Desv. Est.	0.035

A continuación se muestran los espectros de las muestras de chile chipotle (figura 32).

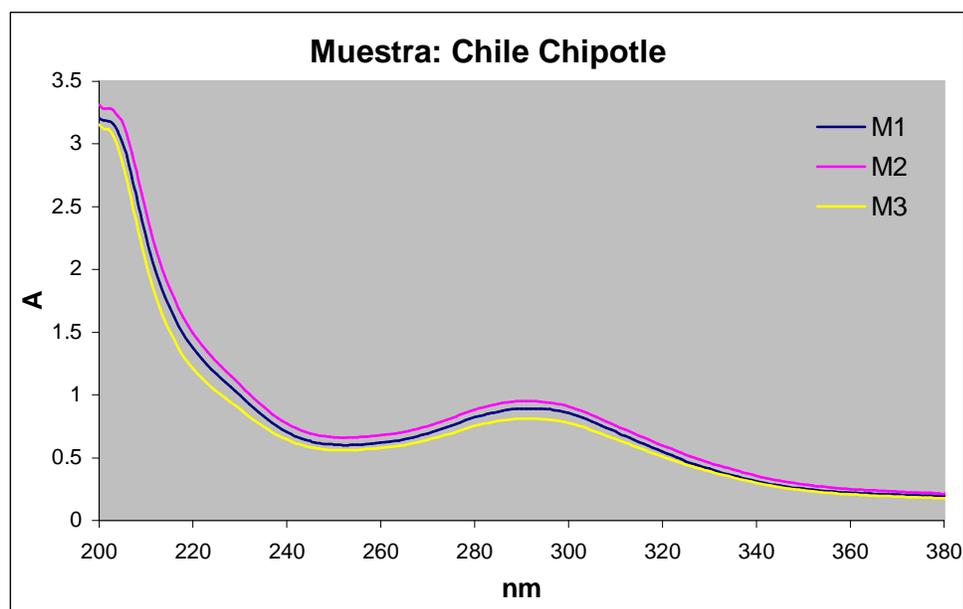


Figura N. 32. Espectros al UV de chile chipotle.

Para el chile de árbol.

Tabla N. 15. Datos para los cálculos de cuantificación de CAP's en chile de árbol.

Chile de Árbol (Pericarpio y Placenta)		
Muestra	A_{283 nm}	P_{muestra} (g)
1	0.7055	1.0119
2	0.7208	1.0430
3	0.6059	1.0150
a = 9.2679 mL/mg*cm		

Las concentraciones de capsaicinoides para las tres muestras de chile de árbol se muestran en la siguiente tabla 16.

Tabla N. 16. Concentración de capsaicinoides en el chile de árbol.

Muestra	% Capsaicinoides
1	0.19
2	0.18
3	0.16
Promedio	0.176
Desv. Est.	0.015

A continuación se muestran los espectros de las muestras de chile de árbol (figura 33).

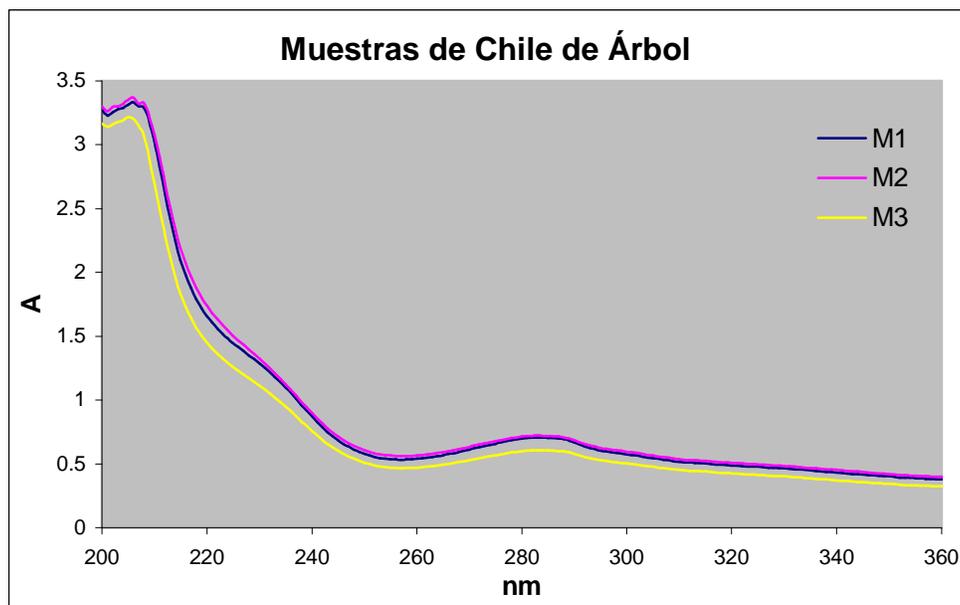


Figura N. 33. Espectros al UV de chile de árbol.

