



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS
QUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DE CAPSAICINA Y DEHIDROCAPSAICINA EN
CHILES POR EXTRACCIÓN ASISTIDA CON ULTRASONIDO SEGUIDA
DE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

TESIS

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.A. LUIS ANGEL ALVARADO SUÁREZ



TUTOR: Dra. Araceli Peña Álvarez

2010



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 la Universidad Nacional Autónoma de México por una vez más darme la oportunidad de superarme y ofrecer a todos los mexicanos una educación superior de excelencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A la Dra. Araceli Peña Álvarez por los conocimientos y el tiempo dedicado al proyecto de investigación.

A mis sinodales por sus comentarios y aportes para mejorar este proyecto de investigación.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, los que estuvieron: Alejandra, Jorge Luis, Ana, Miguel, Hipocrates; los que están: Sandra, Edgar, Esteban, Rene. A todos ellos gracias por compartir su amistad, conocimientos y tiempo en el laboratorio.

Y de manera muy especial a Martha mi madre, Gabriela, Daniel y a toda mi familia.

El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Química Analítica de la División de estudios de Posgrado, Edificio “B” de la Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se presentó en el 44° Congreso Mexicano de Química en Septiembre de 2009.INDICE

Resumen-----	1
1. INTRODUCCIÓN-----	2
2. ANTECEDENTES-----	4
2.1 Chiles-----	4
2.1.1 Morfología-----	5
2.2.2 Composición química-----	6
2.2.3 Usos-----	7
2.2.3.1 Deshidratación de chiles-----	7
2.2.3.2 Elaboración de salmueras y encurtidos-----	8
2.2.3.3 Obtención de oleorresinas, aceites esenciales y pigmentos-----	9
2.2.3.4 Elaboración de salsas-----	10
2.3 Capsaicinoides-----	10
2.3.1 Tejido y localización subcelular de los capsaicinoides-----	12
2.3.2 Síntesis de capsaicinoides-----	13
2.3.3 Aplicaciones-----	14
2.3.4 Estabilidad química-----	15
2.4 Estudios previos sobre caracterización y cuantificación de capsaicinoides en chiles y productos elaborados con base en esta especia-----	19
2.5 Extracción con ultrasonido-----	21
2.5.1 Historia-----	21
2.5.2 Mecanismo de extracción-----	21
2.5.3 Equipo y procedimiento de extracción-----	23
2.6 Microextracción en Fase Sólida-----	24
2.6.1 Métodos de extracción-----	26
2.6.2 Tipos de recubrimiento-----	27
2.6.3 Optimización del proceso de MEFS-----	28
2.7 Diseño de experimentos-----	29
2.8 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas-----	31
2.8.1 Acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masas-----	33
3. OBJETIVOS-----	35
3.1 Objetivo General-----	35
3.2 Objetivo Particular-----	35
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL-----	36
4.1 Extracción de capsaicinoides-----	36
4.1.1 Materiales y equipo-----	36
4.1.2 Reactivos-----	37
4.1.3 Estándares-----	37
4.4.1 Muestras-----	38
4.1.4.1 Acondicionamiento de las muestras-----	38
4.1.4.2 Cantidad de muestra analizada-----	39
4.1.5 Capsaicinoides analizados-----	39
4.2 Análisis cromatográfico-----	40
4.2.1 Condiciones Cromatográficas-----	40
4.2.2 Identificación de capsaicinoides-----	41
4.2.3 Cuantificación de capsaicina y dehidrocapsaicina-----	41
4.3 Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS)-----	41

4.3.1 Selección de los parámetros para la Extracción Asistida con Ultrasonido-----	42
4.3.2 Variables seleccionadas para la optimización de la extracción de capsaicinoides-----	42
4.3.3 Procedimiento para la extracción de capsaicinoides en chiles utilizando EAUS-----	45
4.3.4 Análisis de capsaicinoides en chiles utilizando EAUS-----	45
4.3.5 Precisión y linealidad-----	46
4.3.6 Recobro -----	47
4.4 Análisis de capsaicinoides en chiles utilizando MEFS-----	47
4.4.1 Parámetros de extracción-----	48
4.4.2 Análisis de capsaicinoides en chiles utilizando extracción Soxhlet-----	49
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS-----	51
5.1 Extracción de capsaicinoides utilizando Extracción Asistida con Ultrasonido-----	51
5.1.1 Selección de parámetros para EAUS-CG-EM-----	51
5.2 Precisión y Linealidad del método-----	57
5.3 Recobro-----	59
5.4 Cuantificación de capsaicinoides en 11 variedades de chiles por EAUS---	60
5.5 Cuantificación de capsaicinoides en 11 variedades de chiles por extracción Soxhlet-----	63
5.6 Cuantificación de capsaicinoides en 11 variedades de chiles por MEFS--	69
5.7 Comparación de la concentración de los capsaicinoides obtenidos con los diferentes métodos de extracción-----	74
5.7.1 Comparación de la concentración extraída de capsaicina-----	74
5.7.1.1 Análisis de varianza de la concentración extraída de capsaicina por los diferentes métodos-----	77
5.7.1.2 Prueba de rango múltiple de los métodos de extracción de capsaicina-----	78
5.7.2 Comparación de la concentración extraída de DHC-----	80
5.7.2.1 Análisis de varianza de la concentración extraída de capsaicina por los diferentes métodos-----	81
5.7.2.2 Prueba de rango múltiple de los métodos de extracción de DHC-----	83
6. CONCLUSIONES-----	86
7. BIBLIOGRAFÍA-----	88

RESUMEN

Se desarrolló y optimizó un método por Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS) seguida de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) para la cuantificación de capsaicina y dihidrocapsaicina, que son los capsaicinoides mayoritarios en los chiles. Estos capsaicinoides son los responsables de la pungencia o picor característico del chile, además de ser uno de los atributos más apreciados en dicha especie.

La EAUS se optimizó utilizando un diseño de experimentos factorial 2^5 en el cual se consideraron: el disolvente, el tiempo de extracción, la temperatura de extracción, la cantidad de muestra y la potencia de la sonda. Las condiciones óptimas propuestas para la extracción fueron: etanol como disolvente, 25 minutos de extracción, 50 °C de temperatura, 0.25g de muestra y 60% de amplitud. La identificación de cada compuesto se realizó mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos con los espectros de masas de los estándares correspondientes y los espectros de la base de datos de la biblioteca del EM (NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library versión 2.0 build Nov. 2000). La cuantificación de los capsaicinoides extraídos se realizó por CG-EM, utilizando curvas de calibración para cada capsaicinoide en estudio.

Se analizaron 11 variedades de chiles obteniendo la concentración de capsaicina y dihidrocapsaicina presentes. Con el propósito de mostrar la eficiencia del método con respecto a otros métodos existentes se llevó a cabo la cuantificación de los capsaicinoides en las mismas muestras utilizando diferentes métodos de extracción: Soxhlet que es la metodología oficial de la AOAC y Microextracción en Fase Sólida un método previamente desarrollado en el laboratorio.

Utilizando un análisis de varianza fue posible comparar los métodos. Los resultados mostraron que no existe diferencia significativa entre el método desarrollado y el método oficial.

El método desarrollado tiene varias ventajas sobre el oficial, entre las que destacan: simplicidad, menor tiempo de extracción y menor cantidad de muestra para el análisis.

1. INTRODUCCIÓN

Los chiles fueron domesticados en México por su sabor color y pungencia. Hace alrededor de 6,000 años los chiles rojos fueron utilizados en el trópico de Sudamérica como una especia para disfrazar el sabor de la comida blanda o desabrida. Los chiles se llaman chile en México y Centroamérica y ají en Sudamérica y las Indias Occidentales.

Todas las especies de chiles son originarias de América y en la época de la colonia fueron llevados a España, desde donde se dispersaron a Europa y de ahí al resto del mundo.

En México existen más de 40 variedades de chiles. La diversidad y la riqueza de los platillos preparados con este producto son impresionantes. Desde los típicos y consistentes moles de Puebla, Oaxaca y Yucatán, las salsas y adobos del estado de México, Guadalajara o San Luis Potosí. La variedad de gustos, sabores e ingredientes que en las cocinas del país se emplean en conjunción con los diferentes chiles, ha permitido el desarrollo de una gastronomía característica, de un gusto peculiar y sugerente, que no obstante las transformaciones y las influencias, conserva una tónica particular, debida justamente, a la variedad de formas y maneras en que en nuestro país se consume el chile.

México destaca a nivel mundial por tener la mayor variabilidad genética de *Capsicum annum*, que ha dado origen a un gran número de variedades o tipos de chiles, entre los que destacan el serrano, jalapeño, ancho, pasilla, guajillo y de árbol.

En algunos estados del país se destinan superficies al cultivo del chile para deshidratado, principalmente, y en otros se destinan principalmente para producto fresco y encurtido.

México es también uno de los principales productores de chiles en el mundo. El consumo de chiles por persona es mayor al consumo de arroz y de papa. En 2001 se registró un consumo per cápita de 8.7 kilogramos. Esto representa un incremento del 17.6% de 1980 a la fecha. El chile verde sigue siendo, junto con el maíz y el frijol, una importante fuente de alimentación para la población.

México ocupa el tercer lugar de la producción mundial de chiles frescos, detrás de China y Turquía, y ocupa el noveno lugar de producción de chiles secos detrás de India, China, Bangladesh, Perú, Pakistán, Etiopía, Vietnam y Myanmar.

Hoy en día el chile no es sólo importante desde el punto de vista gastronómico, sino también desde el farmacéutico. Dentro de sus aplicaciones farmacológicas se puede mencionar su uso en tratamiento contra el dolor en diversas enfermedades como artritis reumatoide, migraña, herpes y neuropatías diabéticas. Debido a la estructura fenólica que presentan los compuestos capsaicinoides presentes en el chile, éste presenta actividad antioxidante, tanto a nivel celular como en la matriz alimentaria, retardando la velocidad de oxidación de los lípidos presentes.

Se conocen diferentes metodologías para la cuantificación o detección de compuestos capsaicinoides en chiles, que son los compuestos responsables de la pungencia, la característica más importante de este fruto. Las metodologías abarcan desde métodos Espectrofotométricos, hasta Cromatografía de líquidos o Gases con acoplamiento a Espectrometría de Masas. Sin embargo, la mayoría de estos métodos conllevan una larga preparación de la muestra, lo cual implica un alto consumo de disolventes y de tiempo.

Por tal motivo, el presente trabajo plantea el desarrollo y optimización de una metodología para la detección y cuantificación de compuestos capsaicinoides presentes en chiles, utilizando la extracción asistida con ultrasonido (sonda) seguida de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. La técnica propuesta es simple, rápida, requiere una menor cantidad de muestra, y tiene relativamente un bajo costo.

2. ANECDENTES

2.1 Chiles

El género *Capsicum* comprende varias especies de plantas, emparentadas con el tomate, oriundas del Continente Americano, cuyo fruto se consume en diferentes preparaciones y se emplea como base para colorantes en alimentos. Dicho fruto recibe diferentes nombres de acuerdo al país por ejemplo: ají, chile o chili, pimiento, guindilla, morrón, peperonchino. En México se utiliza la palabra chile que proviene del náhuatl *chilli* para referirse a cualquier fruto del género *Capsicum*.

La descripción taxonómica filogenética de los chiles está descrita como:

División	Spermatophyta
Línea	Angiospermae
Clase	Dicotyledones
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>

La clasificación de los chiles se basa principalmente en la forma de las flores, la genética, la bioquímica y la distribución geográfica. El género *Capsicum* incluye alrededor de 26 especies, de las cuales el hombre solamente utiliza 12, y solamente 5 han sido domesticadas y se cultivan de manera regular. Dichas especies son: *Capsicum annum*, (Figura 1), *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum furtescens* y *Capsicum pubescens* (López Riquelme. 2003., Hundall y Dhal., 2004).



Figura 1. Especies del género *Capsicum*

2.1.1 Morfología y Estructura

Las especies de *Capsicum* son angiosperma dicotiledónea de árboles o arbustos anuales. La planta, de tallo leñoso, forma normalmente un arbusto de hasta 1.5 m de altura; algunas variedades alcanzan tamaños superiores. Las flores son blancas o verdosas en la mayoría de las variedades, salvo en algunos casos en que se presentan flores de coloración violácea. Dichas flores son hermafroditas con dos o cuatro pistilos, en cuya base se encuentra el ovario conteniendo los óvulos, estos al ser fecundados producen semillas. Los óvulos están unidos a la placenta a través de un hilillo llamado funículo.



Figura 2: Morfología de las especies de *Capsicum*

El fruto es técnicamente una baya que varía en coloración y tamaño de acuerdo a la variedad; puede ser cúbico, cónico o esférico. El interior del fruto en la parte interior del pericarpio es hueco y está dividido en dos o cuatro costillas verticales interiores que portan las semillas de color amarillo pálido. La placenta con las semillas y las costillas sobresalen formando el corazón, el cual está cubierto por tejido placentario; su forma está relacionada con la forma del fruto. Sus componentes mayoritarios son: semilla, pericarpio, placenta y pedúnculo.

La región capsular externa corresponde al pericarpio y un eje, está formada por un pedúnculo grueso y corto, que varía en forma, color y acritud. En la región capsular externa se distinguen tres regiones: base, cuerpo y ápice. La base está formada por el extremo de un pedúnculo y los tejidos desarrollados a partir del receptáculo floral, pudiendo ser concha, convexa o plana. El pericarpio es coriáceo; dependiendo de la madurez del fruto sus colores abarcan, según la especie, desde el blanco y el amarillo hasta el morado intenso, pasando por el naranja, el rojo brillante y el lavanda. El color verde es señal de inmadurez, aunque muchas especies se consumen también de ese modo. El cuerpo del fruto presenta una superficie suave, frecuentemente asurcada y con depresiones o rugosidad transversal (Hundall y Dhall., 2004).

2.2.2 Composición química

El chile tiene un papel importante en la alimentación ya que proporciona vitaminas y minerales; es una buena fuente de proteínas, carbohidratos y minerales, así como de antioxidantes naturales, como flavonoides (quercetina, luteolina), ácidos fenólicos, carotenoides (β -caroteno, capsantina, etc.), tocoferoles, vitamina A y vitamina C; contienen también una gran cantidad de compuestos aromáticos que forman parte del sabor global de los alimentos que los contienen (Rosa et al., 1999).

Los chiles tienen dentro de sus componentes minoritarios a los capsaicinoides, dentro de los cuales la capsaicina y la dihidrocapsaicina representan aproximadamente el 90% de estos compuestos. Este grupo de compuestos incluye también otros homólogos de estas sustancias, que se encuentran presentes en el pericarpio y en la placenta del fruto.

En la Tabla 1 se muestra el análisis bromatológico del pimiento verde, cabe señalar que la composición de otras variedades de chile pudieran ser diferentes (Hundall y Dhall., 2004).

Tabla 1. Composición del pimiento verde (por 100g de porción comestible)

Componente	Contenido	Componente	Contenido
Humedad (g)	85.3	Cloruro (mg)	15
Proteínas (g)	2.9	Fosforo (mg)	80
Lípidos (g)	0.6	Hierro (mg)	1.2
Carbohidratos (g)	3.0	Sodio (mg)	6.5
Fibra (g)	6.8	Potasio (mg)	217
Minerales (g)	1.0	Cobre (mg)	1.55
Calcio (mg)	3.0	Ácido ascórbico (mg)	111
Magnesio (mg)	24	Riboflavina (mg)	0.39

2.2.3 Usos

El uso del chile es muy variado y es diferente en cada país, pero definitivamente su mayor aplicación reside en la industria de alimentos, esto debido a sus apreciadas características de sabor, olor y color. Existen diferentes sectores de la industria involucrados en el procesamiento de chiles, entre los cuales se encuentran:

- Deshidratación de chiles
- Elaboración de salmueras y encurtidos
- Obtención de oleorresinas, aceites esenciales y pigmentos
- Elaboración de salsas

2.2.3.1 Deshidratación de chiles

Uno de los métodos más antiguos empleados para la conservación de alimentos es el secado; que consiste en extraer el agua de ellos, lo que evita la proliferación

de microorganismos que eventualmente llevan a la descomposición del alimento. Al reducir la cantidad de agua, los microorganismos presentes en el alimento o aquéllos que pudieran interactuar con el alimento por contaminación, no pueden reproducirse. El secado de alimentos se hizo inicialmente utilizando la energía del sol y el viento. El agua suele eliminarse por evaporación (secado al aire, al sol, ahumado o por convección), y en el caso de la liofilización, los alimentos se congelan en primer lugar y luego se elimina el agua por sublimación.

El secado de los chiles se lleva a cabo en las plantas deshidratadoras que generalmente “maquilan” el secado del producto pesando a la entrada el volumen de chile en verde. El chile se coloca en charolas de malla que a su vez son depositadas en carros metálicos para ser introducidos a los túneles de secado.

Los túneles trabajan con un sistema de aire caliente forzado utilizando gas o diésel como combustible. El tiempo de secado depende del sistema y de la humedad de los chiles. El tiempo promedio de secado en la mayoría de los casos es de 4 horas por sección. Cada sección corresponde a una cantidad específica de carros, que generalmente son 5 y que varía de acuerdo a la capacidad de secado de cada planta.

Este método de conservación aporta además ventajas derivadas de la reducción de peso, lo cual facilita el almacenamiento, el manejo y el transporte del producto (Consejo Nacional de productores de Chile).

2.2.3.2 Elaboración de salmueras y encurtidos

El uso de la sal para la conservación de los alimentos está muy extendido, debido a que aporta sabor, ejerce un efecto conservador e influye en la textura y otras características de los encurtidos.

La sal empleada debe de ser de buena calidad, es decir, debe presentar un bajo contenido en calcio, magnesio y hierro, un color blanco y debe encontrarse libre de bacterias halofíticas y materias extrañas. El salado y la salmuera son las principales aplicaciones de la sal en la preparación de los encurtidos y salsas. Los

Jalapeños, los Serranos y los Chipotles son los chiles que más frecuentemente se conservan en escabeche. El escabeche es una salsa o adobo que se hace con aceite frito, vino o vinagre, hojas de laurel y otros ingredientes, para conservar y hacer sabrosos los chiles. Esta es la forma más común de chiles enlatados que se encuentran a la venta en el mercado. El chile es de las especies más comunes para encurtidos, para sazonar otros vegetales al ser sometidos a diversas transformaciones, tienen en común su aderezo con vinagre. Los chiles pueden someterse a fermentación ácido-láctica o bien no fermentarse. También pueden elaborarse numerosos tipos de encurtidos mediante adiciones de azúcares, especias, esencias y aromas, pero siempre con presencia de vinagre, pues es la característica fundamental del encurtido. Los encurtidos, independientemente de que se fermenten o no, pueden pasteurizarse para mejorar su conservación. El proceso de fabricación de encurtidos comprende dos fases: La primera en la cual se lleva a cabo la fermentación ácido-láctica de la materia prima, realizada por la flora microbiana presente de forma natural en los frutos. En esta fase se realizan una serie de operaciones preparatorias tales como limpieza y corte de los chiles. La segunda fase de elaboración es a partir de la materia prima fermentada y conservada en salmuera o bien partiendo de productos en fresco que son elaborados a partir de los distintos tipos de encurtidos (CONAPROCH).

2.2.3.3. Obtención de oleorresinas, aceites esenciales y pigmentos

Los usos industriales del chile son cada vez mayores. El chile rojo en polvo, rico en capsantina (ingrediente que determina la cantidad de pigmento en un chile) se emplea en la avicultura como alimento para las gallinas, con objeto de obtener una intensa coloración amarilla, muy apreciada, tanto en las yemas de los huevos como en la piel de los pollos. De los chiles deshidratados a su vez se extrae una sustancia llamada oleorresina que se utiliza en la preparación de carnes frías y embutidos; como componente de pinturas marinas; como repelente en la agricultura y la ganadería menor, contra mamíferos depredadores; en la industria tabacalera, para mejorar el sabor de ciertas mezclas de tabaco; en la industria

farmacéutica, como estimulante; en la industria cosmética, para la elaboración de champú y jabón, así como para producir pigmentos colorantes para lápices labiales y polvos faciales; en la fabricación de aerosoles defensivos; y en fin, hasta en la industria militar, donde se emplea en la fabricación del llamado pepper-gas (CONAPROCH).

2.2.3.4 Elaboración de salsas

En México, el sector productivo de chiles de la Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias (CANAINCA) se encuentra en el tercer sitio en la producción con el 8% de la participación, sólo superado por las bebidas y las legumbres. Así mismo, junto con las salsas y condimentos, presentan en total un 10% de crecimiento, ubicándose en el segundo lugar de crecimiento de la mezcla total de la industria. El sector chiles de la industria generó una derrama económica en 2000 de 2,616 millones de pesos. El sector se compone por cinco segmentos: Serrano, Jalapeño, Chipotle, Morrón y otros chiles (Güeros, Largos, Pimientos, Poblanos, etc.). Las industrias salseras en todo el mundo han ido en aumento. Muchos países han empezado a elaborar salsas, en pequeñas compañías con sabores diversos (CONAPROCH).

2.3 Capsaicinoides

El sabor picante de los chiles pertenecientes al género *Capsicum* se debe a la presencia de un grupo de compuestos conocidos como capsaicinoides, los cuales se sintetizan y acumulan en el tejido placentario de los frutos. Los capsaicinoides son amidas formadas por la unión de una vainillilamina y un ácido graso.

El consumo del chile se debe principalmente al sabor picante, el cual es causado por la presencia de capsaicinoides. La concentración de este tipo de compuestos en las diferentes especies del género *Capsicum* puede variar desde un 0.003%

hasta 1% en algunos casos como el chile Habanero, aunque generalmente las concentraciones que se encuentran están en un rango de 0.3 y 0.5%.

La variación de la concentración y tipo de compuestos capsaicinoides contenidos en un chile es el resultado de factores ambientales y genéticos. El contenido de capsaicinoides varía entre cultivares de la misma especie y entre los frutos de un mismo cultivar. La pungencia también está influenciada por las condiciones ambientales, humedad, temperatura, tipo de suelo, y nivel de fertilización.

Los capsaicinoides son una mezcla de compuestos entre los cuales se destacan la capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida) (Figura 3) y la dihidrocapsaicina que tiene una insaturación entre los carbonos 6 y 7.

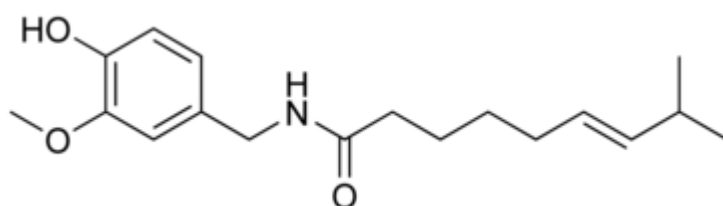


Figura 3. Estructura química de la capsaicina

Estos dos compuestos generalmente representan más del 90% de la concentración total de capsaicinoides en los chiles. La capsaicina forma cristales, en estado puro es insoluble en agua y soluble en varios disolventes orgánicos, tiene un punto de fusión de 65 °C y un punto de ebullición entre 210 y 220 °C.

