



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUATITLÁN

CONTENIDO Y ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE DE PIMIENTOS (C.
Annuum) DE DIFERENTE COLOR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

LICENCIADA EN QUÍMICA INDUSTRIAL

PRESENTA:

ERIKA MARCELA MONTES DE OCA RIVAS

ASESOR: DR. FEDERICO GARCÍA JIMÉNEZ
CO-ASESOR: DRA. OFELIA COLLERA



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.

Agradecimientos:

A través de la elaboración de esta tesis he descubierto lo afortunada que soy al estar rodeada de amigos que con su apoyo y buen humor hicieron más ameno no sólo este trabajo, sino mi vida.

Luz, Jacobo y Santiago, no sé que haría sin ustedes.

También estoy en deuda con el personal del Instituto de Química, en donde pasé largo tiempo. En especial agradezco la paciencia, apoyo y guía de Carmen Márquez, Virginia Gómez, Rocío Patiño y Eréndira García Ríos.

A mis asesores Dr. Federico García, su esposa Yolanda Castells y a la Dra. Ofelia Collera Zúñiga por su confianza y apoyo.

A mis padres, los amo y les agradezco.

Contenido y Actividad Antioxidante de Pimientos (*C. Annuum*) de Diferente Color

Índice

Glosario de siglas empleadas	3
Resumen:	4
Objetivo:.....	5
Problema a resolver	5
Hipótesis	7
Introducción	8
Espectroscopía Raman.....	9
<i>Resonancia Raman</i>	10
Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	16
Resonancia paramagnética electrónica.....	18
Teoría de los radicales libres	25
<i>Cromatógrafo de gases</i>	27
Micro-extracción en fase sólida	29
Antecedentes del <i>Capsicum annuum</i>	31
<i>Variedad a estudiar</i>	37
Composición	39
<i>Carotenoides</i>	39
<i>Capsaicinoides</i>	42
<i>Compuestos volátiles</i>	43
<i>Vitaminas</i>	45
<i>Glicolípidos</i>	46
<i>Flavonoides</i>	47
Procedimiento experimental.....	49
<i>Obtención de los espectros Raman</i>	49
<i>Extracción de carotenoides</i>	50
<i>Obtención de espectros de RPE de muestras sólidas</i>	51
<i>Preparación de especies radicales</i>	52
<i>Obtención de las Extracciones Etanólicas para RPE</i>	52

<i>Procedimiento RPE</i>	53
<i>Determinación de los Compuestos volátiles</i>	55
Resultados.....	58
Espectros Raman	58
Identificación de carotenoides	62
Espectros de RPE.....	70
Determinación de la actividad antioxidante	71
Determinación de las Condiciones para la Micro Extracción en Fase Sólida	74
Discusión	75
Conclusión	79
Bibliografía, Ciberografía y Hemerografía.	80

Glosario de Siglas Empleadas

CONAPROCH	Consejo Nacional de Productores de Chile
DPPH	1,1-difenil-2-picril hidracilo
EPR	Electronic Paramagnetic Resonance
IR	Infrarrojo
MEFS	Micro-Extracción en Fase Sólida
ROS	Reactive Oxygen Species
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
SPME	Solid Phase Micro Extraction
TEMPOL	4-hidroxi -2,2,6,6 - tetrametilpiperidina 1-oxil

Resumen:

Los antioxidantes son sustancias que cuando se presentan en bajas concentraciones con respecto a aquellas de un sustrato oxidable mitiga considerablemente o previene la oxidación de dicho sustrato. Generalmente son sustancias coloridas debido a la conjugación de sus dobles enlaces, en el caso de los colores de los pimientos se deben a la concentración de carotenoides. Es decir, el color del pimiento morrón (rojo, verde, amarillo y naranja) puede estar relacionado con la actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se evaluó mediante la magnitud de la desaparición de las especies radicales activas DPPH y TEMPOL en presencia de los extractos de pimiento, siendo el pimiento verde el que presentó mayor actividad antioxidante.

Se identificaron los carotenoides y, según el caso, sus respectivos isómeros a través de HPLC con arreglo de diodos, siendo algunos de ellos: anteraxantina, auroxantina, criptoxantina, crocetina, fitoeno, fitoflueno, licopeno, luteína, neoxantina, pirroxantina, violaxantina, zeaxantina, α -caroteno, β -caroteno, β -zeacaroteno y ϵ -caroteno.

Se determinaron los siguientes compuestos volátiles con micro extracción en fase sólida (MEFS-CG-EM): 1-isopropil-4-metilbenceno, 2-etilfenil-2-oxo propanamida, 4-(2,6,6-trimetil-ciclohex-2-en-1-il)-but-3-enol, 5-(hidroxiamino) pentanol, 5-metil-2-(1-metiletil)-ciclo hexanol, ácido *p-tert*-butilbenzoico, adenosina, butanal, ciclohexadienona, etoxiacetaldehído, fenilacetaldehído, hexanal, octanal, pentanal, propanal y tetrametilpirazina.

Objetivo:

Identificar la presencia de compuestos carotenoides en pimientos de coloración rojo, naranja, amarillo y verde, mediante espectroscopía Raman y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Determinar la actividad antioxidante con el empleo de radicales estables: DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) y Tempol (4-hidroxi -2,2,6,6 – tetrametil piperidina 1-oxil).

Estudiar la composición de los compuestos volátiles de estos pimientos.

Problema a Resolver

El conocer la composición de los alimentos se ha convertido en una exigencia para mantener la salud humana así como realizar programas de siembra y de procesamiento industrial. El proceso de búsqueda y evaluación que permite identificar, seleccionar y aislar los componentes que pueden ser de valor comercial se denomina bioprospección [28].

Uno de los problemas de la economía mexicana es la presencia de productos de origen chino que ingresan al país de manera ilegal. El contrabando incluye productos agropecuarios entre los que se encuentran los chiles. El CONAPROCH establece que en 2005 se importaron a México 45 mil toneladas de chiles de India y China, cuando en el país se produjeron 70 mil toneladas.

Durante el segundo semestre de 2006, campesinos del estado de Puebla protestaron por la importación ilegal de alrededor de 7000 toneladas de chiles procedentes de la República Popular China y Corea del Sur [53].

Además de China naciones como Chile, Perú y Ecuador han tratado de sacar algunas especies del país para registrarlas por lo que existe el riesgo de que puedan solicitar regalías. Dicho riesgo ha llevado a buscar protecciones que impidan

reproducir las variedades mexicanas en otros territorios. Entre estas protecciones esta la denominación de origen.

Actualmente el chile habanero mexicano busca la denominación de origen que lo distinguirá como el de mayor contenido de capsaicina. Estableciendo que esta variedad es sólo de México y delimitando la región exclusiva en la que crece, lo cual proporcionará una ventaja competitiva frente a China e India.

La marca, que es el paso previo a la denominación de origen, fue otorgada por el Instituto Mexicano de Propiedad Industrial de manera que sólo cinco miembros de la Asociación de Productores de Chile Habanero de Yucatán tienen el derecho exclusivo a usar esta marca en productos hechos a base de esta variedad ^[51].

Hipótesis

Se sabe que los pimientos son fuente de vitaminas E y C así como de carotenoides con valor de pro-vitamina A. También contienen compuestos fenólicos y flavonoides. Se conoce que estos compuestos presentan actividad antioxidante, es decir, pueden reducir los productos de oxidación dañinos para el cuerpo humano. Los colores de los pimientos se deben a la concentración de los compuestos mencionados, de esta manera el color del pimiento morrón puede estar relacionado también con la actividad antioxidante.

En este estudio se busca relacionar el contenido de carotenoides con el color (rojo, verde, amarillo y naranja) para establecer si este está relacionado con la actividad antioxidante de los pimientos.

Introducción

Antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, gallatos propílicos y *tert*-butilhidroquinona son empleados comúnmente en la industria alimenticia por su eficiencia y bajo precio. Sin embargo, el creciente interés de los consumidores en la toxicidad de los conservadores alimenticios ha creado la necesidad de identificar fuentes naturales y confiables de antioxidantes alimenticios [37]. Por ejemplo, al aceite de ajonjolí contiene 10% de un antioxidante relacionado con la vitamina E. Esto ha sido determinado en el Instituto de Química de la UNAM mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

En este contexto las frutas y verduras son materias primas favorables para obtener extractos ricos en compuestos con antioxidantes [37].

Los métodos de control de calidad actuales de las legumbres se rigen por la pureza visual (uniformidad de tamaño, forma y color típico del cultivo, firmeza y ausencia de defectos tales como grietas y quemaduras de sol [18]) y el estado microbiológico (pudriciones). Sin embargo, este control de calidad resulta insuficiente, pues no proporciona información de los compuestos con aroma y sabor que son el verdadero valor del chile como condimento [36].

Su consumo se incrementa en Europa y la India, por lo que se requieren de métodos simples de control de calidad. Sin embargo el análisis de los carotenoides resulta complicado de manera inherente. Los métodos desarrollados emplean disolventes para la extracción, sustancias cáusticas para su saponificación [49] e instrumental costoso (espectrofotometría, espectroscopía de masas, cromatografía de gases-líquidos o cromatografía de líquidos de alta resolución) [65] para su separación e identificación.

A continuación se describen los fundamentos de las técnicas empleadas para la identificación de los compuestos carotenoides, la determinación de la actividad antioxidante y de los compuestos volátiles en los pimientos.

Espectroscopía RAMAN

La espectroscopía RAMAN se fundamenta en la irradiación de una muestra (sólida, líquida o gas) a una longitud de onda determinada y la observación de la energía emitida por aquella a una longitud de onda mayor de acuerdo con un espectro de emisión característico para dicha molécula. Este espectro se observa generalmente en la región del infrarrojo (666 cm^{-1} a 3500 cm^{-1}).

La interacción entre la radiación electromagnética y los electrones provee las herramientas para el estudio de las propiedades estructurales y electrónicas de las sustancias ^[39]. De esta manera el método RAMAN es una técnica no destructiva que puede utilizarse *in vivo* e *in situ* para la determinación de carotenoides ^[57].

Considere la vibración de una molécula diatómica en la que dos átomos están enlazados químicamente, siendo m_1 y m_2 las masas de los átomos 1 y 2, y r_1 y r_2 las distancias desde el centro de gravedad (C.G.) a los átomos designados. De esta manera $r_1 + r_2$ es la distancia en equilibrio y x_1 y x_2 son los distanciamientos de los átomos de sus posiciones de equilibrio.

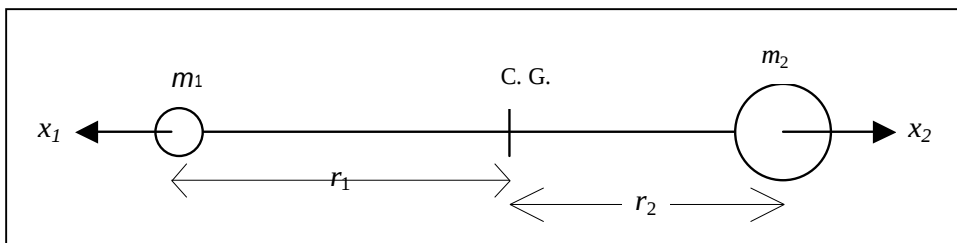


Fig. 1 Vibración de una molécula diatómica

Se considera que el enlace químico es como un resorte que obedece la ley de Hooke. Los átomos vibran con una frecuencia que depende de las masas y de la fuerza del enlace. Así, las vibraciones de cada molécula tienen frecuencias características.

El origen del espectro Raman es muy diferente al de IR. En la espectroscopía Raman la muestra es irradiada por un rayo láser intenso en la región UV-Vis (ν_0) y la fluorescencia se observa en una posición perpendicular respecto al haz incidente en la región del espectro infrarrojo [23].

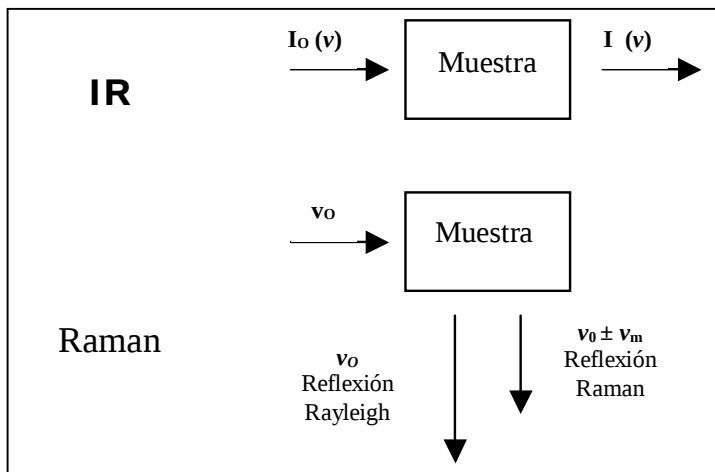


Fig. 2 Diferencias en la Obtención de Espectros Raman e IR

El haz reflejado consiste de dos tipos:

- 1) La dispersión Rayleigh, la cuál es fuerte y tiene la misma dirección que el haz incidente (ν_0) y la otra denominada
- 2) Dispersión Raman, la cuál es muy débil ($\approx 10^{-5}$) y tiene las frecuencias $\nu_0 \pm \nu_m$ dónde ν_m es la frecuencia vibracional de una molécula. Las líneas $\nu_0 - \nu_m$ y $\nu_0 + \nu_m$ son llamadas de Stokes y anti-Stokes respectivamente.

De esta manera en la espectroscopía Raman se mide la frecuencia vibracional (ν_m) como un aumento en la frecuencia del rayo incidente (ν_0) [30].

Resonancia Raman

Ocurre cuando una muestra es irradiada con una energía que corresponde a la de la transición electrónica de un grupo cromóforo particular. Bajo estas condiciones, las intensidades de las bandas Raman originadas en este cromóforo son aumentadas selectivamente [30].

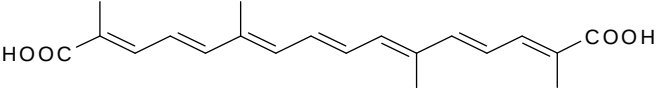
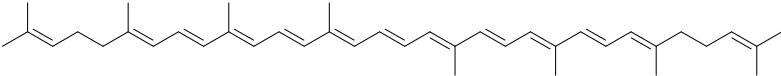
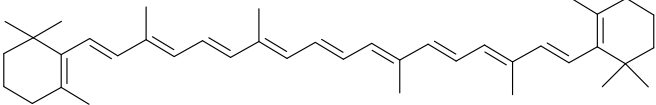
En el espectro Raman los carotenoides dan dos bandas intensas cerca de 1525 cm^{-1} y 1155 cm^{-1} atribuidos a la contracción de los enlaces conjugados ($\text{C}=\text{C}$ y $\text{C}-\text{C}$, respectivamente) en la cadena central como se puede observar en las figuras 3 y 4. La posición de la longitud de onda (ν_1) de la primera banda se relaciona con la longitud de la cadena poliénica. Existe una correlación lineal razonable entre ν_1 y $(N + 1)^{-1}$ donde N es el número de dobles enlaces conjugados en la cadena principal [67]. Así carotenoides con 11, 9, 8 y 7 dobles enlaces conjugados tienen sus bandas características alrededor de 1510, 1525, 1530 y 1536 cm^{-1} respectivamente.

Las bandas se emplean para la identificación, aunque esta longitud de onda puede verse ligeramente influenciada por los grupos adyacentes a los carotenoides y su unión a otros constituyentes de las plantas [4] mediante la formación de ésteres.

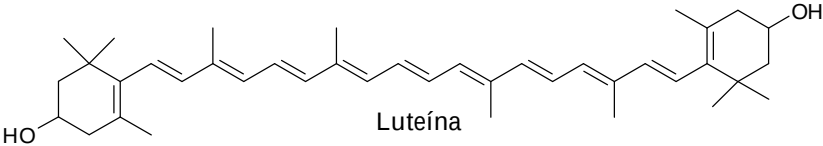
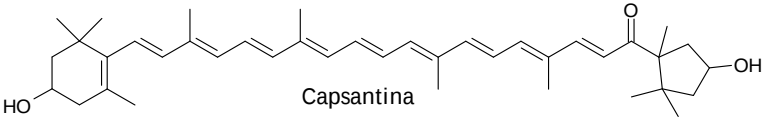
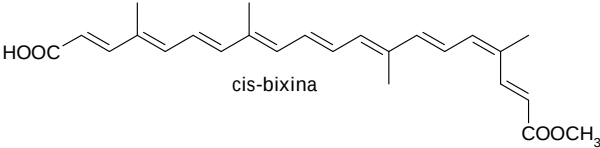
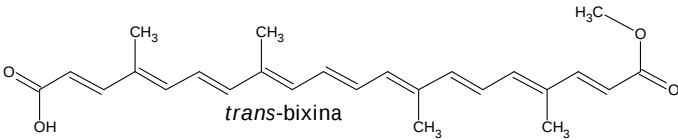
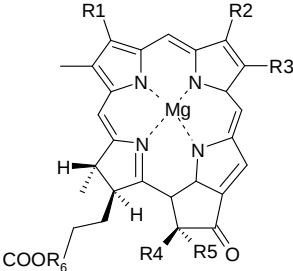
Se han reportado espectros Raman con máximos entre 1517 a 1526 cm^{-1} atribuibles a vibraciones de estrechamiento de las cadenas conjugadas poliénicas de nueve átomos de carbono pertenecientes a los carotenoides [4]. Así las bandas en el espectro Raman probables para los pimientos [3, 59 y 60] se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Bandas Raman para los posibles carotenoides en pimientos

Compuesto	Señal Raman (cm ⁻¹)
 Crocetina	1536
	1165
	1020
 Licopeno	1510
	1156
	1004
 β -caroteno	1524
	1157
	1009

Continuación de Tabla 1

 Luteína	1527
	1157
	1004
 Capsantina	1517
	1158
	1004
 cis-bixina	1518
	1154
	1007
 trans-bixina	1523
	1155
	1008
 Clorofilas (porfirinas)	1606, 1327, 1286, 740.