Para chile guajillo.

Tabla N. 17. Datos para los cálculos de cuantificación de CAP's en chile guajillo.

Chile guajillo (Pericarpio y Placenta)		
Muestra	A_{287 nm}	P_{muestra} (g)
1	0.4441	1.0195
2	0.4441	1.0196
3	0.4445	1.0194
a = 8.0993 mL/mg*cm		

Las concentraciones de capsaicinoides para las tres muestras de chile guajillo se muestran en la tabla 18.

Tabla N. 18. Concentración de capsaicinoides en el chile guajillo.

Muestra	% Capsaicinoides
1	0.13
2	0.13
3	0.13
Promedio	0.13
Desv. Est.	1.82 E-9

A continuación se muestran los espectros de las muestras de chile guajillo (figura 34).

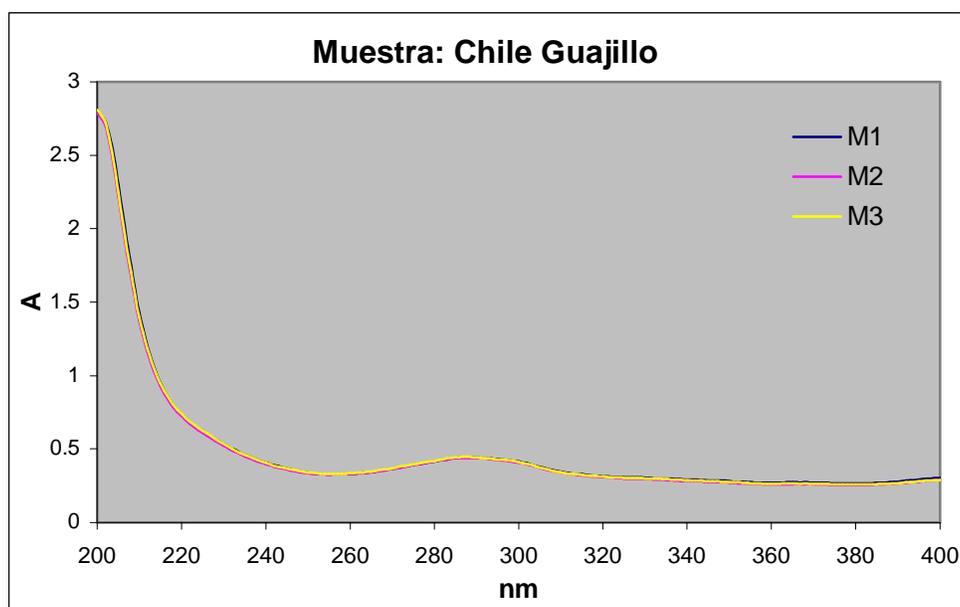


Figura N. 34. Espectros al UV de chile guajillo.

Para chile mulato.

Tabla N. 19. Datos para los cálculos de cuantificación de CAP's en chile mulato.

Chile Mulato (Pericarpio y Placenta)		
Muestra	A_{290 nm}	P_{muestra} (g)
1	0.7738	1.0158
2	0.7982	1.0037
3	0.8777	1.0377
a = 5.7426 mL/mg*cm		

Las concentraciones de capsaicinoides para las tres muestras de chile mulato se muestran en la tabla 20.

Tabla N. 20. Concentración de capsaicinoides en el chile mulato.

Muestra	% Capsaicinoides
1	0.33
2	0.34
3	0.37
Promedio	0.346
Desv. Est.	0.020

A continuación se muestran los espectros de las muestras de chile mulato (Figura 35).