Otros capsaicinoides son la norcapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina I, homocapsaicina II, homodihidrocapsaicina, nornorcapsaicina, nornordihidrocapsaicina y nonivamida (Figura 4). La función biológica de los capsaicinoides debida a su localización en la placenta del fruto, es proteger las semillas, sin embargo las aves no son sensibles a la capsaicina, por lo que pueden esparcir las semillas silvestres.

La mayoría de los capsaicinoides son pungentes y desarrollan su acción irritante en tejidos orales, garganta, y estómago, pero existen capsaicinoides no pungentes como la ω -hidroxicapsaicina. El mecanismo del picor se da cuando los

capsaicinoides activan un grupo de neuronas sensoriales periféricas que responden al dolor provocado por estímulos químicos mecánicos o térmicos. Dichas neuronas son llamadas nociceptores pues transmiten información sobre el daño en tejidos de diversas partes del cuerpo hacia la medula espinal y el cerebro (Barbero et al., 2008., Reinbach et al., 2007).

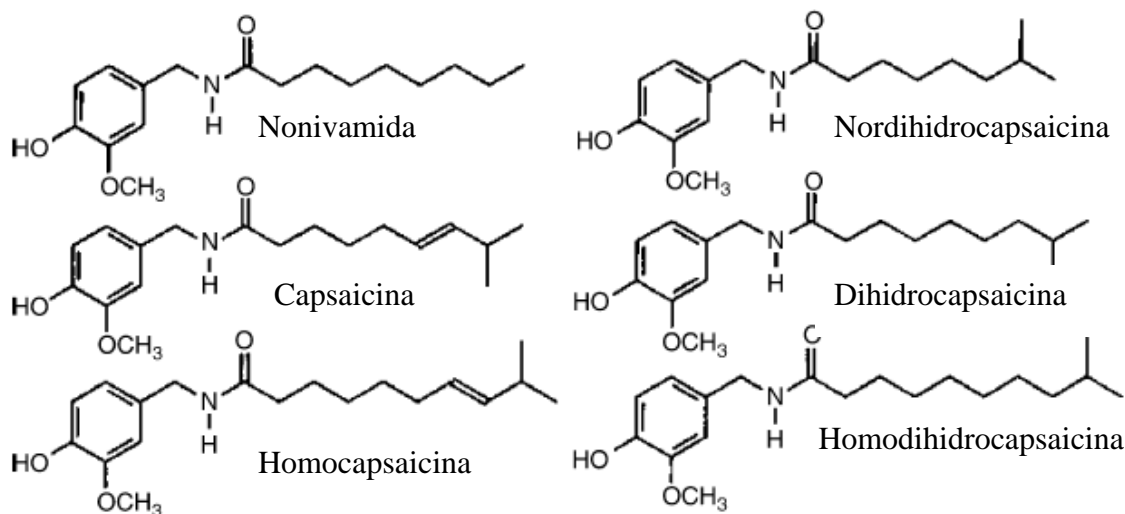


Figura 4. Estructura de compuestos capsaicinoides (Spicer y Almirall; 2005)

2.3.1 Tejido y localización subcelular de los capsaicinoides

La acumulación de capsaicinoides está asociada al desarrollo primario del fruto, éstos se acumulan en etapas primarias del desarrollo de la fruta y se reservan hasta la etapa final del crecimiento. El lugar de acumulación de la capsaicina es la placenta, más que en el pericarpio, en cualquier etapa del desarrollo del fruto. Una pequeña cantidad de capsaicinoides se encuentra en el pericarpio y las semillas.

La biosíntesis y acumulación de los capsaicinoides se dan en la placenta, en donde se acumula en vesículas y vacuolas de células epidérmicas de la placenta. Las enzimas necesarias para la síntesis son la KAS(b-cetoacil-sintetasa) y la FAT(ácido graso transferasa) las cuales se encuentran en la epidermis placentaria.

2.3.2 Síntesis de capsaicinoides

La síntesis de los capsaicinoides se da a partir de la unión entre la porción fenólica que es la vainillilamina y un ácido graso. A su vez es conocida también la ruta de síntesis de la vainillilamina que es derivada de la L-fenilalanina. Por otra parte, la L-valina genera los ácidos grasos para la formación de los capsaicinoides. Las diferencias estructurales entre los diferentes capsaicinoides reside en las estructuras de los ácidos grasos que las forman, éstos pueden ser de 11 o 9 carbonos, así como un diferente número de insaturaciones, aunque no se sabe con certeza si las cadenas hidrocarbonadas sufren modificaciones luego de su unión con la vainillilamida. La vainillilamida se forma por transformaciones enzimáticas sucesivas a partir de la fenilalanina, mientras que el ácido graso se forma a partir de la valina o la leucina (Vázquez et al., 2007).

Las características estructurales que determinan la pungencia de los capsaicinoides están asociadas con la presencia de un enlace amida que conecta la vainillilamida y la cadena del ácido graso (Figura 5).

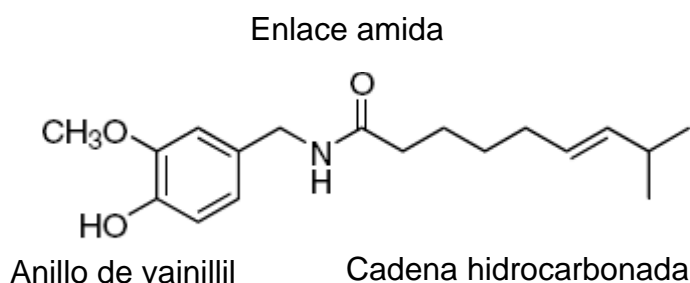


Figura 5. Enlace amida de la capsaicina (Spicer y Almirall; 2005)

Se conoce un grupo de sustancias no pungentes con estructuras similares a los capsaicinoides, los capsinoides tienen las mismas cadenas hidrocarbonadas, pero el anillo aromático es derivado de un vainillilalcohol.

Debido a las múltiples aplicaciones de los capsaicinoides, se ha tratado de sintetizar *in vitro*, compuestos análogos, suprimiendo los efectos irritantes que provocan en los tejidos. Los capsaicinoides análogos sintetizados no presentaron

pungencia a excepción de un par de ellos aunque en menor intensidad (Castillo et al. 2007).

2.3.3 Aplicaciones

Las especies del género *Capsicum* se han utilizado por mucho tiempo como parte importante en el sabor y color de los alimentos. La pungencia que provocan es muy apreciada en países de Norteamérica y Asia, y está relacionada directamente con el contenido de compuestos capsaicinoides (Schweiggert et al., 2007). Los chiles son vegetales, que además de las propiedades únicas que ofrecen en cuanto a sabor se refiere, tienen una alta concentración de antioxidantes entre los cuales se encuentran los compuestos capsaicinoides y algunos flavonoides como la quercetina y lutelina. En estado fresco contienen también una gran cantidad de ácido ascórbico. Las distintas tonalidades que van de rojo profundo a un rosa-amarillo pálido en los chiles se deben principalmente a la presencia de algunos carotenoides oxigenados como la capsantina y la capsorrubina (Conforti et al., 2007., Suhaj et al., 2006., Deepa et al., 2006) (Figura 6).

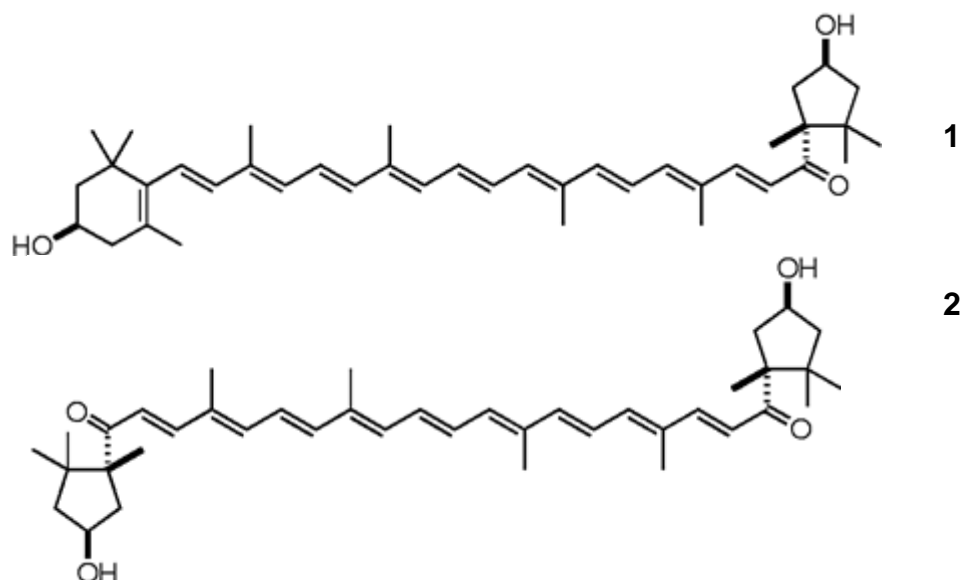


Figura 6. Estructura de la capsantina (1) y capsorrubina (2)

Los capsaicinoides a su vez tienen una gran actividad fisiológica y farmacéutica, por lo cual las especies del género *Capsicum* son también empleadas como materia prima por la industria farmacéutica.

Entre las aplicaciones farmacológicas de los capsaicinoides se puede mencionar su uso en: tratamiento contra el dolor en diversas enfermedades como artritis reumatoide, migraña, herpes y neuropatías diabéticas. Se ha reportado también que su inclusión en la dieta reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Debido a su estructura fenólica tiene actividad antioxidante, tanto a nivel celular como en la matriz alimentaria, retardando la velocidad de oxidación de los lípidos presentes (Rosa et al., 2009).

Recientemente se ha incrementado el uso de aerosoles para defensa personal, los cuales incapacitan temporalmente debido a una irritación sensorial. Los componentes activos que se utilizan actualmente son los capsaicinoides (Spicer et al., 2005).

2.3.4 Estabilidad química

Debido al gran número de aplicaciones que tienen los compuestos capsaicinoides, es necesario tener un control del contenido de éstos en los frutos del género *Capsicum*, ya sea para su extracción y uso directo, o aún cuando se utiliza el fruto para la preparación de alimentos frescos o procesados. Por tal motivo es importante conocer la estabilidad de los compuestos capsaicinoides durante el almacenamiento, procesado y extracción.

El impacto industrial que tienen los chiles es muy importante hoy en día. Por eso además de la contaminación microbiana y el color, la pungencia es el mayor parámetro de calidad a controlar, por lo que se debe cuidar la estabilidad de los capsaicinoides.

El contenido de capsaicinoides en el fruto depende de varios factores, dentro de los factores intrínsecos están la edad y la especie mientras que los factores extrínsecos que pueden afectarlo son ambientales como el suelo, la luz, la humedad, la temperatura y los fertilizantes.

Actualmente existen básicamente dos maneras de medir la concentración de capsaicinoides: la metodología organoléptica utilizando la prueba Scoville o la metodología analítica, utilizando métodos cromatográficos, ya sea de líquidos o gases.

La prueba Scoville consiste en la preparación de una solución con extracto de chile que es diluída en agua azucarada hasta que la sensación pungente ya no puede ser detectada por un panel entrenado en análisis sensorial especializado en pungencia; el grado de disolución del extracto da su medida en la escala. Así, un chile como el Morrón, que no contiene capsaicina, tiene cero en la escala de Scoville. Sin embargo, entre los chiles más picantes como el Habanero, se encuentra un grado de 300,000 o más. Esto indica que el extracto fue diluido 300,000 veces antes que la capsaicina fuese indetectable.

Este método tiene varias desventajas, entre ellas, el que no distingue entre los diferentes capsaicinoides, es difícil hacer una relación con la concentración presente en la muestra, se requiere un panel entrenado para hacer las mediciones. Debido a que es un análisis sensorial, la variación en las mediciones es muy grande dependiendo del panel que lleve a cabo el análisis (Castillo et al., 2007).

Como ventaja esta metodología es muy específica para los compuestos capsaicinoides, dado que la sensación de pungencia en la cavidad bucal sólo se produce por estos compuestos, y no se da aún cuando se exponen compuestos análogos con ligeras diferencias en la estructura, lo que garantiza que la medición se hace solamente sobre compuestos capsaicinoides.

Por otra parte, el análisis químico se realiza principalmente por cromatografía, ya sea de líquidos o de gases, esto debido a que los compuestos capsaicinoides se encuentran generalmente en los chiles que son matrices que contienen una mezcla de muchos compuestos, y es necesario separarlos de los demás componentes.

En primera instancia se debe separar el material lipídico, que es donde se encuentran los compuestos capsaicinoides y para realizarlo se pueden llevar a cabo diferentes métodos de extracción. Más adelante se realiza una revisión de algunos estudios previos sobre caracterización y cuantificación de capsaicinoides en chiles y productos elaborados con base en esta especie.

Una de las ventajas más importantes del análisis químico, radica en que es posible distinguir entre los diferentes capsaicinoides presentes en la muestra, mientras que la metodología sensorial sólo mide el grado de pungencia debido al conjunto de capsaicinoides.

Al igual que muchos otros compuestos de naturaleza lipídica, el deterioro de los capsaicinoides se puede dar por dos vías, enzimática y química; la que dependerá de las condiciones extrínsecas a las cuales sea sometido el chile, ya sea durante el procesado o almacenamiento.

Se ha encontrado que una parte importante de la pérdida de los capsaicinoides se debe a la degradación enzimática causada por las peroxidasas. Generalmente este proceso de degradación se da incluso desde que los frutos se encuentran en la planta a lo largo del proceso de maduración, y posteriormente durante el almacenaje si no se controla la acción de la enzima (por escaldado o por secado). Los productos de la oxidación de los compuestos capsaicinoides dan lugar a productos con estructuras similares a la lignina, y de estos se han identificado dos dímeros, la 5,5 dicapsaicina y la 4-o-5 dicapsaicina éter (Figura 7).

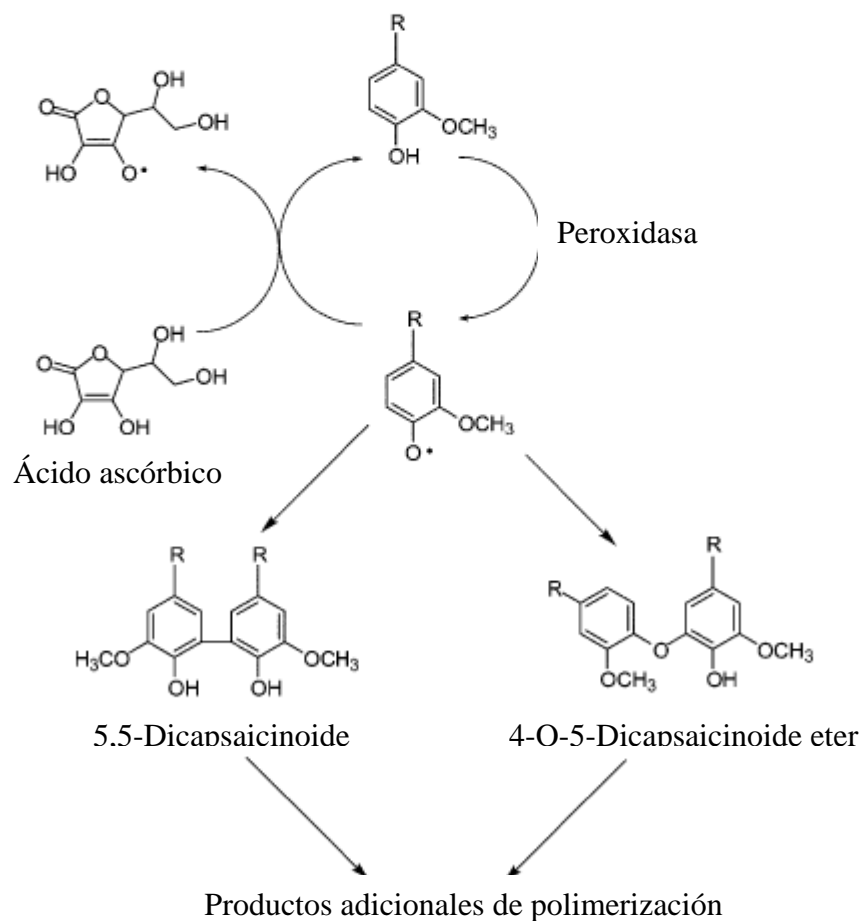
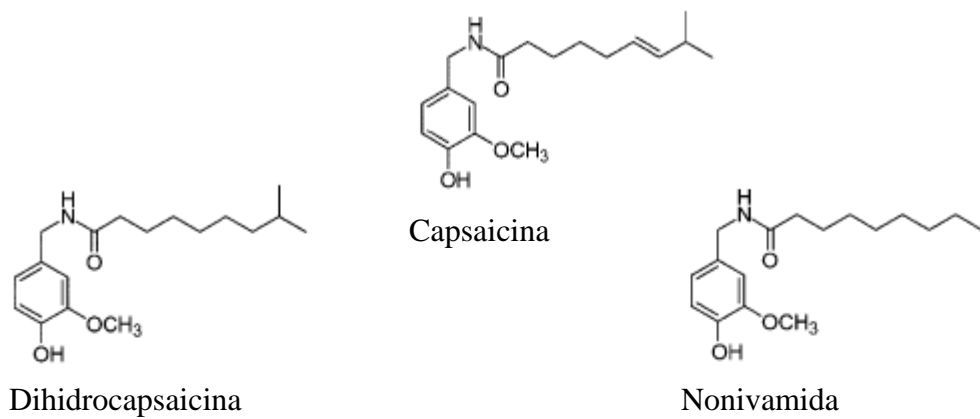


Figura 7. Ruta de degradación de compuestos capsaicinoides (Goodwin et al., 2003.)

En la Figura 7 se muestra la ruta de degradación de la capsaicina y la dihidrocapsaicina, que son los capsaicinoides más comunes, por acción de la peroxidasa, formándose en primer lugar los dimeros que ya se han mencionado y

posteriormente productos de la polimerización de estos dímeros (Goodwin et al., 2003., Pomar et al., 1997).

El ciclo catalítico inicia con el peróxido de hidrógeno que oxida al hierro de la peroxidasa, formando el radical ferril-oxo porfirina; a continuación un sustrato reductor, en este caso algún compuesto capsaicinoide, reduce la enzima dejándola en su estado original. Cabe mencionar que se requieren 2 equivalentes de sustrato reductor para reestablecer la enzima.

Generalmente uno de los procesos más utilizados para la conservación de los chiles es el secado, que puede ser al sol o en hornos. Este proceso disminuye considerablemente la actividad enzimática, pero provoca un aumento en la reactividad química dando lugar a la oxidación lipídica. Durante el secado se ha reportado una pérdida de aproximadamente el 20% de los capsaicinoides con secado en horno y de 24% de pérdida con secado al sol, lo cual se debe en ambos casos a la oxidación química, y cuando se emplea secado al sol se combina con oxidación enzimática (Topuz y Ozdemi; 2004., Vengaiyah et al., 2007). La estabilidad de los capsaicinoides ante el escaldado o un almacenamiento prolongado presenta una pérdida del 22% ante el calentamiento, mientras que la pérdida de éstos ante el almacenamiento es del 6% en ausencia de luz y de 11% con luz, lo cual nos indica que la degradación es principalmente la oxidación de estos compuestos por vía química en este caso (Topuz., 2008).

2.4 Estudios previos sobre caracterización y cuantificación de capsaicinoides en chiles y productos elaborados con base en esta especie

Existe una gran variedad de métodos que se pueden utilizar para la determinación de capsaicinoides en distintas muestras que van desde chiles hasta ropa, cremas o armas de defensa personal.

Se conocen diferentes técnicas mediante las cuales se pueden extraer capsaicinoides de los chiles: maceración, agitación magnética, extracción

enzimática (Perkins et al 2002), extracción asistida con ultrasonido (Boonkird et al., 2008), soxhlet (Horwitz 2000), extracción con fluidos supercríticos, (Perva-Uzulanic et al 2004), extracción con disolventes presurizados, extracción con microondas (Barbero et al., 2008), Microextracción en Fase Sólida (Peña-Alvarez et al 2009). De todas estas técnicas se puede enumerar una lista de ventajas y desventajas, por ejemplo la extracción de acuerdo al método oficial de la AOAC es la que se realiza usando el método de Soxhlet; pero se requiere un tiempo largo de extracción, así como una considerable cantidad de disolvente. El método oficial propuesto por la AOAC para la determinación de capsaicinoides consiste en la extracción por Soxhlet con etanol por 5 horas; posteriormente el extracto es filtrado y analizado por Cromatografía de Líquidos con detector UV o Fluorescencia (Horwitz 2000).

Luego de realizar la extracción de los compuestos capsaicinoides es necesario un método mediante el cual caracterizar y cuantificar dichos compuestos, de entre la múltiples técnicas que se conocen se pueden mencionar:

Metodología	Referencia
Métodos sensoriales	ASTM 1991
Espectrofotométricos	Perucka et al., 2000
Cromatografía de gases	Krajewska et al., 1987
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	Bret et al., 1998., Spicer et al; 2005
Cromatografía con fluidos supercríticos	Perva-Uzunalic et al ., 2004., Karnka et al., 2002
Cromatografía de líquidos con detectores UV y Fluorescencia	Karnka et al., 2002., Poyrazoglu et al ., 2005., Barbero et al., 2008
Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas	Choi et al., 2005., Kozukue et al., 2005., Garces-Claver et al., 2006
Cromatografía de líquidos acoplada a resonancia magnética nuclear	Nyberg et al., 2001., Thompson et al., 2006
Cromatografía capilar electrocinética micelar	Laskaridou-Monnerville 1999
Análisis enzimático	Perkins et al; 2002

En cada uno de estos métodos se pretende cuantificar o caracterizar los compuestos capsaicinoides mediante metodologías más eficientes, reduciendo el tiempo de preparación de muestra.

2.5 Extracción con ultrasonido

Un método que se ha utilizado recientemente para la extracción de compuestos provenientes de especies vegetales es la extracción asistida por ultrasonido, la cual resulta muy atractiva por su simplicidad, corto tiempo de extracción, reducción en la temperatura y el uso de una menor cantidad de disolvente, lo cual resulta muy útil en la extracción de compuestos termolábiles o compuestos poco estables.

2.5.1 Historia

Uno de los primeros reportes que citan el empleo de ultrasonido para la extracción de compuestos de origen vegetal data de 1952 y consiste en la extracción en medio acuoso de un compuesto vegetal. Se encontró que la eficiencia de la extracción era comparable a la realizada por calentamiento a temperatura de ebullición (Vinatoru 2001., Boonkird et al., 2008).

2.5.2 Mecanismo de extracción

La extracción asistida por ultrasonido está basada en el empleo de energía derivada del ultrasonido, que son ondas con frecuencias mayores a 20 kHz las cuales facilitan la extracción de analitos de matrices sólidas usando un disolvente orgánico. La eficiencia de la extracción se atribuye al fenómeno de “cavitación” que se produce en el disolvente por el paso de ondas ultrasónicas. Las fluctuaciones en la presión producidas por las ondas causan la formación de miles de burbujas microscópicas en el disolvente, las cuales implotan creando una gran

cantidad de ondas de choque, generando presión y temperaturas extremas en el sitio de la implosión (Figura 8, Barbero et al 2008).