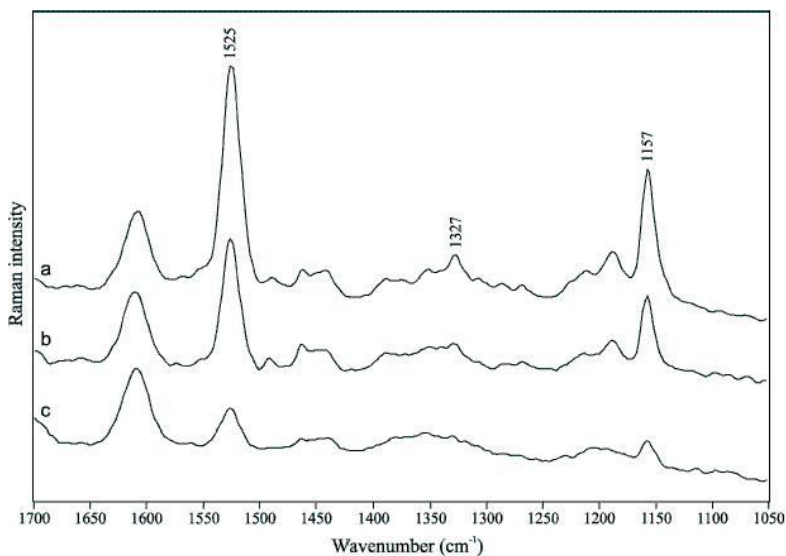


Fig. 3 Espectro NIR-FT-Raman del tallo de *Pelargonium*. **a)** parte central rojo oscuro, **b)** cerca de borde del tallo **c)** tejido verde. Las bandas de carotenoides (1525 y 1157 cm⁻¹) y clorofilas (1327 cm⁻¹) están señaladas ^[4]

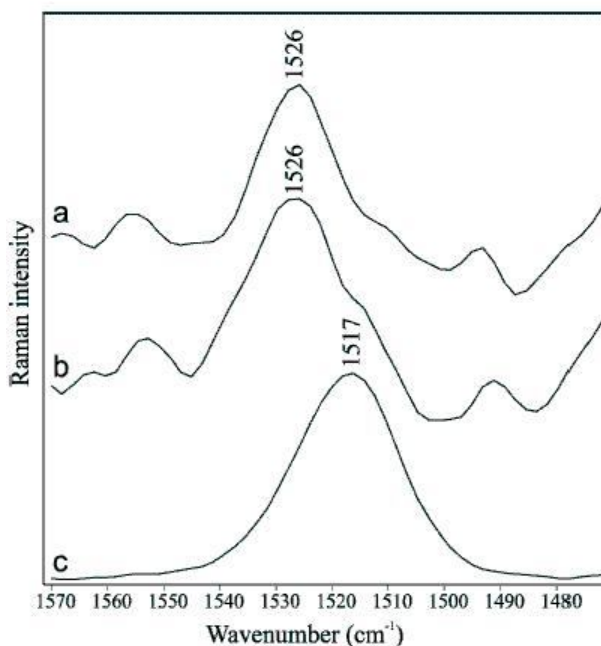


Fig. 4 Espectro NIR-FT Raman de pimiento **a)** verde **b)** verde claro y **c)** rojo. Se muestran luteína (1526 cm⁻¹) y capsantina (1517 cm⁻¹) ^[4]

Entre las aplicaciones de la espectroscopía Raman se han realizado diversos análisis de tejidos biológicos *in situ*, por lo que se analiza la posibilidad de realizar diagnósticos biomédicos en diversos tejidos como córneas, constituyentes de la sangre, colon, hueso para la detección de arterioesclerosis, cáncer y degeneración macular progresiva ^[40].

La sensibilidad de la espectroscopía NIR-FT-Raman es menor en comparación a otras técnicas analíticas, sin embargo en el caso de los carotenoides el límite de detección de esta técnica es incrementado por el aumento de señal causado por el efecto de pre-resonancia del analito. Por este motivo su empleo en la identificación de carotenoides es posible con el apoyo de otras técnicas analíticas como la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) no es un nuevo tipo de cromatografía sino la optimización de los efectos cinéticos. Como consecuencia pequeñas partículas uniformes con porosidad controlada son indispensables, de otra forma la alta presión resultante hace necesario un sistema cerrado.

La purificación cromatográfica es un paso esencial que precede la caracterización de un carotenoide. El comportamiento cromatográfico en HPLC provee la información acerca de la polaridad de los carotenoides relativa a uno o más carotenoides de estructura conocida, así se puede situar a un caroteno, mono-ol, diol o a un carotenoide más polar con funciones mono-ácido y di-ácido.

Como hidrocarburos los carotenos son no-polares. Un aumento en la polaridad puede atribuirse a la presencia de grupos funcionales con oxígeno, siendo la mayor influencia la de los grupos hidroxilo, glicósilo, carboxilo, α -dicetonas y β -dicetonas enolizadas, fenoles o grupos ionizados como sulfato [7].

Debido al intenso color de los carotenoides, su detección en la región del visible es el mejor método. Los sistemas de detección de arreglo de diodos permiten la detección simultánea a varias longitudes de onda, registrándose simultáneamente durante la corrida de un cromatograma [56].

Los componentes esenciales de un espectrofotómetro son:

Fuente luminosa: la lámpara es usualmente de deuterio para la región UV (180 – 400 nm) y para la visible (arriba de 400 nm) es de filamento de tungsteno, tungsteno-halógeno o yoduro.

Medios de dispersión de luz: Se realiza convencionalmente a través de un prisma o una gradilla de difracción. Un conjunto de medios mecánicos permiten que la longitud de onda de la luz que incide sobre la muestra varíe con el tiempo.

Detector: Después de que la luz pasa a través de la muestra, la luz esencialmente monocromática es recibida por un detector, que es usualmente algún tipo de tubo

fotomultiplicador de electrones, que monitorea la intensidad de la luz transmitida a cada longitud de onda.

Un diseño alternativo esta basado en la detección por arreglo de fotodiodos acoplado con HPLC. En este caso la luz de todo el rango espectral incide sobre la muestra, y la luz transmitida es entonces dispersada. La luz con todas las longitudes de onda cae sobre el arreglo de diodos simultáneamente, pero el arreglo esta posicionado de manera que cada diodo recibe una onda banda muy estrecha. La respuesta de todos los fotodiodos se recolecta simultáneamente, de esta manera un espectro completo puede ser registrado en muy poco tiempo (milisegundos) [7].

Con este sistema se obtiene el espectro de absorción UV-Vis que permite su identificación. El sistema de dobles enlaces conjugados de los carotenoides provee un espectro de absorción con tres picos, con una longitud de onda ($\lambda_{\max}$) y forma características, la estructura fina del espectro se describe con la relación de intensidades $\%III/II$ [52]. También es probable observar otro máximo en la región entre 320 y 380 nm, llamado "pico *cis*" pues aparece cuando hay una estereoisomerización *trans* $\rightarrow$ *cis* [71 y 72]. Suele asumirse que estos isómeros no ocurren en la naturaleza, pues dicha isomerización se observa cuando los carotenoides se exponen a altas temperaturas o por catálisis con yodo, aunque se han observado series de carotenoides del tipo *cis* en algunas frutas [72].

Se sabe que los compuestos carotenoides presentan actividad antioxidante, para medirla se puede utilizar la resonancia paramagnética electrónica.

Resonancia Paramagnética Electrónica

La resonancia paramagnética electrónica (RPE) es la absorción de ondas electromagnéticas (del dominio de las microondas) que interactúan con el momento magnético de los electrones libres de la muestra (interacción magnética por tanto) siendo necesaria la aplicación de un campo magnético externo, H ^[53], para que se produzca.

El proceso de resonancia ocurre cuando una excitación externa a un sistema varía con la frecuencia propia de dicho sistema. En estas condiciones se produce una respuesta amplificada del sistema, que absorbe potencia de la excitación.

Las aplicaciones de la RPE son numerosas y se extienden a diversos campos de la investigación. En principio, la posesión de un momento neto de espín electrónico es la única condición necesaria de un material para poder ser estudiado por RPE. Son numerosos los sistemas que satisfacen esta condición:

- Radicales libres, en estado sólido, líquido o gaseoso.
- La mayoría de los iones de elementos de transición y tierras raras.
- Defectos en los cristales iónicos.
- Electrones de conducción en los semiconductores.
- Bi-radicales, sistemas en estado triplete, etc. ^[54]

Una distinción especial en el proceso de interacción es la que existe entre los casos de intercambio energético entre radiación y materia (inelástica) y aquellos en que tanto una como otra permanecen en el mismo estado tras la interacción (elástica). Entre las interacciones inelásticas se encuentra la RPE, que proporciona información sobre los distintos estados energéticos de la materia.

Los intercambios de energía de radiación y materia (cuantos) describen la radiación dentro de un conjunto discreto de niveles energéticos. La energía intercambiada permite clasificar el tipo de espectroscopía dentro del cuadro general de la interacción electromagnética inelástica.

Podemos describir 3 posibles procesos de interacción inelástica:

- *absorción* de un fotón con transición de la materia a un nivel energético superior (IR, VIS, UV, etc.)
- *emisión espontánea* de un fotón al tiempo que la materia desciende a un nivel energético inferior (típico de fluorescencia y desintegración radioactiva)
- *emisión estimulada* por la interacción con un fotón incidente de la misma energía. En este caso el fotón emitido lo es en la misma dirección y con igual fase que el incidente produciéndose un haz de interacción coherente.

El proceso físico que da origen a la separación entre niveles energéticos en la materia es el *efecto Zeeman* o de interacción entre un campo magnético externo y el momento de los electrones (o núcleos en RMN) cuyo valor es siempre cercano a $1 \mu_B$ (magnetón de Bohr) = $9.27 \times 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$. Esta energía depende del campo aplicado, pero es del orden de: $\Delta E \approx 1 \mu_B \times 1 \text{ Tesla} \approx 10^{-4} \text{ eV} \approx 1 \text{ cm}^{-1} \approx 1 \text{ K}$ para electrones en un campo magnético de 1 Tesla = 10,000 Gauss.

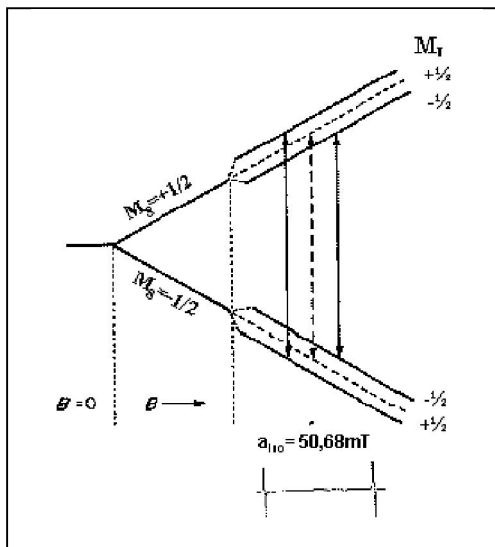


Fig. 5 Desdoblamiento de los niveles Zeeman del átomo de hidrógeno por el momento magnético nuclear. Existen solamente dos transiciones, por tanto el espectro RPE está compuesto por dos líneas resonantes [54].

La interacción de los momentos magnéticos con un campo externo constante produce un cambio de la energía del sistema y da origen al paramagnetismo, el cual supone la respuesta a un campo estático B_0 . Ahora se pueden inducir transiciones

entre los estados de espín paralelo y anti-paralelo mediante la aplicación de radiación electromagnética de frecuencia adecuada (ω_0) es decir aquella que cumple con la condición de resonancia a la que se produce absorción de energía al estar más poblado el nivel de menor energía.

La respuesta de un momento magnético, es típica de otros sistemas resonantes en que una pequeña excitación recibe una gran respuesta. Quizá el sistema resonante más sencillo sea el oscilador formado por una masa m suspendida de un resorte cuya constante recuperadora representamos por K y x el desplazamiento cuando se aplica una fuerza.

Un sistema paramagnético no posee un campo magnético resultante, pero adquiere un momento magnético en la dirección de un campo aplicado cuyo tamaño es función del campo. Dicho momento resulta en parte de los dipolos inducidos por un cambio en el movimiento de los electrones constituyentes de cada átomo o ión.

Los átomos o iones de las sustancias paramagnéticas tienen momentos magnéticos permanentes de magnitud atómica o nuclear. En ausencia de un campo magnético externo los dipolos están orientados al azar, pero la aplicación de un campo resulta en la redistribución de esas variadas orientaciones de manera que la sustancia adquiere un momento magnético neto ^[1].

Esta es la situación más habitualmente encontrada en el caso de átomos libres, con la excepción de los gases nobles o de átomos como Be o Zn. En estos casos el número de electrones es par y en el estado fundamental, los electrones llenan los orbitales de energía. Los iones de metales de transición son generalmente paramagnéticos en virtud de que poseen orbitales d parcialmente llenos. Los espectros RPE de iones d^5 se caracterizan por bandas espectrales con $g_{\text{eff}} = 2.0, 3.3$ y 4.3 . Sus intensidades relativas varían con la estructura y composición.

El átomo de hidrógeno es un ejemplo de un átomo paramagnético cuyo estado fundamental $2s$ es un doblete ligado a las dos componentes $m = \pm \frac{1}{2}$ del espín del electrón. Si se introduce un campo magnético H se produce una separación de ambos estados, como se indica en la figura 5.

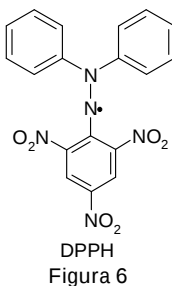
El paramagnetismo aparece siempre que un átomo, molécula o sistema más complejo presenta un número impar de electrones, por lo que alguno de ellos esta desapareado. No obstante cuando los átomos se agregan para dar lugar a moléculas se facilita el apareamiento de los electrones dando lugar a un estado singulete y por tanto a la ausencia de paramagnetismo. De este modo moléculas como H_2 , N_2 o F_2 no son paramagnéticas, aunque los átomos H, N y F sí lo sean.

La obtención de un espectro de RPE precisaría de tres componentes esenciales: una fuente de radiación electromagnética una muestra y un detector. Variando la frecuencia electromagnética y midiendo con el detector la cantidad de radiación que pasa a través de la muestra, registraríamos el espectro deseado.

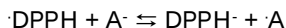
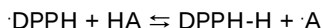
En la mayoría de los equipos la fuente de radiación electromagnética y el detector se hallan en un accesorio que se denomina *punto de microondas*. La muestra se coloca en el interior de la *cavidad*, una caja metálica que permite amplificar las débiles respuestas que proporciona la muestra. La cavidad se sitúa entre los polos de un electroimán, que permite ajustar la diferencia energética entre los niveles electrónicos a la frecuencia de la radiación incidente. Finalmente se dispone de un bloque de control que permite coordinar las diferentes unidades y registrar los datos de salida.

Las especies radicales activas para evaluar la actividad antioxidante se generan inmediatamente antes de las mediciones en RPE de la mezcla del extracto con DPPH y TEMPOL. La magnitud de la desaparición de los radicales en la presencia del extracto permite evaluar la habilidad de secuestrar a los radicales (actividad antioxidante) por parte de los extractos de pimiento.

El DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo, fig. 6) es un radical estable capaz de aceptar electrones (o un radical $H\cdot$) de radicales activos, formando un producto estable e irreversible comportándose así como un secuestrador de radicales.



Adicionalmente el DPPH actúa como un aceptor de electrones de antioxidantes (HA) y permite la transferencia de electrones en reacciones con fenoles y aminas, entre otros compuestos:

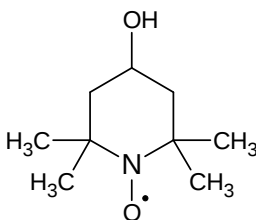


El radical $\cdot\text{A}$ del antioxidante formado en la reacción con DPPH puede ser a veces observado por RPE (e.g. el radical tocoferoxil puede ser generado por este método) pero generalmente su concentración es baja. La disminución del DPPH puede cuantificarse por espectroscopía UV/visible ($\lambda_{\text{máx.}} = 520$), así como con HPLC.

De acuerdo a investigaciones previas, la actividad antioxidante de compuestos fenólicos está determinada por su estructura, la posición y grado de hidroxilación en la estructura del anillo. Se supone que la habilidad de los compuestos fenólicos para secuestrar al radical DPPH depende del potencial redox ^[50].

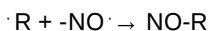
Se ha reportado que α -tocoferol, el ácido ascórbico y los carotenoides reaccionan con DPPH siendo el orden de actividad: carotenoides $\approx$ ácido ascórbico $>$ α -tocoferol, aunque la actividad de los carotenoides también se ve afectada por su estructura ^[44].

El TEMPOL (4-hidroxi -2,2,6,6 – tetrametil piperidina 1-oxil, fig. 7) es un radical nitróxido estable, usado ampliamente para investigar las propiedades de sistemas biofísicos y bioquímicos.



Tempol
Figura 7

Generalmente el TEMPOL puede determinar radicales producidos en organismos vivos, por ejemplo, se ha demostrado que la adición de TEMPOL puede proteger animales de laboratorio del daño asociado con condiciones de estrés oxidativo y nitrosoactivo [35].



Además el TEMPOL puede reducirse a una hidroxilamina silente en RPE siendo esta sustancia capaz de re-oxidarse nuevamente a un nitróxido paramagnético. De acuerdo a la literatura TEMPOL oxida de manera eficaz al ácido ascórbico [50].

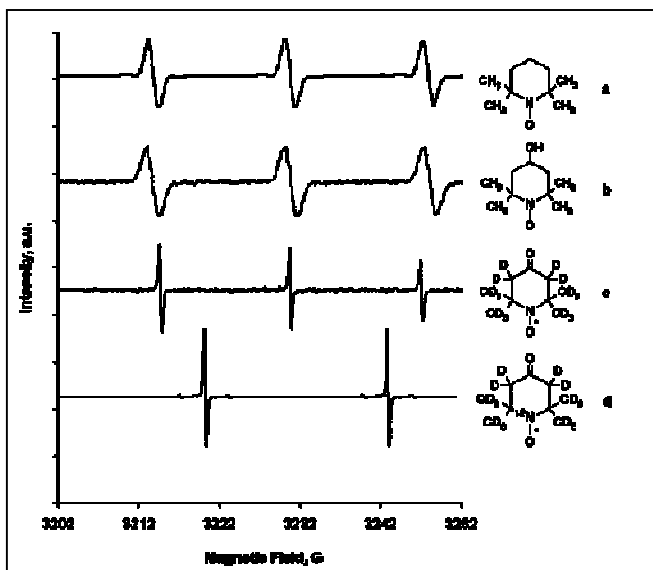


Figura 8 Estructura y espectros EPR de los nitroxidos en solución: **(a)** TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil), **(b)** TEMPOL (4-hidroxi-TEMPO), **(c)** perdeuterado - TEMPONE (4-oxo-TEMPO-D16), **(d)** 15N-sustituido-perdeuterado TEMPONE (4-oxo-TEMPO-D16-15N) ^[35]

La espectroscopía RPE representa una valiosa herramienta para evaluar las actividades antioxidantes. Los antioxidantes son sustancias que cuando se presentan a bajas concentraciones con respecto a aquellas de un sustrato oxidable mitigan considerablemente o previenen la oxidación de dicho sustrato ^[37].