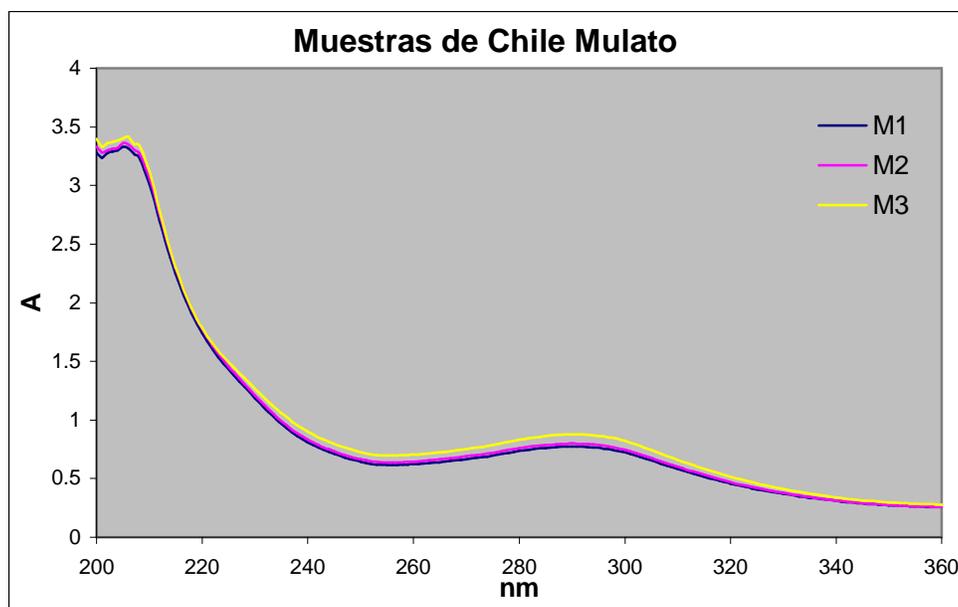


Figura N. 35. Espectros al UV de chile mulato.

Para chile pasilla.

Tabla N. 21. Datos para los cálculos de cuantificación de CAP's en chile pasilla.

Chile Pasilla (Pericarpio y Placenta)		
Muestra	A_{283 nm}	P_{muestra} (g)
1	0.3397	1.0162
2	0.3412	1.0218
3	0.2970	1.0125
a = 9.2679 mL/mg*cm		

Las concentraciones de capsaicinoides para las tres muestras de chile pasilla se muestran en la tabla 22.

Tabla N. 22. Concentración de capsaicinoides en el chile pasilla.

Muestra	% Capsaicinoides
1	0.08
2	0.08
3	0.08
Promedio	0.08
Desv. Est.	1.31 E-9

A continuación se muestran los espectros de las muestras de chile pasilla (figura 36).

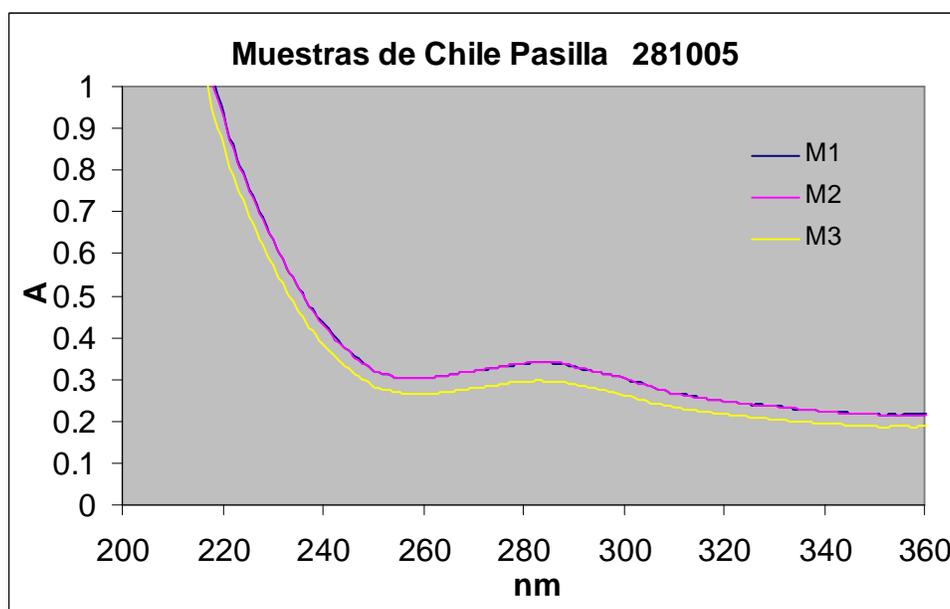


Figura N. 36. Espectros al UV de chile pasilla.

Los resultados promedio de cada muestra en base seca se presentan en la tabla 23 y se muestra una gráfica de barras con el contenido de capsaicinoides para cada chile (figura 37).

Tabla N. 23. Concentración de capsaicinoides en los diferentes tipos de chile.