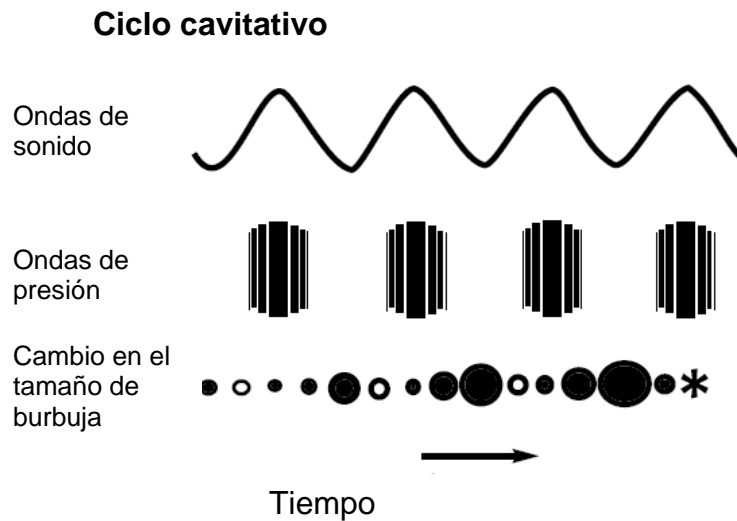


Figura 8. Ciclo cavitativo

El ultrasonido provoca también un efecto mecánico durante la extracción, permitiendo una mayor penetración del disolvente en la matriz de la muestra, esto incrementa la superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida. Lo anterior en conjunto con una mayor disrupción celular, debido al efecto cavitativo, incrementa el contenido de los componentes intracelulares en el medio de extracción. En algunos casos el incremento de la temperatura durante la extracción asistida con ultrasonido puede aumentar la eficiencia de la extracción. Los tejidos vegetales están rodeados por paredes; el mecanismo de extracción consiste en dos fenómenos físicos, el primero es la difusión del disolvente a través de las paredes celulares, y el segundo es la ruptura de las paredes y la liberación de los compuestos hacia el medio. Algunas células vegetales almacenan el contenido lipídico en glándulas externas, cuya pared es muy delgada y por lo tanto es muy fácilmente destruída por el efecto de sonicación. Esto explica el por qué la extracción del contenido lipídico utilizando ultrasonido resulta altamente eficiente (Vinatoru 2001., Boonkird et al 2008., Barbero et al 2008).

2.5.3 Equipo y procedimiento de extracción

El equipo que generalmente se usa para hacer la extracción asistida por ultrasonido es un baño ultrasónico, cuya potencia varía de los 100 a los 600 W. Por otra parte los procesadores ultrasónicos o sondas ultrasónicas tienen un mayor rango de aplicación, así como una mayor eficiencia.

Los procesadores ultrasónicos consisten de tres componentes principales: Una fuente de energía, un convertidor, y una punta. La fuente de energía se encarga de convertir el voltaje de 50/60 Hz en energía eléctrica de alta frecuencia (20 kHz), posteriormente el convertidor transforma la energía eléctrica en energía mecánica, en forma de pequeñas vibraciones. Estas vibraciones son transmitidas hacia el líquido a través de la punta. Las puntas con un diámetro pequeño producen una cavitación de gran intensidad pero enfocada solamente al volumen cercano. Por otra parte, las puntas con un diámetro mayor producen una cavitación menor, pero pueden procesar un volumen mayor. Las puntas están hechas de titanio por sus propiedades acústicas, su resistencia a la corrosión, baja toxicidad, y resistencia a la erosión por cavitación.

Los procesadores también tienen una aplicación industrial, en cuyo caso se utilizan procesadores de 500 a 750 Watts, que pueden manejar volúmenes de hasta 10 litros. Para volúmenes no mayores a 150 mL se recomienda el uso de procesadores de 100-130 Watts.

El procedimiento para realizar la extracción asistida con ultrasonido es bastante sencillo. La matriz que contiene el analito de interés se coloca en un vaso con el disolvente adecuado. Se puede colocar en una parilla para controlar la temperatura y se introduce la punta del sonicador en el recipiente. Se controla la amplitud y el tiempo de sonicación. Una vez que se ha separado el material lipídico del resto de la matriz alimentaria se lleva a cabo un proceso cromatográfico para separar los capsaicinoides del resto de los lípidos. Se han reportado diferentes técnicas para llevar a cabo la separación, entre las que

destacan la oficial que consiste en una separación usando cromatografía de líquidos utilizando diferentes detectores. Se utiliza también recientemente la cromatografía de gases con diferentes detectores e incluso acoplada a espectrometría de masas.

2.6 Microextracción en fase Sólida

La Microextracción en Fase Sólida (MEFS) fue desarrollada a principios de la década de los 90 por Pawliszyn y colaboradores como un método de preparación de muestra para compuestos orgánicos volátiles libre de disolventes. La MEFS se utiliza para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de muestras ambientales o de alimentos, ya sea en fase acuosa, sólida o gaseosa. La técnica consiste en una fibra de sílice fundida recubierta por una fase estacionaria de material polimérico, la cual está soportada en un microtubo de acero inoxidable. Incorporado a una microjeringa. El microtubo que contiene la fibra puede exponerse o retraerse mediante de un émbolo, como se muestra en la Figura 9.

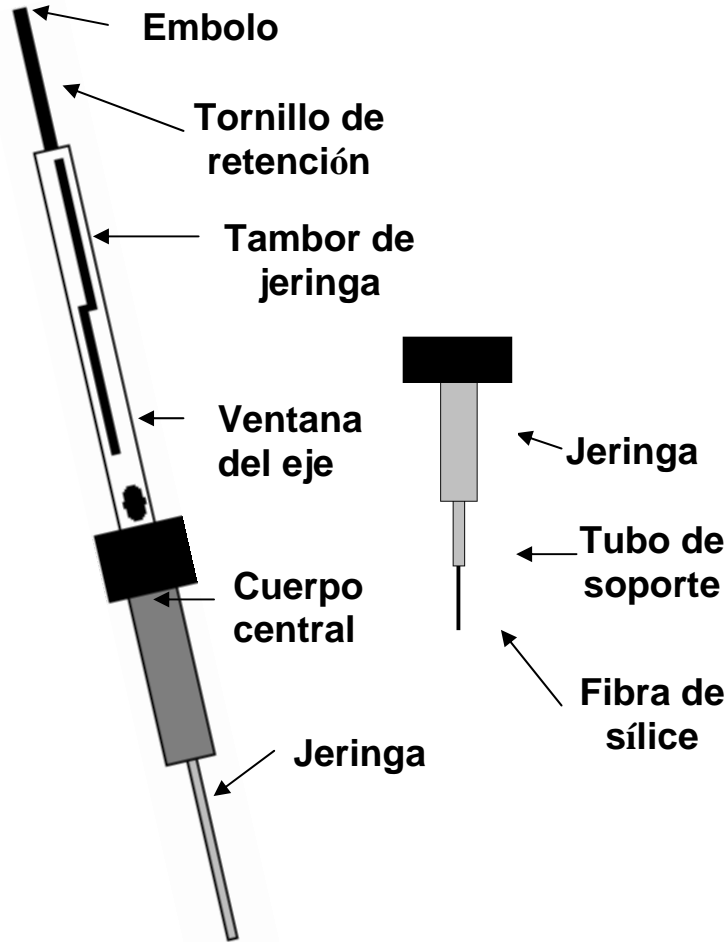


Figura 9. Esquema del sistema de MEFS.

El principio de operación para la extracción de los analitos de interés presentes en la muestra utilizando el dispositivo de MEFS es el siguiente: la fibra se expone a la muestra, inmediatamente comienza el transporte de los analitos desde la matriz hacia la fibra y la extracción se considera completa cuando se alcanza el equilibrio de distribución del analito entre la matriz de la muestra y la fibra. Esto significa que una vez que se alcanza el equilibrio la cantidad de extracto se mantiene constante, y es independiente de cualquier incremento en el tiempo de extracción. De acuerdo a lo anterior la MEFS no es una técnica de extracción exhaustiva, pero dado que tiene una relación proporcional entre la cantidad de analitos adsorbidos en la fibra y la concentración inicial en la matriz de la muestra, el equilibrio completo no es necesario para realizar un análisis cuantitativo con MEFS, siempre

y cuando se utilicen condiciones constantes y se mida cuidadosamente el tiempo de extracción.

Una vez que el analito ha sido extraído y concentrado en la fibra de sílice es desorbido por medio de temperatura en el inyector de un cromatógrafo de gases o mediante un disolvente en una cámara de desorción previo al análisis por cromatografía de líquidos.

2.6.1 Métodos de extracción

Existen tres tipos básicos de MEFS: extracción directa, extracción Headspace, y extracción con membrana.

En la extracción directa, la fibra recubierta con el adsorbente se expone directamente a la muestra (generalmente en disolución acuosa) y los analitos migran directamente a la fibra. Para facilitar la extracción se utiliza agitación para propiciar el contacto entre los analitos y la fibra. En el caso de matrices gaseosas la convección natural del gas es suficiente para alcanzar rápidamente el equilibrio entre las fases.

En la extracción Headspace es necesario que los analitos se encuentren en la fase gaseosa para entrar en contacto con la fibra, la cual se coloca en el espacio de cabeza o fase vapor de la muestra. Este tipo de extracción permite proteger la fibra de compuestos de alto peso molecular y otros compuestos no volátiles, como material húmico o proteínas. El uso de este modo de extracción permite a su vez la modificación de la matriz, sin dañar la fibra.

En la extracción con membrana, al igual que en la extracción directa, la fibra se pone en contacto con la muestra pero utilizando una membrana que funge como barrera entre la muestra y la fibra, esto para evitar que compuestos interferentes entren en contacto con la fibra. Esta técnica se utiliza cuando se trabaja con matrices complejas y cuyos analitos de interés tengan baja volatilidad impidiendo su análisis por Headspace (Pawliszyn, 1997).

2.6.2 Tipos de recubrimiento

Existen diferentes tipos de fibras con diferente polaridad de acuerdo a los tipos de fase estacionaria con la que están elaboradas. También se tienen diferentes espesores de película, dentro de las que destacan: polidimetilsiloxano (PDMS) la cual se considera una fibra de recubrimiento polimérico de aplicación general, poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), polietilenglicol/divinilbenceno (CW/DVB), polietilenglicol/resina templada (CW/TPR), carbón activado/polidimetilsiloxano (CA/PDMS), carboxen (CAR), hasta fibras con materiales especializados como fibras de intercambio iónico para remover iones metálicos y proteínas en disoluciones acuosas. La fase estacionaria puede estar químicamente unida a la fibra de sílice fundida y diferentes fases pueden entrecruzarse mediante enlace parcialmente cruzado o enlace altamente cruzado. Las ventajas de estas fases en Microextracción en Fase Sólida son similares a las obtenidas como fases estacionarias en Cromatografía de Gases (Pawliszyn, 1997). La Figura 10 esquematiza las propiedades de polaridad y retención de cada fase.

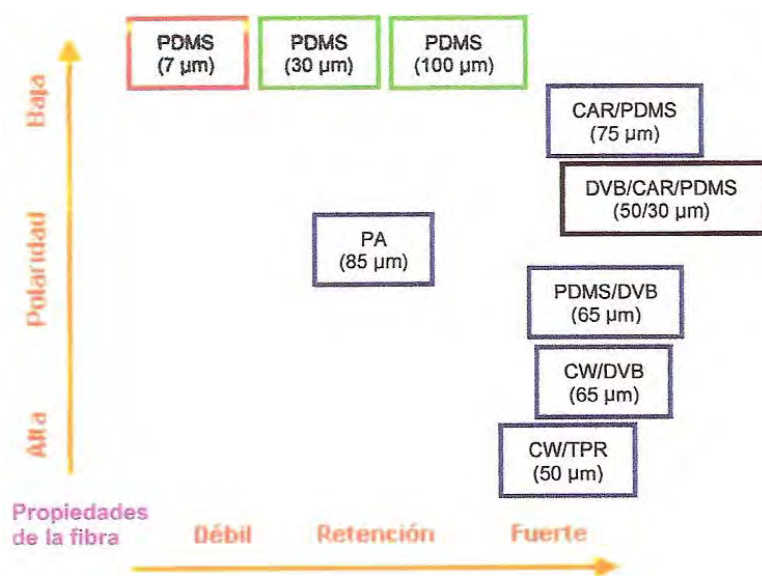


Figura 10. Propiedades de fibras de MEFS disponibles comercialmente: enlazadas, no enlazadas, parcialmente entrecruzadas, altamente entrecruzadas

2.6.3 Optimización del proceso de MEFS

En MEFS es necesario optimizar las condiciones de extracción de tal forma que aseguren la máxima sensibilidad del analito por la fibra y la eficiencia de extracción. Dichas condiciones incluyen: la selección del método de extracción, la selección de la fibra, la técnica de agitación, el tiempo de extracción, la temperatura de extracción, el efecto del pH, la adición de sales, y la desorción.

El modo de extracción se debe seleccionar considerando la volatilidad de los analitos, así como la matriz. Es preferible utilizar MEFS-Extracción directa para analitos de baja volatilidad, mientras que para analitos volátiles el uso de MEFS-Headspace presenta un menor ruido de fondo.

La elección correcta de la fibra es muy importante para obtener los mejores resultados. De acuerdo a los diferentes espesores y propiedades de las fibras; éstas se seleccionan de acuerdo a los compuestos que se quieren extraer. En general los compuestos volátiles requieren una cubierta gruesa, mientras que para los compuestos semivolátiles resulta efectiva una cubierta delgada. Generalmente para la extracción de compuestos no polares se utilizan fibras de naturaleza no polar, por ejemplo Polidimetilsiloxano (PDMS), mientras que para compuestos polares se utilizan fibras polares como Poliacrilato (PA). Existen también fibras mixtas como la de divinilbenceno (DVB).

La agitación se utiliza para facilitar la transferencia del analito desde la matriz hacia la fibra. Existen diferentes tipos de agitación, utilizando un sonicador, movimiento de la fibra o la más común que es agitación magnética.

Es importante también optimizar el tiempo de extracción en MEFS, esta es una variable que debe controlarse cuidadosamente, ya que aunque la MEFS tiene una mayor sensibilidad en el punto de equilibrio, éste no es necesario para realizar un análisis preciso y exacto, ya que existe una relación lineal entre la cantidad del analito adsorbido en la fibra y su concentración inicial en la matriz en condiciones de no equilibrio.

El pH de la muestra se debe regular de tal manera que se incremente la concentración de especies neutras en disolución para que se incremente la cantidad de analito extraído.

La adición de sales propicia la extracción de analitos debido al efecto de “salting-out”, el cual produce un cambio en la fuerza iónica, favoreciendo la extracción de compuestos volátiles. Es preferible usar sales sólo en modo de Headspace para evitar el daño de la fibra.

La desorción térmica eficiente de un analito depende de la temperatura, el espesor de la fibra, y del tiempo de exposición. Generalmente la temperatura óptima de desorción es igual al punto de ebullición del analito en estudio (Ramírez, 2007).

2.7 Diseño de experimentos

Un diseño de experimentos es una metodología estadística destinada a la planeación y análisis de un experimento. Se entiende por experimento la creación y preparación de lotes de prueba que verifiquen la validez de hipótesis establecidas.

Existen diversos modelos para un diseño de experimentos, por ejemplo: aleatorizado por bloques, ANOVAS de más de dos factores, cuadrado latino, cuadrado grecolatino, diseños factoriales, diseños factoriales fraccionados.

Cuando se tiene más de dos variables independientes es recomendable aplicar un diseño factorial; este tipo de diseño requiere relativamente pocos experimentos elementales, indica tendencias y se puede estudiar un gran número de variables con una menor cantidad de experimentos.

Una vez realizado el experimento es posible conocer el efecto de cada factor o variable así como las interacciones que se dan entre los factores, lo cual es más eficiente que estudiar cada factor por separado.

Al utilizar un diseño de experimentos se debe poder comprobar las hipótesis objeto de estudio, sin confundirse por variables insospechadas (error experimental). Se debe a su vez mantener los costos de experimentación a un nivel razonable, en comparación con el objeto de estudio y se debe indicar el comportamiento de las variables estudiadas (Miller et al., 2002).

De entre las variables independientes se pueden identificar dos tipos de variables. Las variables cualitativas son aquellas de carácter nominal y sólo pueden ser comparadas como diferentes entre si, por ejemplo un color, un operador, un disolvente o un reactivo.

Existen también las variables continuas, cuyos valores son de carácter numérico y permiten realizar un mayor número de comparaciones. Ejemplos de este tipo de variables puede ser el peso o la temperatura.

La variable dependiente es la unidad experimental sobre la cual se efectúa la medición y que es impactada por las variables independientes.

El proceso para realizar un diseño de experimentos comienza por la definición e identificación del objetivo del diseño, posteriormente se deben identificar las variables independientes así como sus tratamientos, los cuales son niveles de las variables reales y controlables. Además estos tratamientos deben ser relevantes para el objeto de estudio. De cada tratamiento es aconsejable realizar varias réplicas, entendiendo por réplica una repetición completa de todos los pasos del experimento. El uso de estas réplicas disminuye el error experimental.

Una vez que se obtienen los resultados experimentales se deben realizar los cálculos estadísticos para obtener la información necesaria para conocer el impacto de las variables independientes sobre la respuesta.

2.8 Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas

La Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas es una de las técnicas acopladas mas utilizadas para el análisis de mezclas complejas. La gran ventaja de este acoplamiento reside en la forma como se complementan ambas técnicas, la Cromatografía de Gases se emplea para separar los componentes de una mezcla basada en sus diferentes afinidades por la fase estacionaria en la columna, por otra parte la Espectrometría de Masas se emplea para detectar y cuantificar las especies que eluyen de la columna además de proveer información definitiva sobre la identidad de los compuestos (Skoog et al., 2001).

La Cromatografía de Gases se utiliza básicamente en muestras volátiles generalmente de peso molecular bajo (en caso de no ser completamente volátiles se pueden derivatizar) y no es adecuada para muestras termolábiles. Una de las desventajas de la Cromatografía de Gases es que no se puede confirmar la identidad o estructura de los analitos utilizando un detector convencional. Los tiempos de retención de los analitos están relacionados con los coeficientes de partición, dicho tiempo es característico pero no único o específico para cada compuesto (Skoog et al., 2001., Mc Nair et al., 1998).

La Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas (EM) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación molecular, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula, el cual se puede relacionar con una biblioteca de espectros.
- Cuantitatividad que permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad. Habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt.
- Universalidad y especificidad.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.

- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida. Se puede obtener un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorear para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Dentro del espectrómetro de masas se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de ionización electrónica que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, generalmente 70 eV, capaz de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas (Gross, 2004).

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema detector mediante un analizador másico. En el caso más simple, se utiliza un cuadrupolo como analizador. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria de una computadora para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen. Generalmente la comparación se realiza contra la biblioteca del NIST (National Institute of Standard and Technology). La cuantificación es usualmente obtenida relacionando la respuesta del compuesto en comparación con la obtenida de un estándar de concentración conocida (Skoog et al., 2001., Mc Nair et al., 1998).

2.8.1 Acoplamiento cromatografía de gases-espectrometría de masa

La Cromatografía de Gases es una técnica que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en Cromatografía de Gases.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin previamente separarlos, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, CG y EM da lugar a una técnica combinada que permite la separación e identificación de mezclas complejas. El primer acoplamiento reportado lo realizaron Gohlke y McLafferty en 1955, aunque en esa época, el acoplamiento no era tan natural como lo es hoy en día. Esto debido a que se utilizaban columnas empacadas, cuyo flujo era superior al admisible para el empleo de Espectrometría de Masas, y para poder hacer el acoplamiento se utilizaron separadores de flujo, divisores e incluso membranas. A partir del empleo de columnas capilares en Cromatografía de Gases, la interfase es sencilla y no requiere una división del flujo (Gohlke y McLafferty 1995).

La utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente el acoplamiento

directo resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elusión sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.

En este proceso el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatográfico al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica, cuya representación gráfica constituye el cromatograma iónico total o "TIC" (total ion current). En efecto, la corriente iónica generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado.

En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible, se recurre a la técnica de detección por monitoreo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones. De esta forma, se aumentan la selectividad y sensibilidad del método, reduciéndose las interferencias (Skoog et al., 2001., Mc Nair et al., 1998).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Desarrollar y optimizar un procedimiento para la cuantificación de capsaicina y dihidrocapsaicina en chiles por Extracción Asistida con Ultrasonido (sonda) seguida de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.

3.2 Objetivo Particular

Aplicar la técnica desarrollada para cuantificar el contenido de capsaicina y dihidrocapsaicina en chiles y comparar su eficiencia con el método de extracción oficial (Soxhlet) y Microextracción en Fase Sólida.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Extracción de capsaicinoides

La cantidad de capsaicinoides presentes en los chiles es muy variable, esto entre diferentes variedades así como dentro de una misma variedad. Los capsaicinoides se encuentran dentro del material lipídico de los chiles (aquel material que es soluble en disolventes orgánicos de baja polaridad). Por tal motivo es necesario realizar una extracción de los capsaicinoides para posteriormente analizarlos utilizando cromatografía de gases- espectrometría de masas. Para su extracción y concentración se utilizaron tres diferentes técnicas: Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS), Microextracción en Fase Sólida (MEFS), y Extracción por Soxhlet. De los 8 capsaicinoides identificados en chiles en trabajos previos, se cuantificaron capsaicina y dihidrocapsaicina por ser los dos capsaicinoides mayoritarios que contribuyen en aproximadamente un 90% del porcentaje de pungencia (Perucka et al., 2000).

Los materiales, equipo, reactivos y el desarrollo experimental del presente trabajo se detalla a continuación.

4.1.1 Materiales y equipo

- Barras agitadoras magnéticas de 5 mm x 3 mm y 10 mm x 3mm.
- Balanza analítica Sartorius modelo CP124S.
- Jarra de carburo de tungsteno con balines y molino de balines SpexIndustries, modelo 545.
- Jeringas Hamilton de vidrio de 10, 50, 100, 150, 500 μ L.
- Dispositivo para Microextracción en Fase Sólida modo extracción directa desarrollado en el laboratorio (Ramírez, 2007).

- Fibra PDMS (polidimetilsiloxano 100 μm) y soporte de la fibra para inyección manual (Supelco, Bellafonte, P.A. USA). La fibra fue acondicionada de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Tabla 2).
- Liofilizadora Heto Drywinner.
- Material de vidrio Pyrex: matraces aforados de 1, 2, 5, 10, y 25 mL, pipetas volumétricas de 1, 2, 5 mL tipo A. Probetas de 25 y 50 mL. Vasos de precipitado de 10, 50, y 100 mL.
- Equipo de extracción Soxhlet.
- Viales de vidrio con tapón horadado de polipropileno y septa de teflón.
- Papel filtro Whatman No. 4 (cat No. 1004125).
- Parrilla con agitador magnético Cole-Parmer, modelo 04644.-Series.
- Procesador ultrasónico (Cole Parmer Ultrasonic Procesor 100 Watts).
- Rotavapor (Rotavapor-R Buchi).