La importancia de incluir alimentos con una alta actividad antioxidante en la dieta se explica con la Teoría del envejecimiento por radicales libres.

Teoría de los Radicales Libres

La teoría del envejecimiento por radicales libres fue propuesta por Denham Harman al observar que la radiación causa mutación, cáncer y envejecimiento. Harman argumentó que los radicales libres de oxígeno producidos durante la respiración (el metabolismo del oxígeno en la mitocondria y los peroxisomas ^[29]) causa daño acumulativo que eventualmente conducirá al mal funcionamiento de los organismos ^[15].

Para la mayoría de las estructuras biológicas el deterioro ocasionado por los radicales libres se debe a procesos de oxidación y se supone que provoca enfermedades, principalmente en los tejidos expuestos a la luz, como cáncer de piel, envejecimiento prematuro de la piel, desórdenes de fotosensibilidad o simplemente quemaduras de sol, al igual que enfermedades oftálmicas como cataratas y degeneración macular ^[24].

Los radicales de interés se denominan como especies reactivas de oxígeno, representadas por sus siglas en inglés ROS, porque los radicales más representativos contienen oxígeno, aunque también se reconocen especies con nitrógeno (RNS) y cloro (RCS). Existen radicales libres cloro ($\text{Cl}^\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), perhidroxilo ($\text{HO}_2^{\cdot-}$), óxido nítrico ($\text{NO}^\cdot$), peroxinitrito ($\text{ONOO}^\cdot$) y moléculas reactivas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) e hipoclorito y su base conjugada (HOCl , $\text{ClO}^\cdot$).

Las mayores fuentes de radicales libres son: trauma mecánico, luz y otras fuentes de energía, metales en las células, enzimas, xenobióticos, ejercicio exhaustivo y estrés psicológico. También son producidos por los alimentos que se consumen, induciendo la oxidación de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos ^[29].

La capacidad desigual de disipar a los radicales libres por las células hace necesario tener estrategias para contrarrestarlos. Las sustancias químicas encontradas en los alimentos son la base de varias intervenciones farmacológicas (terapia antioxidante) y en particular de la medicina ortomolecular ^[15].

El principal motivo del interés actual por los carotenoides es la formación de sus radicales al apagar a los radicales libres. Los procesos antioxidantes y pro-oxidantes se deben a dichas reacciones [22]. Por ejemplo, el comportamiento de licopeno, β -caroteno y luteína dependen de su concentración en las células, además su polaridad determina la orientación de los carotenoides en la membrana celular y su interacción con los intermediarios reactivos [24].

De igual manera, se ha observado que algunos radicales de carotenoides, como el β -caroteno⁺, reaccionan con las vitaminas C y E convirtiendo al radical en el carotenoide progenitor (reacción de "reparación"). Estas interacciones pueden relacionarse con los efectos sinérgicos de algunas combinaciones de antioxidantes [Error! No se encuentra el origen de la referencia.].

Los carotenoides pueden encontrarse en las plantas en forma degradada, siendo aquellos formados por cadenas de 9 a 13 átomos de carbono parte de los compuestos volátiles[26], que también pueden poseer actividad antioxidante. Al tratarse de compuestos con un bajo punto de ebullición se analizan por cromatografía de gases.

Cromatografía de Gases

Una mezcla de compuestos para ser analizados se inyectan en el CG en donde la mezcla es vaporizada en una cámara caliente. La mezcla de gases viaja a través de una columna de CG, donde los compuestos se separan a medida que interactúan con la columna. En el cromatograma resultante se observan picos resultantes de esta separación. Estos compuestos así separados entran entonces al espectrómetro de masas.

Un espectrómetro de masas crea partículas cargadas (iones) a partir de moléculas. Después analiza esos iones para brindar información acerca del peso molecular del compuesto y su estructura química.

Todos los espectrómetros de masas consisten de tres regiones distintivas:

1) Ionizador: Los iones necesarios para el análisis de masas son formados por impacto electrónico (EI, por sus siglas en inglés). Las moléculas de gas provenientes del CG son bombardeadas por rayo de alta energía (70 eV). Un electrón que impacte a una molécula puede impartir energía suficiente para remover otro electrón de esa molécula.

La ionización por impacto electrónico produce iones con una carga conteniendo sólo un electrón desapareado. Una molécula cargada que permanece intacta se denomina el ión molecular. La importancia de reconocer este pico es que proporciona el peso molecular del compuesto. La energía impartida por el impacto del electrón y la inestabilidad del ión molecular puede provocar que el ión se rompa en partes más pequeñas (fragmentos).

2) Analizador de iones. Los iones moleculares y fragmentos son acelerados por la carga de las partículas a través del espectrómetro de masas mientras que las moléculas y fragmentos sin carga son bombeados fuera. El cuadrupolo del analizador de iones emplea voltajes positivos y negativos para controlar la ruta de los iones. Los iones viajan a través de la ruta basados en su relación masa carga (m/z)

3) Detector: Existen varios tipos de detectores pero la mayoría funcionan produciendo una señal electrónica cuando colisionan con un ión. El analizador de

masas clasifica los iones de acuerdo a m/z y el detector registra la abundancia de cada m/z . La calibración regular de la escala m/z es necesaria para mantener la precisión del instrumento. La calibración se realiza al introducir un compuesto conocido en el instrumento y ajustar los circuitos para que el ión molecular y sus fragmentos se reporten de manera adecuada ^[64].

Una forma de obtener los compuestos volátiles para realizar la cromatografía de gases es con la micro-extracción en fase sólida.

Micro-Extracción en Fase Sólida

La Micro-Extracción en Fase Sólida (MEFS) es una técnica de adsorción / desorción desarrollada en 1990 por J. Pawliszyn en la Universidad de Waterloo, Ontario, Canadá.

La MEFS se basa en la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra (una fase estacionaria) desde el momento en que la fibra entra en contacto con la muestra hasta que se alcanza el equilibrio de distribución entre la fibra y la muestra.

Se obtiene una relación proporcional de los analitos adsorbidos por la fibra con la concentración inicial en la matriz. Por esta razón se considera un análisis proximal, aunque los resultados son comparables a los obtenidos por otras metodologías.

La fibra está unida a un émbolo de acero inoxidable instalado en un contenedor que parece una jeringa. El émbolo mueve a la fibra de sílice fundida dentro y fuera de una aguja hueca. Para utilizar la unidad, el analista ubica la fibra en la aguja, la aguja pasa a través del séptum que sella el vial de la muestra, y presiona del émbolo para exponer la fibra a la muestra (Fig. 18).

Después de que el equilibrio de adsorción se alcanza, por lo general de 2 a 30 minutos, la fibra se retrae en la aguja y se retira del vial. Por último, la aguja se introduce en el inyector del Cromatógrafo de Gases, donde los analitos adsorbidos son térmicamente desorbidos y llevados a la columna del CG, o en la interfaz MEFS / HPLC (fig. 18).

El tiempo de extracción está determinado por el lapso necesario para obtener extracciones precisas de los analitos con las constantes de distribución más altas. La constante de distribución en general aumenta con un mayor peso molecular y punto de ebullición del analito.

La selectividad puede ser alterada al cambiar el polímero que cubre la fibra o el espesor del revestimiento, de acuerdo a las características de los analitos de interés. En general, compuestos volátiles requieren un recubrimiento grueso y un recubrimiento fino es más eficaz para adsorber / desorber analitos semi-volátiles.

Para líquidos la cantidad de analito adsorbido por el recubrimiento en el equilibrio está directamente relacionada con la concentración del analito en la muestra dada la ecuación 1:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad \text{ec. (1)}$$

Donde n = masa de analito adsorbida por el revestimiento, C_0 = concentración inicial del analito en la muestra, K_{fs} = coeficiente de partición de analito entre el revestimiento y la matriz de la muestra, V_f = volumen del revestimiento V_s = volumen de la muestra.

La relación entre la concentración inicial de analito en la muestra y la cantidad de analito adsorbido por el revestimiento es lineal y al tener los recubrimientos fuertes afinidades para los compuestos orgánicos que están destinados a extraer y con una adecuada calibración, la MEFS se puede utilizar para determinar las concentraciones de analitos de interés en una muestra.

Además de cambiar el tipo de recubrimiento o espesor, un analista puede mejorar la recuperación del analito, o alterar la selectividad en favor de los compuestos más volátiles o menos volátiles, cambiando las condiciones de análisis: la adición de un electrolito a la muestra, cambiando el pH, muestreo del espacio superior en lugar de la inmersión en la muestra o viceversa.

La fibra es reutilizable. Los compuestos más polares (dimetilftalato y dietilftalato) exhiben una pobre recuperación en la fibra no polar de Polidimetilsiloxano. Una fibra con una fase de revestimiento polar (poliacrilato) se necesita para extraer de manera efectiva estos compuestos [63].

Antecedentes del *Capsicum Annuum*

Por otra parte, se trabajó con los carotenoides presentes en los pimientos cuyo nombre taxonómico es *Capsicum annuum*

En México, se conoce como *chile* al fruto de las plantas pertenecientes al género *Capsicum*, procedente de la palabra griega *kapto* que significa "morder" para aludir a su acritud.

El chile tiene una larga tradición cultural en México, se consume junto con el maíz y el frijol, desde hace más de 6,000 años ^[17]. Su trascendencia radica tanto en sus propiedades organolépticas (color, sabor y potencia como picante) así como en su valor nutricional.

El género *Capsicum* incluye a una gran cantidad de plantas, de 20 a 30 especies nativas de las regiones tropicales de América, de acuerdo con las investigaciones botánicas y etimológicas ^[48 y 66].

Los nombres comunes son ambiguos pues dependen de la región geográfica y la variedad. A los frutos picantes se les nombra *ají* en el Caribe y América del Sur, *páprika* (mejor conocida en polvo que como verdura fresca) en los Balcanes, *chile* en México y Centroamérica, mientras que los tipos "dulces" (de sabor muy diferente) se nombran como *pimiento morrón* y en inglés *bell* o *sweet pepper* ^[38] por ser las variedades de mayor consumo en países fuera de Latinoamérica.

En varias lenguas el *Capsicum* lleva un nombre relacionado con la pimienta. En inglés se llama *pepper*, en francés *piment enragé* o *poivre rouge*, en italiano *peperone*. En muchos escritos españoles del siglo XVI lo llaman "pimienta de las Indias" a pesar de no tener ninguna relación con la pimienta (*Piper nigrum*).

La confusión se originó en 1494, cuando Pedro Mártir escribió que Colón había encontrado "pimienta más picante que la del Cáucaso" ^[38], pues sintió la sensación picante que le provocaba la pimienta negra ^[12], a pesar de que su sabor es muy diferente, pues el principio picante de la pimienta es el alcaloide piperina ^[59] mientras que el del chile es la capsaicina.

La capsaicina además, es capaz de combatir las sustancias inflamatorias por lo que se ha empleado al chile en la medicina tradicional en contra del reumatismo ^[25].

Taxonomía del Género *Capsicum*

Reino: *Plantae*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Orden: *Solanales*
Familia: *Solanaceae*
Género: *Capsicum*

Las plantas se clasifican por la posesión o ausencia de varios caracteres, por lo que su reconocimiento depende de la combinación de los mismos. Los chiles presentan ciertos atributos comunes a la familia de las solanáceas (papa, jitomate, berenjena y tabaco) y otros específicos del género *Capsicum*: una antera dehiscente longitudinal o capsida (parte donde se almacena el polen capaz de abrirse para esparcir el polen o las semillas) ^[38, 47 y 61].

El género *Capsicum* fue denominado en el siglo XVI por los herbarios europeos y adoptado por J. P. Tournefort en su trabajo *Institutiones rei herbarie*, publicado en 1700 ^[38]. Es en "*Hortus Cliffortianus*" ("El Jardín de Clifford"; Ámsterdam, 1737) en el que Linneo describe, continuando con la denominación, dos especies de *Capsicum* (*C. annum* y *C. frutescens*) y en su "*Mantissa*" (1767) dos especies adicionales *C.grossum* y *C. baccatum* ^[61].

La clasificación del naturalista sueco Carl Linné (1707-1778) (castellanizado Linneo), considera a los estambres y la fructificación como los caracteres evaluables y obliga a que las especies sean conocidas mediante dos nombres: el primero es el de género; el segundo el restrictivo específico ^[33].

Sigue en uso la nomenclatura propuesta por Linneo ^[61], aunque la clasificación taxonómica es motivo de confusión entre los botánicos ^[14]. Se reconocen las siguientes especies de *Capsicum* por ser las más importantes económicamente ^[61]:

- *Capsicum annuum*
Etimología: *annuum* significa anual.
Variedades:
- *annuum* Incluye las variedades más comunes: jalapeño, páprika, chilpetín, poblano, cherry, campana, serrano y ancho
- *aviculare* es la variedad espontánea ^[38]
- *Capsicum frutescens*.
Etimología: *frutescens* significa matorral o arbusto.
Esta especie incluye el chile tabasco, el piquín y los chiles de árbol.
- *Capsicum chinense*.
Etimología: *chinense* significa de China
Esta especie incluye a los chiles más picosos, como el habanero y el scotch bonnet.
- *Capsicum pubescens*.
Etimología: *pubescens* significa velludo
Esta especie incluye al chile manzano y rocoto
- *Capsicum baccatum*.
Etimología: *baccatum* significa como moras.
Esta especie incluye al ají escabeche y amarillo, endémicas de Perú.
Variedades: - *pendulum*. - *baccatum*

Las especies a su vez poseen numerosas variedades generadas por diferencias en el clima, selección natural (variedades nativas o espontáneas), selección humana (variedades naturalizadas) y el tipo de suelo.

Las sociedades precolombinas domesticaron 5 especies de *Capsicum* (*C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. chinense*, *C. baccatum* L., y *C. pubescens*) independientemente y en localidades separadas geográficamente de América ^[5 y 66] que permanecen especulativas, pero las evidencias arqueológicas y los estudios genéticos sugieren que *C. annuum* fue domesticado inicialmente en México, *C. frutescens* en el Caribe, *C. chinense* al norte del Amazonas, *C. baccatum* en las tierras bajas de Bolivia y *C. pubescens* al sur de los Andes ^[48].

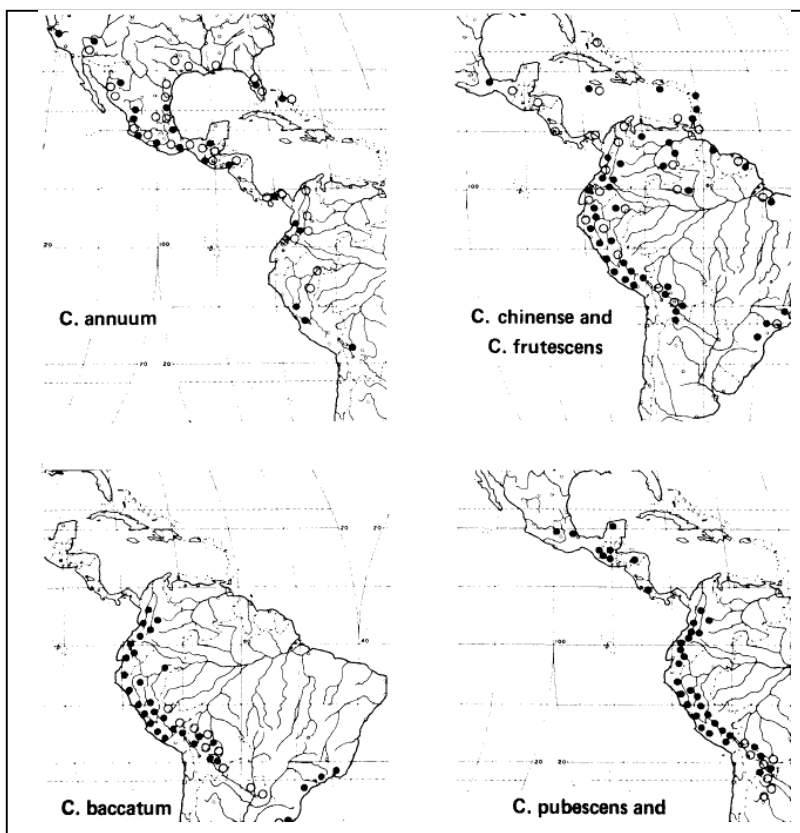


Fig. 9 Distribución Geográfica de las especies domesticadas de *Capsicum* (círculos negros) y sus progenitores silvestres (círculos blancos) [27]

Su cultivo en España empezó a finales del siglo XV después de que fue llevado por Diego Álvarez Chanca, médico del segundo viaje de Colón a las Indias occidentales, quién escribió sobre sus efectos medicinales en 1494. El sencillo crecimiento del chile combinado con el aumento del apetito por las especias durante el siglo XVI impulsó la diseminación de este cultivo a través de las rutas comerciales de España y Portugal incorporándose a las cocinas locales [14 y 66].

Se inicia así la dispersión, cultivo y amplia diversificación biológica que excede a la clasificación en variedades en todo el mundo.

Características de *Capsicum annuum*

Capsicum annuum var. *Annuum* es la variedad más importante económicamente por su producción, distribución geográfica, variedades y diversidad de usos. Se conoce en todo el mundo y en algunos países es la fuente de vitamina C más importante [27].

El género *Capsicum annuum* se cultiva en las principales regiones tropicales, subtropicales y templadas de México, de 0 a 2500 m de altura. En los estados de Puebla, Morelos y Querétaro se encuentra la mayor diversidad de chiles cultivados y silvestres.

La planta de *Capsicum annuum* es de tallo leñoso, forma un arbusto normalmente de 30 cm hasta 1.5 m de altura, de tallos empinados y ramosos con las hojas aovadas o entre aovadas y lanceoladas, sobre un prolongado rabillo, de bordes enteros o apenas sinuados en la base.

Los pedúnculos son solitarios, rara vez se presentan en pares, en el mismo nódulo y generalmente están colgantes.