Tipo de Chile	% de CAP's
Pasilla	0.08 ± 0.035
Guajillo	0.13 ± 0.015
De Árbol	0.17 ± 1.86 E-9
Mulato	0.34 ± 0.020
Chipotle	0.48 ± 1.31 E-9

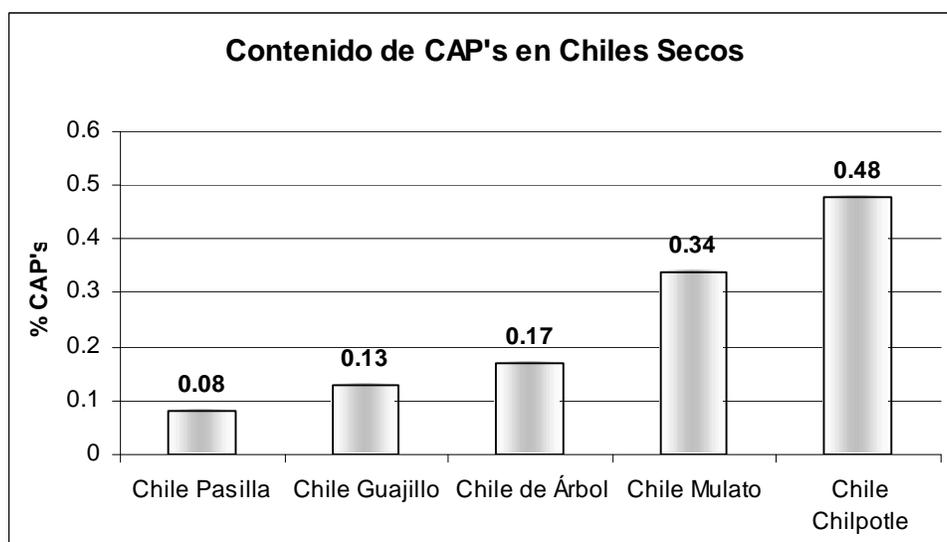


Figura N. 37. Contenido de capsaicinoides en los chiles trabajados.

CONCLUSIONES

1. Los capsaicinoides son insolubles en hexano y solubles en metanol, pero al estar en pequeña cantidad e interactuando con la fracción grasa presentan más afinidad por el hexano que por el metanol. La extracción de capsaicinoides con acetona y éter de petróleo presenta el inconveniente de que la acetona absorbe al UV y en el éter de petróleo se extraen tanto la fracción grasa como los capsaicinoides, el disolvente empleado para la extracción debe ser metanol.
2. El uso de carbón activado que se propone en la metodología de una experiencia previa⁷ para eliminar el color no es recomendable debido a que presenta cierta afinidad por los capsaicinoides y no permite una adecuada cuantificación.
3. Los capsaicinoides presentan su $\lambda_{\text{máx}}$ a 281 nm, pero cambia dependiendo del tipo de chile en el que se encuentren, la variación es debido a que los capsaicinoides se encuentran en diferentes medios.
4. La columna de extracción en fase sólida que retiene la fracción de ácidos grasos y permite la cuantificación de los capsaicinoides, es la Bakerbond spe Amino (NH₂) de la marca J.T. Baker®.

5. El pericarpio y la placenta contienen mayor concentración de capsaicinoides que las semillas.

6. La metodología propuesta es la siguiente: Pesar 1 g de muestra en un matraz de 50 mL, agregar 25 mL de metanol y agitar durante 15 minutos, filtrar; tomar 1 mL del filtrado y aforar a 10 mL, acondicionar la columna de EFS en el Manifold, agregando metanol y dejándolo que humedezca al adsorbente por 10 minutos, cambiar el disolvente de acondicionamiento por el extracto (es importante mantener el disolvente húmedo), pasar a través de la columna el extracto y leer en el espectrofotómetro a la longitud de onda correspondiente con el tipo de chile que está analizando.

7. El método propuesto es eficiente para cuantificar capsaicinoides sin la interferencia de la fracción de ácidos grasos.