Tabla 2. Características de la fibra utilizada

Fibra	Espesor de la película	Temperatura de acondicionamiento	Tiempo de acondicionamiento	pH óptimo de trabajo
PDMS	100 μm	250 ° C	1 hr	2-11

4.1.2 Reactivos

Alcohol etílico absoluto anhidro (99.9% de pureza), diclorometano (99.8% de pureza J.T. Baker, México) y agua destilada.

4.1.3 Estándares

Estandares de capsaicina (pureza 97%) y dihidrocapsaicina (pureza 90%), Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich, Suiza.

Las disoluciones estándar de cada capsaicinoide se prepararon por separado pesando aproximadamente 2.2 mg y posteriormente se aforaron a 1mL con etanol.

4.1.4 Muestras

Se analizaron 11 variedades de chiles. Los chiles fueron adquiridos a granel en diferentes centros comerciales y mercados populares. Las características y lugar de adquisición se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Muestras de chile analizadas, características y lugar de adquisición

Chile	Tipo de chile	Lugar de compra	Marca	Presentación
Ancho	Seco	Central de abasto	Granel	100 g
Árbol	Seco	Superama	Valle verde	250 g
Canica	Seco	Central de abasto	Granel	100 g
Cascabel	Seco	Central de abasto	Granel	100 g
Chipotle	Seco	Central de abasto	Granel	100 g
Guajillo	Seco	Central de abasto	Granel	100 g
Habanero	Fresco	Mercado local	Granel	100 g
Jalapeño	Fresco	Mercado local	Granel	100 g
Morrón	Fresco	Mercado local	Granel	1 Pieza
Pico de pajaró	Seco	Central de abasto	Granel	100 g
Piquín	Seco	Merced	Granel	100 g

4.1.4.1 Acondicionamiento de las muestras

El procedimiento para obtener muestras homogéneas fué diferente de acuerdo al tipo de chile. En el caso de los chiles secos, éstos se limpiaron, se les retiraron las semillas, los cabos y se trocearon. La molienda se realizó utilizando una jarra de carburo de tungsteno en la cual se colocó la muestra y los balines para

posteriormente introducirse al molino. Después de 10 minutos de molienda, la muestra se retiró de la jarra de carburo de tungsteno y se almacenó en bolsas de plástico cerradas herméticamente. Todos los chiles secos se sometieron a dicho tratamiento, a excepción del chile Cascabel, que debido a la dureza del pericarpio fue necesario molerlo por un lapso de 20 minutos.

Los chiles frescos de igual forma se limpiaron, se les retiraron las semillas, los cabos y fueron picados para posteriormente liofilizarlos. La liofilización se llevó a cabo empleando nitrógeno líquido y un liofilizador Heto Drywinner. Una vez que se obtienen los chiles secos, se molieron bajo las mismas condiciones que los chiles secos.

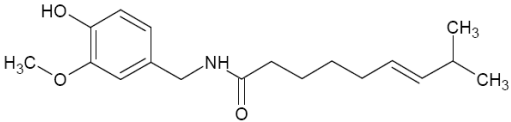
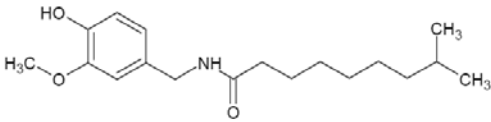
4.1.4.2 Cantidad de muestra analizada

Cada uno de los diferentes métodos de extracción requirió una cantidad diferente de muestra para el análisis. La cantidad de muestra necesaria para la extracción por el método de EAUS, se determinó después de la optimización del método. Por otra parte la cantidad de muestra requerida para la extracción por MEFS y la extracción por Soxhlet fueron las utilizadas en estudios previos (Peña-Alvarez et al. 2009., Ramirez, 2007).

4.1.5 Capsaicinoides analizados

Debido a su importancia los capsaicinoides analizados fueron capsaicina y dihidrocapsaicina. Su peso molecular y estructura química se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Capsaicinoides analizados

Capsaicinoide	Estructura química	Peso molecular
Capsaicina		305.42 uma
Dihidrocapsaicina		307.43 uma

4.2 Análisis Cromatográfico

4.2.1 Condiciones Cromatográficas

Para realizar el análisis cromatográfico se utilizó un Cromatógrafo de Gases (6890 Agilent Technologies) acoplado a un Detector de Masas (5973 Agilent Technologies) con inyector split/splitless y columna capilar de sílice fundida ZB-5 (5% difenil 95% polidimetilsiloxano) de 30 m de longitud x 250 μm de diámetro interno x 0.25 μm de grosor de película (Zebron Phenomenex, USA).

El gas acarreador fue Helio a un flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del inyector fue de 260 °C en modo splitless por 3 minutos. La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230 °C y la temperatura del analizador másico de 150 °C. Los análisis se realizaron por ionización electrónica empleando una energía de 70 eV. Se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN por sus siglas en inglés) de 50 a 550 m/z para el análisis.

El programa de temperatura fue: Temperatura inicial 40 °C durante 1 minuto, posteriormente un incremento a razón de 10 °C/min hasta alcanzar los 300 °C manteniendo la temperatura final por un lapso de 5 minutos.

4.2.2 Identificación de capsaicinoides

Para la identificación de los capsaicinoides en las muestras analizadas se compararon los espectros de masas obtenidos con los estándares, así como con los espectros de masas de la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library versión 2.0 build Nov. 2000).

4.2.3 Cuantificación de capsaicina y dihidrocapsaicina

La cuantificación se realizó con base en el área del pico cromatográfico de cada compuesto utilizando curvas de calibración absolutas. Para cada una de las metodologías de extracción utilizadas se realizaron sus respectivas curvas de calibración absolutas por triplicado.

4.3 Extracción Asistida con Ultrasonido (EAUS)

Para realizar la EAUS se utilizó un procesador ultrasónico de 100 Watts con una sonda estándar de titanio con longitud de 138 mm. La muestra se colocó en un vaso de precipitados de 100 mL, con 50 mL de etanol. Para controlar la temperatura, el vaso se colocó en un baño de agua calentado con parrilla; la extracción se realizó introduciendo la sonda dentro del vaso de manera que ésta se encuentre en medio y lo más cercana al fondo. El extracto se filtró para eliminar los componentes insolubles y posteriormente se evaporó a sequedad utilizando un rotavapor. Se redisolvió en una mezcla 25:1 de diclorometano-etanol, llevando a un volumen de 5 mL o 2 mL dependiendo del contenido de capsaicinoides. Se inyectó 1 μ L de la solución al CG-EM.

4.3.1 Selección de los parámetros para la Extracción Asistida con Ultrasonido

Para la selección de parámetros a utilizar en la EAUS de los compuestos capsaicinoides se utilizó un diseño experimental factorial 2^5 . En las pruebas realizadas para la selección de los parámetros de extracción se utilizó como muestra Chile Piquín.

4.3.2 Variables seleccionadas para la optimización de la extracción de capsaicinoides

La variable independiente que se utilizó en el diseño de experimentos fue el área de los picos cromatográficos que es proporcional a la concentración extraída de capsaicinoides. De esta forma las áreas de los compuestos pueden ser tomadas como respuesta. En el diseño se consideraron las siguientes variables:

Disolvente. La eficiencia de la extracción de los capsaicinoides usando la EAUS depende en gran medida de la selección del disolvente y de la capacidad de este de absorber y transmitir la energía producida por el ultrasonido. Además los capsaicinoides deben tener una alta solubilidad en el disolvente empleado. Entre los disolventes reportados para la extracción de capsaicinoides se encuentran: etanol, metanol, acetonitrilo, y agua.

Cantidad de muestra. Se espera que a una menor cantidad de muestra aumente la eficiencia de extracción, aunque debe considerarse que si ésta se disminuye de manera drástica se puede ver afectada posteriormente la determinación cromatográfica. Lo anterior se establece

Temperatura de extracción. Este es un parámetro fundamental en la extracción, generalmente a mayor temperatura es mayor la eficiencia de extracción sin

embargo, la temperatura puede también producir reacciones de degradación, disminuyendo la concentración de capsaicinoides extraídos. En este estudio trabajó con temperaturas en el rango de 25 °C (temperatura ambiente) a 50 °C. Esto debido a que se conoce que el efecto cavitativo se ve disminuído a temperaturas cercanas al punto de ebullición del disolvente.

Tiempo. Se espera que a medida que se incrementa el tiempo de extracción, aumente de forma directa la cantidad de analitos extraídos hasta llegar a la saturación del analito en el disolvente. Considerando que la potencia de la sonda ultrasónica es mayor a la de los baños ultrasónicos, el tiempo de extracción debe disminuir considerablemente, por lo que se trabajó en un rango de 2 a 10 minutos.

Potencia de la Sonda ultrasónica. La amplitud de la sonda no se recomienda usar al 100%, por lo que se pretende probarla en un intervalo de 40% a 80%.

Una vez establecidas las variables y dado que se empleó un diseño factorial, ellas deben ser codificadas en valores altos y bajos. A continuación se presenta en la Tabla 5 la codificación de las variables.

Tabla 5. Codificación de las variables independientes

Factor	Variable codificada / variable real	
	-1	1
Tiempo	5 min	25 min
Temperatura	25°C	50°C
Disolvente	Agua pH 7	Etanol
Cantidad de muestra	0.25 g	0.5 g
Amplitud	40%	80%

Finalmente se establecieron los tratamientos los cuales se presentan codificados en la Tabla 6. Así por ejemplo, el primer tratamiento indica que se debe utilizar agua pH 7, 50 °C, 5 minutos, 0.5 g de muestra y una potencia del 80% de amplitud.

Tabla 6. Tratamientos del diseño de experimentos

Tratamiento	Disolvente	Temperatura	Tiempo	Cantidad	Potencia
1	-1	1	-1	1	1
2	-1	1	1	1	-1
3	-1	-1	-1	1	1
4	-1	1	1	-1	1
5	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	-1	-1	-1
7	-1	-1	-1	-1	-1
8	1	-1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	-1	1
10	-1	1	-1	-1	1
11	1	1	-1	-1	1
12	1	-1	-1	-1	-1
13	-1	1	-1	1	-1
14	-1	-1	1	1	-1
15	1	-1	1	-1	-1
16	1	1	1	-1	-1
17	1	1	-1	1	-1
18	1	-1	1	1	1
19	-1	-1	1	-1	-1
20	1	1	1	-1	1
21	1	-1	1	-1	1
22	1	1	-1	1	1
23	-1	1	-1	-1	-1
24	-1	1	1	-1	-1
25	-1	-1	1	-1	1
26	-1	-1	-1	1	-1
27	-1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1
29	-1	-1	1	1	1
30	1	1	1	1	-1
31	1	-1	1	1	-1
32	1	-1	-1	1	1

4.3.3 Procedimiento para la extracción de capsaicinoides en chiles utilizando EAUS

Después de realizar la parte experimental del diseño de experimentos se propusieron las siguientes condiciones óptimas de extracción:

- Etanol como disolvente
- Temperatura de extracción de 50 °C
- Tiempo de extracción 25 minutos
- Cantidad de muestra 0.25 g
- Potencia del 60%

4.3.4 Análisis de capsaicinoides en chiles utilizando EAUS

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción, se analizaron 11 variedades diferentes de chiles, siguiendo la metodología señalada en el inciso 4.3 (Diagrama 1).

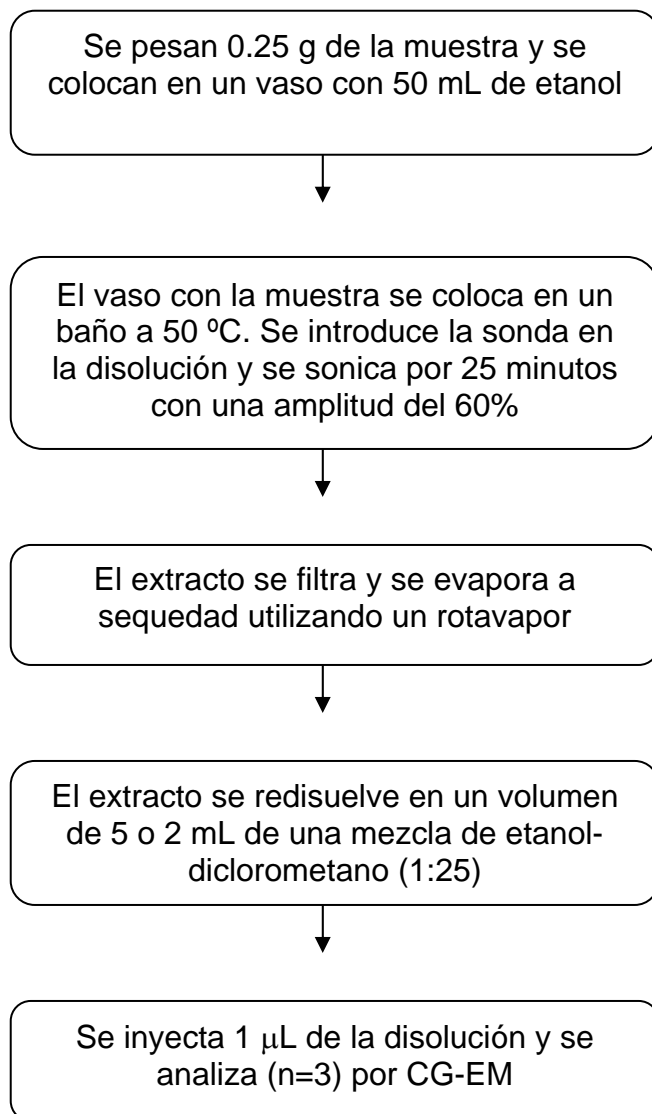


Diagrama 1. Proceso de análisis de muestra por EAUS seguido de CG-EM Condiciones óptimas establecidas en el inciso 4.3.3

4.3.5 Precisión y Linealidad

La precisión del método se evaluó inyectando por triplicado en el CG-EM, el extracto obtenido de Chile Morrón fortificado con 200 µg/mL de cada capsaicinoide. Las concentraciones obtenidas luego de la extracción se promediaron y se obtuvo una desviación estándar, a partir de la cual fue posible calcular el porcentaje del coeficiente de variación, el cual se utilizó como parámetro de precisión.

Para evaluar la linealidad del método se realizaron por triplicado curvas de calibración externa en un rango de concentración de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$. Las disoluciones de diferente concentración para cada uno de los capsaicinoides se prepararon a partir de estándares de concentración conocida.

4.3.6 Recobro

El recobro de la técnica de EAUS se realizó utilizando el chile Morrón, el cual presentó concentraciones muy bajas de los capsaicinoides cuantificados. Se tomó esta matriz y se fortificó con tres diferentes concentraciones de capsaicinoides (200, 800 y 1600 $\mu\text{g/mL}$) y se determinó su concentración luego de realizar la extracción de acuerdo a las condiciones y procedimiento descritos en el inciso 4.3.4.

4.4 Análisis de capsaicinoides en chiles utilizando MEFS

La MEFS en modo de extracción directa se realizó utilizando un dispositivo de extracción que no permite el contacto de la matriz con la superficie de la fibra, evitando así su deterioro. El dispositivo empleado fue desarrollado previamente en el laboratorio (Ramírez, 2007).

El dispositivo consta de tres tubos de vidrio de diferente diámetro interno (d.i.) y altura, el tubo externo (7cm x1.8 cm d.i.) que contiene la muestra a analizar, el disolvente y un agitador magnetico (5mm x 3mm). Los tubos internos con la base perforada (6.5 x 1.5 cm d.i. y 6.7cm x 1.3 cm d.i.) se colocan uno dentro del otro. Entre la base de estos tubos se coloca papel filtro. Los dos tubos internos se introducen en el tubo externo realizando la función de un émbolo con base perforada que permite que la disolución migre del tubo externo hacia el interno sin permitir el paso de los restos de matriz insoluble, esto debido a que el papel filtro actúa como una membrana. En el tubo interno se coloca un agitador magnético

(10mm x 3mm) para asegurar la perfecta agitación y mejorar la difusión hacia la fibra (Figura 11).

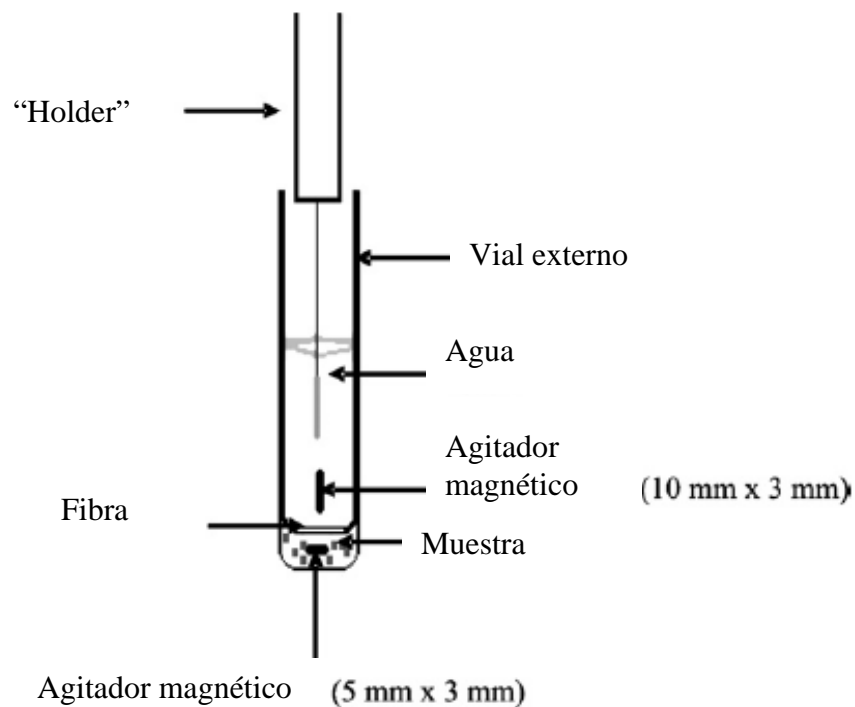


Figura 11. Dispositivo de extracción.

4.4.1 Parámetros de extracción

Los parámetros de extracción se optimizaron en un trabajo previo (Ramírez, 2007), obteniendo los mejores resultados con las siguientes condiciones: Fibra PDMS, buffer de fosfatos pH 7, agitación 1200 rpm y extracción a 50 °C durante 40 minutos. Bajo estas condiciones se analizaron las mismas 11 variedades de chiles utilizando la EAUS (Diagrama 2).

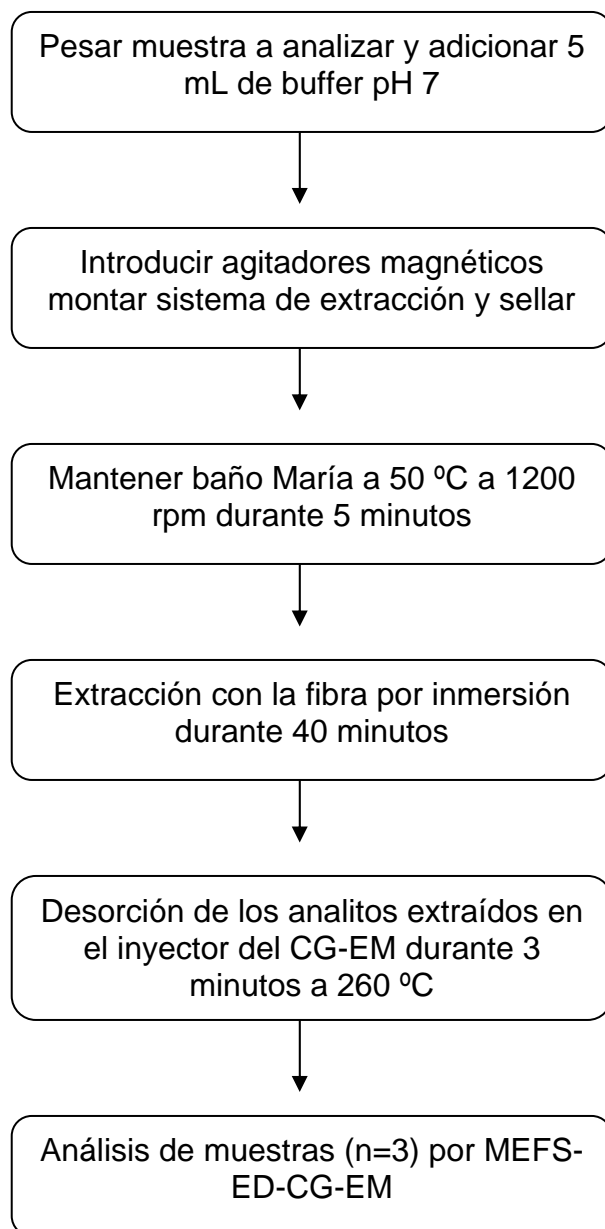


Diagrama 2. Proceso de análisis de muestra por MEFS-ED-CG-EM Condiciones óptimas indicadas en el inciso 4.4.1

4.4.2 Análisis de capsaicinoides en chiles utilizando extracción Soxhlet

Las 11 variedades de chiles analizadas previamente usando la EAUS y la MEFS se analizaron utilizando el método oficial de la AOAC, el cual corresponde a la extracción por Soxhlet. La extracción se realizó utilizando aproximadamente 500 mg de chile y 50 mL de etanol. La muestra se colocó en un cartucho de celulosa que se introdujo en el sistema Soxhlet. Se mantuvo a reflujo por 5 horas a

temperatura de ebullición del disolvente (78 °C). El extracto se filtró para eliminar los componentes insolubles y se evaporó a sequedad utilizando un rotavapor. Se redisolvió en una mezcla 25:1 de diclorometano-etanol, llevándolo a un volumen de 5 mL o 2 mL dependiendo de la concentración de capsaicinoides. Se inyectó 1 μ L de la solución al CG-EM (Diagrama 3).