Fig. 10 Pedúnculos de *Capsicum Annuum*

Las flores tienen cáliz dentado, forman cinco dientecitos en el borde, los cuáles persisten y se endurecen hasta madurar el fruto. La corola es grande blanca o verdosa, una por nódulo, con el cabillo torcido hacia abajo y poseen anteras azules o moradas [27 y 61].

Después de la floración, aparece una baya de color rojo, verde o amarillo en estado tierno, pero que adquiere color rojo, amarillo o café en el maduro [38]. Las semillas son amarillas arriñonadas o casi discoidales de 3 a 5 mm en su diámetro mayor, la mayor parte se alojan en la parte superior, junto al tallo.

El fruto varía en la coloración y tamaño, de acuerdo a la variedad su forma puede ser cúbica, cónica o esférica (Fig. 11) [61]. Está dividido en dos o cuatro costillas verticales interiores que portan las semillas. Estas se distribuyen a lo largo de la pared del fruto, no llegan al centro por lo cual, dentro del fruto existe una sola cavidad. La carnosidad varía de acuerdo a la especie aunque por lo general es de 5 a 7 mm.

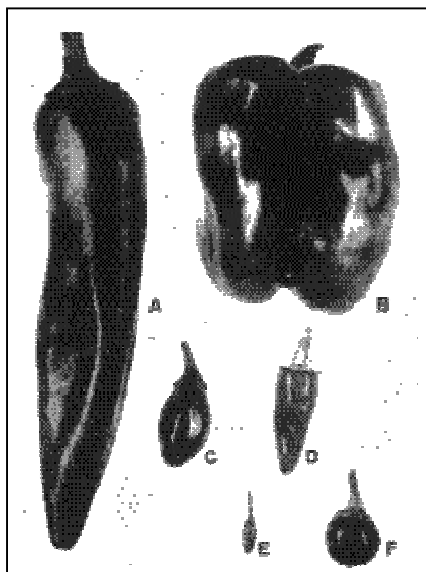


Fig. 11 Variación en tamaño y forma del fruto de *C. annuum* A. Chile California, B. California Wonder, C. Mirasol D. Floral Gem, E. Piquín, F. Páprika [61]

El análisis citogenético de los chiles en México demuestra que en Puebla se encuentran en un mayor avance en el proceso de domesticación. Esto coincide con la evidencia arqueológica de restos de semillas de chile en el valle de Tehuacán, Puebla con una antigüedad de 5 a 7 mil años A.C. [21]. Es notable que este mismo sitio se ha señalado como el origen de la domesticación del maíz.

Variedad a Estudiar

Las variedades cultivadas ofrecen dificultades en su clasificación debido a su gran número, el estado transitorio de algunas de ellas y la constante creación de nuevas variedades, por lo que frecuentemente se denominan de acuerdo a su nombre común o comercial.

Los chiles dulces *Capsicum annuum* var. *Annuum*, clasificados también como *C. grossum* Grp, *C. annuum* var. *Grossum*, Sendt [6, 19 y 44], siendo sus nombres comerciales: bell, Early Wonder, Emerald Giant, California Wonder y pimiento morrón o semáforo (haciendo alusión a su variedad de colores).

No es un chile de consumo entre los indígenas, lo cuál indica que se trata de una variedad naturalizada después de llegar a Europa y Norteamérica. Las normas de calidad están impuestas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, ya que se cultivan para su exportación, pues su demanda en los mercados internos es baja. Los estados de mayor producción son Sinaloa y Sonora, donde se cosechan con un buen rendimiento.

Un chile dulce de buena calidad debe de medir de 8 a 12 cm de largo por 8 cm de ancho y ser de forma cuadrada y achatada (fig. 11 B), con paredes gruesas formadas por 3 o 4 lóculos interiores. El pericarpio es liso y brillante (fig. 12). El fruto es cosechado antes de que cambie su color debido a la maduración (tiene un ciclo vegetativo más corto que los otros) no es picante [38].

La mayoría de los pimientos son verdes en su estado inmaduro, cambiando a rojo conforme madura, aunque algunos pasan de verde a amarillo o naranja y otros de blanco a rojo [44].

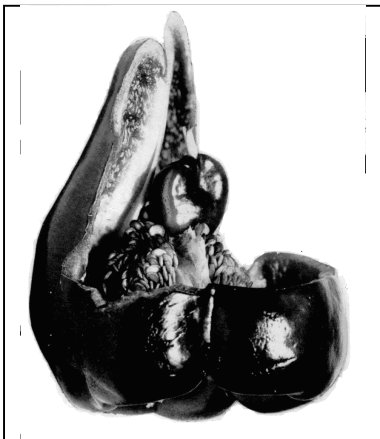


Fig. 12 Fruto cortado
para mostrar su
interior ^[6]

Los pimientos rojo, verde, amarillo y naranja están disponibles en el mercado siendo el pimiento verde el que más se produce y consume ^[31]. Además del color las diferencias la composición de nutrientes en pimientos de distinta coloración han sido reportados ^[62].

Composición

Los frutos maduros del pimiento (*Capsicum annuum* var. *Anuum*) son ampliamente empleados como colorantes alimenticios, por sus brillantes colores (rojo y naranja) que evidencian que son una buena fuente de pigmentos carotenoides y flavonoides. Algunos de los chiles se utilizan para dar color a los alimentos y no sólo por sus características picantes.

Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos que presentan gran variedad de propiedades biológicas, entre las que se encuentran la recolección de luz en la fotosíntesis y la fotoprotección en plantas, mientras que en los animales es pro-vitamina A y antioxidante [24].

Son terpenoides de 40 átomos de C constituidos de 8 unidades isoprénicas (C₅), de manera tal que la secuencia se invierte en el centro, una unidad central de 22 átomos de C con cuatro grupos metilo en los laterales de la cadena separados por seis átomos de carbono en el centro y 5 átomos de C en el resto. El grupo final puede o no estar ciclizado, siendo los anillos iguales o diferentes.

Una característica distintiva es un larga cadena de dobles enlaces conjugados (9 – 11), que actúa como un cromóforo que absorbe la luz y es responsable de su color amarillo, naranja o rojo de los alimentos.

La ciclización y otras modificaciones, tales como, hidrogenación, deshidrogenación, migración de dobles enlaces, acortamiento de la cadena o extensión, re-arreglo, isomerización, oxidación o la combinación de estos procesos da como resultado un gran número de estructuras [52]. Por ejemplo, la destrucción oxidativa de los extremos conduce a la bixina (que es el carotenoide típico del achiote o annatto *Bixa orellana*) y sus derivados.

Los carotenoides constituidos únicamente por carbono e hidrógeno se llaman colectivamente carotenos, aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas (del griego *xanthos*, amarillo y *phyll*, hoja) [34].

Se han encontrado más de 30 carotenoides en diferentes variedades rojas de *Capsicum*, entre ellos anteraxantina, β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina, violaxantina, luteína, α -criptoxantina, criptocapsina, cicloviolaxantina, cucurbitaxantina A, cucurbitacromo, capsantina, anteraxantina, mutatoxantina, luteoxantina, violaxantina, auroxantina, criptoflavina, capsoluteína y neoxantina [41].

En los pimientos el color verde se debe a la clorofila y a los carotenoides típicos del cloroplasto, violaxantina, neoxantina, luteína y β -caroteno [42]. El color amarillo-naranja es ocasionado por α y β -caroteno, zaeaxantina, luteína y β -criptoxantina; el color rojo se debe a la presencia de los carotenoides específicos de este género: capsantina, capsorubina, 3,6- y 5,6-epóxido de capsantina [16, 41, 42, 44 y 52]

La cantidad de carotenoides se ve afectada por la forma de cultivo, parte de la planta, clima o sitio geográfico de producción; método de cosecha y manejo, procesamiento y almacenaje, porque los mismos carotenoides se encuentran en la misma variedad.

El factor que afecta el contenido de los carotenoides es el estado de madurez que tiene la planta cuando se cosecha y cuando se consume, pues después de cosechados la biosíntesis de carotenoides continua. De igual manera existe la descomposición si se dan las condiciones favorables de altas temperaturas y exposición a la luz [!Error! No se encuentra el origen de la referencia.]. La composición se enriquece por la presencia de cantidades traza de los precursores de la biosíntesis, junto con los derivados de los principales componentes.

Aunque se consideran a los carotenoides como pigmentos de las plantas, también se encuentran en algunas animales. Los animales son incapaces de sintetizar carotenoides, así que estos provienen de la dieta y son absorbidos o acumulados [52]. Un ejemplo importante es el color de los camarones y langostas, debido a la astaxantina, el colorante más costoso.

Se presume que los peces y las aves acumulan carotenoides como ornamentos sexuales porque tienen la función dual de colorantes y antioxidantes. Los machos que acumulen más carotenoides poseerán una salud superior y comunicarán este estatus a las hembras a través de sus colores brillantes [45].

Debido a su estructura los carotenoides son antioxidantes lipofílicos, aunque pueden encontrarse como complejos solubles en agua cuando están complejados a proteínas [69], capaces de destruir radicales peroxilo-lípidos y disipar el oxígeno singulete. Sin embargo, los carotenoides podrían presentar también la función pro-oxidante cuando se encuentran en altas concentraciones dentro de la célula [24].

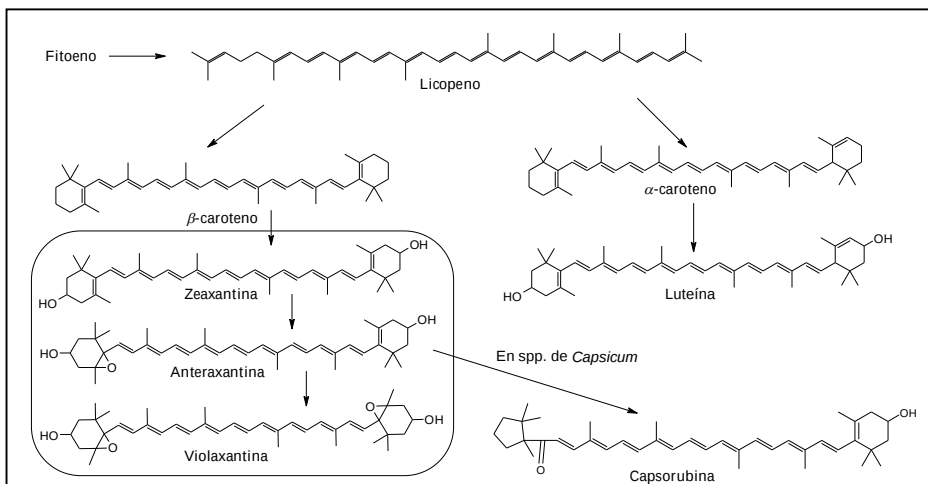


Fig. 13 Esquema condensado de la biosíntesis de carotenoides [3]

Capsaicinoides

Son los alcaloides típicos del género *Capsicum* y son los responsables de su sabor picante. De estos se han identificado 12 compuestos de los cuáles la capsaicina y la hidrocapsaicina son responsables del 90% del picante. Los compuestos restantes difieren en la longitud de la cadena hidrocarbonada y en el grado de insaturación. La estructura general de los capsaicinoides se representa por la figura 14 ^[10].

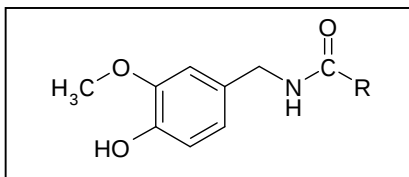


Fig. 14 Estructura general de los capsaicinoides

Capsaicina	R: (CH ₂) ₄ -CH=CH-CH-(CH ₃) ₂
Dihidrocapsaicina	R: (CH ₂) ₆ -CH-(CH ₃) ₂
Homocapsaicina	R: (CH ₂) ₄ -CH=CH-CH ₂ -CH-(CH ₃) ₂
Homodihidrocapsaicina	R: (CH ₂) ₇ -CH-(CH ₃) ₂
Nordihidrocapsaicina	R: (CH ₂) ₅ -CH-(CH ₃) ₂

La capsantina (acetilada con ácidos grasos) es el carotenoide en mayor abundancia en los pimientos rojos no es pro-vitamina A, pero si es un efectivo disipador de los radicales libres ^[68].

La acción picante de los chiles se debe a una mezcla de amidas, en donde la capsaicina forma aproximadamente 69% del principio picante, la dihidrocapsaicina constituye el 22%. Otros capsaicinoides presentes en el chile son homocapsaicina, homodihidrocapsaicina y nordihidrocapsaicina. El largo de la cadena de la amida esta relacionado con el picor, siendo mayor el picor cuando la cadena está conformada por 9 átomos de carbono ^[10 y 32].

Compuestos volátiles

Los carotenoides determinan no solo el color sino el sabor y aroma, pues la degradación de los carotenoides es clave para la formación de los compuestos volátiles de las plantas ^[26] que además actúan como un mecanismo de defensa de la planta ^[3].

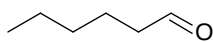
Cuando los compuestos volátiles son extraídos, por lo general por destilación por arrastre de vapor, son líquidos lípidos y rara vez de color, solubles en disolventes orgánicos que se denominan aceites esenciales. Poseen un fuerte olor y son mezclas complejas, de alrededor de 20-60 componentes en concentraciones muy diferentes.

La propiedad antioxidante de los aceites esenciales y sus componentes ha sido demostrada *in vitro* por métodos físico-químicos. En particular, la capacidad antioxidante de algunos compuestos fenólicos ha sido exhortada para promover su uso como aditivos alimenticios naturales ^[2].

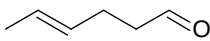
Se han encontrado más de 125 componentes volátiles en los frutos de *Capsicum* aunque no se ha determinado su importancia en el aroma. En el pimiento verde se caracterizaron, por Buttery los compuestos ^[8] mostrados en la fig. 15. En la páprika procesada: acetaldehído, 2-metil propanol, 2-metil butanal, 3-metil butanal, dimetil sulfuro, 6-metil-5-hepten-2-ona, tetrametil pirazina y β -ionona.

Los compuestos β -ionona y 6-metil-5-hepten-2-ona tienen una presencia predecible pues el β -caroteno es precursor de la β -ionona, el licopeno de 6-metil-5-hepten-2-ona igualmente el hexanal es un producto de oxidación enzimática del ácido linoléico [Error! No se encuentra el origen de la referencia.].

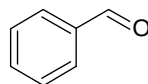
En la evaluación sensorial de los componentes se identificaron a el 2-metoxi-3-isobutil pirazina, 2-metoxi-3-(1-metilpropil) pirazina, 2-metoxi-3-(2-metil propil) pirazina y 3-hexenol como responsables del aroma del pimiento verde, el de nona-*trans*, *cis*- 2,6-dienal como olor a pepino, el de deca-2,4-dienal como a pollo frito, limoneno como cítrico y el de salicilato de metilo como hierbabuena ^[8, 36].



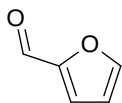
Hexanal
 $C_6H_{12}O$



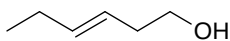
4-Hexenal
 $C_6H_{10}O$



Benzaldehído
 C_7H_6O



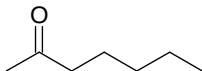
Furfancarboxaldehído
 $C_5H_4O_2$



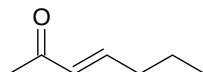
3-Hexen-1-ol
 $C_6H_{12}O$



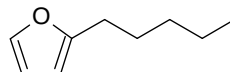
Furano
 C_4H_4O



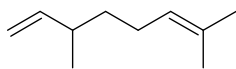
Heptan-2-ona
 $C_7H_{14}O$



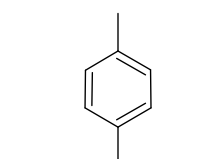
3-Hepten-2-ona
 $C_7H_{12}O$



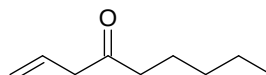
2-pentilfurano
 $C_{10}H_{18}O$



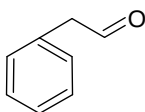
3,7-dimetil-1,6-octadieno
 $C_{10}H_{18}$



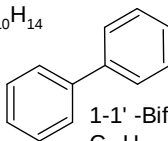
1-metil-4-(1-metiletil)
benceno
 $C_{10}H_{14}$



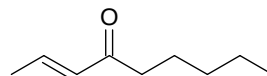
Non-1-en-4-ona
 $C_9H_{16}O$



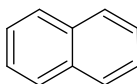
Fenilacetaldehído
 C_8H_8O



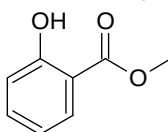
1-1' -Bifenilo
 $C_{12}H_{10}$



2-nonen-4-ona
 $C_9H_{16}O$



Naftaleno
 $C_{10}H_8$



.ácido2-hidroxi-metil éster benzoico
 $C_8H_8O_3$

Fig. 15 Compuestos volátiles de pimienta verde

Vitaminas

La vitamina E tiene cualidades antioxidantes. La forma más común de vitamina E es el α - Tocoferol, además de ser el biológicamente más activo. Se reserva en gran cantidad y es transportado a los diversos órganos del cuerpo.

Las mayores fuentes naturales de α -tocoferol son los aceites de maíz, semilla de algodón, soya y germen de avena, mientras que las frutas, los vegetales y granos enteros contienen una menor cantidad [13], es notable su presencia en el aceite de ajonjolí.

La Vitamina C o L - ácido ascórbico, es un nutriente esencial para los primates superiores y un pequeño número de otras especies. Dicha vitamina es requerida para ciertas reacciones metabólicas en todos los animales y plantas. Es ampliamente sabido que su deficiencia causa escorbuto en humanos de ahí el nombre de ascórbico que se le da al ácido. Posee una acción antioxidante, el ácido ascórbico se convierte en ácido dehidroascórbico, cuando reacciona con el oxígeno del aire, otras sustancias oxidantes o con algunas enzimas [11].

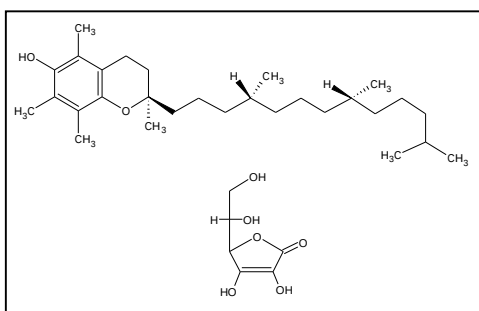


Fig. 16 Vitaminas E y C, respectivamente.