8. De acuerdo a los análisis realizados el chile que presentó mayor concentración de capsaicinoides fue el chile chipotle.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castro Cid del P. V., Determinación de Capsaicina en algunas variedades Mexicanas de Capsicum Tesis Licenciatura, UNAM, México D.F., pág. 8 – 16. 1979.
2. Guzmán M., S., Torres P., I., (2004). Análisis preeliminar de compuestos fenólicos y Capsaicinoides en variedades de chile con diferente capacidad pungente. 1ª Convención Mundial del Chile 2004, Memorias. Págs. 115 – 122.
3. Menéndez L., Lastra A., (2004). The analgesic effect induced by capsaicin enhanced in inflammatory states., Life Sciences 74 ; 3235 – 3244.
4. Duffy, V. B., Zogbaum, A. T., (1997). Oral analgesia with topical capsaicin in cancer patients: A tool for medical nutrition therapy. J. American Diet. Assoc. 97, 9,1. Pág. A26.
5. Castillo, E., Torres-Gavilán, A., (2006). Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues. Food Chemistry., doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.026.
6. Spicer, O., Almirall, J., (2005). Extraction of capsaicins in aerosol defense spray from fabrics. Talanta 67. Págs. 377 – 382.
7. Valdés Velázquez Juan Fco., Determinación espectrofotométrica (UV) cuantitativa de capsaicinoides en materias primas pungentes utilizadas en confitería. Tesis Licenciatura, UNAM, México D.F., Pág. 1 – 77, 2004.

8. Bachelot, J.D., Bradley T.J., (2000). Determination of the Scoville heat value for hot sauces and chillies: An HPLC experiment. Department of chemistry, Wake Forest University Winston. Journal. Chem. Education. Vol. 77, No 2.
9. Woodbury J. E., (1980) Determination of Capsicum pungency by High-Pressure-Liquid-Chromatography and Spectrofluometric Detection., J Assoc. Off. Anal. Chem., vol. 63, No. 3. 1980.
10. Ramírez Ch. C., Chile (*Capsicum annum*) Ensayo Bibliográfico. Tesis Licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), IPN, México D.F., pág. 6. 1993.
11. Moreno M, A., Extracción supercrítica de colorantes y capsaicina de *Capsicum annum*. Tesis. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), México D.F., pág. 4, 5, 7 – 10, 17 – 30. 2000.
12. Chapman, D. Exedra. Lípidos. Ed. Alhambra. Madrid, España. Pág.42 – 43. 1973.
13. Krajewska, A., Powers, J., (1988). Sensory properties of naturally occurring capsaicinoids. Journal Food Science 53-3. págs. 902 – 905.
14. Trejo G. A. y Wild A. C., (1973). A New Method for the Determination of Capsaicin in Capsicum Fruits. Journal Food Science, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Sección de Alimentos, I. P. N., Vol.38, Pág. 342 – 344.
15. Chanda, S., Erexson, G., (2004). Genotoxicity studies with pure trans-capsaicin. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. Mutation Research 557. págs. 57 – 97.

- 16.**Rios M., V. M. Capsaicina en frutos del género Capsicum. Tesis Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México D. F., págs. 17 – 20. 1969.
- 17.**Quattriocchi, O., Abelaira de Andrizzi, S., Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Editado por Merck, S. A., Argentina, págs. 211 – 218. 1992.
- 18.**Morris Z., Ruthann K., Solid Phase Extraction for Sample Preparation., J.T. Baker Inc., 1994. Págs. 1 – 55.
- 19.**J. T. Baker Chromatography Product Page. Aminopropyl Bonded Silica Gel (column)., <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/Z7088.htm>, 12/12/05, 14:59.
- 20.**Ramírez Maya E.M., Nuevo método por espectrofotometría UV con segunda derivada para la determinación de ácido ascórbico en jugos de fruta procesados., Tesis Licenciatura, UNAM, México D.F., 2002. Pág. 33 – 36.
- 21.**Skoog D A, West D M, Química Analítica, Mc Graw Hill, Septima edición, México, 2000., Pág. 609.
- 22.**Skoog H.D.A., James F.H., Nieman A.T., Principios de Análisis Instrumental, Mc Graw Hill, quinta edición, México., Año 1998 Pág. 322 – 336.
- 23.**Silverstein R. M., Spectrometric Identification of Organic Compounds., 5ª Edición. John Wiley and Sons inc.,1991., Pág. 289 – 295.
- 24.**Matissek, R., Análisis de Alimentos. Ed. Acribia, S. A., Zaragoza, España. Cap. Lípidos. 1992.
- 25.**Perucka I., Wieslaw O., (2000). Extracción and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper Capsicum annum L. by spectrophotometry and high-

performance liquid chromatography., Food Chemistry, vol. 71, págs. 287 – 291.

- 26.** Spielvogel, B. F., Vyakaranam, K., (2001). A novel protonated boranoamino acid amide derivate, $(\text{CH}_3)_3\text{N}\cdot\text{BH}_2\text{C}(\text{OH})=\text{N}^+\text{HC}_2\text{H}_5\text{Cl}^-$: A synthetic and structural investigation. In. Chem. Com. 4. págs. 336 – 338.