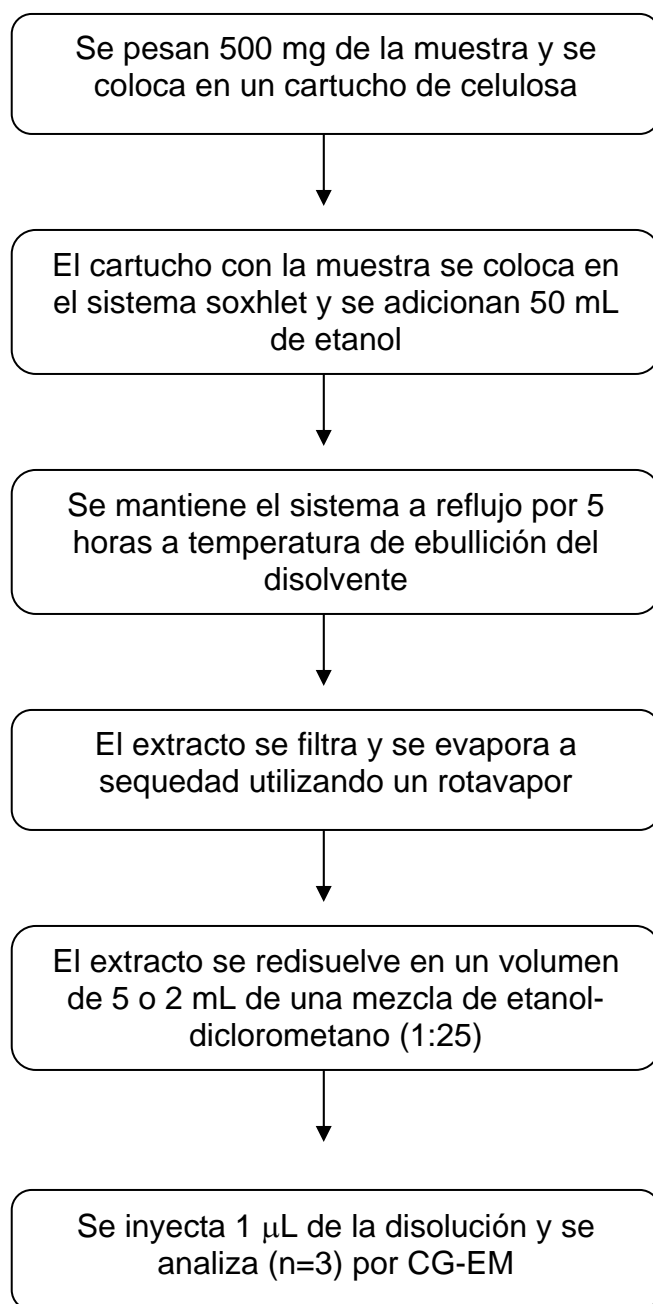


Diagrama 3. Proceso de análisis de muestra por Soxhlet-CG-EM.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Extracción de capsaicinoides utilizando Extracción Asistida con Ultrasonido

5.1.1 Selección de parámetros para EAUS-CG-EM

Para la selección de parámetros a utilizar en la EAUS de capsaicinoides, se utilizaron los resultados obtenidos por el diseño factorial 2^5 . En el diseño de experimentos se consideraron las siguientes variables: tiempo de extracción (5-25 minutos), potencia (40-80%), disolvente (agua pH 7- etanol), cantidad de muestra (0.25-0.5 g), temperatura (25 °-50 °C). Para realizar el diseño de experimentos se utilizó chile Piquín, debido a que en estudios previos (Ramírez, 2007), se encontró que esta especie de chile, tiene una concentración moderada de los dos capsaicinoides más abundantes, capsaicina y dihidrocapsaicina. Los resultados obtenidos luego de realizar el diseño factorial muestra que las condiciones óptimas de extracción son aquellas que impactan en la concentración obtenida de capsaicinoides luego de la extracción.

El diseño seleccionado permite analizar los resultados utilizando varias pruebas estadísticas y gráficas que nos sirven para determinar qué factores tienen significancia estadística en la extracción, y también permite conocer la relevancia de las interacciones entre los factores.

De acuerdo al análisis de varianza que se obtiene del diseño de experimentos las variables que afectan de manera significativa la extracción de capsaicinoides son: el disolvente, el tiempo de extracción, y la cantidad de muestra. El diseño de experimentos a su vez permite conocer el impacto que pueden tener sobre la extracción, la interacción de las variables entre sí. De las interacciones que resultaron tener una afectación significativa se encuentran: Disolvente–Potencia, Temperatura –Tiempo de extracción, Temperatura- Cantidad de Muestra, y

Temperatura-Potencia. Lo anterior se puede ver en la Tabla 7, que presenta los resultados del análisis de varianza del diseño de experimentos, dichos resultados se presentan con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 7. Análisis de varianza de las variables del diseño de experimentos

Variable		Suma de cuadrados	Gl	Suma de cuadrados	F	P
A: Disolvente		2.95205E7	1	2.95205E7	1973.19	0.0000
B: Temperatura de extracción		14036.0	1	14036.0	0.94	0.3357
C: Tiempo		906579.	1	906579.	60.60	0.0000
D: Cantidad de muestra		261182.	1	261182.	17.46	0.0001
E: Potencia		49701.1	1	49701.1	3.32	0.0721
INTERACCIONES	AB	15587.8	1	15587.8	1.04	0.3105
	AC	50185.3	1	50185.3	3.35	0.0707
	AD	11853.7	1	11853.7	0.79	0.3761
	AE	78506.3	1	78506.3	5.25	0.0246
	BC	136391.	1	136391.	9.12	0.0034
	BD	72532.3	1	72532.3	4.85	0.0306
	BE	77798.7	1	77798.7	5.20	0.0252
	CD	1082.29	1	1082.29	0.07	0.7886
	CE	31836.6	1	31836.6	2.13	0.1485
	DE	58531.2	1	58531.2	3.91	0.0514
Total error		1.19687E6	80	14960.8		
Total (corr.)		3.24832E7	95			

F. Estadístico F
P. Estadístico P

Cabe señalar que la influencia que se da por las interacciones de las variables se encuentra en el límite, lo cual se puede apreciar de manera gráfica en la Figura 12 que corresponde al diagrama de pareto correspondiente al efecto estandarizado de las variables del diseño de experimentos.

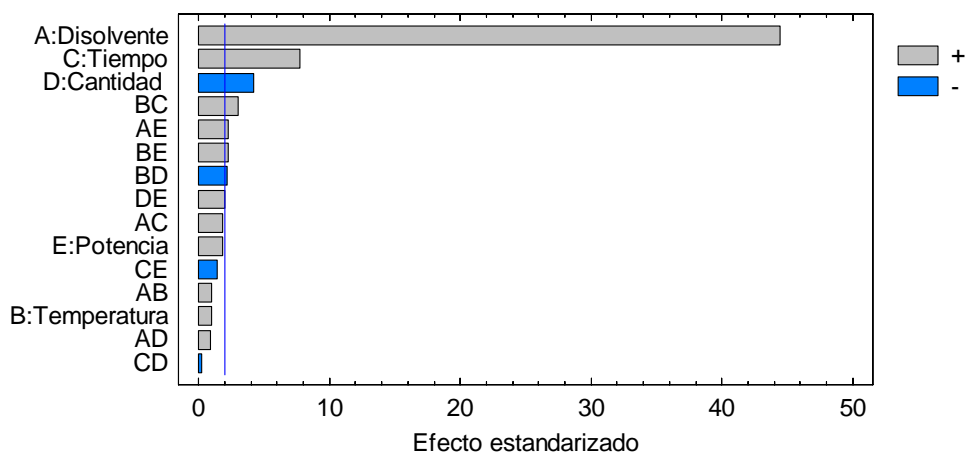


Figura 12. Diagrama de pareto de la EAUS

Tomando en consideración la influencia de las variables y sus interacciones se establecieron las siguientes condiciones de trabajo:

a) **Disolvente.** De acuerdo al diseño de experimentos, la eficiencia en la extracción de los capsaicinoides se ve favorecida utilizando etanol. La eficiencia del disolvente depende en gran medida de la capacidad de este de absorber y transmitir la energía producida por el ultrasonido. Además los capsaicinoides deben tener una alta solubilidad en el disolvente empleado, siendo este el caso del etanol. Usando agua como disolvente la concentración extraída de capsaicinoides fue muy baja, debido en gran medida a la baja solubilidad de los capsaicinoides en este disolvente. Cabe señalar que el efecto producido por esta variable es el que más afecta la extracción de los capsaicinoides ya que cuando se utiliza el etanol durante la extracción, aumenta considerablemente la cantidad de capsaicinoides extraídos (Barbero et al., 2008).

b) **Tiempo.** De acuerdo al diseño de experimentos la segunda variable en importancia es el tiempo de extracción, hasta llegar a la saturación, a medida que se incrementa el tiempo de extracción, aumenta de forma directa la cantidad de capsaicinoides sin que se presente alguna señal de inestabilidad por parte de los compuestos extraídos, por lo cual se eligió trabajar con un tiempo de extracción de 25 minutos.

c) **Cantidad de muestra.** El diseño de experimentos mostró que la cantidad de muestra es una variable que afecta de manera significativa la eficiencia de la extracción. A diferencia de las dos variables anteriores (disolvente y tiempo), se observó que la cantidad de muestra es una variable que presenta una mayor eficiencia de extracción a un valor bajo de esta variable. Por tal motivo se eligió trabajar con 0.25 g de muestra. Lo anterior se puede explicar debido a que al existir una mayor cantidad de disolvente por cantidad de muestra, se obtiene una mayor cantidad de analito extraído.

d) **Potencia de la sonda ultrasónica.** De acuerdo al diseño de experimentos la potencia no resultó ser una variable significativa para la cantidad extraída de capsaicinoides. La potencia utilizada fue de 60%, el cual es un punto intermedio entre las potencias analizadas (40-80%), esto debido a que la interacción de la potencia con el disolvente y con la temperatura tienen un impacto significativo sobre la extracción.

e) **Temperatura de extracción.** A pesar de que se esperaba que la temperatura fuese un parámetro fundamental en la extracción, de acuerdo al diseño de experimentos, la influencia principal de la temperatura no resultó significativa sobre la extracción de capsaicinoides; sin embargo la interacción de la temperatura con el tiempo si resulto significativa, por lo tanto se estableció trabajar con 25 °C.

La ecuación codificada que representa la respuesta, que en este caso es la concentración de capsaicinoides extraídos, excluye los términos que no son significativos y que pueden ser explicados por el error experimental. Con base a lo discutido anteriormente se establece la siguiente ecuación que describe el comportamiento del método optimizado de EAUS.

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/g}) = 814.5 + 554.5*\mathbf{A} + 97.1*\mathbf{B} - 52.1*\mathbf{C} + 28.5*\mathbf{AD} + 37.7*\mathbf{EB} - 27.4*\mathbf{EC} + 28.4*\mathbf{ED}$$

A = Disolvente

B = Temperatura

C = Tiempo

D = Cantidad de muestra

E = Potencia

Esta ecuación describe el impacto que tiene cada una de las variables significativas para la extracción de capsaicinoides. Se puede observar que la de mayor impacto es el disolvente con un coeficiente de 554.53, posteriormente el tiempo con 97.17, después esta la cantidad de muestra con 52.15, pero a diferencia de las dos anteriores el signo que tiene esta variable es negativo, es decir que a mayor cantidad de muestra se ve disminuida la concentración de capsaicinoides extraídos. En menor medida, afectan las interacciones entre las variables que van desde 37.69, 27.48, 28.46, haciendo notar que la interacción que involucra la cantidad de muestra es igualmente negativa. Finalmente, con la ecuación codificada, se obtiene la superficie de respuesta estimada (Figura 13).

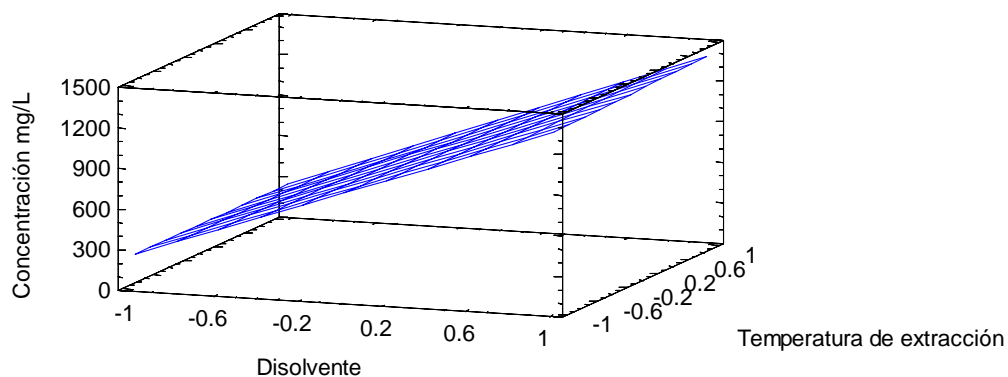


Figura 13. Superficie de respuesta estimada de la EAUS

De la superficie de respuesta estimada se puede observar que no hay variaciones a lo largo del plano, debido a que el diseño comprende solamente dos variables. Por el mismo motivo, la totalidad de los efectos de las diferentes variables y sus interacciones tienen un comportamiento lineal. En la Figura 14 se muestra el gráfico de residuales para corroborar que no se observa ninguna tendencia en los datos.

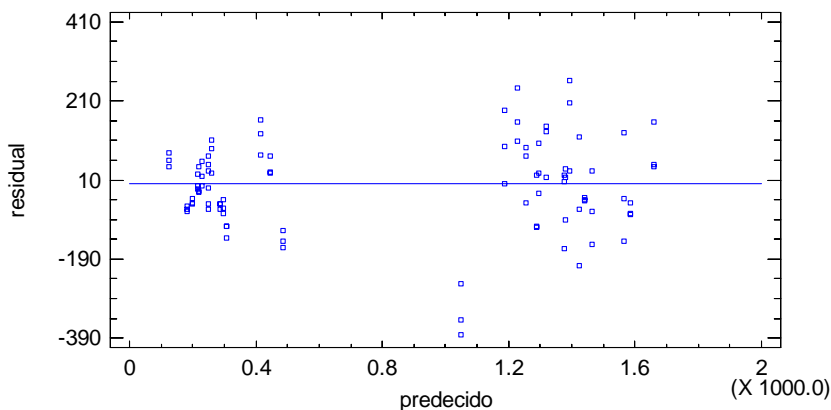


Figura 14. Gráfico de residuales

5.2 Precisión y Linealidad del método de EAUS-CG-EM

Para evaluar la precisión del método se consideró el porcentaje de coeficiente de variación, el cual se obtiene luego de calcular el promedio y la desviación estándar de una muestra ($n=3$) de Chile Morrón fortificada con $200 \mu\text{g/mL}$ de cada uno de los capsaicinoides. Los porcentajes de coeficiente de variación obtenidos son 1.1% para capsaicina y 1.2% para dihidrocapsaicina (DHC); ambos valores están por debajo del 10%, por lo que se puede establecer que el método tiene una precisión aceptable.

Una vez que se han encontrado las condiciones óptimas de extracción de capsaicinoides con el diseño de experimentos, se procedió a evaluar la linealidad del método, por ello se utilizó una curva de calibración externa de capsaicina y DHC con un intervalo lineal de $10 \mu\text{g/mL}$ a $100 \mu\text{g/mL}$. En la Figura 15 se presenta la curva de calibración de capsaicina, y en la Figura 16 la curva de calibración de la DHC, ambas se realizaron por triplicado.

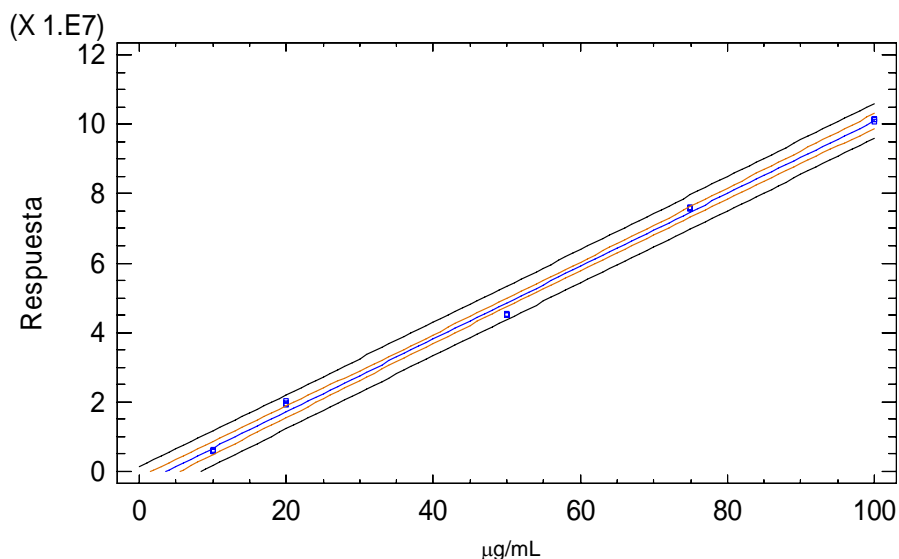


Figura 15. Curva de calibración de capsaicina para el método de EAUS

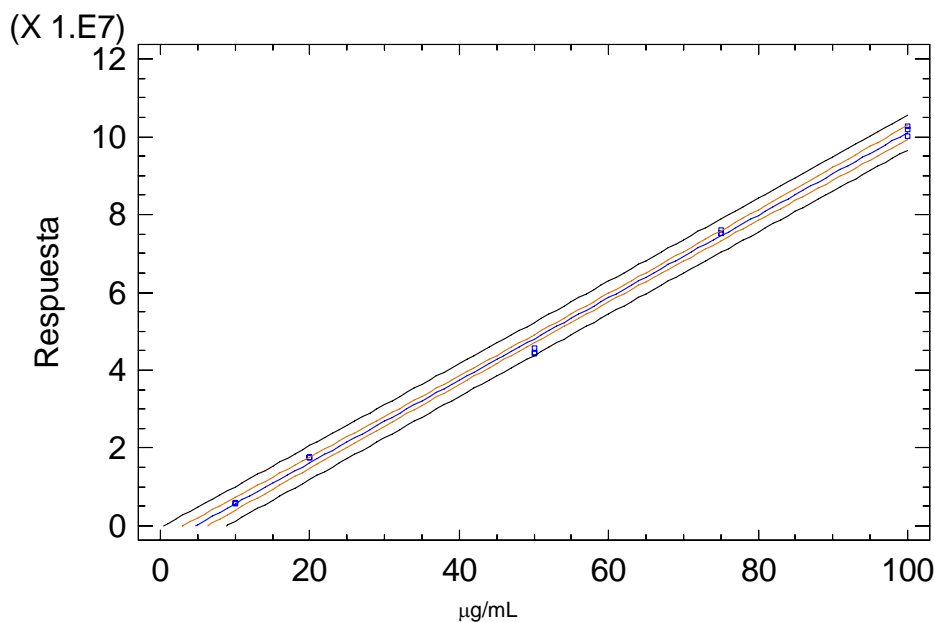


Figura 16. Curva de calibración de DHC para el método de EAUS

En la Tabla 8 se muestran los coeficientes de correlación de las curvas, así como el intervalo lineal.

Tabla 8. Linealidad L.D. y LQ del método de EAUS (n = 3)

Capsaicinoide	Coefficiente de correlación	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	L.D. (µg/mL)	L.Q. (µg/mL)
Capsaicina	0.9983	10-100	Respuesta = $-3.78E6 + 1.04E6 \cdot \mu\text{g/mL}$ Capsaicina	6.4	21
Dihidrocapsaicina	0.9987	10-100	Respuesta = $-4.96E6 + 1.06E6 \cdot \mu\text{g/mL}$ DHC	5.6	18

L.D. Límite de detección

L.Q. Límite de cuantificación

En la Tabla 8 también se muestran los límites de detección y cuantificación para ambos capsaicinoides, los cuales se obtienen a partir de la incertidumbre del primer punto de la curva de calibración. El límite de detección se puede describir como la concentración que proporciona una señal que se puede distinguir inequívocamente del blanco. Debido a que en este método la curva de calibración no incluye un punto cero, se toma el primer punto de la curva para determinar tanto el límite de detección como el de cuantificación. Los límites de detección y

cuantificación se calcularon de acuerdo a las ecuaciones (1) y (2) respectivamente.

$$L.D. = \left[\frac{O + 3 * DS1^{er} \text{ punto}}{m} \right] \dots\dots\dots (1)$$

$$L.C. = \left[\frac{O + 10 * DS1^{er} \text{ punto}}{m} \right] \dots\dots\dots (2)$$

5.3 Recobro

Para calcular el recobro de la EAUS seguida del análisis cromatográfico, se fortificó el chile Morrón (el cual se considera una matriz prácticamente libre de capsaicinoides) a tres diferentes niveles de concentración. Los chiles fortificados se sometieron al proceso de extracción bajo las condiciones optimizadas. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Recobro de capsaicina y dihidrocapsaicina (n = 3)

Capsaicinoide	Concentración adicionada (µg/g)	Concentración obtenida (µg/g)	Concentración recuperada (µg/g)*	% Recobro*	% C.V
Capsaicina	0	82.1	---	---	2.4
Capsaicina	200	255.1	173.1±2	86.6±12.2	1.1
Capsaicina	800	864.7	782.7±12.7	97.8±2.7	1.6
Capsaicina	1600	1682.2	1600.1±27.4	100±1.7	1.7
Dihidrocapsaicina	0	48	---	---	3.1
Dihidrocapsaicina	200	215.2	167.3±2.1	83.7± 12.3	1.2
Dihidrocapsaicina	800	850.9	802.8±32.8	100.3± 2.7	4.1
Dihidrocapsaicina	1600	1633.7	1585.7±21.7	99.1± 1.6	1.3

*(Media ± desviación estándar)

De la Tabla 9 se puede decir que los recobros obtenidos para ambos capsaicinoides utilizando el método de EAUS, son muy cercanos al 100%. Los recobros obtenidos para capsaicina van del 86% en concentraciones bajas, al 100% en concentraciones, a concentraciones bajas, pareciera que el recobro es menor, pero en realidad se debe a que la incertidumbre aumenta cuando se calculan concentraciones bajas, es posible ver en la tabla que el error para concentraciones bajas es mucho mayor al obtenido en las otras dos. Lo ideal sería

contar con un chile totalmente libre de capsaicinoides, pero considerando la complejidad de la matriz, los recobros obtenidos son muy satisfactorios.

Por otra parte, el obtener recobros cercanos al 100% nos indica que el tratamiento al cual es sometida la muestra durante la extracción, no provoca un deterioro aparente.

5.4 Cuantificación de capsaicinoides en 11 variedades de chiles por EAUS-CG-EM

Con el fin de demostrar la aplicabilidad del método desarrollado, se realizó el análisis de las 11 variedades de chiles en estudio. Los chiles fueron seleccionados por uso, disponibilidad, y por el conocimiento previo de su pungencia, la cual está relacionada con el contenido de capsaicinoides. Se analizaron chiles con un bajo contenido de capsaicinoides, como es el caso del chile Morrón, hasta chiles con muy alto contenido de dichos compuestos, por ejemplo el chile Habanero.

En la Tabla 10 se presentan los resultados de la cuantificación de capsaicina en 11 variedades de chiles

Tabla 10. Concentración de capsaicina obtenida por EAUS (n = 3)

Chiles	µg/g Capsaicina*	% C.V.
Ancho	168.5±1.1	0.6
Árbol	1243.6±60	4.82
Canica	1011.7±28.4	2.8
Cascabel	183.2±12.3	6.7
Chipotle	287.9±14.2	4.3
Guajillo	870.8±70	8
Habanero	6803.8±643	9.5
Jalapeño	629.4±15.1	2.4
Morrón	101.8±1.4	1.4
Pico de pájaro	943.5±62	6.5
Piquín	1182.4±21	1.8

*(Media ± desviación estándar)

En la Tabla 10, se muestra la concentración de capsaicina calculada para las 11 variedades de chiles, todas ellas por arriba del límite de cuantificación del método, se puede observar que las concentraciones van desde $101 \pm 1.4 \mu\text{g/mL}$ en el chile Morrón hasta $6803 \pm 643 \mu\text{g/mL}$ en el chile Habanero. En cuanto a la reproducibilidad del método se observa que los coeficientes de variación son todos menores al 10%, y van desde 0.64% para el chile Ancho hasta 9.45% para el chile Habanero. Una posible explicación para el incremento en la variación es que a medida que se incrementa la concentración de capsaicina, es necesario realizar una mayor dilución para medir la concentración en la curva de calibración, lo cual provoca un mayor error experimental y por lo tanto una mayor variación.

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la cuantificación de DHC en las 11 variedades de chiles, la DHC es el segundo capsaicinoide en importancia debido a su concentración en los chiles. En la mayoría de éstos, este compuesto se encuentra en menor concentración que la capsaicina, con la excepción del chile Canica.