Glicolípidos

Se considera que los glicolípidos de las plantas comestibles son nutrientes de la dieta humana. Los glicolípidos de las plantas superiores consisten de esteril-glucósidos, esfingoglicolípidos y gliceroglicolípidos. Estos glicolípidos son ampliamente distribuidos, aunque no de manera universal, en las plantas comestibles.

Los pimientos rojos contienen los tres tipos de glicolípidos antes mencionados, y se han caracterizado los siguientes glicolípidos: esteril glucósido acetilado (fig 17-1), monogalactosil diasil glicerol (fig 17-2), esteril glucósido (fig 17-3), glucocerebrosido (fig 17 -4) y digalactosil diasil glicerol (fig 17-5) [68].

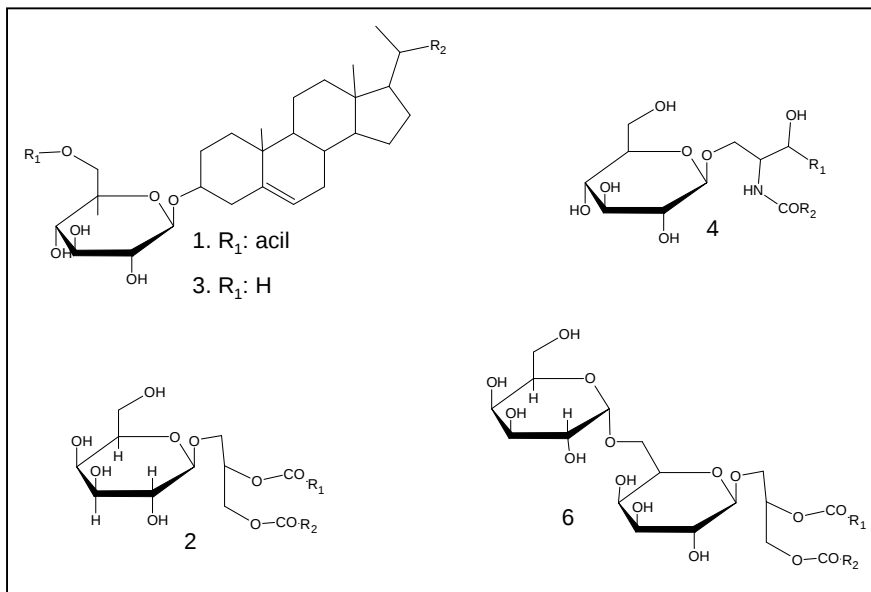


Fig. 17 Glicolípidos encontrados en Pimiento Rojo

Flavonoides:

Compuestos Fenólicos

Constituyen a más de 4,000 metabolitos vegetales secundarios. Los flavonoides son compuestos polifenoles con un esqueleto de difenilpropano. Los cuatro clases principales son 4-oxo-flavonoides (flavonas, flavonoles), antocianinas, isoflavonas y los derivados de flavan-3-ol ^[46].

Los compuestos fenólicos son poderosos antioxidantes. La actividad antirradical de los flavonoides y los compuestos fenólicos se basa principalmente en las propiedades redox de sus grupos hidroxilo y su relación estructural entre las diferentes partes de su estructura.

Las investigaciones sugieren que los efectos celulares de los flavonoides pueden medirse a través de interacciones con proteínas centrales específicas a cascadas de señalización intracelular.

En variedades polacas de *Capsicum annuum* se caracterizaron *trans-p*-feruloil- β -D-glucopiranosido, *trans-p*-sinapoil- β -D-glucopiranosido, quercetin-3-O- α -L-ramnopiranosido-7-O- β -D-glucopiranosido, *trans-p*-ferulil alcohol-4-O-[6-(2-metil-3-hidroxipropionil)] glucopiranosida, luteolin 6-C- β -D-glucopiranosil-8-C-R-L-arabinopiranosido, apigenina-6-C- β -D-glucopiranosil-8-C- α -L-arabinopiranosido, luteolin-7-O-[2-(β -D-apiofuranosil)- β -D-glucopiranoside], quercetin 3-O- α -L-ramnopiranosida, y luteolin 7-O-[2-(β -D-apiofuranosil)-4-(D-glucopiranosil)-6-malonil]- β -D-glucopiranosida. Los principales compuestos aislados de los frutos rojos fueron sinapoil y feruloil glucosidos, mientras que en el verde fue quercetin-3-O-L-ramnosido. Esta última presentó la mayor actividad antirradical con DPPH ^[43].

Procedimiento Experimental

Procedimiento Experimental

Los especímenes de pimiento verde, amarillo, rojo y naranja se obtuvieron de tiendas locales, siendo procedentes de los estados de Sinaloa, Jalisco e Hidalgo.

Obtención de los Espectros Raman

Para obtener los espectros Raman fue necesario realizar el secado de las muestras para que la señal no se viera distorsionada por el grosor de éstas (debido a la baja polarizabilidad del agua tiene una baja respuesta que no aparece en el espectro).

Secado de las muestras con calor

Los pimientos frescos, uno de cada color, procedentes de Sinaloa se cortaron para retirarles las semillas y el pedúnculo.

Debido a que se requería una pieza del tejido (pericarpio) lo más lisa posible se cortaron en grandes pedazos y se prensaron sobre papel para retirarles humedad.

Las muestras fueron llevadas a la estufa que se mantuvo a una temperatura de 60 °C, para evitar la descomposición de los carotenoides, por 3 días.

Secado de muestras a vacío

Los pimientos se cortaron para retirarles las semillas y el pedúnculo, se cortaron en grandes pedazos que se prensaron entre hojas de papel periódico.

Las muestras se colocaron dentro de un desecador con cloruro de calcio anhidro, conectado a una bomba de vacío. Se cambiaba el cloruro de calcio cuando se saturaba y las muestras se mantuvieron en la oscuridad hasta que se secaron por completo.

Se empleó un equipo Raman Perkin Elmer Limited, System 2000, NIR FT-Raman, Inglaterra; con un láser de Kriptón a 1000 mW. Las muestras de pimiento se recortaron en cuadros de 1 x 1 cm, colocándose el lado de la cutícula en dirección al punto de incidencia del láser Raman.

Los espectros fueron grabados con una resolución de 1 cm a partir de 100 hasta 3500 cm^{-1} [57].

Extracción de carotenoides

Procedimiento Pre-cromatográfico

A los pimientos procedentes de Jalisco, se les retiraron las semillas y los pedúnculos. El pericarpio restante se cortó en trozos de 1 cm o menos.

Se pesaron 70 g de pimiento un lote por cada color. Se mezclaron con acetona grado HPLC, de forma que el disolvente cubriera a las muestras, en un matraz de bola de 500 mL. Esta mezcla de muestra con acetona se sometieron a un baño de agua (Techne) a 45° C, se empleó un refrigerante con agua a 10 °C y se mantuvo el matraz en la oscuridad.

Se filtró con un embudo Buchner y el residuo sólido de pimiento se re-extrae con disolvente fresco. La extracción y la filtración se repitieron hasta que el tejido era incoloro.

El filtrado de las extracciones se reunió y se transfirió a un rotavapor en donde se destiló la acetona. Al extracto se le realizaron extracciones líquido – líquido con éter dietílico y agua destilada.

Se saponificaron los extractos con una disolución KOH : MeOH al 20% m/v [20, 52]. La fracción insaponificable se extrajo con éter y agua destilada con un embudo de separación.

La fase etérea se secó sobre sulfato de sodio anhidro y después con un flujo de N_2 para concentrar la muestra.

Los extractos así obtenidos se mantuvieron en refrigeración y en la oscuridad antes de llevarse al cromatógrafo de líquidos (HPLC) con arreglo de Diodos para su separación e identificación.

Condiciones Cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos Waters modelo 1515, con un detector: UV-DAD Waters 2996, columna Nucleosil 100-5, Eluyente: Hex/iPrOH 99/1 y una longitud de onda de detección del cromatograma de 450 nm.

Obtención de Espectros de RPE de muestras sólidas

Las muestras desecadas de pimienta que se utilizaron para obtener el espectro Raman, se pulverizaron para colocarse dentro de una celda cilíndrica para RPE.

Las mediciones de RPE se realizaron a temperatura ambiente, con un espectrómetro Jeol JES-TE300 trabajando en la banda X, a una frecuencia de modulación de 100 KHz.

Las celdas se colocaron dentro de la cavidad del espectrómetro en el modo TE₀₁₁. La calibración externa del campo magnético se realizó con una gaussmetro de precisión Jeol ES – FC5 y la frecuencia de microondas con un medidor de frecuencia 5350B HP.

Los parámetros para los espectros de RPE para los ejemplares deshidratados de pimienta fueron: centro de campo de 335 mT; una potencia de microondas de 1.01 mW; una frecuencia de microondas de 9.12 GHz; un ancho de barrido de 5.0 mT; ancho de modulación, 2.0 x 0.1 mT; constante de tiempo, 0.1 s; amplitud, 200; tiempo de barrido, 60 s; acumulación, 1 scan.

Los espectros EPR fueron grabados (como la primera derivada) y manejados usando una computadora conectada al espectrómetro, con el programa ESPRIT – 382 – v 1.916.

Preparación de Especies Radicales

DPPH

Se pesaron 2.2 mg de DPPH ((Sigma Chemicals) y se llevaron a un aforo de 5 mL con etanol (grado HPLC) siendo ésta la disolución stock (1×10^{-3} M)

El stock se conservó en refrigeración para reducir la descomposición del radical.

A partir del stock se prepararon las diluciones, justo antes de ser empleadas para que la concentración de DPPH se mantuviera estable. La dilución se realizó con 666 μ L de la disolución stock aforados a 5 mL con etanol (1.3×10^{-4} M).

TEMPOL

Se pesaron 2.6 mg de TEMPOL (Sigma Chemicals) y se llevaron a un aforo de 5 mL con etanol (grado HPLC) siendo ésta la disolución stock (1.5 mM).

El stock se conservó en refrigeración para reducir la descomposición del radical.

A partir del stock se prepararon las diluciones, justo antes de ser empleadas. La dilución se realizó con 2.07 mL de la disolución stock aforados a 5 mL con etanol (6.21×10^{-4} M).

Obtención de las Extracciones Etanólicas para RPE

Las muestras de pimientos, procedentes de Jalisco se abren para retirarles las semillas y los pedúnculos. El resto se cortó en trozos de 1 cm o menos.

Se pesó cada pimiento completo, siendo los pesos para cada pimiento los siguientes: Verde: 108.6 g, Rojo: 109.8 g, Naranja: 183.7 g y Amarillo: 144.3 g.

Se mezclaron con etanol (grado HPLC) de forma en que se cubrieran las muestras. Las muestras se sometieron a un baño de agua de 40°C.

La mezcla se filtró con un embudo Buchner. El residuo de pimiento continuó extrayéndose repetidamente hasta que el tejido era incoloro.

Los extractos se concentraron en un rotavapor a 60 °C y se llevaron a un aforo a los siguientes volúmenes: Pimiento rojo y verde a 5 mL, Pimiento naranja y amarillo a 10 mL.

Preparación de las diluciones de los extractos de pimiento

Del extracto etanólico de pimiento Naranja (10 mL) se tomó 1 mL y se llevó a un aforo de 10 mL (disolución A). De la disolución A se tomó 1 mL y se aforó a 5 mL, empleándose esta dilución en los sistemas extracto /radical.

El extracto etanólico de pimiento Amarillo (10 mL) se tomó 1 mL y se aforó a 10 mL con agua destilada, de esta se tomó 1 mL y se llevó a un volumen de 5 mL con etanol.

Del extracto de pimiento Verde (10 mL EtOH:H₂O 1:1 v/v) se tomó 1 mL y se aforó a 5 mL con agua destilada de esta dilución se tomó 0.25 mL y se llevó a un volumen de aforo de 5 mL con etanol.

El extracto etanólico de pimiento Rojo (5 mL etanol) se tomó 0.5 mL y se llevaron a un aforo de 1 mL, este se diluyó a 10 mL de los cuales se tomó 0.25 mL y se aforaron a 10 mL con etanol.

Procedimiento RPE

En la Tabla 2 se muestra la composición de los sistemas que se midieron, cada uno por triplicado.

Las muestras fueron mezcladas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y el tiempo de reacción se midió a partir de la adición de los agentes reactivos (DPPH o TEMPOL). Las muestras se mantuvieron en un baño de agua (techné) a 37° C.

Las muestras después de 20 min. fueron transferidas a una celda plana para RPE de 20 µL, cerrada con un tapón e insertada en una cavidad estándar del espectrómetro.

Las mediciones de RPE se realizaron a temperatura ambiente, con un espectrómetro Jeol JES-TE300 trabajando en la banda X, a una frecuencia de modulación de 100 KHz.

Tabla 2

Sistema (concentración después de la mezcla)	Extracto del pimienta	Agua Destilada
DPPH 150 μ L (6.5×10^{-5} M) / TEMPOL (3.105×10^{-4} M)	0	150
	30	120
	60	90
	90	60
	120	30
	150	0

Las celdas se colocaron dentro de la cavidad del espectrómetro en el modo TE₀₁₁. La calibración externa del campo magnético se realizó con una gaussmetro de precisión Jeol ES – FC5 y la frecuencia de microondas con un medidor de frecuencia 5350B HP.

Los parámetros para los espectros de RPE para los ejemplares deshidratados de pimienta fueron: centro de campo de 334.61 mT; una potencia de microondas de 3.0 mW; una frecuencia de microondas de 9.44 GHz; un ancho de barrido de 5.0 mT; ancho de modulación, 0.16 mT; constante de tiempo, 0.3 s; amplitud, 320; tiempo de barrido, 120 s; acumulación, 1 scan.

Los espectros EPR fueron grabados como la primera derivada y manejados usando una computadora conectada al espectrómetro, con el programa ESPRIT – 382 – v 1.916.

Las concentraciones relativas de los radicales aductos fueron calculadas a partir de las contribuciones de los espectros individuales al espectro experimental del blanco, después de una doble integración.

Determinación de los Compuestos volátiles

La identificación de los compuestos volátiles se realizó por medio de MEFS – CG – EM.

Determinación del método

Se realizaron pruebas (tiempo de extracción, temperatura, agitación y adición de sal) para elegir las mejores condiciones de adsorción.

Se evaluaron las fibras (SPME Fiber Assortment kit 4 for manual holder, 24 ga Supelco) para la determinación de compuestos volátiles: 65 μm PDMS/DVB, 100 μm PDMS y 75 μm CAR/PDMS. Antes del análisis las fibras se acondicionaron con las especificaciones del fabricante:

Condiciones para el acondicionamiento de las fibra.

PDMS – DVB	65 μm	250 °C	0.5 h
------------	------------------	--------	-------

CAR- PDMS	75	300 °C	1 h
-----------	----	--------	-----

PDMS	100	250 °C	1 h
------	-----	--------	-----

Se emplearon 10 mL de jugo de pimienta naranja en un frasco vial de 20 mL. Se colocó la fibra en el headspace (parte gaseosa sobre la superficie líquida) y se siguió el programa de temperatura descrito por Santos-Hernández [58]: 40 °C isotérmicamente durante 1 minuto, rampa de 5 °C/min hasta 210 °C y rampa de 10 °C/min hasta 280 °C.

Para el resto de las pruebas en la selección de parámetros se emplearon los siguientes estándares: benzaldehído, citrónelal, eugenol, mentol, salicilato de metilo, piperonal, tetrametil-pirazina, α -ionona, β -ionona de 2 ppm en aceite de soya.

Para probar la temperatura óptima de extracción se empleó una parrilla con agitación, y las muestras, esta vez de 0.4 mL en un frasco vial de 2 mL sellado con un séptum de teflón (Supelco) se mantuvieron en baño maría a 32, 43 y 63 °C.

Influencia de agregar sal

Se compararon muestras de jugo de pimienta con sal al 30% m/v, concentración recomendada por el fabricante ^[63] (Supelco, Belfonte) y sin ella.

Tiempo de extracción

Se probaron las extracciones por periodos de 15, 25 y 60 min.

Preparación de las muestras de pimienta.

Los pimientos se cortaron en trozos pequeños. Los trozos se prensaron para separar el jugo.

Se colocaron 0.5 mL de jugo con un agitador magnético de vidrio en los frascos viales de 2 mL con séptum de teflón, se colocaron sobre una parrilla con agitación magnética en baño maría de 43 °C. La fibra se expuso a la muestra por 30 minutos.

La fibra se llevó al cromatógrafo de gases- EM para la desorción de los analitos. Se dispuso de un cromatógrafo de gases Agilent 6890, con detector de ionización de flama y columna AT5 30m x 0.25 mm, 0.1 µm de espesor acoplado a un espectrómetro de masas JCMate JEOL.

La temperatura inicial fue de 35° C isotérmicamente durante 5 min, con una rampa de 5°C por min hasta una temperatura final de 280°C. He 20 mL/min, inyector a 300 °C splitless con pulso a los 2 min. Detector a 280°C.

El proceso de micro-extracción en fase sólida se muestra en la Figura 18.

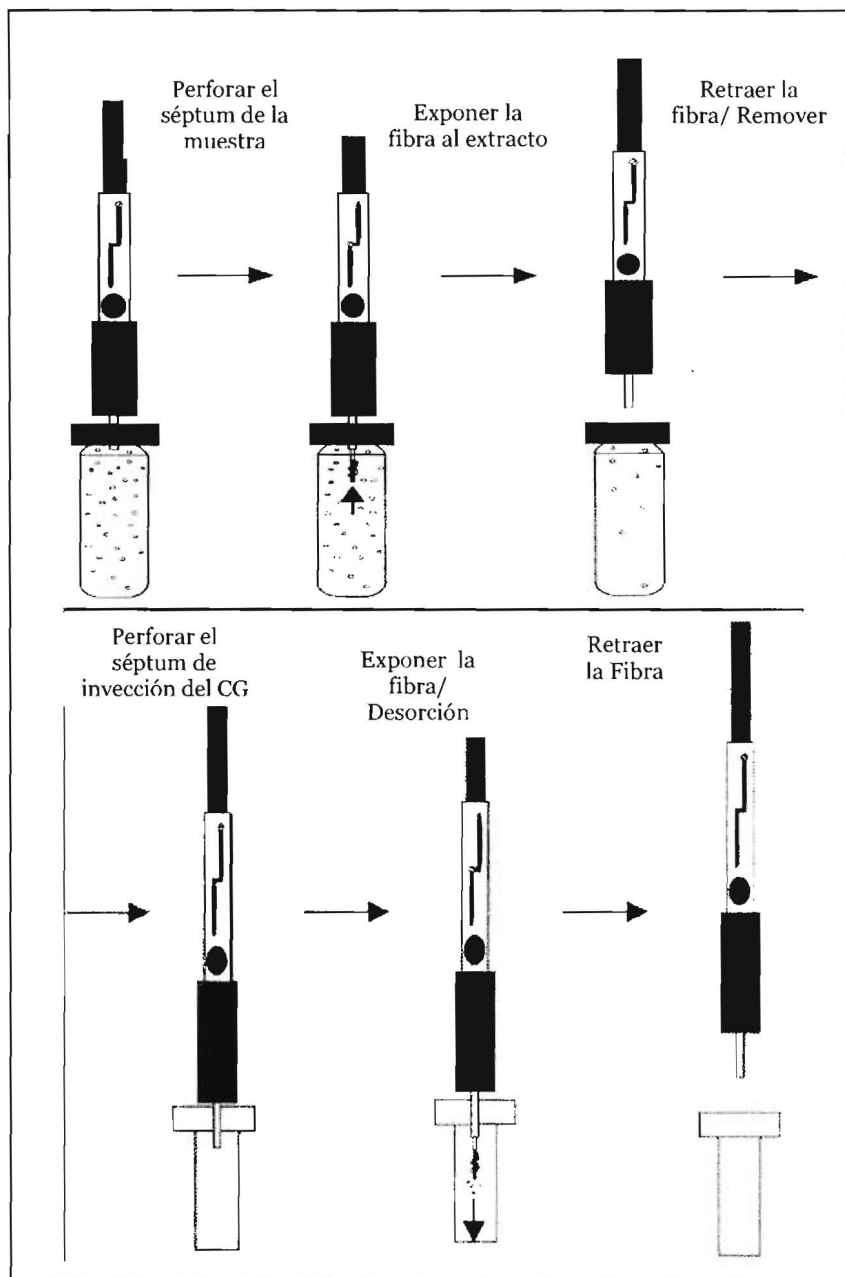


Fig. 18 Esquema de la Micro-Extracción en Fase Sólida

Resultados

Espectros Raman

Se obtuvieron los espectros Raman de las muestras secadas a vacío. A continuación se señalan las bandas correspondientes a los carotenoides y la clorofila [3, 4, 59 y 60]. El número de dobles enlaces conjugados se muestra en paréntesis.

Tabla 3

Bandas experimentales correspondientes a los carotenoides obtenidas *in situ* en pimientos (*C. annuum*).

Pimiento Amarillo	
Bandas (cm ⁻¹)	Compuestos Probables
1528	Luteína(9) β -caroteno(9)
1158	Luteína(9) Licopeno(11)
1016	No Identificado
Pimiento Rojo	
Bandas (cm ⁻¹)	Compuestos Probables
1521	Zeaxantina(9), α -caroteno(9), β -caroteno(9)
1157	Zeaxantina(9) β -caroteno(9) Luteína(9) anteraxantina (9) β -criptoxantina(9)
1008	β -caroteno(9), Licopeno(11), Luteína(9),

Pimiento Naranja	
Bandas (cm ⁻¹)	Compuestos Probables
1540	No Identificado
1516	Capsantina(9)
1162	No Identificado
1150	No Identificado
1014	No Identificado
Bandas (cm ⁻¹)	Compuestos Probables
Pimiento Verde	
Bandas (cm ⁻¹)	Compuestos Probables
1519	Cis-bixina(9)
1325	Clorofila
1285	
1004	Luteína(9), Licopeno(11)

Pimiento Naranja

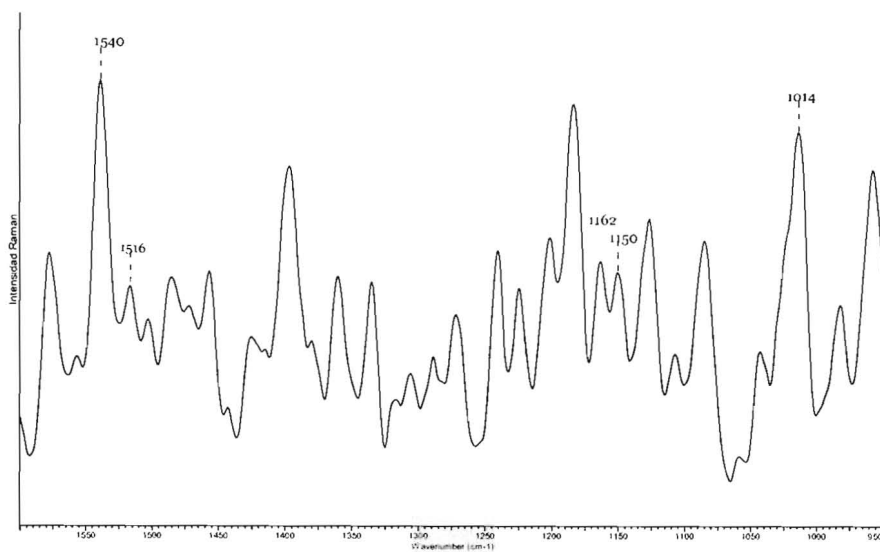


Fig. 19 Espectro Raman para Pimiento Amarillo

Pimiento Amarillo

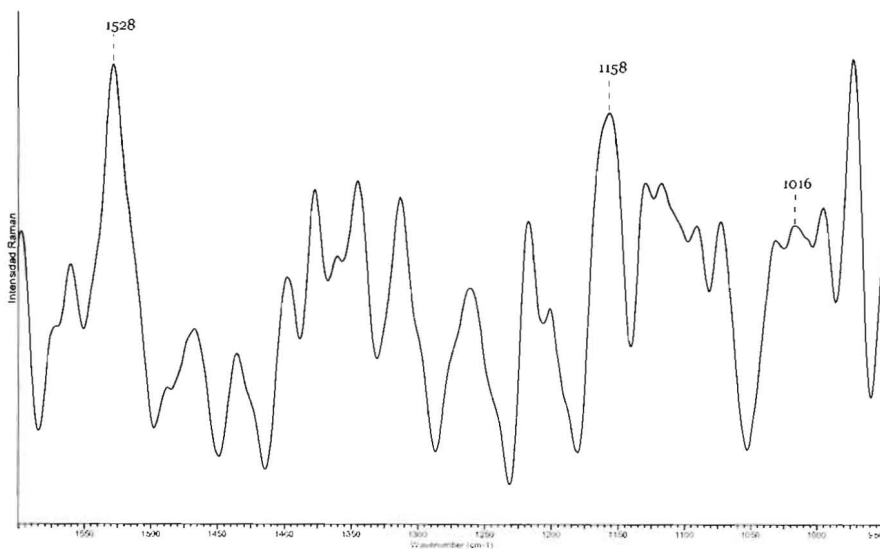


Fig. 20 Espectro Raman para Pimiento Naranja

Pimiento Verde

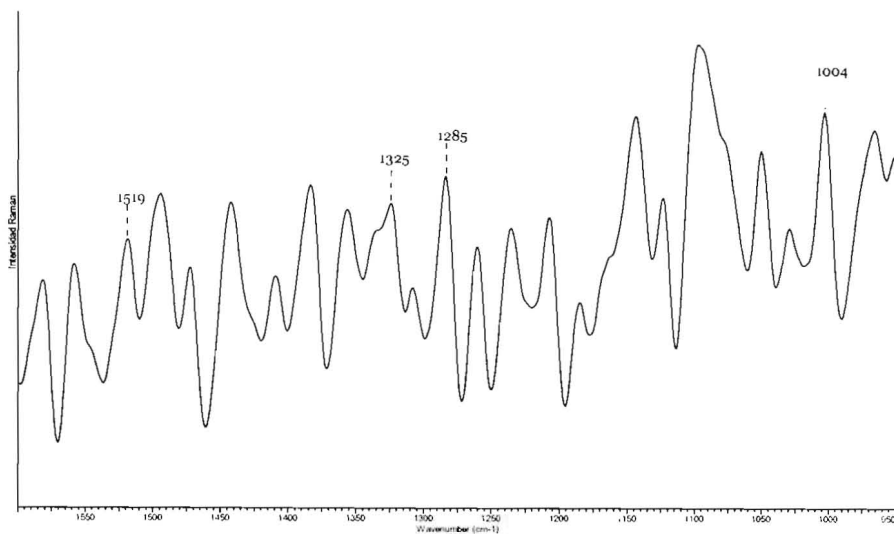


Fig. 21 Espectro Raman para Pimiento Verde

Pimiento Rojo

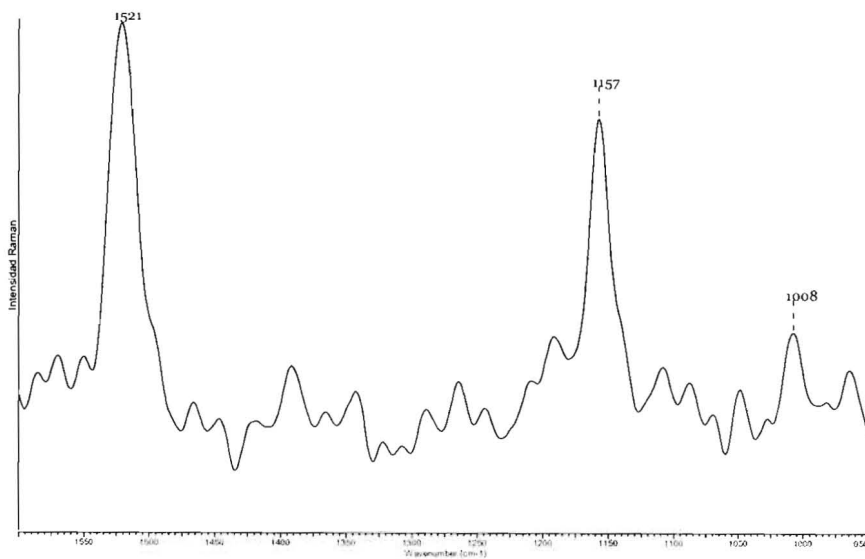


Fig. 22 Espectro Raman para Pimiento Rojo

Identificación de carotenoides

Se realizó la separación a través de HPLC con arreglo de diodos con sus espectros Uv-vis para su identificación [7, 52, 70y 72].

Fig. 23 Cromatograma de Pimiento rojo

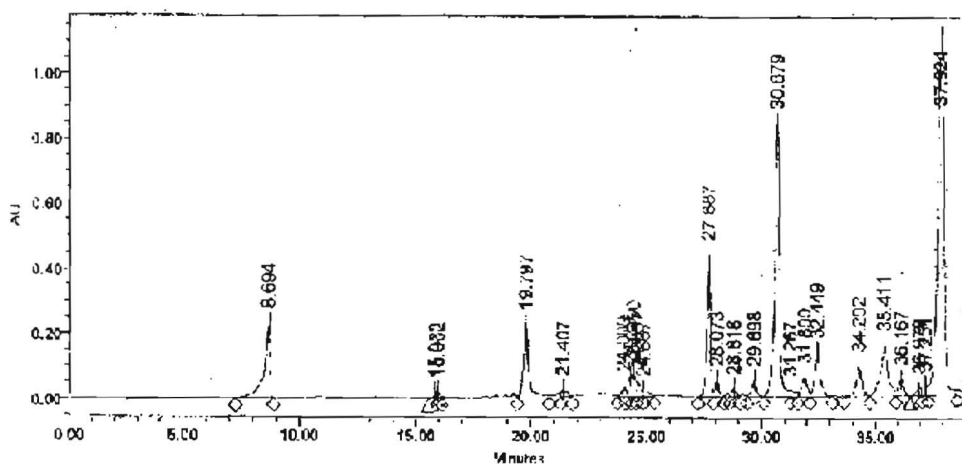


Tabla 4. Carotenoides probables en Pimiento rojo

Tiempo de Retención	Bandas			%III/II	Picos cis		%Aa/Ab	Carotenoide Probable
8.694	276	285						fitoeno
	333	348	367					fitoflueno
	425	449	475					11-cis- β -caroteno
19.797	422	452	479	44.4				7-cis- β -caroteno
21.407	430	460	495	0		356		zeaxantina
24.009	418	442	471	105	330	392	9	ϵ -caroteno
24.285	439	470	495	0				Licopeno
24.637	433	467	495	0	353			Semi- β -carotenona
27.687	422	447	476	60	335	395		Luteína
28.073	421	447	475	47		397		Luteína
28.818	420	443	469	36	333		20	Aucoxantina
19.698	400	423	450	104	301	376	8.5, 23	Crocetina
30.679	425	453	479	44				Violaxantina
31.899	400	423	450	116	378		33	Crocetina
32.449		465	502	0	351			Cantaxantina
34.292	405	429	455	75	316		10	β -zeacaroteno
35.411	408	429	455	62	315		8	β -zeacaroteno
36.167		458	483	0	353		23	Pirroxantina
36.979	428	452	477	0	288		19	No Identificado
37.251	421	448	475	57	336		17	α -criptoxantina
37.924		467	498	0				No Identificado
39.844	437	462	488	10	363		15	Semi- α -carotenona

Fig. 24 Cromatograma de Pimiento Amarillo

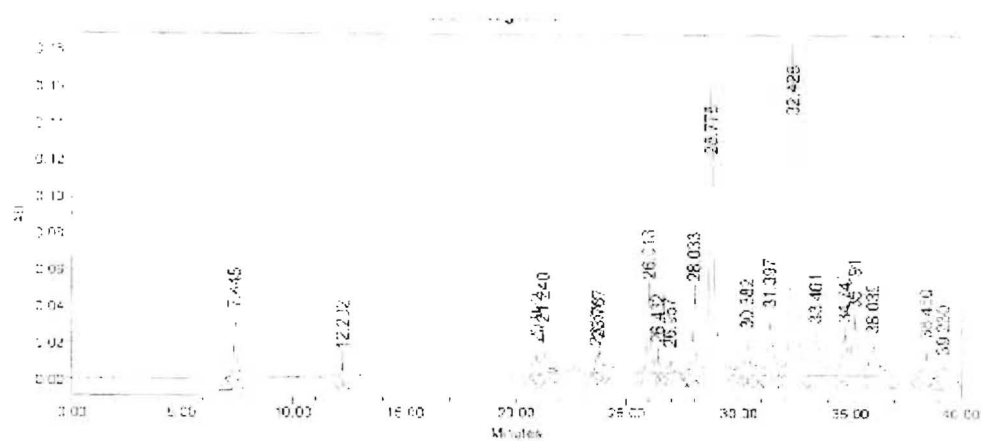


Tabla 5. Carotenoides probables en Pimiento amarillo

Tiempo de Retención	Bandas			%III/II	Picos cis		%Aa/Ab	Carotenoide Probable
7.445	425	448	477	38	342		19	11- <i>cis</i> - β -caroteno
20.922	422	450	477	50				7- <i>cis</i> - β -caroteno
21.24	425	450	477	42				Todo trans- β -caroteno
23.639	440	470	495	43				Licopeno
23.767	440	470	493	14	324			Licopeno
26.013	421	447	476	73	334		11	Isolicopeno
26.432	423	444	476	71	334		44	Luteína
26.957	400	423	450	130	313		10	crocetina
28.033	422	447	476	70	329		10	<i>trans</i> -luteína
28.778	427	452	481	40				zeaxantina
30.382	405	430	455	73				β -zeacaroteno
31.397	405	429	455	50				β -zeacaroteno
32.428		470	495	0				Pirroxantina
33.461	444	465	488	0				No Identificado
34.74	424	449	475	55	341		10	β -criptoxantina
35.191		465	489	0	358		12	Adonixantina
36.039		464		0	353		33	6- <i>cis</i> -capsantina
38.45	404	427	448					Azafrin
39.45	400	424	449	104	311	374		hidroxi-Crocetina

Fig. 25 Cromatograma de Pimiento Naranja

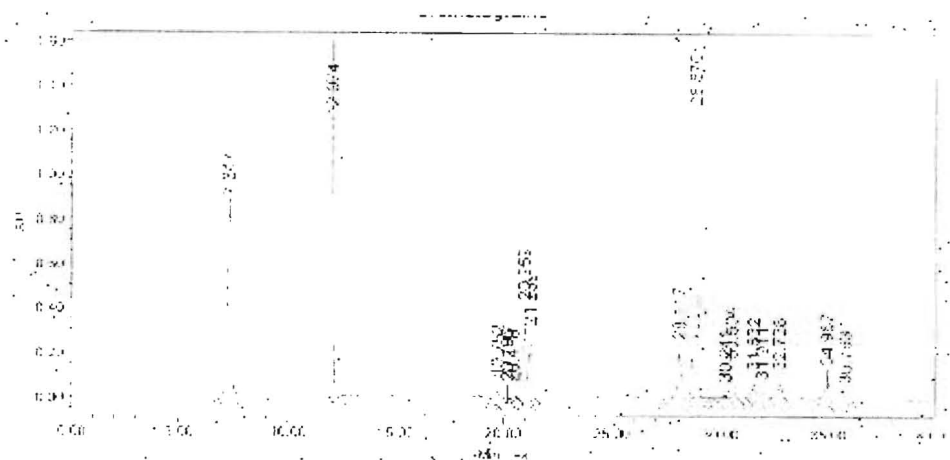


Tabla 6. Carotenoides probables en Pimiento Naranja

Tiempo de Retención	Bandas			%III/II	Picos cis	%Aa/Ab	Carotenoide Probable
7.347	422	448	476	44	337	12.5	7-cis- β -caroteno
12.074	426	458	482	36	337	14	Isomero de luteína
19.752	421	444	475	42	334	30	Luteína
20.959	429	452	479	40			No Identificado
21.239	422	449	477	45			β -criptoxantina
28.117	422	447	476	70	334	8	Crocoxantina
28.87	428	452	481	44			Violaxantina
30.504	408	429	455	65	316	10	β -zeacaroteno
31.532	408	429	455	50	330		cis- β -zeacaroteno
31.911	422	448	477	68	333	12	cis-zeaxantina
32.738	422	448	476	40	344	15	β - ϵ -caroteno
34.967	423	447	472	18	339	48	cis-antrexantina
35.793	424	449	477	20	338	56	Zeaxantina