El porcentaje de coeficiente de variación al igual que en la cuantificación de capsaicina es en todos los casos menor al 10%, por lo cual es bastante aceptable. Los coeficientes de variación obtenidos van desde 1% del chile Ancho hasta 9.3% del chile Guajillo.

Tabla 11. Concentración de DHC extraída por ultrasonido (n = 3)

Chiles	$\mu\text{g/g DHC}^*$	% C.V.
Ancho	178.2 ± 1.7	1
Árbol	822.7 ± 37.4	4.5
Canica	1210.9 ± 40.7	3.4
Cascabel	152 ± 10.7	7
Chipotle	247.8 ± 6.5	2.6
Guajillo	639.9 ± 59.4	9.3
Habanero	2736.1 ± 242.7	8.9
Jalapeño	435.2 ± 10.3	2.4
Morrón	110 ± 1.5	1.4
Pico de pájaro	688.2 ± 20.1	2.9
Piquín	747.5 ± 39.5	5.3

* (Media \pm desviación estándar)

La Figura 17 presenta un cromatograma de la EAUS del chile Canica, en dicho cromatograma se puede observar la presencia de una gran cantidad de señales, que corresponden a diferentes compuestos, de acuerdo a su concentración, los ácidos grasos ocupan el primer sitio. De los ácidos grasos se identifican el ácido Láurico, Mirístico, Palmítico, Palmitoleico, Oleico, Linoleico, y Linolénico, variando la presencia y concentración de estos de acuerdo al chile analizado. Entre los otros compuestos presentes se pueden mencionar otros capsaicinoides además de Vitamina E, Nonivamida, Benzendicarboxilos, Ácido propanoico, y Ácido ascórbico.

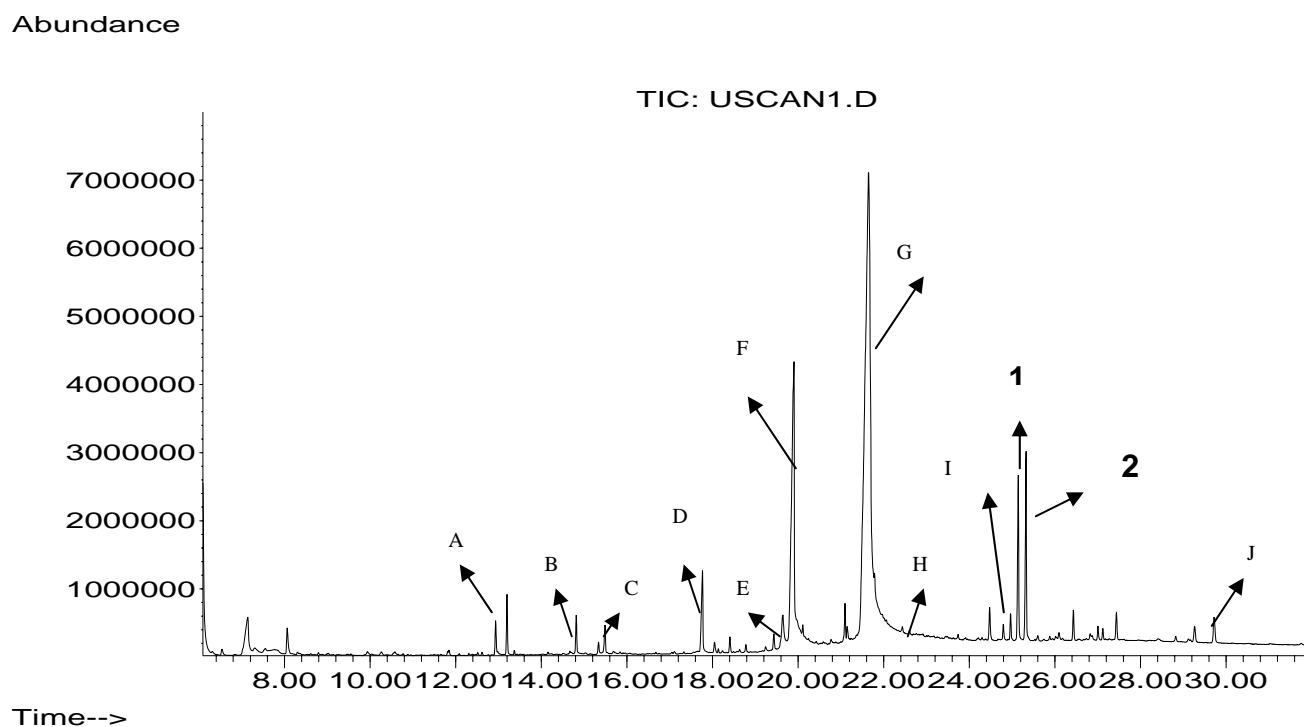


Figura 17. Cromatograma de la EAUS del chile Canica. A- Ácido Propanoico, B. Benzendicarboxilo, C. ácido Láurico D. ácido Mirístico E. ácido Palmitoléico F. ácido palmítico, G. ácido Linoléico, H. ácido Oléico, I. Nonivamida, J. Vitamina E, 1. Capsaicina, 2. Dihidrocapsaicina.

5.5 Cuantificación de capsaicinoides en 11 variedades de chiles por Extracción con Soxhlet-CG-EM

La extracción por Soxhlet se realizó utilizando 500 mg de muestra, 50 mL de Etanol y manteniendo el reflujo por 5 horas a 78 °C. Con el fin de cuantificar la capsaicina y DHC en los chiles se estableció una curva de calibración, con un rango de trabajo de 10 a 100 µg/mL. En la Figura 18 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de dicha curva. En A se muestran los picos correspondientes a la capsaicina en concentración de 10 a 100 µg/mL. En B se muestran los picos correspondientes a la DHC en concentración de 10-100 µg/mL.

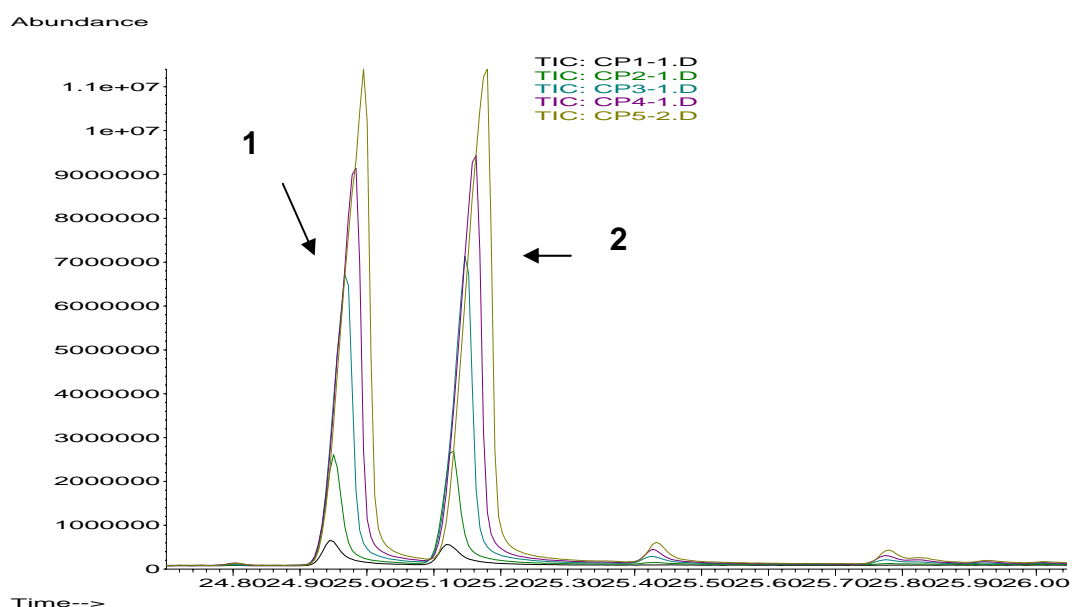


Figura 18. Cromatogramas correspondientes a la curva de calibración de 1. capsaicina y 2. DHC.

En la Figura 19 se muestra la curva de calibración externa de capsaicina, que presenta una correlación superior a 0.999. Se realizó también una curva de calibración externa para la cuantificación de la DHC, en un rango lineal de 10-100 µg/mL, la curva presenta una correlación de 0.9996, que es aceptable (Figura 20).

En la Tabla 12 se muestran los parámetros de linealidad, límites de detección y cuantificación que corresponden al método de extracción por Soxhlet calculados de la misma forma que en el inciso 5.2

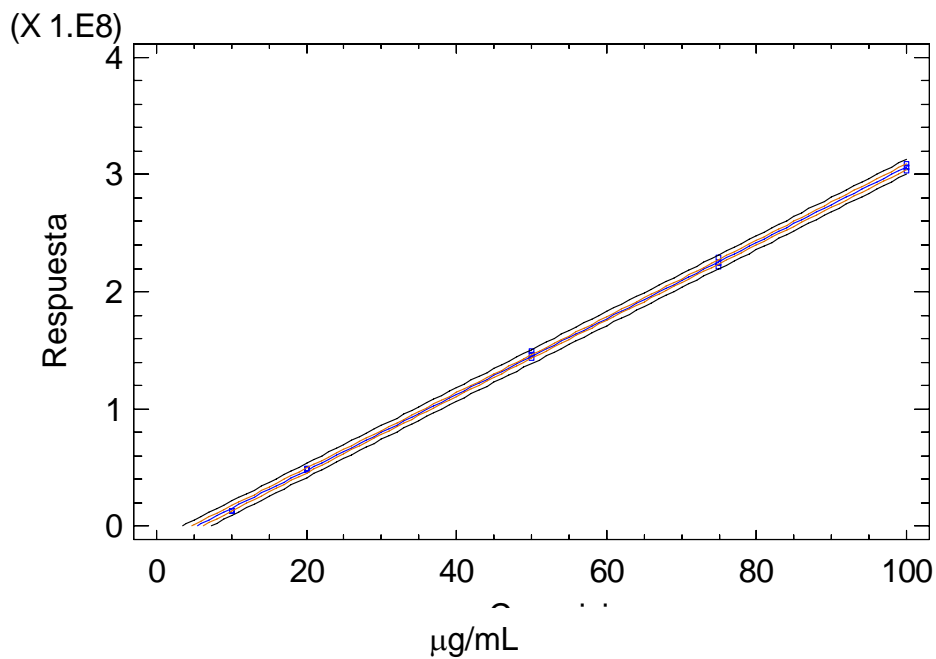


Figura 19. Curva de calibración de capsaicina

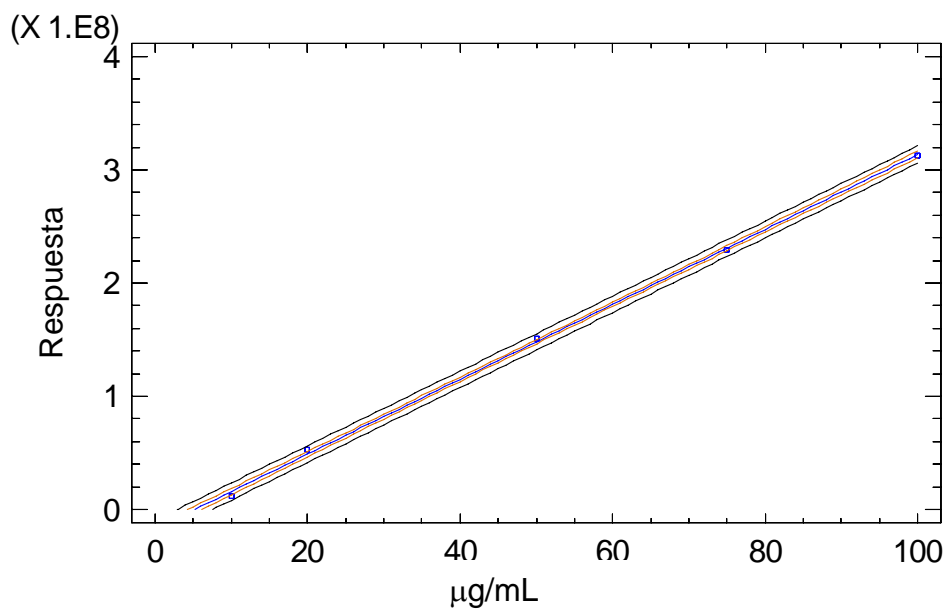


Figura 20. Curva de calibración de DHC

Tabla 12. Linealidad L.D.y L.Q. del método de extracción por Soxhlet (n = 3)

Capsaicinoide	Coefficiente de correlación	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	L.D. (µg/mL)	L.Q. (µg/mL)
Capsaicina	0.9997	10-100	Respuesta = $-1.76E7 + 3.24386E6 * \mu\text{g/mL Capsaicina}$	2.6	8.8
Dihidrocapsaicina	0.9996	10-100	Respuesta = $-1.72E7 + 3.30E6 * \mu\text{g/mL DHC}$	3.2	10.7

L.D. Límite de detección

L.Q. Límite de cuantificación

En cuanto a la precisión, el porcentaje de los coeficientes de variación es de 4.6% para capsaicina y 3.2% para DHC. En el caso de ambos capsaicinoides el porcentaje de coeficiente de variación se encuentra por debajo del 5%, lo que indica que el método presenta una buena precisión, los límites de detección y cuantificación se encuentran por debajo de las concentraciones encontradas en todas las muestras analizadas.

Utilizando las curvas de calibración externa para capsaicina y DHC, se realizó la cuantificación de este compuesto en las mismas 11 variedades de chiles que fueron previamente analizadas utilizando la EAUS. Los resultados se muestran en las Tablas 13 Y 14 respectivamente.

Tabla 13. Concentración de capsaicina extraída por Soxhlet (n = 3)

Chiles	(µg/g) Capsaicina*	% C.V.
Ancho	204.1 \pm 5.3	2.6
Árbol	1140.5 \pm 64	5.6
Canica	709.9 \pm 49.5	7
Cascabel	152 \pm 3.8	2.5
Chipotle	372.1 \pm 28.4	7.6
Guajillo	722.2 \pm 10.8	15
Habanero	9332.3 \pm 766	8.2
Jalapeño	175.4 \pm 45.3	25.9
Morrón	63.3 \pm 2.4	3.8
Pico de pájaro	1185.2 \pm 192	16.2
Piquín	1154.6 \pm 86.2	7.5

*(Media \pm desviación estándar)

Las concentraciones obtenidas con la extracción soxhlet, presentan buena reproducibilidad, ya que en 8 de las 11 muestras se obtuvo un coeficiente de variación menor al 10%. Entre las 3 muestras que tienen coeficientes de variación por encima de 10% no hay una similitud entre la concentración de capsaicina extraída, lo que sugiere que la variación no sigue una tendencia, y se puede explicar por errores experimentales. La extracción por Soxhlet es una extracción exhaustiva, que tiene la cualidad de extraer todo el material lipídico de las muestras, tal cual se puede apreciar en los cromatogramas, donde se observan además de los picos correspondientes a los capsaicinoides, una gran cantidad de señales que se deben a los otros compuestos extraídos, los cuales dependen de la variedad del chile analizado. Lo anterior se ve ejemplificado en la figura 21 y 22.

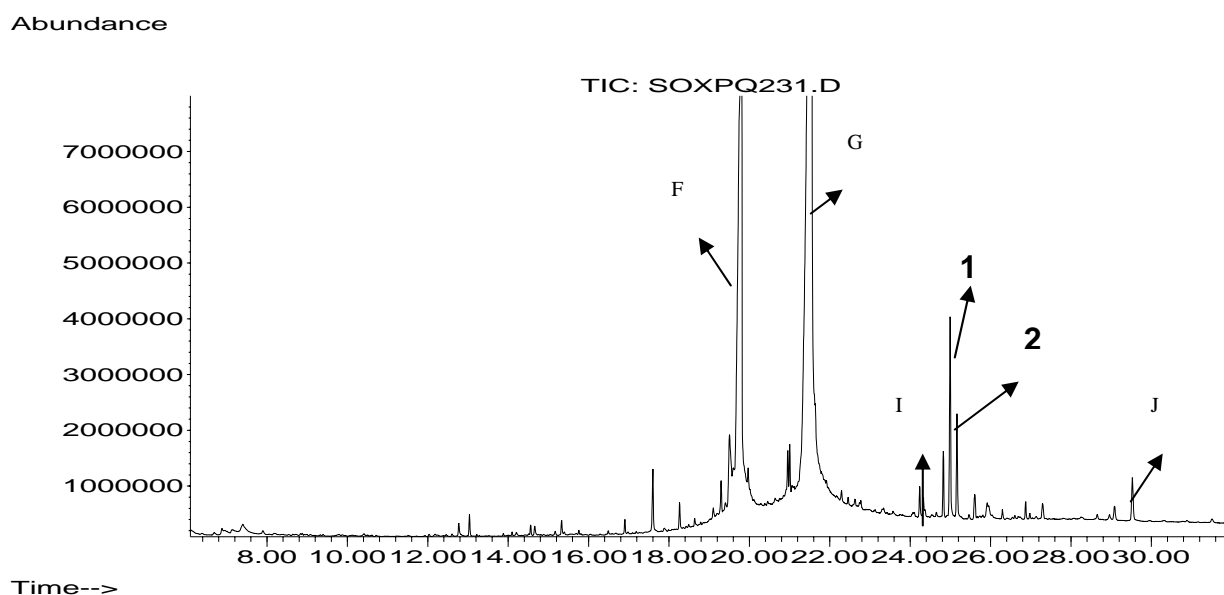


Figura 21. Cromatograma de la extracción por Soxhlet del chile Piquín. Identificación de los compuestos de acuerdo a la Figura 17.

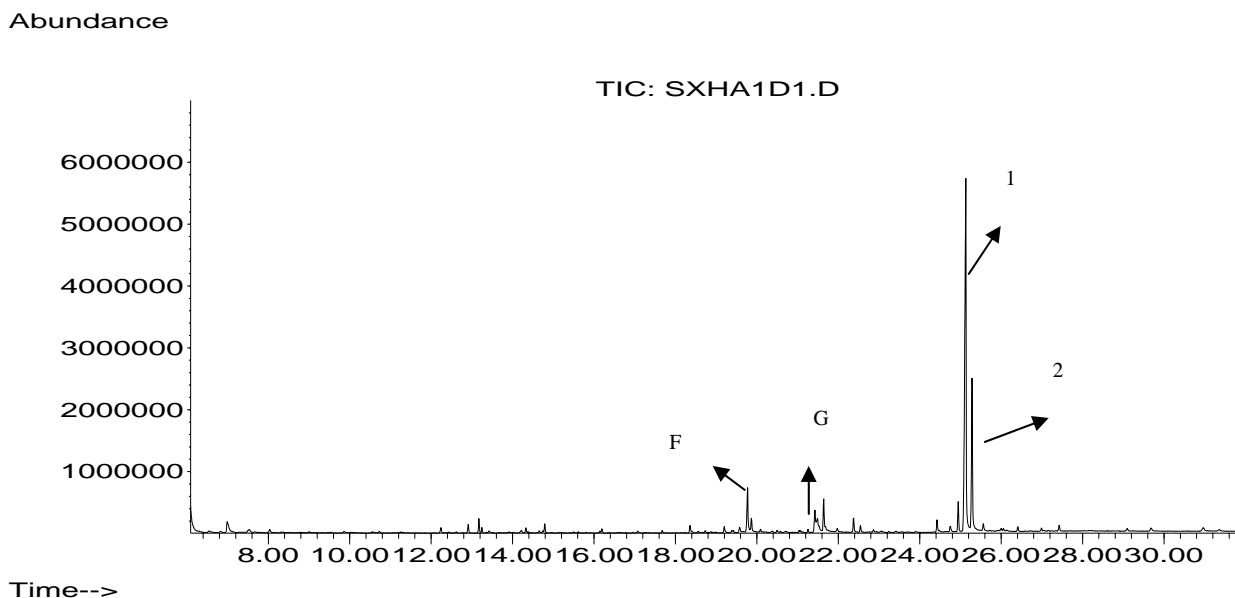


Figura 22. Cromatograma de la extracción por Soxhlet del chile Habanero. Identificación de los compuestos de acuerdo a la Figura 17.

En la Figura 21 se presenta un cromatograma de la extracción por Soxhlet del chile Piquín. Se observa que al igual que en el caso del cromatograma de EAUS de chile Canica, el chile Piquín presenta una gran variedad de compuestos, entre los cuales destacan algunos ácidos grasos, como el Palmítico y el Linoléico.

Por otra parte en la Figura 22, se presenta un cromatograma de la extracción con Soxhlet del chile Habanero el cual, a diferencia del chile Piquín, no presenta una gran cantidad de ácidos grasos u otros compuestos. Esta diferencia se puede apreciar incluso a simple vista, mientras que el extracto de chile Piquín es de un color rojo intenso, el extracto de chile Habanero presenta un amarillo pálido.

En la Tabla 14 se muestra la concentración obtenida de DHC extraída por Soxhlet, se puede observar que al igual que en la concentraciones obtenida utilizando EAUS, la presencia de DHC en la mayoría de los chiles es menor a la de la capsaicina. El porcentaje de los coeficientes de variación son en su mayoría menores al 10%, lo cual indica una buena reproducibilidad de la técnica, a excepción de la obtenida para el chile Jalapeño que es de 29% y de la obtenida

para el chile Guajillo que es de 12%. Estos dos últimos chiles son también los que presentan una mayor variación en el caso de la concentración de capsaicina determinada, lo cual se puede deber a errores experimentales.

Tabla 14. Concentración de DHC extraída por Soxhlet (n = 3)

Chiles	($\mu\text{g/g}$) DHC*	% C.V.
Ancho	142.2 \pm 4.3	3
Árbol	749.9 \pm 37.6	5
Canica	816.2 \pm 70.1	8.6
Cascabel	104.3 \pm 1	0.9
Chipotle	372.1 \pm 28.4	7.6
Guajillo	551.5 \pm 69.5	12.6
Habanero	4128.7 \pm 366	8.9
Jalapeño	141 \pm 41	29
Morrón	74.4 \pm 0.8	1.1
Pico de pájaro	856.8 \pm 87.4	10.2
Piquín	700.1 \pm 8.5	1.2

*(Media \pm desviación estándar)

5.6 Cuantificación de capsaicinoides en 11 variedades de chiles por MEFS-CG-EM

La Microextracción en Fase Sólida de los capsaicinoides se realizó igualmente en las 11 variedades de chiles analizados por las dos técnicas de extracción empleadas anteriormente. Con el fin de hacer la cuantificación de los capsaicinoides extraídos, se realizaron las curvas de calibración externa para capsaicina y DHC. En este caso las curvas de calibración abarcan un intervalo de concentración menor, que va de 1- 10 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con las curvas utilizadas en los métodos anteriores que van de 10 -100 $\mu\text{g/mL}$. La razón por la cual se consideró emplear curvas en este intervalo de concentración, se debe a la cantidad de muestra analizada. En los casos del método de EAUS, se utilizan 250 mg de muestra, en extracción por soxhlet se utilizan 500 mg de muestra, pero en MEFS, el dispositivo diseñado para la extracción no permite el análisis de cantidades de tal orden de magnitud, por lo tanto se utilizan cantidades que van de 10 a 50 mg dependiendo de la cantidad de capsaicinoides presentes en la muestra.