Fig. 26 Cromatograma de Pimiento Verde

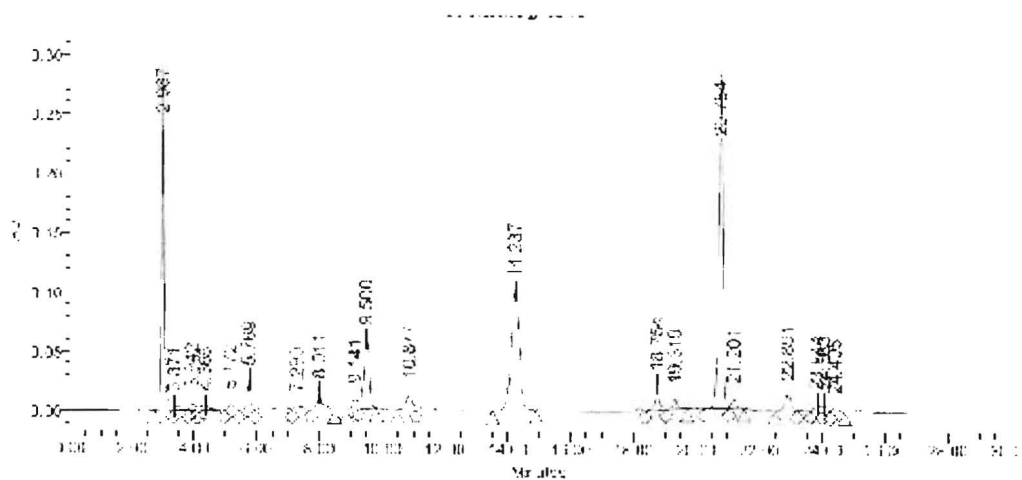


Tabla 7. Carotenoides probables en Pimiento Verde

Tiempo de retención	Bandas			%III/II	Picos cis	%Aa/Ab	Carotenoide probable
2.987	422	450	477	33			7- <i>cis</i> - β -caroteno
3.942	420	438	470	-	370	-	di- <i>cis</i> - α -caroteno
4.366	409	438	466	-	-	-	Todo <i>cis</i> -Licopeno
5.172		409		-	320	24.5	Azafrin-éster
5.769		409			321	22.4	Isómero de azafrin-éster
7.290	395	413	435	75	-	-	Auroxantina
9.141	420	447	473	80			Luteína-5-6-epóxido
9.5	(424)	453		0			8'-apo- β -caroteno
10.877	422	444	473	64	332	12	Anteraxantina
14.237	(432)	454		0	339	24	Apo-8'-zeaxantinal
18.754		454		0			No Identificado
19.319		454					No Identificado
20.754	421	455	473	71	333	10	Luteína
21.201	(420)	450	476	66	320	35	<i>cis</i> -luteína
22.891	416	438	467	73	326	16	Neoxantina
23.844	(417)	438	464	33	330	50	<i>cis</i> -neoxantina
24.036	417	438	465	44	333	48	<i>cis</i> -neoxantina
24.405	418	438.2	470	53	330	61	<i>cis</i> -neoxantina

Espectros de RPE de las muestras sólidas.

Los espectros obtenidos de los ejemplares de pimiento deshidratado mostraron tres bandas: $g \approx 2.0252$, $H: 321.7$; $g \approx 2.0055$, $H: 324.9$ y $g \approx 2.0039$, $H: 325.115$ las cuales se observan en la Fig. 24.

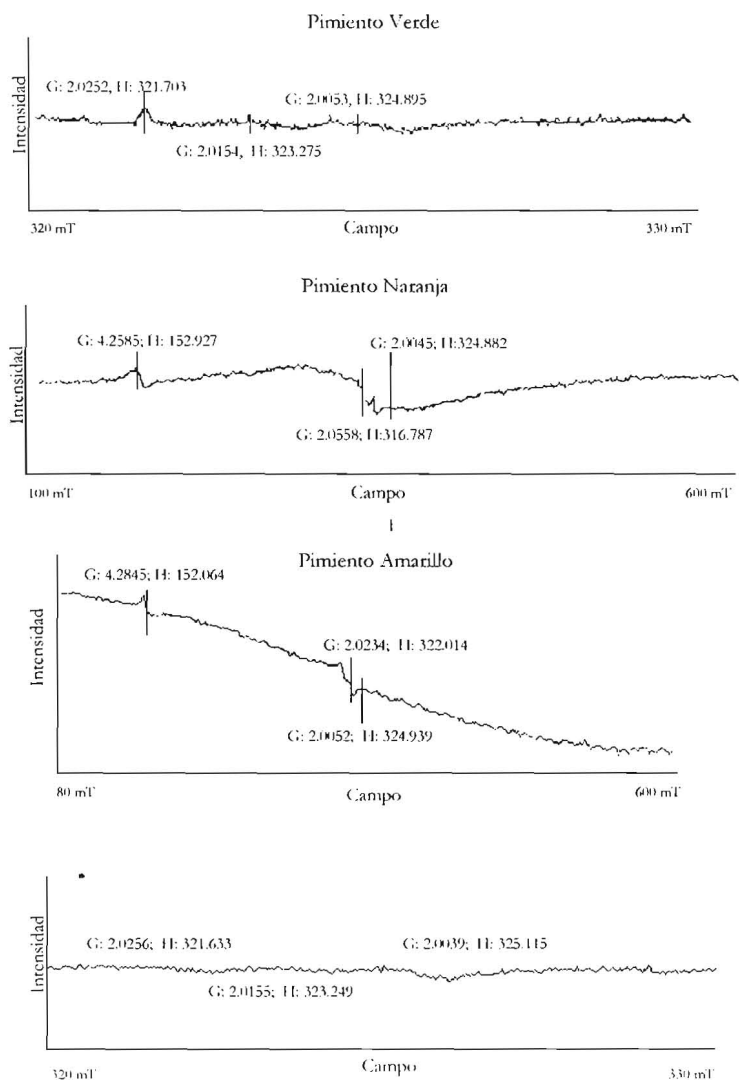


Fig. 27 Espectros RPE de muestras sólidas de Pimientos

Determinación de la actividad antioxidante

En la Fig. 25 se muestran los espectros de RPE correspondientes a las reacciones del DPPH en presencia de los extractos de pimienta. Se puede percibir como el extracto del pimienta secuestra al radical hasta que su señal desaparece.

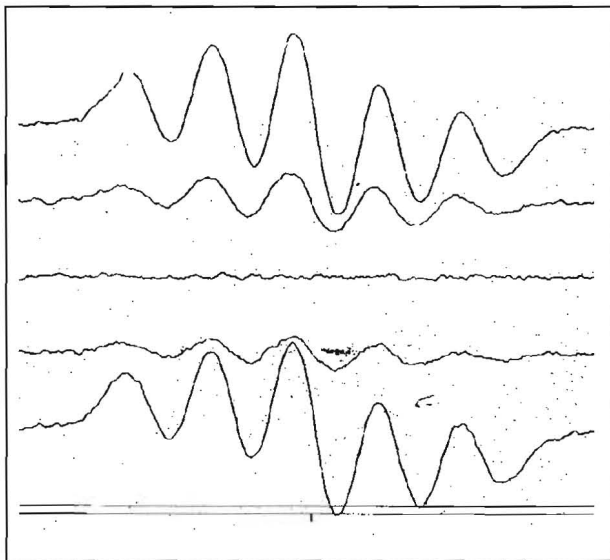


Fig. 28 DPPH – Pimiento Verde, DPPH – Pimiento Amarillo, DPPH – Pimiento Rojo y DPPH respectivamente.

De esta manera se observó el espectro del radical DPPH, con lo que se calculó la magnitud de su desaparición relacionándola con la actividad antioxidante.

A continuación se muestra en la tabla 8 la concentración relativa, expresada como porcentaje del radical DPPH, después de una doble integración de los espectros RPE.

Tabla 8 Concentración Relativa

μL de extracto	P. Naranja	P. Rojo	P. Verde	P. Amarillo
	% DPPH	% DPPH	% DPPH	% DPPH
0	100	100	100	100
30	91.212	94.824	59.112	23.598
60	62.303	64.984	19.521	0
90	41.897	64.22	0	
120	18.802	5.281		
150	2.454	1.346		

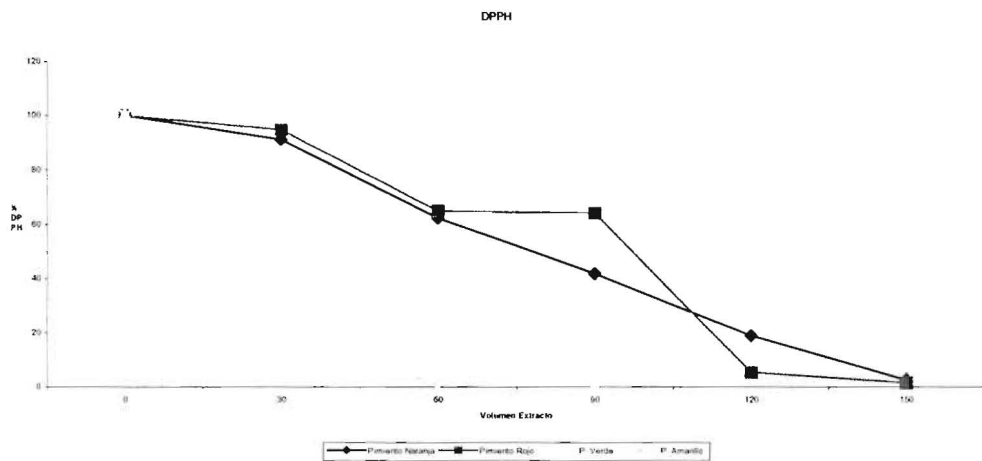


Fig. 29 Representación Gráfica de la desaparición de la señal de DPPH

En el caso del radical Tempol, se registró el secuestro del radical sólo por el extracto del pimiento verde.

Como se puede observar en la Fig. 27 la señal del Tempol mientras que en la Fig. 28 desapareció por completo en presencia del extracto de pimiento verde.

Fig. 30 Espectro de Tempol

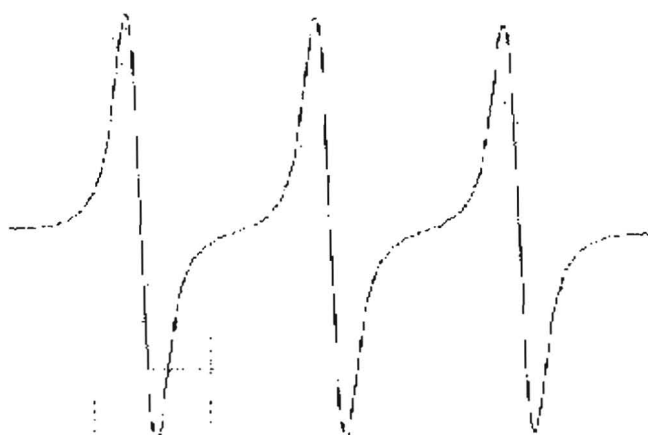
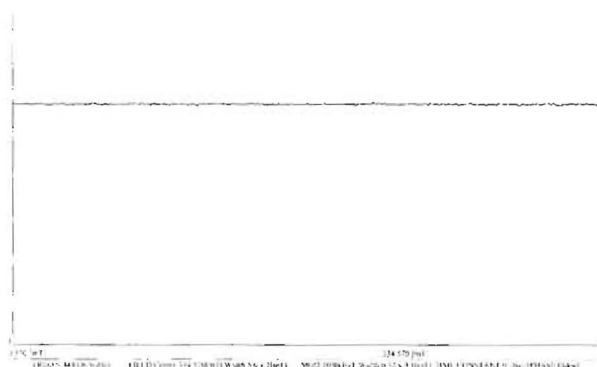


Fig. 31 Espectro de RPE de Tempol / extracto de pimiento Verde



Determinación de las Condiciones para la Micro Extracción en Fase Sólida

Se determinó que las mejores condiciones para extraer los compuestos volátiles del jugo de pimienta son: la fibra 75 μm CAR/PDMS, sin agregar sal, a 43 °C y 30 min. de extracción. Con estas condiciones se identificaron los siguientes compuestos volátiles:

Tabla 9
Compuestos volátiles identificados

P. Verde	P. Amarillo	P. Naranja	P. Rojo
Propanal	Pentanal	Butanal	Tetrametilpirazina
Butanal	Butanal	Adenosina	Fenilacetaldehído
Pentanal	1-metil-4-(1-metil-etil) benceno	Etoxiacetaldehído	5-(hidroxiamino) pentanol
Tetrametilpirazina		2-etilfenil-2-oxo propanamida	Hexanal
5-metil-2-(1-metiletil)-ciclo hexanol		Fenilacetaldehído	Ciclohexadienona
		4-(2,6,6-trimetil-ciclohex-2-en-1-il)-but-3-enol	Octanal
		Ácido p-tert-butil-benzoico	

Discusión

Para la obtención de los espectros Raman se comprobó que aunque el agua de los tejidos vivos no produce una interferencia en la señal, sí provoca un aumento en el grosor lo que obstruye la incidencia del láser. Se eligió tomar los espectros Raman secando el tejido para que este fuera más delgado, aunque una alternativa es emplear un micrótopo. El mejor método para secar las muestras fue a vacío, pues no existió descomposición de la muestra por luz, calor o microorganismos y el tejido tenía una textura lisa que facilitaba la incidencia del láser sobre la muestra.

Se observó el espectro Raman característico para compuestos carotenoides en el espectro del pimiento rojo, mientras que en el verde el espectro predominante fue el de la clorofila. Para los pimientos amarillos fue una combinación de los espectros de los carotenoides con la clorofila, mientras que en el pimiento naranja no se identificaron las bandas típicas de los carotenoides.

La asignación de las bandas pertenecientes a los carotenoides se realizó de acuerdo a lo reportado en la literatura, pero con el análisis de HPLC se determinó a los carotenoides presentes en mayor concentración. De esta forma se asignan las bandas Raman a sus respectivos carotenoides.

En el Pimiento Amarillo los carotenoides presentes en mayor concentración son luteína, β -caroteno, zeaxantina (de 9 dobles enlaces conjugados) y licopeno (11), los cuáles se observaron en las bandas 1528, 1158 y 1016 cm^{-1} .

En el P. naranja se encontró que el caroteno presente en mayor concentración es el 7-*cis*- β -caroteno. Las bandas que muestra el todo *trans*- β -caroteno estándar son 1515, 1156 y 1007 cm^{-1} [60] aunque para la identificación *in situ* se emplea la banda 1520 cm^{-1} [69].

Las diferencias en las posiciones de las bandas entre isómeros *cis* y *trans* es significativa, por ejemplo, 1535 cm^{-1} para el isómero *trans*-crocetina y 1547 cm^{-1} para *cis*-crocetina [59].

Las bandas encontradas experimentalmente (1516, 1162 y 1014 cm^{-1}) son similares a las reportadas para la capsantina (1517, 1158 y 1004 cm^{-1}) ^[59] que tiene 9 dobles enlaces conjugados al igual que el 7-*cis*- β -caroteno, al cual las bandas 1516, 1162 y 1014 cm^{-1} deben referirse.

En el p. Rojo las bandas encontradas experimentalmente (1821, 1157, 1008 cm^{-1}) corresponden a violaxantina, 7-*cis*- β -caroteno y luteína que cuentan con 9 dobles enlaces conjugados.

En el Pimiento verde se observan predominantemente las bandas correspondientes a la clorofila (1325 y 1285 cm^{-1}) y los carotenoides son responsables de las bandas 1519 y 1004 cm^{-1} siendo 7-*cis*- β -caroteno, luteína (9 dobles enlaces conjugados) y licopeno (11 dobles enlaces conjugados).

El número de dobles enlaces conjugados de la cadena poliénica central no es la única responsable de la longitud de onda, también influyen los grupos laterales y los terminales, además de que *in situ* los carotenoides se encuentran formando complejos con proteínas y esterificados con ácidos grasos.

El HPLC con arreglo de diodos permite la identificación precisa de carotenoides a partir de su espectro UV-vis, y si para la separación se emplea un disolvente como hexano facilita la identificación de estereoisómeros, sin tener que recurrir a otro método analítico. Por esta razón se apreció la mezcla isomérica de: todo-*trans*- β -caroteno, 7-*cis*- β -caroteno y 11-*cis*- β -caroteno ^[70, 71 y 72].

Los precursores de la biosíntesis de los carotenoides, fitoeno y fitoflueno, se observaron solamente en los espectros del pimiento rojo, pues las plantas constantemente sintetizan estos precursores y sus derivados.

Durante el procedimiento pre-cromatográfico se mantuvieron las muestras de pimiento en la oscuridad para evitar la descomposición de los carotenoides por foto-oxidación. Del mismo modo se evitó la presencia de acetona en la saponificación para evitar reacciones de condensación, y se realizó la saponificación para remover la clorofila y los lípidos saponificables. Ambas acciones se realizaron para evitar la presencia de compuestos distintos a los carotenoides en el cromatograma.

En los espectros de RPE de las muestras sólidas se observaron las bandas $g \approx 2.0252$, H: 321 mT perteneciente a Fe II de alto espín y $g \approx 2.0055$, H: 325 mT perteneciente a un ión de un metal de transición, probablemente Mn (II), aunque no se resolvió la señal de 6 líneas característica se sabe que los iones de Mn forman parte de las plantas como cofactor de enzimas y en la clorofila dentro del fotosistema II.

La proporción de desaparición de los radicales TEMPOL y DPPH en presencia de los extractos etanólicos de pimienta se observó con la espectroscopía de RPE, para evaluar la habilidad de secuestrar a los radicales, esto es la actividad antioxidante.

Debido a que la composición y el contenido de los constituyentes varía de acuerdo con las condiciones de cultivo, maduración, condiciones climáticas y modo de almacenaje; esto dificulta el evaluar la actividad antioxidante por pruebas *in vitro*, no existen pruebas estandarizadas y ya que las frutas y verduras contienen varios componentes antioxidantes hidrosolubles y liposolubles se decidió realizar las pruebas con los radicales con extractos etanólicos (al ser los radicales solubles en etanol).

Este estudio mostró que con el método elegido para observar la actividad antioxidante (no existe un método estandarizado) de los pimientos, fue el pimiento verde el que presentó la mayor actividad antioxidante siguiendo en orden descendente los de color amarillo, naranja y rojo.

El pimiento rojo posee mayores niveles de carotenoides pro-vitamina A, en el trabajo de Matsufuji ^[44] el pimiento rojo era el que presentaba la mayor actividad antioxidante. Esta diferencia pudo ser causada por los genotipos o variedad (pues los nombres taxonómicos son poco confiables, en especial tratándose de especies cultivadas) así como las condiciones geográficas y de crecimiento.