En las Figuras 23 y 24 se muestran las curvas para capsaicina y DHC respectivamente. Cabe señalar que para la realización de las curvas, los estándares de concentración conocida se sometieron al proceso de MEFS para posteriormente ser desorbidos y analizados en el sistema cromatográfico.

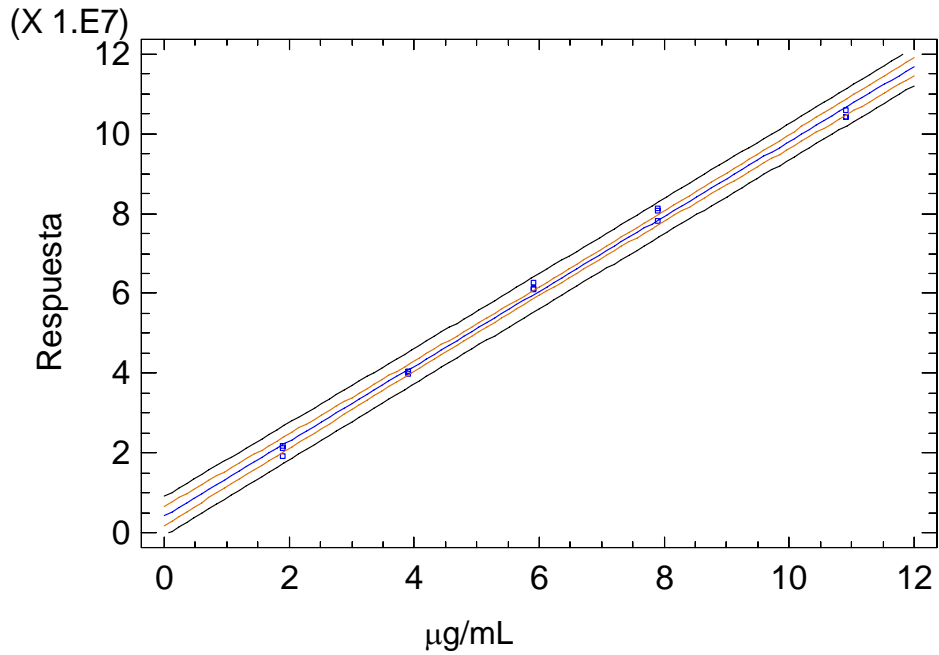


Figura 23. Curva de calibración para capsaicina

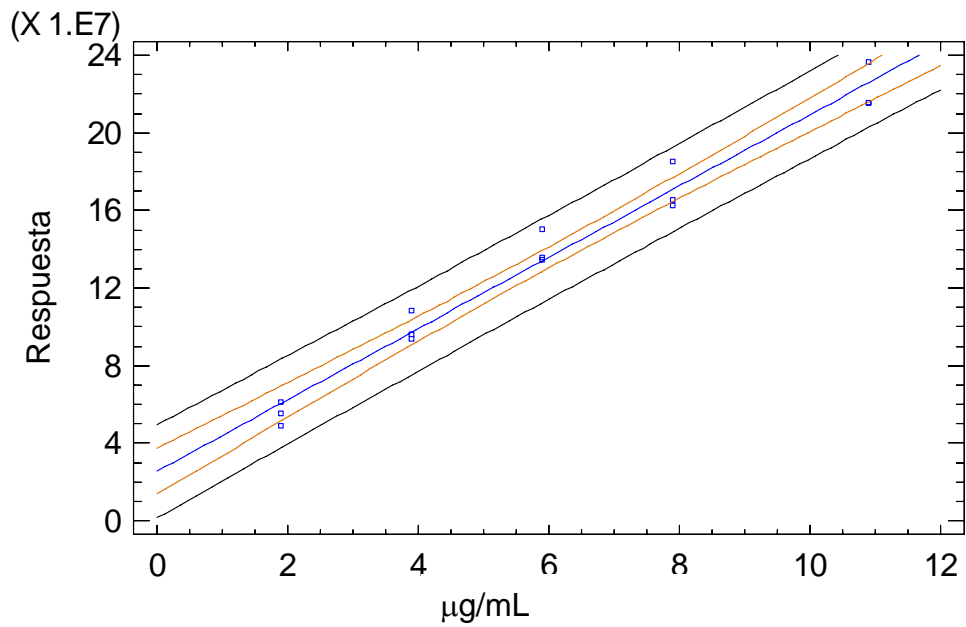


Figura 24. Curva de calibración para DHC

En la Tabla 15, se muestran los parámetros de linealidad, límites de detección y cuantificación del método de MEFS, calculados de la misma forma que en el inciso 5.2

Tabla 15. Linealidad L.D. y L.Q. del método de extracción por MEFS (n = 3)

Capsaicinoide	Coefficiente de correlación	Intervalo lineal (µg/mL)	Ecuación de la recta	L.D. (µg/mL)	L.Q. (µg/mL)
Capsaicina	0.9980	1-10	Respuesta = $4.15E6 + 9.39E6 \cdot \mu\text{g/mL}$ Capsaicina	1.4	4.9
Dihidrocapsaicina	0.9898	1-10	Respuesta = $2.55E7 + 1.83E7 \cdot \mu\text{g/mL}$ DHC	4.2	15

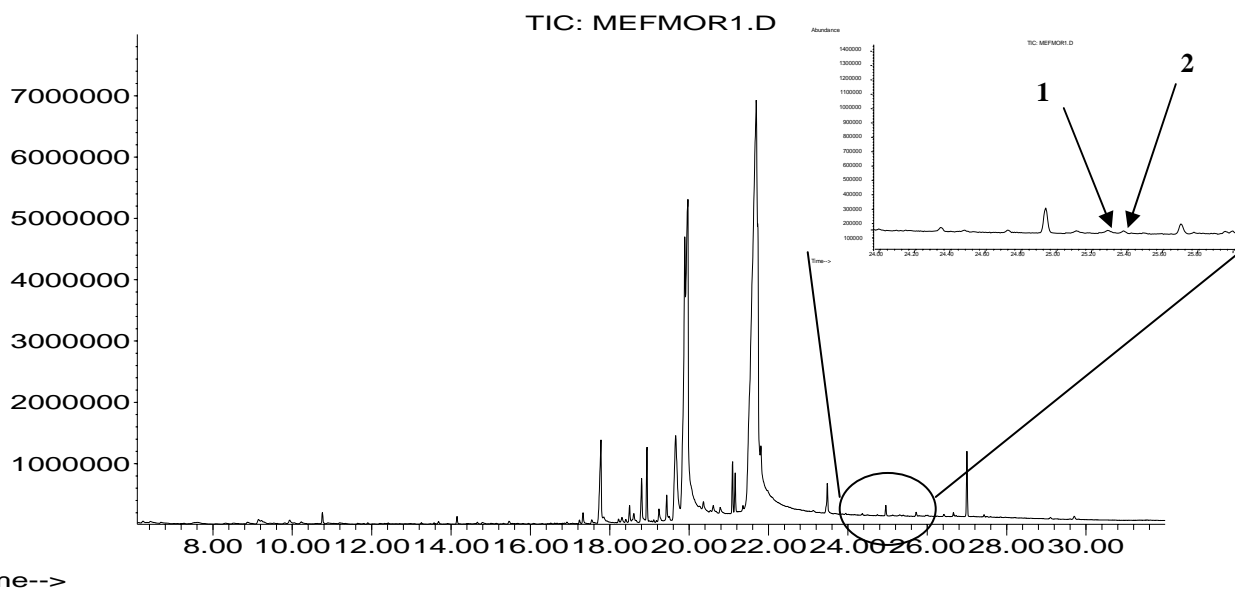
L.D. Límite de detección

L.Q. Límite de cuantificación

Como se mencionó anteriormente el intervalo de concentraciones de las curvas para capsaicina y dihidrocapsaicina es menor a los usados en las otras dos metodologías de extracción por los requerimientos de la técnica. En cuanto a la precisión del método, el porcentaje de los coeficientes de correlación es de 4.6 % para capsaicina y 5.2% para DHC, son bastante buenos considerando que se está trabajando en MEFS, que generalmente da coeficientes de variación ligeramente altos, hasta de un 10%, por lo cual se puede decir que el método tiene una buena reproducibilidad. En cuanto a los límites de detección y cuantificación, estos son menores a los obtenidos para las otras técnicas de extracción; debido a que la técnica de MEFS tiene como ventaja el poder analizar cantidades muy pequeñas de muestra, e incluso trazas de los analitos.

Una vez establecidas las curvas de calibración externa se realizó la cuantificación de los capsaicinoides en las 11 variedades de chiles analizadas anteriormente. En la Tabla 16 se muestra la concentración obtenida para capsaicina. En general son concentraciones menores a las obtenidas por las dos técnicas de extracción anteriores e incluso, para el chile Morrón, la señal obtenida está por debajo del límite de cuantificación, por lo cual no se pudo calcular la concentración extraída. En la Figura 25 se muestra el cromatograma de MEFS correspondiente a chile Morrón, amplificando la zona donde aparecen las señales de los capsaicinoides, en el cual apenas son perceptibles los picos correspondientes a los dos capsaicinoides analizados.

Abundance



Time-->

Figura 25. Cromatograma de la MEFS del chile Morrón. 1. Capsaicina, 2. Dihidrocapsaicina)

Tabla 16. Concentración de capsaicina extraída por MEFS (n = 3)

Chiles	($\mu\text{g/g}$) Capsaicina*	% C.V.
Ancho	33.5 \pm 1.2	3.5
Árbol	117. \pm 0.9	0.8
Canica	528.1 \pm 21.3	4
Cascabel	14.7 \pm 1	6.7
Chipotle	123.4 \pm 4.6	3.8
Guajillo	299.2 \pm 10.2	3.4
Habanero	1753.7 \pm 211	12.1
Jalapeño	306.3 \pm 37.7	12.3
Morrón	NC	NC
Pico de pájaro	446.5 \pm 38	8.5
Piquín	503.4 \pm 56.3	11.2

NC. No Cuantificado

*(Media \pm desviación estándar)

Al igual que en el caso de la capsaicina, la concentración calculada para DHC en cada chile (Tabla 17), es menor a la calculada por los métodos anteriores, los coeficientes de variación son en su mayoría menores al 10% por lo cual se puede establecer que el método tiene una buena reproducibilidad.

Cabe destacar que utilizando MEFS, la DHC presente en los chiles Cascabel y Morrón se encontró por debajo del límite de cuantificación del método, pero si fue detectada en ambos chiles; esto debido a la presencia de una menor cantidad de DHC que de capsaicina de manera general en todos los chiles. Lo anterior se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Concentración de DHC extraída por MEFS (n = 3)

Chiles	(µg/g) DHC*	% C.V.
Ancho	3±0.2	6.6
Árbol	106.9±6.9	6.5
Canica	551±7.7	1.4
Cascabel	NC	NC
Chipotle	25.6±3.8	14.7
Guajillo	99.2±10.5	10.6
Habanero	699.9±89.7	12.8
Jalapeño	117±9.2	7.8
Morrón	NC	NC
Pico de pájaro	240±21.1	8.8
Piquín	237.5±16	6.8

NC. No Cuantificado

*(Media ± desviación estándar)

5.7 Comparación de la concentración de los capsaicinoides obtenidos con los diferentes métodos de extracción

Con el objetivo de conocer la eficiencia de extracción del método propuesto, la concentración obtenida de capsaicinoides mediante la técnica de EAUS, se comparó con la obtenida con las metodologías de extracción por Soxhlet y MEFS. La metodología oficial de extracción es la técnica de Soxhlet, la cual es considerada una extracción exhaustiva y por lo tanto es posible asumir que la extracción de los compuestos es del 100%.

5.7.1 Comparación de la concentración extraída de capsaicina

En la Tabla 18 se presenta la concentración obtenida para capsaicina utilizando los tres diferentes métodos de extracción estudiados y se presentan también los coeficientes de variación correspondientes. En esta primera Tabla se puede ver a simple vista que los valores de concentración correspondientes a la MEFS, se encuentran por debajo de los obtenidos con extracción por Soxhlet y EAUS. Lo anterior se puede explicar en gran medida por el disolvente que se emplea para la MEFS, y en el cual los capsaicinoides son muy poco solubles y se ve impedida la interacción de los analitos con la fibra. Los capsaicinoides se encuentran dentro del material lipídico de los chiles, que al ser insoluble en agua, no permite la liberación de los capsaicinoides al medio. Sin embargo, se puede observar que los tres métodos son bastante precisos, ya que el porcentaje de coeficiente de variación que presentan es en todos los casos menor al 10%.

La MEFS, sin embargo tiene otras ventajas, ya que es un método rápido, libre de disolventes y que tiene límites de detección menores a los otros métodos, que son la extracción por Soxhlet y EAUS, lo cual es muy útil para el análisis de trazas.

Tabla 18. Concentración extraída de capsaicina por los tres diferentes métodos (n = 3)

Chiles	EAUS μg/g*	%C.V.	Soxhlet μg/g*	%C.V.	MEFS μg/g*	%C.V.
Ancho	168.5±1.1	0.6	204.1±5.3	2.6	33.5±1.2	3.5
Árbol	1243.6±60	4.82	1140.5±64	5.6	117.±0.9	0.8
Canica	1011.7±28.4	2.8	709.9±49.5	7	528.1±21.3	4
Cascabel	183.2±12.3	6.7	152±3.8	2.5	14.7±1	6.7
Chipotle	287.9±14.2	4.3	372.1±28.4	7.6	123.4±4.6	3.8
Guajillo	870.8±70	8	722.2±10.8	15	299.2±10.2	3.4
Habanero	6803.8±643	9.5	9332.3±766	8.2	1753.7±211	12.1
Jalapeño	629.4±15.1	2.4	175.4±45.3	25.9	306.3±37.7	12.3
Morrón	101.8±1.4	1.4	63.3±2.4	3.8	NC	NC
Pico de pájaro	943.5±62	6.5	1185.2±192	16.2	446.5±38	8.5
Piquín	1182.4±21	1.8	1154.6±86.2	7.5	503.4±56.3	11.2

NC. No Cuantificado

*(Media ± desviación estándar)

En la Figura 26 se muestran de manera gráfica los resultados de la extracción de capsaicina utilizando los tres diferentes métodos. Al igual que en la Tabla 18, se puede apreciar que la concentración extraída mediante las técnicas de Soxhlet y EAUS es muy similar, mientras que la concentración extraída por MEFS resulta menor, independientemente de la muestra analizada.

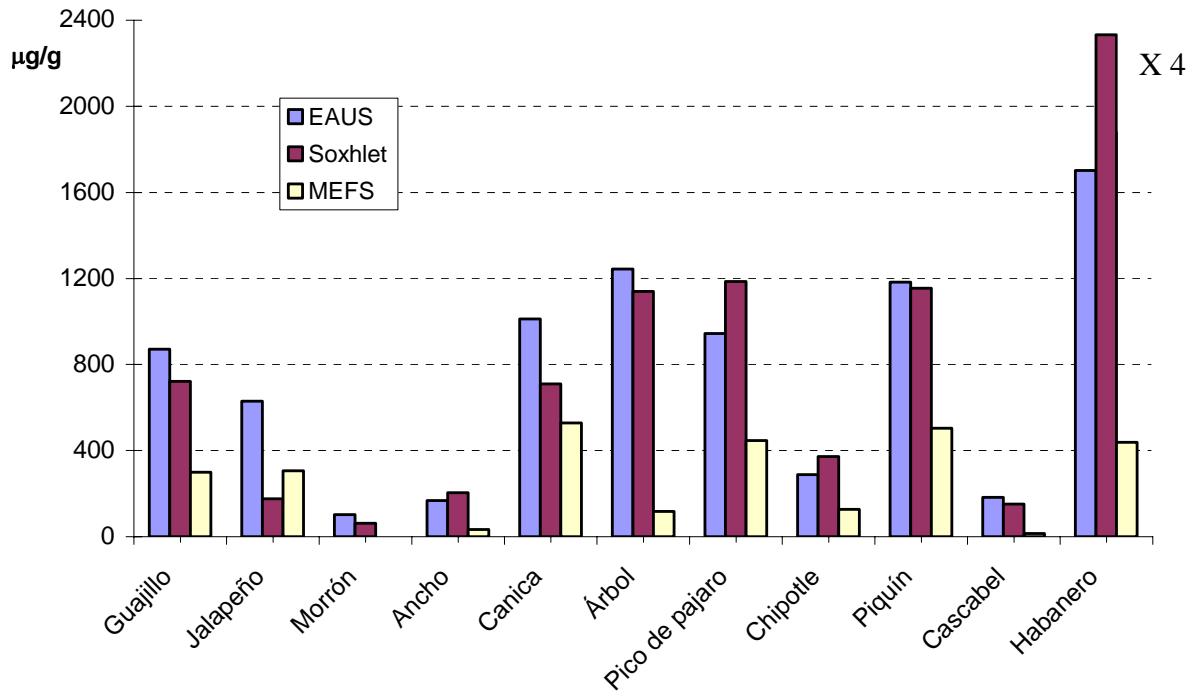


Figura 26. Histograma de la concentración de capsaicina extraída mediante los tres diferentes métodos de extracción.

Con el objetivo de conocer la eficiencia que tiene el método propuesto con respecto a los otros métodos aplicados para la extracción de capsaicinoides se realizó un análisis estadístico para compararlos. Para realizar la comparación entre los tres métodos se utilizó un análisis de variable multifactorial con bloques. Este tipo de análisis de variable permite hacer una comparación de varios factores que afectan una respuesta. En este caso los factores analizados son los tres diferentes métodos de extracción y la respuesta es la concentración de capsaicinoides extraídos. El análisis con bloques permite eliminar la variabilidad que se pudiera presentar por un factor ajeno al que se evalúa, en este caso, la diferencia de concentración entre las 11 variedades de Chile.

5.7.1.1 Análisis de varianza de la concentración extraída de capsaicina por los diferentes métodos

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos luego de realizar el análisis de varianza, mostrando los efectos principales, que son el método de extracción y los chiles analizados. En cuanto al método de extracción, se observa al menos entre uno de los métodos existe diferencia significativa con respecto a la concentración de capsaicina extraída. Por otra parte, el análisis también indica que existe diferencia significativa en la concentración de capsaicina presente en los chiles, lo cual resulta evidente y no es el objeto de estudio.

Tabla 19. Análisis de varianza para la concentración de capsaicina

<i>Variable</i>	Suma de cuadrados	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Efectos principales					
A: método de extracción	1.96244E7	2	9.81221E6	10.49	0.0001
B: chile	2.50719E8	10	2.50719E7	26.80	0.0000
RESIDUAL	8.04646E7	86	935635.		
TOTAL	3.50808E8	98			

F. Estadístico F
P. estadístico P

De acuerdo al análisis de varianza sabemos que existe al menos un método de extracción que difiere significativamente de otro.

El diagrama de puntos por nivel (Figura 27), muestra el rango de concentración de capsaicina obtenida por cada uno de los métodos de extracción. Es posible observar que en su mayoría la concentración obtenida por Microextracción en Fase Sólida se mantiene en un nivel bajo, incluso en las muestras con un alto contenido de capsaicina, mientras que el rango de concentración obtenida con extracción por Soxhlet y Ultrasonido, se encuentra en niveles más altos.

Cabe señalar que la concentración obtenida por Soxhlet es ligeramente superior a la obtenida por EAUS, pero no se puede establecer de manera definitiva

utilizando solamente el análisis de varianza que estas dos ultimas metodologías sean diferentes en cuanto a su eficiencia de extracción. Por otra parte el análisis de residuales indicó que hay homocedasticidad en los datos, es decir la varianza es constante y por lo tanto el uso del análisis de varianza es válido para establecer si existe diferencia entre los métodos. A su vez el análisis de residuales muestra que los errores obedecen a una distribución normal.

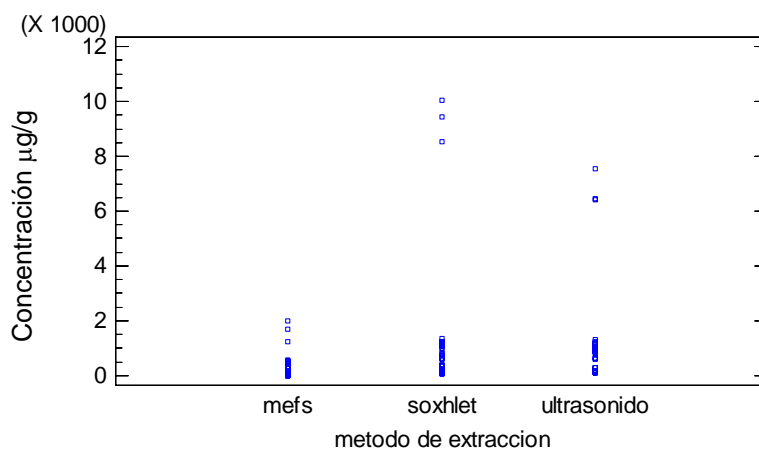


Figura 27. Diagrama de puntos por nivel para la extracción de capsaicina

5.7.1.2 Prueba de rango múltiple de los métodos de extracción de capsaicina

Con el objetivo de conocer cuales métodos difieren entre si, se realizó una prueba de rango múltiple para la concentración obtenida por cada método de extracción. En la Tabla 20 se muestran los resultados luego de realizar dicha prueba. Dentro de los resultados, la prueba indica dos diferentes grupos homogéneos, entendiendo como un grupo homogéneo aquel en el que sus miembros no presentan una diferencia significativa en cuanto a la concentración de capsaicina extraída. En el primer grupo se encuentra solamente la MEFS, esto quiere decir que esta técnica de extracción difiere significativamente de la extracción por Soxhlet y de la EAUS. En el segundo grupo se encuentran la extracción por Soxhlet y la EAUS, lo que indica que no existe una diferencia significativa entre la concentración de capsaicina obtenida por estos dos métodos.

Tabla 20. Prueba de rango múltiple para la concentración por método de extracción, 95.0 % mínima diferencia significativa

Método de extracción	N	Minima Diferencia Promedio	Minima Diferencia Sigma	Grupos homogéneos	
MEFS	33	367.8	168.3	X	
EAUS	33	1220.8	168.3		X
Soxhlet	33	1382.8	168.3		X

La Figura 28 presenta gráficamente los resultados obtenidos luego de la prueba múltiple, en esta se puede ver claramente que el promedio de concentración extraída por MEFS está por debajo de las otras dos metodologías y que su intervalo no se intercepta con los intervalos correspondientes a la extracción por Soxhlet y EAUS. En cuanto a las dos metodologías que no difieren estadísticamente es posible observar que el promedio de concentración extraída para Soxhlet es ligeramente mayor, pero no lo suficiente para considerarlo diferente a la EAUS. Lo anterior se puede explicar por las diferencias que existen en algunos chiles en los que la extracción por Soxhlet es más eficiente, mientras que en otras muestras la EAUS resultó más eficiente. Sin embargo, dentro de estas diferencias no se encontró tendencia alguna, por lo que es posible afirmar que de manera general no existe diferencia significativa entre la concentración de capsaicina extraída utilizando extracción por Soxhlet o EAUS.