Es importante recordar que la estimación de la actividad antioxidante *in vitro* tiene la dificultad de que los vegetales contienen abundantes compuestos con habilidad antioxidante de diferentes polaridades, por lo que la elección del disolvente para las extracciones sólido líquido provoca cierta selectividad, al no ser todos los compuestos solubles.

Conclusión

Se identificaron los carotenoides a través de los espectros Uv-vis obtenidos gracias al HPLC con arreglo de diodos, de esta forma se asignaron las bandas del espectro Raman con sus respectivos carotenoides.

Se observó la actividad antioxidante en RPE con los radicales DPPH y Tempol. El pimiento que presentó mayor actividad antioxidante fue el de color verde, que es el que tiene menor variedad de carotenoides. Con esto se deduce que la diferencia en las actividades antioxidantes a partir del color de los pimientos no depende solo de la presencia de distintos compuestos carotenoides, sino de la cantidad de vitamina C.

Los compuestos volátiles identificados con la MEFS-CG-EM no son conocidos por poseer actividad antioxidante.

Cabe mencionar que para dar un valor agregado a los productos agronómicos se debe buscar incrementar la concentración de los compuestos benéficos así como mejorar el sabor, es necesario analizar los contenidos de fitonutrientes y la capacidad antioxidante en los cultivos. Este trabajo tuvo por objetivo el proponer una metodología para ello, pensando en el desarrollo sustentable al abordar técnicas poco empleadas en el país que permiten una disminución en la cantidad de disolventes empleados como son la espectroscopía Raman y la micro extracción en fase sólida.

Considero que la espectroscopía Raman es una buena alternativa para el control de calidad de frutas y legumbres al relacionar el color con la concentración de compuestos carotenoides cuando se ha realizado un análisis por HPLC previo, para determinar las bandas de interés.

Bibliografía, Ciberografía y Hemerografía.

1. **ABRAGAM A. y BLEANEY B.:** "Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions" Publicaciones Dover. Estados Unidos Americanos, **(1986).**
2. **BAKKALI F., AVERBECK S., AVERBECK D., IDAOMAR M.:** Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 446–475, **(2008)**
3. **BARANSKA Malgorzata, BARANSKI Rafal, SCHULZ Hartwig y NOTHANGEL Thomas:** Tissue-specific accumulation of carotenoids in carrot roots. *Planta*. **224**, 1028-1037 **(2006).**
4. **BARANSKI Rafal, BARANSKA Malgorzata y SCHULZ Hartwig:** Changes in Carotenoid content and distribution in living plant tissue can be observed and mapped in situ using NIR-FT- Raman spectroscopy. *Planta*, **222**, 448 – 457, **(2005).**
5. **BARBOZA Gloria E. y DE BEM BIANCHETTI Luciano:** Three New Species of *Capsicum* (Solanaceae) and a Key to the Wild Species from Brazil. *Systematic Botany* **30** (4), 863–871, **(2005).**
6. **BAUSOR S. C.:** A Monstrous Fruit of *Capsicum*. *American Journal of Botany*, **22**, 826-828, **(1935).**
7. **BRITTON G., LIAAEN-JENSEN S. y PFANDER H.** (eds.): "Carotenoids". Basel: Birkhäuser **(1995).**
8. **BUTTERY R.G., SEIFERT R. M., GUADAGNI D. G. y LING L. C.:** Characterization of Some Volatile Compounds of Bell Pepper. *J. Agric. Food Chem.* **17** (6) 1322 – 1327 **(1969).**
9. **CARDEAL Z.L., GOMES Da SILVA M.D.R. y MARRIOTT P.J.:** Comprehensive two dimensional gas chromatography/ mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 2823 –2836 **(2006).**
10. **CASTRO CID Del PADRO Victor:** "Determinación de Capsaicina en algunas variedades mexicanas de *Capsicum*". México, UNAM. Tesis Profesional, **(1979).**

11. **CHAMPION Dominique, SIMATOS Denise, KALOGIANNI Eleni P., CAYOT Philippe y Le MESTE Martine:** Ascorbic Acid Oxidation in Sucrose Aqueous Model Systems at Subzero Temperatures. *J. Agric. Food Chem.* **52** (11), 3399-3404, **(2004)**.
12. **Chile Pepper Institute:** "The Story of Chile pepper Peppers". *New Mexico State University*, **(2007)**. Las Cruces, Nuevo México, Estados Unidos. [Fecha de consulta: 28 de enero 2008] Disponible en línea en: <<http://www.chilepepperinstitute.org>>
13. **CHING Ling Soon y MOHAMED Suhaila:** Alpha-Tocopherol Content in 62 Edible Tropical Plants. *J. Agric. Food Chem.*, **49** (6), 3101-3105 **(2001)**.
14. **Colaboradores de Wikipedia:** *Chili pepper* [en línea]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2007 [fecha de consulta: 5 de noviembre del 2007]. Disponible en <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Chili_pepper>
15. **Colaboradores de Wikipedia:** *Free-radical theory* [en línea]. Wikipedia, La enciclopedia libre, 2007 [fecha de consulta: 26 de septiembre del 2008]. Disponible en: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Free-radical_theory&oldid=298974890>
16. **COLLERA-ZÚÑIGA Ofelia, GARCÍA JIMÉNEZ Federico y MELÉNDEZ GORDILLO Ricardo:** Comparative Study of Carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry*. **90** 109 – 114 **(2005)**.
17. **COLLYNS Dan:** Chillies Heated Ancient Cuisine. Historia de BBC NEWS. Publicado: 2007/02/16. © BBC. [Fecha de consulta: 31 de enero de 2008] Disponible en línea en: <<http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/2/hi/americas/6367299.stm>>
18. **Consejo Estatal de Productores de Chile de Guanajuato. S.C.** © iMéxico 1996. [fecha de consulta: 28 de enero del 2008]. Disponible en línea en < <http://www.ceprochgto.com> >
19. **CREMER Dirk y EICHNER Karl:** Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) Powder. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **48**, 2464 – 2460 **(2000)**

20. **DAVIES B.H., MATTHEWS Susan y KIRK, T.O.:** The nature and biosynthesis of the carotenoids of different colour varieties of *Capsicum annuum*. *Phytochemistry* **9**, 797 – 805 (1970).
21. **De TEODORO-PARDO Claudia, GARCÍA-VELÁZQUEZ Armando, CORONA-TORRES Tarsicio:** Polimorfismo cromosómico en *Capsicum annuum* L. (solanaceae) en recolectas de Puebla, Morelos y Querétaro, México. *Agrociencia*. **41**, 873 – 881, (2007).
22. **EDGE Ruth Ruth y TRUSCOTT George:** Carotenoid Radicals in the interaction of Carotenoids with Active Oxygen Species, pp. 223 – 234, en: "The Photochemistry of Carotenoids". FRANK H A, YOUNG A. J., BRITTON G y COGDELL R J (eds.) Kluwer Academic Publishers, Holanda, **1999**.
23. **EFREMOV Evtim V., ARIESE, Freek, GOOIJER, Cees:** Achievements in Resonance Raman Spectroscopy. Review of a Technique with a Distinct Analytical Chemistry Potential. *Analytica Chimica Acta*. **606**, 119 – 134 (2008).
24. **EICHLER Olaf, SIES Helmut y STAHL Wilhem:** Divergent optimum levels of lycopene, β -carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblast. *Photochemistry and Photobiology*. **75** (5), 505 – 506 (2002).
25. **ELLIOTT Jane:** Could chilli peppers relieve pain?. Historia de BBC NEWS. Publicado: 2006/06/30. © BBC. [Fecha de consulta: 31 de enero de 2008] Disponible en línea en: <<http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/2/hi/health/4993576.stm>>
26. **ENZELL Curt:** Biodegradation of Carotenoids – an important route to aroma compounds. *Pure & Appl. Chem*. **57** (5), 693 – 700 (1985)
27. **ESHBAUGH Hardy:** Genetic and Systematic Studies of Chili Peppers (*Capsicum* – Solanaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. **102**, 396 – 403, (1976).
28. **EXCELSIOR,** "¿Quién se pirateó mi semilla?", 16 de Noviembre de **2007**.
29. **FERRARI Carlos:** Functional foods and physical activities in health promotion of aging people. *Maturitas* **58**, 327 – 339 (2007)
30. **FERRARO John, NAKAMOTO Kazuo:** "Introductory Raman Spectroscopy". Academic Press, Inc. Estados Unidos Americanos, (1994).

31. **FRANK Christopher , NELSON Robert, SIMONNE Eric, BEHE Bridget y SIMONNE Amarat:** Consumer Preferences for Color, Price, and Vitamin C Content of Bell Peppers. *Hortscience* **36** 795 – 800 **(2001)**.
32. **GALINDO G. H., MARTÍNEZ O.J., ROSALES G.E., y GUEVARA B. I.:** La capsaicina, el principio pungente del chile; su naturaleza, absorción, metabolismo y efectos farmacológicos. *Ciencia* **46**, 84 – 102, **(1995)**.
33. **GONZÁLEZ Antonio:** "El Príncipe de los Botánicos, Linneo". Colección Científicos para la Historia. Nivola libros ediciones. España, **2001**.
34. **Govindjee** en: "The Photochemistry of Carotenoids". FRANK H A, YOUNG A. J., BRITTON G y COGDELL R J (eds.). Kluwer Academic Publishers, Holanda **(1999)**.
35. **KOCHERGINSKY Nikolai M., KOSTETSKI Yuri Yu y SMIRNOVJ Alex I.:** Use of Nitroxide Spin Probes and Electron Paramagnetic Resonance for Assessing Reducing Power of Beer. Role of SH Groups. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1052-1057, **(2005)**
36. **KÔCSIS Nándor, AMTMANN Mária, MEDNYÁNSZKY Zsuzsa, KORÁNY Kornél:** GC-MS Investigation of the Aroma Compounds of Hungarian Red Paprika (*Capsicum Annuum*) Cultivars. *J. Food Comp. Anal.* **15**, 195 – 203 **(2002)**.
37. **LARAZOE Liza, ZUÑIGA-HANSEN María E.:** Phenolic Antioxidant Extraction from Selected Agroindustrial Residual Sources. *Journal of Biotechnology* **131S**, s193 – s194, **(2007)**.
38. **LONG-SOLÍS Janet:** "Capsicum y Cultura: La historia del Chilli". Fondo de Cultura Económica. Segunda Edición. México, **(1998)**.
39. **MANNINEN S.:** Resonant Raman Scattering and Fluorescence Spectroscopy *Radiat. Phys. Chem.* **50**, 77-89 **(1997)**.
40. **MANOHARAN Ramasamy, WANG Yang y FELD Michael:** Histochemical Analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A.* **52**, 215 – 249 **(1996)**.
41. **MAOKA Takashi, FUJIWARA Yasuhiro, HASHIMOTO Keiji y AKIMOTO Naoshige:** Isolation of a Series of Apocarotenoids from the

Fruits of the Red Paprika *Capsicum annuum* L. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1601-1606, (2001).

42. **MARÍN Alicia, FERRERES Federico, TOMÁS-BARBERÁN Francisco A. y GIL María:** Characterization and Quantitation of Antioxidant Constituents of Sweet Pepper (*Capsicum annuum* L.) *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3861 – 3869, (2004).
43. **MATERSKA Magorzata y PERUCKA Irena:** Antioxidant Activity of the Main Phenolic Compounds Isolated from Hot Pepper Fruit (*Capsicum annuum* L.) *J. Agric. Food Chem.* **53** (5), 1750-1756, (2005).
44. **MATSUFUJI Hiroshi, ISHIKAWA Keiko, NUNOMURA Osamu, CHINO Makoto y TAKEDA Mitsuharu:** Anti-oxidant Content of Different Coloured Sweet Peppers, white, green, yellow, orange and red (*Capsicum annuum* L.) *International Journal of Food Science and Technology*, **47**, 1482 – 1488, (2007).
45. **MCGRAW Kevin:** The antioxidant function of many animal pigments: Are there consistent health benefits of sexually selected colourants?. *Animal Behavior* **69** (4), 757 – 764 (2004).
46. **MIEAN Koo Hui y MOHAMED Suhaila:** Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *J. Agric. Food Chem.* **49** (6), 3106 – 3112, (2001).
47. **NEE Michael, BOHS Lynn y KNAPP Sandra:** New species of *Solanum* and *Capsicum* (*Solanaceae*) from Bolivia, with clarification of nomenclature in some Bolivian *Solanum*. *Brittonia, The New York Botanical Garden Press.* **58** (4), 322 – 356 (2006).
48. **PERRY Linda, DICKAU Ruth, ZARRILLO Sonia, HOLST Irene, PEARSALL Deborah M., PIPERNO Dolores R., BERMAN Mary Jane, COOKE RICHARD G., RADEMAKER Kurt, RANERE Anthony J., RAYMOND J. Scott, SANDWEISS Daniel H., SCARAMELLI Franz, TARBLE Kay, ZEIDLER James A.:** Starch Fossils and the Domestication and Dispersal of Chili Peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science.* **315**, 986-988 (2007).

49. **PERUCKA Irena, OLESZEK Wieslaw:** Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography. *Food Chemistry*. **71**, 287 – 291 (**2000**).
50. **POLOVKA Martin, BREZOVA Vlasta y STAŠKO Andrej:** Antioxidant Properties of Tea Investigated by EPR Spectroscopy. *Biophysical Chemistry*. **106**, 39-56 (**2003**).
51. **REFORMA,** "Buscan evitar precios 'picantes'", 10 de marzo del **2008**.
52. **RODRÍGUEZ-AMAYA Delia:** "A Guide to Carotenoid Analysis in Foods". International Life Sciences Institute Press. Estados Unidos Americanos (**2001**).
53. **ROJO Teófilo, LEZAMA L. y BARANDIARAN José M. (Eds.):** "Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica". Universidad del País Vasco, Servicio Editorial. España, (**1997**).
54. **ROJO Teófilo:** "Principios Básicos de la Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica". Universidad del País Vasco, Servicio Editorial. España, (**2004**).
55. **ROSAS María Cristina:** "China en el Siglo XXI: ¿Hacia una nueva bipolaridad?". Universidad Nacional Autónoma de México /Australian National University. México, (**2007**).
56. **RÜEDI Peter:** HPLC – A Powerful Tool in Carotenoid Research. *Pure & Appl. Chem*. **75** (5), 793 – 800 (**1985**).
57. **SÁNCHEZ MILLÁN J. Luis, SERRATO-CRUZ Miguel A., Del VILLAR-MARTÍNEZ Alma, VENEGAS-ESPINOSA Pablo, EVANGELISTA-LOZANO Silvia, JIMÉNEZ-APARICIO Antonio, QUINTERO-GUTIERREZ Adrián y GARCÍA-JÍMENEZ Federico:** Espectroscopía Raman: Herramienta rápida y no invasiva para determinar carotenoides en inflorescencias de *Tagetes erecta* L. *Agrociencia*. **41**, 863 – 871 (**2007**).
58. **SANTOS HERNÁNDEZ Jorge Luis:** Identificación y Cuantificación de terpenos en agave Mezcalero por Micro-extracción en fase sólida –

Cromatografía de gases – Espectrometría de Masas. Tesis: Posgrado Ciencias Químicas, UNAM, **2008**.

59. **SCHULZ Hartwig y BARANSKA Malgorzata:** Identification of Valuable Plant Substances by IR and Raman Spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, **43**, 13 – 25 (**2007**).
60. **SCHULZ Hartwig, BARANSKA Malgorzata y BARANSKI Rafal:** Potential of NIR-FT-Raman Spectroscopy In Natural Carotenoid Analysis. *Biopolymers*, **77**, 212 – 221 (**2005**).
61. **SMITH Paul y HEISER B. Jr.:** Taxonomic and Genetic studies on the cultivated peppers, *Capsicum annuum* L. and *C. Frutescens*. *American Journal of Botany*. **38**, 362 – 368, (**1951**).
62. **SUN T., XU Z. et al.:** Antioxidant Activities of Different Colored Sweet Bell Peppers (*Capsicum Annuum* L.). *J. of Food Science*. **72**, 98 – 102 (**2007**).
63. **SUPELCO:** Bulletin 923 Solid Phase Microextraction: Theory end Optimization of Conditons. © Sigma-Aldrich, 1998. Disponible en línea en: <www.supelco.com>
64. **The University of Arizona, Department of Chemistry:** Introduction to mass spectrometry [en línea] : <www.chem.arizona.edu/massspec/> [Fecha de Consulta: 3 de abril del 2009]
65. **TSOU, Samson C.S. et al.:** Use Of Near Infrared Reflectance To Measure Capsaicinoids in Pepper (*Capsicum* Spp). *Capsicum and Eggplant Newsletter*, **16**, 56-59 (**1997**).
66. **VOTAVA Eric J., BARAL Jit B. y BOSLAND Paul:** Genetic Diversity of Chile (*Capsicum Anuum* Var. *Anuum* L.) Landraces from Northern New Mexico, Colorado and Mexico. *Economic Botany* **59**, 8-17 (**2005**).
67. **WITHNALL Robert, CHOWDHRY Babur, SILVER Jack, EDWARDS Howell y De OLIVEIRA Luiz:** Raman Spectra Of Carotenoids in Natural Products *Spectrochimica Acta Part A*, **59**, 2207 – 2217 (**2003**).
68. **YAMAUCHI Ryo, AIZAWA Koichi, INAKUMA Takahiro y KATO Koji:** Analysis of Molecular Species of Glycolipids in Fruit Pastes of Red Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.) by High-Performance Liquid

Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **49** (2), 622-627 (2001).

69. **ZAGALSKY P.F.:** Carotenoid-Protein Complexes. *Pure & Appl. Chem.* **47**, 103 – 120 (1976).
70. **ZEICHMEISTER Laslo y POLGÁR A.:** *cis-trans* Isomerization and *cis*-Peak in the α -Carotene Set and in some other stereoisomeric sets. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 137-144 (1944).
71. **ZEICHMEISTER Laslo y POLGÁR A.:** *cis-trans* Isomerization and Spectral Characteristics of Carotenoids and Some Related Compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, **65** (8), 1522-1528 (1943).
72. **ZEICHMEISTER Laslo:** "*cis – trans* Isomeric Carotenoids, Vitamins A and Arylpolyenes". Academic Press. Viena, Austria (1962).