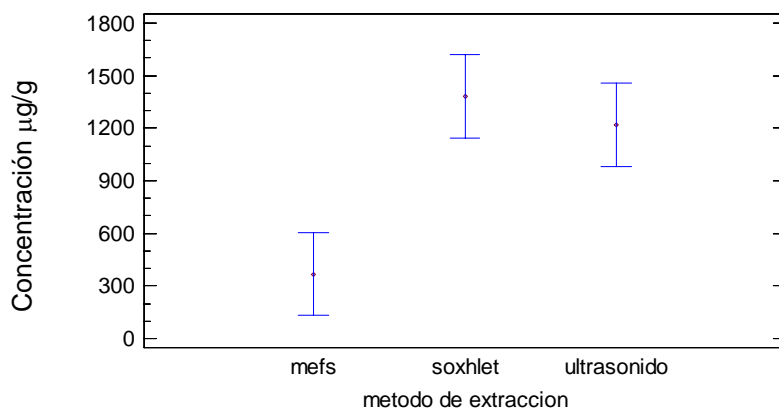


Figura 28. Promedio e intervalos de mínima diferencia significativa al 95%

Las pruebas estadísticas fueron aplicadas a la concentración extraída de capsaicina. Aún cuando en general se puede observar una tendencia similar en la concentración extraída de DHC con respecto a la capsaicina, es preferible realizar el mismo tratamiento estadístico a la extracción de DHC, ya que es posible que el comportamiento de extracción fuera diferente.

5.7.2 Comparación de la concentración extraída de DHC

En la Tabla 21 se muestra la concentración obtenida por cada uno de los métodos de extracción, Al igual que en el caso de la capsaicina, la concentración más baja se obtiene al utilizar MEFS.

Por otra parte, la concentración obtenida por Soxhlet y EAUS son muy similares, y no muestran una tendencia de acuerdo a la concentración extraída.

Tabla 21. Concentración extraída de DHC por los tres diferentes métodos de extracción (n = 3)

Chiles	EAUS µg/g	%C.V.	Soxhlet µg/g	%C.V.	MEFS µg/g	%C.V.
Ancho	178.2±1.7	1	142.2±4.3	3	30±0.2	6.6
Árbol	822.7±37.4	4.5	749.9±37.6	5	106.9±6.9	6.5
Canica	1210.9±40.7	3.4	816.2±70.1	8.6	551±7.7	1.4
Cascabel	152±10.7	7	104.3±1	0.9	NC	NC
Chipotle	247.8±6.5	2.6	372.1±28.4	7.6	25.6±3.8	14.7
Guajillo	639.9±59.4	9.3	551.5±69.5	12.6	99.2±10.5	10.6
Habanero	2736.1±242.7	8.9	4128.7±366	8.9	699.9±89.7	12.8
Jalapeño	435.2±10.3	2.4	141±41	29	117±9.2	7.8
Morrón	110±1.5	1.4	74.4±0.8	1.1	NC	NC
Pico de pájaro	688.2±20.1	2.9	856.8±87.4	10.2	240±21.1	8.8
Piquín	747.5±39.5	5.3	700.1±8.5	1.2	237.5±16	6.8

NC. No Cuantificado

La Figura 29 ilustra de forma gráfica la concentración extraída de DHC. En ocho de las once muestras, la concentración obtenida por EAUS es mayor en comparación con las otras dos metodologías. En las tres muestras restantes, es la

extracción por Soxhlet la que presenta una mayor eficiencia. Finalmente, la MEFS es la que presenta una menor concentración de DHC extraída. La MEFS extrae una menor concentración de ambos capsaicinoides debido muy probablemente al disolvente en el que se realiza la extracción. Los capsaicinoides son insolubles o muy poco solubles en agua, por lo tanto es difícil que se lleve a cabo la transferencia de los analitos desde la matriz hasta la fibra, por lo que es posible que una gran cantidad de los capsaicinoides queden retenidos en la parte de la matriz que permanece insoluble en la disolución.

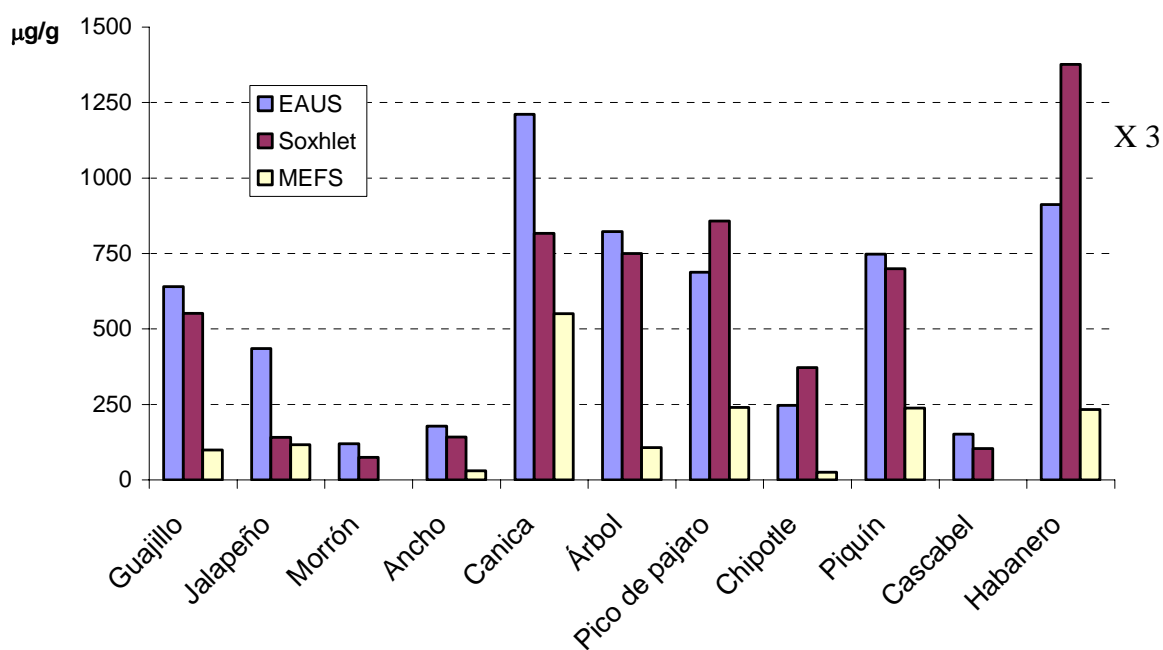


Figura 29. Histograma de la concentración de dihidrocapsaicina extraída mediante los tres diferentes métodos de extracción.

5.7.2.1 Análisis de varianza de la concentración extraída de DHC por los diferentes métodos

Al igual que para la capsaicina, se realizó el análisis de varianza, cuyos resultados se muestran en la Tabla 22. Estos resultados muestran que existe diferencia

significativa en al menos uno de los métodos de extracción, así como entre la concentración de DHC entre las diferentes variedades de chiles.

Tabla 22: Análisis de varianza para la concentración de DHC

<i>Variable</i>	Suma de cuadrados	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Efectos principales					
A: Método de Extracción	8.11869E6	2	4.05935E6	22.55	0.0000
B: Chiles	4.42496E7	10	4.42496E6	24.58	0.0000
RESIDUAL	1.44008E7	80	180010.		
TOTAL	6.40454E7	92			

F. Estadístico F

P. Estadístico P

En la Figura 30 se presenta el diagrama de puntos por nivel, el cual representa gráficamente los resultados del análisis de varianza. La concentración más alta de DHC se obtuvo utilizando la extracción por Soxhlet, seguidas por la obtenida con EAUS y finalmente la obtenida con MEFS. De igual manera que en el análisis de varianza utilizado para diferenciar los métodos de extracción de capsaicina, el análisis de residuales indicó que hay homocedasticidad en los datos, y distribución normal en los errores.

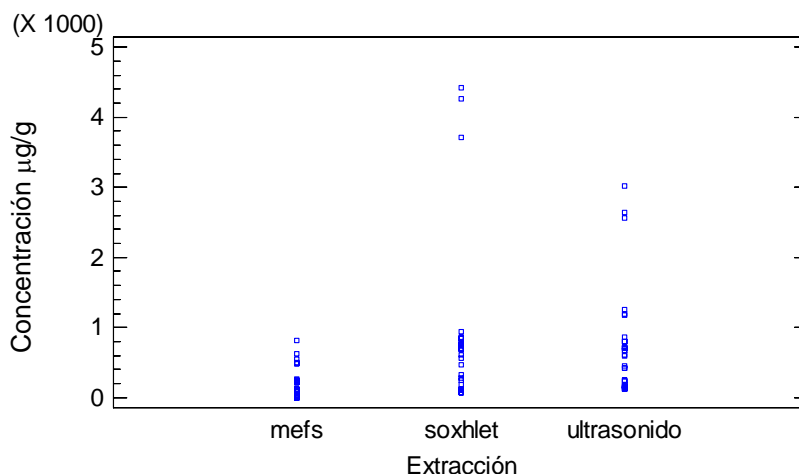


Figura 30. Diagrama de puntos por nivel para la extracción de dihidrocapsaicina

5.7.2.2 Prueba de rango múltiple de los métodos de extracción de DHC

Para establecer entre cuales métodos de extracción existe diferencia significativa, se realizó una prueba de rango múltiple. En la Tabla 23 se muestran los resultados, donde se observan dos grupos homogéneos. En el primer grupo solamente se encuentra la MEFS y en el segundo las extracciones por Soxhlet y EAUS que no presentan diferencia significativa.

Tabla 23. Prueba de rango múltiple para la concentración por método de extracción 95.0 % mínima diferencia significativa

Método de extracción	N	Mínima Diferencia Promedio	Mínima Diferencia sigma	Grupos homogéneos	
MEFS	27	78.0888	85.2826	X	
EAUS	33	725.319	73.8569		X
Soxhlet	33	771.174	73.8569		X

La representación gráfica de los resultados obtenidos luego de la prueba de rango múltiple se muestra en la Figura 31, en donde tanto el promedio como el intervalo de la MEFS, no se intercepta con los correspondientes a la extracción por Soxhlet

y EAUS, siendo estos dos últimos lo que no presentan diferencia significativa entre sí.

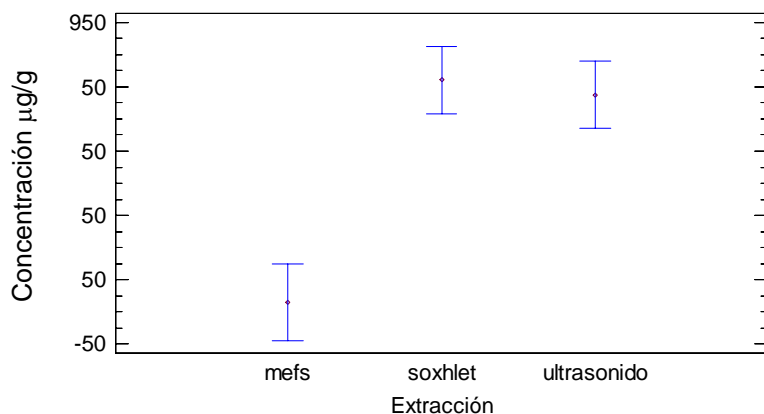


Figura 31. Promedio e intervalos de mínima diferencia significativa al 95%

Una vez realizado el análisis estadístico para ambos capsaicinoides, es posible afirmar que el método de EAUS no presenta diferencia significativa en comparación con el método de Soxhlet, que es la metodología oficial, lo cual representa una gran mejora en la preparación de muestra, ya que la técnica de EAUS presenta varias ventajas en cuanto a tiempo de extracción, que pasa de 5 horas de extracción que requiere el Soxhlet a 25 minutos que necesita la EAUS. Otra ventaja que presenta la extracción por Ultrasonido es que requiere una menor cantidad de muestra (0.25 g) en comparación con 0.5 g para Soxhlet. La simplicidad del montaje es también otra ventaja de la EAUS, ya que solamente se requiere una parrilla, un vaso de precipitados y el procesador ultrasónico. Finalmente, se puede señalar que al disminuir el tiempo disminuye también la cantidad de energía requerida para hacer la extracción. En la Tabla 24 se muestra un comparativo entre ambas metodologías.

Tabla 24. Comparación de la EAUS con extracción Soxhlet

Método	EAUS	Soxhlet	Observación
Tiempo de extracción	25 minutos	5 horas	En el tiempo que se realiza una sola extracción Soxhlet se pueden realizar 12 extracciones utilizando EAUS
Equipo necesario	Procesador ultrasónico Parrilla de calentamiento Vaso de precipitados	Extractor Soxhlet Refrigerante Matraz de Bola Parrilla de Calentamiento Reóstato Cartucho de celulosa Circulador de agua Mangueras	El equipo para la extracción Soxhlet es delicado y requiere montarlo, mientras que utilizando EAUS, solamente se introduce la punta del procesador ultrasónico en un vaso con la muestra
Costo del equipo	\$ 35, 000	\$ 5,000	El equipo de EAUS es más caro pero realiza más extracciones por tiempo en comparación con el Soxhlet
Consumo de energía	2.5 Amperes	12 Amperes	El consumo de energía del reóstato que utiliza el Soxhlet es mucho mayor que el utilizado por el procesador ultrasónico, lo que a la larga representa un mayor gasto de recursos.

6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló y optimizó una metodología de Extracción Asistida por Ultrasonido seguida de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas para la cuantificación de capsaicina y dihidrocapsaicina en chiles. El procedimiento reporta una buena linealidad en un intervalo de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ para ambos capsaicinoides, obteniendo en ambos casos coeficientes de correlación $r > 0.998$. La precisión fue buena para ambos analitos reportando coeficientes de variación menores al 5%.
- La metodología desarrollada para la extracción de capsaicinoides es simple, rápida y con pocos pasos para realizar la extracción, requiere una menor cantidad de muestra y menor tiempo de extracción en comparación con la metodología de extracción por Soxhlet. Por otra parte obtuvo rendimientos de extracción de capsaicinoides superiores a los obtenidos por Microextracción en Fase Sólida, ofreciendo a su vez una precisión muy similar.
- La metodología desarrollada puede aplicarse para el análisis de capsaicina y dihidrocapsaicina en chiles. Utilizando las condiciones óptimas es posible realizar el análisis sin ninguna interferencia de la matriz, durante la extracción, separación y cuantificación.
- La metodología de Extracción Asistida por Ultrasonido presentó un recobro cercano al 100% en chile morrón fortificado con ambos capsaicinoides.
- De los capsaicinoides analizados en la mayoría de las muestras, la capsaicina fue el capsaicinoide de mayor concentración superior al de la dihidrocapsaicina, a excepción del chile Canica y Chile Morrón, en los cuales la dihidrocapsaicina es el capsaicinoide de mayor concentración.

- El chile Habanero fue el chile con la mayor concentración de capsaicinoides totales, contrariamente el chile Morrón fue el chile con menor concentración de capsaicinoides totales.
- Al realizar la comparación de la metodología desarrollada con los métodos de Soxhlet y Microextracción en Fase Sólida, se observó que los métodos que presentan una mayor eficiencia en la extracción de capsaicinoides son el método de Extracción Asistida por Ultrasonido y el método de Soxhlet. Entre estos dos métodos no se encontró una diferencia significativa en la extracción a un nivel de confianza del 95%.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ASTM (1991) “Standar test method for sensory evaluation of oleoresin capsicum”. Annual book of ASTM Standars, pp. 72-75.
- Barbero, G. F., Liazid, A., Palma, M., Barroso, C. (2008) “Fast determination of capsaicinoids from peppers by high-performance liquid chromatography using a reversed phase monolithic column”. Food Chemistry, 107, 1276-1278.
- Boonkird S., Phisalaphong C., Phisalaphong S. (2008) “Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from *Capsicum frutescens* on a lab- and pilot-plant scale”. Ultrasonics Sonochemistry 15:1075–1079.
- Brett V., Thomas B., Schreiber A., y Weisskopf C. (1998) “Simple method for quantitation of capsaicinoids in peppers using capillary Gas Chromatography”. Journal of Agricultural and Food Chemistry” 46:2655-2663.
- Castillo, E., Torres, A., Severiano, P., Navarro, A., López, A., (2007) “Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues”. Food Chemistry, 100 1202–1208.
- Choi S., Suh B., Kozukue E., Kozukue N., Levin C., Friedman M.(2005) “Analysis of the contents of pungent compounds in fresh Korean red peppers and in pepper-containing foods”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:9024-9031.
- Conforti, F., Statti G., Menichini, F. (2007) “Chemical and biological variability of hot pepper fruits (*Capsicum annuum* var. *acuminatum* L.) in relation to maturity stage”. Food Chemistry, 102 1096–1104.

- Consejo Nacional de Productores de chiles (CONAPROCH), Análisis y diagnóstico de la situación actual del sistema producto, 2007 (www.conaproch.org/sp.htm).
- Deepa, N., Kaur, C., Sing, B., Kapoor, H. (2006) "Antioxidant activity in some red sweet pepper cultivars". *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 572–578.
- Diaz J., Pomar F., Bernal A., Merino F., (2004) "Peroxidases and the metabolism of capsaicin in *Capsicum Nahum L.*" *Phytochemistry Reviews*, 3:141-157.
- Estrada B., Bernal M., Diaz J., Pomar F., Merino F., (2002) "Capsaicinoids in vegetative organs of *Capsicum Nahum L.* In relation to fruiting". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1188-1191.
- Garces-Claver A., Arnedo-Andre M., Abadia J., Gil-Ortega R., Alvarez-Fernandez A. (2006) " Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruits by Liquid Chromatography-Electrospray/ Time of Flight Mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9303-9311.
- Goodwin, d., Hertwig, K. (2003) "Peroxidase-catalyzed oxidation of capsaicinoids: steady-state and transient-state kinetic studies". *Archives of Biochemistry and Biophysics*: 417 18–26.
- Gross, J.H. (2004) "Mass spectrometry: a textbook". Editorial Springer, New York.
- Horwitz W. (ed.), (2000) "AOAC Official Method 995.030 Capsaicinoids in *Cpasicum* and their extractives (Liquid Chromatographic Methods)". *Official Methods of Analysis of AOAC International*, pp. 14-16.
- Hundall, S., Dhall, R., (2004) "Breeding for hybrid hot pepper". *Journal of New Seeds*, Vol. 6 No 2/3, pp. 31-74.
- Karnka R., Rayanakorn M., Watanesk S. (2002) "Optimization of High performance Liquid Chromatographic Parameters for the determination of capsaicinoid compounds using the simplex method". *Analytical Sciences*, 18:661-665.

- Kozukue N., Han J., Kozukue E., Lee S., Kim J., Lee K., Levin C., Friedman M. (2005) "Analysis of eight capsaicinoids in peppers and pepper-containing foods by High performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:9172-9181.
- Krajewska A., Powers J. (1987) "Gas Chromatography of methyl derivatives of naturally occurring capsaicinoids". *Journal of Chromatography*, 409:223-233.
- Krajewska A., Powers J. (1988) "Pentafluorobenzoylation of capsaicinoids for Gas Chromatography with electron capture detection". *Journal of Chromatography*, 457: 279-286.
- Laskaridou-Monnerville A. (1999) "Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin by micellar electrokinetic capillary Chromatography and its application to various species of capsicum Solanaceae". *Journal of Chromatography A*, 838:293-302.
- López Riquelme, G., (2003) "Chilli, la especia del Nuevo Mundo". *Ciencias*, 69:66-75.
- Mc Nair H.M., Miller J.M., (1998) "Basic Gas Chromatography" Editorial John Wiley y Sons Inc., New York.
- Miller J. N., Miller J.C (2002) "Estadística y Quimiometría para Química Analítica" Prentice Hall 4^o edición Madrid.
- Nyberg N., Baumann H., Keene L., (2001) "Application of solid-phase extraction coupled to a NMR flow-probe in the analysis of HPLC fractions". *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39:236-240.
- Pawliszyn J. (1997) "Solid Phase Microextraction" Wiley-VCH Inc., New York.
- Peña-Alvarez A., Ramirez-Maya E., Alvarado-Suárez L. (2009) "Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry" *Journal of Chromatography A*, 1216, 2843–2847.

- Perkins B., Bushway R., Guthrie K. (2002) "Determination of capsaicinoids in salsa by Liquid Chromatography and Immunoassay". *Journal of AOAC International*, Vol. 85 No. 1 pp. 82-85.
- Perucka, I., Oleszeck, W. (2000) "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.
- Perva-Uzunali A., Skerget M., (2004) "Extraction of chili pepper (var. Byedige) with supercritical CO₂: effect of pressure and temperature on capsaicinoids and colour extraction efficiency". *Food Chemistry*, 87 pp. 51-58.
- Pomar, F., Bernal, M., Díaz, J., Merino, F., (1997) "Purification, Characterization and Kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase". *Phytochemistry*, 46 13133-1317.
- Poyrazoglu E., S., Yemis O. (2005) "Determination of capsaicinoid profile of different chili peppers grown in Turkey". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:1435-1438.
- Ramirez, M., E. (2007) "Determinación de Capsaicina y Dihidrocapsaicina en alimentos por Microextracción en Fase Sólida-Extracción Directa-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-ED-CG-EM)" Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Reinbach, H., Meinert, L., Ballabio, M., (2007) "Interactions between oral burn, meat flavor and texture in chili spiced pork patties evaluated by time-intensity". *Food Quality and Preference*, 18: 909–919.
- Rosa A., Deiana M., Casu V., (1999) "Antioxidant activity of Capsaicinoids", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*", 50:7386-7401.
- Rosa, A., Appendino, G., Melis, M., Deiana, M., Atzeri, A. (2009) "Protective effect and relation structure-activity of nonivamide and iododerivatives in several models of lipid oxidation". *Chemico-Biological Interactions*

- Schweiggert, U., Carle, R., Schieber, A. (2007) "Conventional and alternative processes for spice production - a review". Trends in Food Science & Technology, 18: 260-268.
- Skoog D.A., Holler F.J., Mieman T.A., (2001) "Principios de Análisis instrumental" Mc Graw Hill 5º edición Madrid.
- Spicer, O., Almirall, J. (2005) "Extraction of capsaicins in aerosol defense sprays from fabrics". Talanta, 67: 377–382.
- Suhaj, M., (2006) "Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review". Journal of Food Composition and Analysis, 19 531–537.
- Thompson R., Pennino M., Brenner M., Mehta M. (2006) "Isolation of individual capsaicinoids from a mixture and their characterization by C13 NMR spectrometry". Talanta, 70:315-322.
- Topuz, A., (2008) "A novel approach for color degradation kinetics of paprika as a function of water activity". Food Science and Technology, 41: 1672-1677.
- Topuz, A., Ozdemir, F. (2004) "Influences of gamma irradiation and storage on the capsaicinoids of sun-dried and dehydrated paprika". Food Chemistry, 86: 509–515.
- Vázquez, F., Miranda, M., González, M., Gutiérrez, G., Velásquez, C., Nieto, Y. (2007) "La biosíntesis de capsaicinoides, el principio picante del chile". Revista Fitotecnia Mexicana, vol 30 num. 4 pp. 353-360.
- Vengaiyah, P., Pnadey, J., (2007) "Dehydration kinetics of sweet pepper (*Capsicum annum* L.)". Journal of Food Engineering, 81: 282–286.
- Vinatoru M. (2001) "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs". Ultrasonics Sonochemistry 8: 303-313.